Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Actividad antioxidante y hepatoprotectora de *Hylocereus cf. monocanthus* (Lemaire) Britton & Rose sobre la hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en ratas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Janet Rocio ALFARO AYVAR

ASESOR

Dr. Luis Alberto INOSTROZA RUIZ

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Alfaro J. Actividad antioxidante y hepatoprotectora de H*ylocereus cf. monocanthus* (Lemaire) Britton & Rose sobre la hepatotoxicidad inducida por Tetracloruro de carbono en ratas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Janet Rocio Alfaro Ayvar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40566328
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5069-6905
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	18089817
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8038-0730
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	18089817
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Edgar Robert Tapia Manrique
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09440524
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Amadeo Collado Pacheco
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07535726

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.3. Recursos alimenticios
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado Calle: Jr. Puno № 1002 Latitud: -12.056200, Longitud: -77.023392
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2022 - diciembre 2022 Enero 2023 - junio 2023
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07 Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05 Patología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.09

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **12:00 hrs. del 14 de febrero de 2025** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dr. Luis Alberto Inostroza Ruiz (asesor), Dr. Edgar Robert Tapia Manrique y el Mg. Amadeo Collado Pacheco; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y HEPATOPROTECTORA DE *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose SOBRE LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO EN RATAS"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Janet Rocio Alfaro Ayvar.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECIOCHO (18) MUY BUENO

Luego el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Janet Rocio Alfaro Ayvar,** el Grado Académico de **Magíster en Toxicología.**

Siendo las 1:20 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 1:30 hrs. del 14 de febrero del 2025.

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E)
Presidente

Dr. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P.P. T.P.)
Miembro - Asesor

Dr. Edgar Robert Tapia Manrique (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Mg. Amadeo Collado Pacheco (P. Asoc. T.P.)
Miembro

Observaciones:

.....

.....

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1

Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Luis Alberto Inostroza Ruiz en mi condición de asesor acreditado con la Dictamen N°370-FFB-UPG-2019 de la tesis, cuyo título es: **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y HEPATOPROTECTORA DE *Hylocereus cf. monocanthus* (Lemaire) Britton & Rose SOBRE LA HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO EN RATAS**, presentado por la Bach. **Janet Rocio Alfaro Ayvar** para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Tesis, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documentoevaluado cuenta con el porcentaje de **17%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuarcon los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Asesor

DNI: 18089817

Dr. Luis Alberto Inostroza Ruiz



Escaneado con CamScanner

DEDICATORIA

A Dios que es la luz, guía, fuente de inspiración y fortaleza en mi vida, ayudándome en el logro exitoso de mis anhelos personales y profesionales.

A mis amados padres, **Hilda Ayvar Junco** y **Cesar Alfaro Salazar** por su profundo amor y cariño.

A mis hermanas **Carito**, **Lisset** y **Katherine** que me brindaron su cariño y motivación constante.

A mi maravillosa familia y en especial a mi menor hija **Janneth Violeta Tovar Alfaro**, principal fuente de motivación y orgullo en mi vida, por su continua comprensión que ha permitido el logro de mis objetivos personales y académicos en mi vida.

A mis muy queridos tíos **Félix** y **Elena** por su constante motivación, amor incondicional y confianza plena en mi durante todos estos años.

A mi incondicional amiga **Sharo**, que estuvo acompañándome siempre en los momentos más importantes de mi vida, brindándome un cariño sincero e incondicional y en general a todas aquellas personas que me acompañaron durante todo este proceso.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor y guía durante todo el proceso de ejecución del presente trabajo de investigación, el **Dr. Luis Alberto Inostroza Ruíz**, brindándome todo su apoyo y asesoría gracias a su amplio acervo de conocimientos y experiencia académica que posee como docente en esta prestigiosa universidad.

Al **Dr. Américo Jorge Castro Luna**, un brillante y reconocido investigador que me brindó su apoyo para ejecutar la parte experimental del presente trabajo académico en las instalaciones del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.

A quien en vida fue **Dr. José Ernesto Ráez Gonzales** jefe del Área de Histopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor San Marcos, por sus valiosos aportes en el estudio histopatológico.

ÍNDICE

Carátula…… i
Dedicatoria……... ii
Agradecimiento…… iii
Índice…… iv
Resumen……..... vi
Abstract…… vii
Índice de tablas…… viii
Índice de figuras……..... ix
CAPÍTULO I.
INTRODUCCIÓN……... 1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO……... 3
2.1 Antecedentes…….. 3
2.2.1 *Hylocereus monacantus*…… 7
2.2.1.1 Componentes bioactivos de la pulpa del fruto de *Hylocereus monacantus* 9
2.2.1.2 Capacidad antioxidante ……... 10
2.2.2 Hepatotoxicidad……..... 13
2.2.2.1 Consideraciones …….. 13
2.2.2.2 Componentes celulares y organización hepática……..... 15
2.3.2.3 Mecanismos de hepatotoxicidad inducida químicamente……... 20
2.2.3 Compuestos que causan daño hepático……... 27
2.3.4 Tetracloruro de carbono……..... 27
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA……..... 33
3.1 Tipo de investigación …… 33
3.2 Recolección e identificación del material vegetal …… 33
3.3 Obtención del extracto ……..... 34
3.4 Estudio fitoquímico ……..... 34
3.5 Evaluación de la actividad antioxidante ……... 34
3.6 Evaluación del efecto hepatoprotector ……..... 36
3.7 Análisis estadístico ……... 37
CAPÍTULO IV. RESULTADOS…… 38
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN……..... 54
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES…… 62
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 63
CAPÍTULO VIII. ANEXOS…… 73
8.1 Anexo 1. Posición taxonómica de *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose……..…… 73
8.2 Anexo 2. Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina total…… 74
8.3 Anexo 3. Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina directa…….. 76
8.4 Anexo 4. Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina indirecta……... 78
8.5 Anexo 5. Pruebas estadísticas de ANOVA para proteínas totales……. 80

8.6 Anexo 6. Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de albúmina……. 82
8.7 Anexo 7. Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de globulinas…… 84
8.8 Anexo 8. Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de fosfatasa alcalina……. 86
8.9 Anexo 9. Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de transaminasa glutámico oxalacética……... 88
8.10 Anexo 10. Recolección de la muestra de *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) en Paiján- Provincia de Ascope, Región La Libertad…….. 90
8.11 Anexo 11. Muestra de *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) en el distrito de Paiján, provincia de Ascope, región La Libertad…… 91
8.12 Anexo 12. Preparación del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm)…… 92
8.13 Anexo 13. Preparación de las diluciones del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) para medir la actividad antioxidante 93
8.14 Anexo 14. Clasificación de las ratas albinas según el tipo de tratamiento experimental…… 94
8.15 Anexo 15. Rotulado de los contendores del tejido hepático de ratas albinas sometidas a diversos tratamientos experimentales…… 94
8.16 Anexo 16. Extracción del hígado de una rata albina sometidas a un tipo de tratamiento experimental…… 95
8.17 Anexo 17. Muestra de hígado de rata albina sometidas a un tipo de tratamiento experimental…….. 96
8.18 Anexo 18. Preparación del contendor del tejido hepático de ratas albinas para análisis histopatológico…… 96
8.19 Anexo 19. Centrifugación la sangre de las ratas albinas sometidas a los diversos tratamientos para la determinación de los análisis bioquímicos…… 97

RESUMEN

El fruto del *Hylocereus monocanthus* es una fuente prometedora de antioxidantes naturales y es considerado un alimento funcional y nutraceútico. El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad hepatoprotectora del extracto etanólico del *Hylocereus cf. monacanthus* (EEtHm) en ratas albinas con toxicidad aguda inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4). Mediante análisis fitoquímico se demostró que el fruto de *Hylocereus cf. monacanthus* contenía fenoles, flavonoides y otros metabolitos secundarios; la actividad antioxidante se determinó por los métodos $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$, la actividad hepatoprotectora se evaluó a través ensayos bioquímicos de albumina (ALB), bilirrubina directa (BD), bilirrubina indirecta (BI), bilirrubina total (BT), fosfatasa alcalina (FAL), globulinas (GLOB), proteínas totales (PT) y transaminasa glutámica oxalacética (TGO) en suero y un estudio histopatológico. Los resultados del EEtHm evidencian una moderada actividad antioxidante equivalente al Trolox de 62,978 y 34,729 mg Trolox/g de EEtHm para los ensayos del $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$, respectivamente. El tratamiento con EEtHm en ratas albinas con hepatotoxicidad inducida por CCl_4 mantuvo disminuidos los valores de la actividad enzimática del FAL, TGO, BT, BD, BI; sin embargo, se evidenció un incrementó de los valores de las PT y no sufrieron cambios significativos los valores de ALB y GLOB, protegiéndolo de una modificación histopatológica del agente hepatotóxico. Se concluye que el extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus*, presenta efecto hepatoprotector sobre lesiones de origen toxico metabólico provocadas por CCl_4 en ratas albinas y también por la actividad antioxidante que presenta.

Palabras clave: actividad antioxidante; *Hylocereus cf. monacanthus*; hepatoprotector; tetracloruro de carbono; toxicidad; ratas albinas.

ABSTRACT

The fruit of *Hylocereus cf. monocanthus* is a promising source of natural antioxidants and is considered a functional and nutraceutical food. The objective of the present study was to determine the hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) in albino rats with acute carbon tetrachloride (CCl_4)-induced toxicity. Phytochemical analysis showed that the fruit of *Hylocereus monacanthus* contained phenols, flavonoids and other secondary metabolites; antioxidant activity was determined by $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$ methods, hepatoprotective activity was assessed by biochemical assays of albumin (ALB), direct bilirubin (BD), indirect bilirubin (BI), total bilirubin (BT), alkaline phosphatase (ALP), globulins (GLOB), total protein (TP) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) in serum and a histopathological study. The results of EEtHm evidenced a moderate Trolox equivalent antioxidant activity of 62.978 and 34.729 mg trolox/g EEtHm, for the $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$ assays, respectively. Treatment with EEtHm in albino rats with CCl_4-induced hepatotoxicity maintained decreased values of FAL, TGO, BT, BD, BI; however, there was an increase in the PT values and no significant changes in the ALB and GLOB values, protecting it from histopathological modification of the hepatotoxic agent. It is concluded that the ethanolic extract of *Hylocereus cf. monacanthus* has a hepatoprotective effect on lesions of metabolic toxic origin caused by CCl4 in albino rats and also due to its antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity; *Hylocereus monacanthus*; hepatoprotective; carbon tetrachloride; toxicity; albino rats.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas, químicas, compuestos bioactivos, macronutrientes y propiedad funcional de la pulpa del fruto de *Hylocereus monocanthus* 12

Tabla 2. Metabolitos secundarios en el extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) 38

Tabla 3. Actividad antioxidante del EEtHm por el método de DPPH• 39

Tabla 4. Resultados de la actividad antioxidante del estándar Trolox por el método del radical DPPH• 40

Tabla 5. Actividad antioxidante del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) por el método de $ABTS^{\bullet+}$ 41

Tabla 6. Actividad antioxidante del estándar Trolox por el método $ABTS^{\bullet+}$ 41

Tabla 7. Valores de la bilirrubina total (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCL_4 y silimarina 43

Tabla 8. Valores de la bilirrubina directa (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con con EEtHm, CCl_4 y silimarina 44

Tabla 9. Valores de bilirrubina indirecta (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 45

Tabla 10. Valores de las proteínas totales (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 46

Tabla 11. Valores de la albumina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 47

Tabla 12. Valores de la globulina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 48

Tabla 13. Valores de la e fosfatasa alcalina (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 49

Tabla 14. Valores de la transaminasa glutámico oxalacética (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 50

Tabla 15. Reporte del efecto del extracto etanólico del *Hylocereus monocanthus* sobre los valores de la BT, BD, BI, PT, ALB, GLO, FAL, TGO, utilizando el modelo experimental del CCl_4 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de *Hylocereus cf. monocanthus (Lemaire) Britton & Rose* 8

Figura 2. Comparación del lóbulo hepático estructural con regiones acinares funcionales 16

Figura 3. Ciclo de triglicéridos en la patogénesis del hígado graso 23

Figura 4. La activación metabólica del tetracloruro de carbono al radical triclorometilo mediada por enzimas del citocromo P450 (CYP450) 29

Figura 5. Química de la peroxidación lipídica. Destrucción peroxidativa de un lípido poliinsaturado iniciada por un ataque de radicales libres como el radical triclorometilo ($CCl_3^{\bullet}$) 31

Figura 6. Metabolismo del tetracloruro de carbono. 32

Figura 7. Dispersión entre las concentraciones del extracto etanólico de versus el % de inhibición del radical $DPPH^{\bullet}$ 40

Figura 8. Dispersión entre las concentraciones de la solución standar de Trolox versus el % de inhibición del radical $DPPH^{\bullet}$ 40

Figura 9. Dispersión entre las concentraciones de la solución patrón de Trolox versus el % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$ 42

Figura 10. Dispersión entre las concentraciones del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) versus el % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$ 42

Figura 11. Representación gráfica de los valores de la bilirrubina total (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 43

Figura 12. Valores de la bilirrubina directa (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 44

Figura 13. Valores de la bilirrubina indirecta (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 45

Figura 14. Valores de las proteínas totales (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 46

Figura 15. Valores de la albumina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 47

Figura 16. Valores de la globulina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 48

Figura 17. Valores de la fosfatasa alcalina (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 49

Figura 18. Valores de la transaminasa glutámico oxalacética (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina 50

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha demostrado la eficiencia terapéutica del alto consumo de frutas y verduras; y una menor incidencia de enfermedades degenerativas, entre ellas la pitahaya *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose. Esta fruta ha ganado popularidad en Europa y Estados Unidos por su apariencia exótica e impresionante. Además, el fruto se conoce por su riqueza en nutrientes y por sus beneficios para la salud, por lo que se ha considerado un potencial alimento nutraceútico[6]; por lo que generan el reto de continuar en la búsqueda del fármaco hepatoprotector eficaz, a razón de que el problema hepático es considerado uno de los problemas más serios a nivel mundial[1].

La enfermedad hepática es un serio problema de salud a nivel mundial[1]. El hígado es un órgano vital que realiza una amplia variedad de funciones necesarias para la supervivencia del ser humano y en la desintoxicación de agentes tóxicas, siendo un órgano susceptible a su deterioro o lesión, generándose una hepatotoxicidad que puede ser inducida químicamente por contaminantes ambientales, xenobióticos presentes en el entorno laboral, fármacos administrados o por el consumo involuntario de alimentos con elevados valores residuales de sustancias tóxicas[2,3].

En la mayoría de los casos de enfermedades hepáticas, no existe un tratamiento eficaz para la toxicidad hepática inducida por xenobióticos. Por lo que diversos autores han propuesto distintos productos como posibles hepatoprotectores (ajo, silimarina, n-acetilcisteína) contra esos agentes tóxicos, debido a su actividad antioxidante ya que no interfieren con las acciones terapéuticas de los fármacos[4,5].

El CCl_4 es uno de los hepatotóxicos más estudiados desde un punto de vista bioquímico y patológico, muy empleado en ensayos preclínicos con animales experimentación como las ratas por caracterizar la lesión hepática aguda mediada por los radicales libres inducidas químicamente por xenobióticos y dando como resultado un incremento de su fibrosis, necrosis y esteatosis, evidenciando características patológicas muy semejantes a la hepatitis crónica y cirrosis en humanos[6].

Por lo cual el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" (EEtHm) sobre la toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas; como un potente activo con acción antioxidante y hepatoprotectora.

El presente estudió, tuvo los siguientes objetivos:

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" (EEtHm) sobre la toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas.

1.2 Objetivos específicos

1) Determinar preliminarmente los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" mediante ensayos de coloración y precipitación.
2) Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* por el método del radical 2,2-difenilpicrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$).
3) Determinar la actividad antioxidante del *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" por el método del radical catiónico ácido 2,2'-acino-bis-(3-etiltiazolina- bencenosulfónico-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$).
4) Evaluar la actividad hepatoprotectora del *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" sobre la toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas en función al perfil hepático y estudio histológico del hígado.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Mohammed et al.[1] en su trabajo de investigación "Efecto hepatoprotector del extracto metanólico del fruto de *Hylocereus polyrhizus* contra la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono en ratas", emplearon ratas albinas como modelo de experimentación animal y los resultados evidenciaron lesiones hepáticas graves por un incremento de los valores de la ALT, PT, AST o TGO, BI, CT y posterior a la administración del extracto metanólico de los frutos del *Hylocereus polyrhizus* a una dosis de 300 mg/kg del peso corporal, se normalizó significante los marcadores bioquímicos elevados, evidenciando un notable efecto hepatoprotector atribuido a la presencia de compuestos fenólicos y tocoferoles totales presentes en el extracto de la semilla, aproximadamente 86,1 g de polifenol total en 0,5 g del fruto seco y un notable efecto antioxidante al reducir el stress oxidativo y captar los radicales libres, siendo necesario mencionar que los resultados de la prueba de toxicidad aguda del extracto dieron negativo, demostrando su inocuidad y la seguridad de su empleo para futuros estudios.

Prutha et al.[7] en su investigación "Estudio de la actividad antioxidante y hepatoprotectora del fruto del *Hylocereus undatus* en ratas experimentales" evidenciaron que el extracto hidroalcohólico de su fruto a dosis experimentales (250 y 500 mg/kg) posee una actividad antioxidante y hepatoprotectora frente a una lesión hepática inducida por los agentes hepatotóxicos como el acetaminofén y etanol a dosis de 2 g/kg y 2 mL/100 g, respectivamente. Un estudio fitoquímico de su extracto reveló la abundante presencia de saponinas, flavonoides y polifenoles, metabolitos con actividad antioxidantes que protegen al organismo de los radicales libres producidos, desacelerando o inhibiendo el daño oxidativo y la peroxidación lipídica responsables de la inflamación, fibrosis y necrosis en los hepatocitos. Dependiendo de la dosis del agente hepatoprotector, se percibió una disminución de los niveles bioquímicos de la TGO, FA, BT, BD y de la lesión hepática, en comparación con el grupo control del tóxico, siendo necesario mayores estudios de aislamiento y caracterización de los principios activos para conocer los mecanismos responsables de la actividad hepatoprotectora.

Cauilan[8] en su estudio "Potencial hepatoprotector del *Hylocereus polyrhizus* (fruta del dragón) en el daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono en ratas albinas Wistar" aplicó el método de maceración de 100 g de muestra en 200 mL de solvente de etanol al 95 % durante dos o tres días para producir el extracto etanólico de la pulpa y la cáscara de la fruta y los datos recopilados posterior al tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de saponinas, flavonoides y triterpenos que poseen actividad antioxidante y brindan una protección al hígado frente una peroxidación lipídica, la administración oral del extracto a una dosis experimental de 2500 mg/kg de peso durante siete días consecutivos evidencio un efecto hepatoprotector contra el daño hepático inducido por el CCl_4 a una dosis de 0,5 mg/kg de peso y siendo corroborado por los resultados del análisis bioquímico realizados en la sangre de los animales de experimentación, que muestran una disminución de los valores de las enzimas de TGO en un 20,13 % y el SGOT en un 55,27 %, respectivamente.

Rajesh et al.[9] realizó el estudio de la "Evaluación preliminar de la actividad antihepatotóxica de una formulación poliherbal de Kamilari", empleando un modelo experimental en ratas que simula a una cirrosis hepática generado en el ser humano por inducción del tetracloruro de carbono, sugiriendo los resultados de la investigación que la administración oral de Kamilari a una dosis experimental de 750 mg/kg de peso generaba un efecto hepatoprotector, disminuyendo significativa del valor de algunos parámetros bioquímicos alterados en el suero de las ratas como el GTP (glutamato piruvato transaminasa), FAL, BI, ALT y reduciendo la hiperbillirubinemia, una prueba muy sensible que evidencia la gravedad de la necrosis hepática, siendo estabilizado la disfunción biliar al regenerarse el parénquima hepático lesionado por la toxicidad crónica del agente hepatotóxico; así mismo informes previos mencionaron la formación del hígado graso por un incremento CT y TG (triglicéridos) por una disminución o inhibición de los mecanismos de oxidación y secreción, ocasionando su acumulo y exacerbando la necrosis centrolobulillar del hepatocito.

Tenore et al.[10] en su investigación "Potencial nutraceútico y beneficios antioxidantes del extracto de la pitahaya roja (*Hylocereus polyrhizus*)" atribuyeron sus capacidades antioxidantes al elevado contenido de compuestos polifenólicos, flavonoides y

betacianinas presentes en el extracto de la cáscara y la pulpa de la fruta, confirmando su presencia mediante técnicas espectrofotométricas como el método del FRAP (actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante) a 593 nm y el ensayo de la captación de radicales $DPPH^{\bullet}$ a 515 nm, revelando los resultados que la reducción de su absorbancia es un indicativo de la capacidad reductora de las muestras, expresándose como equivalentes al Trolox. El estudio recomendaba el subfraccionamiento de los extractos debido a la complejidad de la extracción, empleando el método de partición de solventes, proporcionando resultados más fiables al agrupar en una sola fracción los compuestos fitoquímicos de interés para su plena identificación, permitiendo una cuantificación más precisa al minimizar un potencial riesgo de interferencias entre ellos.

Abd Manan et al.[11] realizaron la investigación "Characterization of Antioxidant Activities in Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Pulp Water-based Extract" evidenciando una correlación positiva entre el incremento de su sabor dulce y la capacidad antioxidante del extracto acuoso de la pulpa de la fruta, inhibiendo el elevado contenido de compuestos fenólicos y flavonoides los efectos deletéreos de los radicales libres, siendo determinados por los ensayos de $DPPH^{\bullet}$ a 515 nm y $ABTS^{\bullet+}$ a 734 nm con los siguientes resultados 73,38 ± 2,24 % y 92,66 ± 0,22 %, respectivamente y la elección del empleo del agua como disolvente, se atribuye a sus propiedades atoxicas y biodegradables, con una óptima capacidad de extracción del compuesto bioactivo que permite proyectar el empleo del extracto acuoso por las industrias farmacéuticas y nutracéuticas.

Berger[12] en su estudio "Carbon Tethracloride-Induced morphologic Alterations in Isolated rat hepatocytes" evidenció alteraciones en la permeabilidad de la membrana del retículo endoplasmático, mitocondrias, núcleo y de la membrana plasmática, incrementándose el flujo interno de la enzima GOT posterior a la exposición de 2 mL de hepatocitos aislados a 15 µL de vapores de CCl_4. La intensidad de la lesión inducida es proporcional a la concentración y tiempo del contacto con el solvente, a los 5 min la membrana plasmática presenta una pérdida de sus microvellosidades y la formación de ampollas superficiales, presumiblemente por una alteración en la homeostasis del calcio o por falta de oxígeno celular, a los 15 min surge una inflamación, dilatación,

desgranulación y fraccionamiento de la membrana vesicular del retículo endoplasmático rugoso, desorganizando su contenido y a los 20 min la formación de vacuolas, aglutinación de la cromatina nuclear y desorganización de las crestas de los mitocondrias; pero al disminuir el volumen del solvente a 1 µL, se restauró la morfología de los hepatocitos que no sufrieron daños irreversibles.

Esquivel et al.[13] en el estudio de las "Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria" demostraron la abundante presencia de betacianinas (betanina, isobetanina, filocactina, isofilocactina, hilocerenina e isohilocerenina), pigmentos solubles en agua de color rojo – violeta con concentraciones que van desde 18, 477 a 717 mg/mL, dependiendo de su genotipo da origen a una amplia gama de tonalidades con un elevado poder tintoreo permitiendo su empleo en la industria alimentaria y convirtiéndose en una fuente prometedora de colorantes alimentarios; asimismo revelo un elevada presencia de fenoles totales y flavonoides en la cascara y pulpa de los frutos, existencia correlación directa entre su contenido y la capacidad antioxidante, eliminado radicales libres y una capacidad antiproliferativa eliminando cepas de células cancerígenas. Pudiendo ser comercializado como fruta fresca y como producto industrializado, con las consideraciones a tener durante su procesamiento para garantizar la estabilidad de los pigmentos, dependiendo de varios factores como la temperatura, concentración de nitrógeno, humedad, luz y entre otros[13].

Verona-Ruiz et al.[14] en su investigación "Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos" recopilaron información de los compuestos bioactivos contenidos en el fruto de la pitahaya conocido como "Fruta del Dragón", evidenciando la presencia de vitaminas, glucosa, ácidos grasos, fibras solubles, fitoalbúmina, minerales y betacianinas, ampliamente conocidos por sus propiedades nutraceúticas en beneficio de la salud como la prevención del cáncer, diabetes, control de la hipertensión arterial y prevención de trastornos digestivos, presentando el fruto una actividad antioxidante de 160, 84 mg de Trolox/100 mL de jugo superior a otras cactáceas, regulando el estrés oxidativo e inhibiendo la oxidación y peroxidación lipídica, la presencia de polifenoles, flavonoides y vitamina C (*Hylocereus undatus*) regularizaron los

trastornos metabólicas relacionados con la obesidad y el reporte de elevadas concentraciones ácido fenólico, antocianinas y flavonoides presentes en el polvo de pitahaya y extracto del fruto fresco, ratificaron su potente actividad antioxidante y un incremento de su consumo por la población al retardar el envejecimiento prematuro.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Hylocereus monocantus*

La pitahaya (*Hylocereus sp*) comúnmente conocida como "Fruta del Dragón", es una fruta exótica originaria de los bosques tropicales y subtropicales del oeste de México, América Central y del Sur, las Indias occidentales, soportando temperaturas de hasta 40 °C y extendiéndose su cultivo hasta Malasia, Tailandia, Vietnam, Australia, Taiwán y algunas otras partes del mundo, siendo las especies más comercializadas el *Hylocereus undatus, Hylocereus megalanthu* y el *Hylocereus monocanthus*, inicialmente conocido como *Hylocereus polyrhizus*, con un fruto impresionante de atractivos y vibrantes colores provenientes de los pigmentos de las betacianinas, betalaínas y antocianinas, siendo notablemente la forma más decorativa la elipsoidal (referente a una baya), posee una piel (mesocarpio) de color rojo purpura brillante incrustada de escamas o bractéolos de color verde, que son como orejas o brácteas y una pulpa (endocarpio) jugosa, carnosa y comestible de color rojo brillante, impregnada de numerosas semillas negras, pequeñas, blandas, comestibles y distribuidas uniformemente en toda la pulpa , su fruto escarlata mide de 10 a 12 cm de diámetro y pesa 350 a 450 g, recibiendo diversos nombres según el país que los produce, destacando la pitahaya o fruta de dragón (Perú), Fresa Pera, Bella de nuit (Francia), Dragon fruit, Belle of the night, flor de cáliz (Venezuela, Puerto Rico), por su parecido a un dragón los lugareños lo (países anglohablantes), Distelbrin (Alemania) denominan "Buah Naga" o "Buah Mata Naga" y "Dragon Rojo" (Malasia, Vietnam), entre otros[11,15].

La pitahaya roja es un fruto con características estéticas que atraen con éxito la atención del mundo, agregando su valor comercial y elevando su potencial de explotación económica las propiedades organolépticas y nutricionales que presenta, incrementándose el consumo de su pulpa y la piel del fruto por la actividad antioxidante que presenta los compuestos bioactivos los compuestos fenólicos, carotenoides y nutrientes como azúcares, fibra soluble dietética, pectina, minerales,

vitamina C, proteína carbohidrato, flavonoide, tiamina, niacina, piridoxina, cobalamina, hierro, fitoalbúmina y ácidos grasos esenciales como ácido linoleico y linoleico presentes en las semillas y pigmentos como las betacianinas, betalaínas y antocianinas, siendo extraídos para su estudio mediante un sistema de solventes como etanol, metanol, acetona, hexano y agua, evidenciando su elevada concentración en los extractos, incluso en el acuoso pese a la naturaleza polar de los antioxidantes[14,15,16].

El consumo del fruto tiene una influencia relevante en la promoción de la salud, demostrado sus excelentes propiedades hipoglucemiante, cicatrizante y antiproliferativa, antioxidantes y hepatoprotectora, confiriendo protección contra enfermedades crónicas como los trastornos cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, exhibiendo los nutrientes y los compuestos bioactivos propiedades antioxidantes, al incrementar la captación de radicales libres, inhibir o disminuir la secreción de especies reactivas de oxígeno (ERO) causadas por el estrés oxidativo, una potente actividad hepatoprotectora, disminuyendo la formación del colesterol total y de los triglicéridos generada como resultados de la peroxidación lipídica inducida por los fármacos o agentes hepatotóxicos y los pigmentos empleados como colorante natural, proporcionando los estudios datos confirmatorios útiles para el desarrollo de nuevos fármacos y datos de referencia para el desarrollo de productos que puedan emplearse en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria[8,15,16].



Figura 1. Frutos de *Hylocereus cf. monocanthus (Lemaire) Britton & Rose*

2.2.1.1. Componentes bioactivos de la pulpa del fruto de *Hylocereus monocathus*

A. Betalaínas

En años recientes se generó una tendencia global que incrementa el consumo de los colorantes sintéticos de origen natural por su naturaleza atoxica y potente capacidad colorante, reemplazando a los colorantes sintéticos, aunque ello involucre un mayor costo, percibiéndose un incremento de su consumo por genera beneficios que mejoran de la salud de la población, revelando estudios realizados a una temperatura de 35 °C, 8 min de proceso de extracción y una muestra de 20 g de pitahaya, una concentración de 9 mg/L de contenido del pigmento de betalaína en la pitahaya, un potente antioxidante que posee una elevada capacidad de inhibir la oxidación y la peroxidación lipídica, tratando con éxito todos los trastornos relacionados al deterioro de la salud causados por el estrés oxidativo y siendo etiquetado el pigmento por la Comunidad Europea como E-162 (aditivo alimentario) que evita la decoloración[14].

B. Betacianina

El fruto del *Hylocereus monocanthus* es una fuente natural del pigmento de la betacianina,que posee una elevada actividad antioxidante con capacidad para eliminar los radicales libres, investigaciones en modelos experimentales de ratones, mencionan propiedades beneficiosas para el tratamiento de la obesidad, regulando metabolismo permitiendo y disminuyendo significativamente el incremento de su peso y mejorar del perfil lipídico, así mismo muestra su efecto anti hiperglucémicos disminuyendo la resistencia a la insulina (diabetes tipo II) en ratas y evitando una hepatotosteatosis (hígado graso), actualmente la pitaya roja es empleada como colorante natural en la industria alimentaria por su elevada capacidad de tinción, requiriendo una pequeña cantidad para obtener un efecto colorante óptimo y presentando una estabilidad térmica superior o semejante al rojo de remolacha, evidenciando el resultados del análisis sensorial de la leche teñido ambos pigmentos, presentado la betacianina un mejor nivel de aceptación del color y retraso de la actividad antimicrobiana[14].

C. Compuestos fenólicos

El *Hylocereus sp* es considerada una buena fuente de polifenoles que pueda integrarse en la dieta humana, su elevado contenido pudiendo variar desde moléculas simples como los ácidos fenólicos (el gálico) a los complejos como los taninos, flavonoides y

antocianinas y las variaciones de su composición química dependen del género del fruto y los factores medioambientales de donde proceden, son responsables de brindar el color natural y sabor a los frutos, como las antocianinas responsable de los colores rosa, escarlata, rojo, aunque son muy inestables durante el procesado, almacenamiento, congelación, llegando a perder su color y los flavonoides carecen de color, al menos que presenten muy elevadas concentraciones, pero pueden convertirse en compuestos coloreados bajo determinadas condiciones de manipulación, procesado, los compuestos fenólicos poseen una potente actividad antioxidante, incrementando la resistencia frente daño oxidativo provocado por los radicales libres, siendo considerada una actividad biológica responsable del efecto preventivo de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer[17].

Para que un compuesto fenólico sea considerado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas, la primera es de encontrarse en una concentración baja con relación al sustrato a ser oxidado, para retrasar, enlentecer o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre y la segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores, entre los compuestos fenólicos con una reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente hidroxicinámico, hidroxibenzóico, caféico, clorogénico), taninos (elligataninos), calconas y cumarinas, presentes en una gran diversidad de alimentos[14,17].

2.2.1.2 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas inhibiendo la propagación de la reacción de oxidación, el ensayo para medir la Actividad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC, por sus iniciales en inglés), constituyendo uno de los métodos más referenciados en la bibliografía científica que permite medir la concentración de una solución de Trolox con un potencial antioxidante equivalente a una concentración 1mM del compuesto fenólico a estudiar, reflejando su habilidad para donar un hidrógeno que pueda ser secuestrada por el catión $ABTS^{\bullet+}$ (oxidante), determinando el contenido de compuestos fenólicos presentes (ácido fenólico, flavonoides y antocianinas) en el jugo de la pitahaya y en el polvo del *Hylocereus monocanthus*, detectando elevadas concentraciones en el jugo

de 45,31 mg de ácido gálico/100 mL de jugo de pitahaya y en el polvo de 386,09 ± 1,52 mg en 100 g de polvo y cuyos valores son excedentes a otras frutas[17].

La abundante presencia de nutrientes como los ácidos grasos, terpenos, oligoelementos, fósforo, calcio, fibra y de compuestos fenólicos, flavonoides, vitamina C, pigmentos de betacianinas y betalaínas, evidenciando una elevada capacidad antioxidante que es determinada por el método DPPH• (Determinación cuantitativa del ensayo de actividad de captación de radicales libres) dando un valor de 160,84 mg de Trolox/100 mL de jugo que es superior a otras cactáceas rojas como la tuna, permitiendo disminuir el stress oxidativo ocasionado por un desequilibrio entre los agentes prooxidantes y antioxidantes en el organismo, regulando los trastornos metabólicos (responsables de la obesidad, algunas tipos de diabetes), fortaleciendo el sistema inmunológico, incentivando la formación del colágeno para fortalecer los huesos, dientes y prevenir la artritis reumatoide, arterioesclerosis, finalmente la presencia de sus propiedades antimicrobianas y antibacterianas permiten su aplicación en la preparación de fármacos de naturaleza farmacológica[16,17].

Tabla 1. Características fisicoquímicas, químicas, compuestos bioactivos y macronutrientes y propiedad funcional de la pulpa del *Hylocereus monocanthus*

Características fisicoquímicas y químicas		Compuestos bioactivos y macronutrientes		Propiedad funcional
Humedad	86,82 g.100 g^{-1}	Vitamina C	9,85 mg.100 g^{-1}	Hepatoprotectora
Ceniza	0,89 g.100 g^{-1}	Betalainasa	11,43 mg.100 g^{-1}	Antioxidante
Proteínas	1,75 g.100 g^{-1}	Betalaína	42,71 mg.100 g^{-1}	Antiinflamatorio
Lípidos	0,87 g.100 g g^{-1}	Betacianinas	118,76 mg.100 g g^{-1}	Antimicrobiano
Fibras totales	4,21 g.100 g^{-1}	Betaniano	3,18 g.100 g^{-1}	Antiproliferativa
Fibras insolubles	2,16 g.100 g^{-1}	Isobetano	0,54 g.100 g^{-1}	Antitirosinasa
Fibras solubles	2,05 g.100 g^{-1}	Filocactina	5,31 g.100 g^{-1}	Antihiperlipidémico
Carbohidratos	5,5 g.100 g^{-1}	Flavonoides totales	10, 33 mg. RE 100 g^{-1}	Hepatoprotectora
Azúcares totales	10,00 g.100 g^{-1}	Betacianinas totales	16,53 mg 100 g^{-1}	Síndrome metabólico
pH	4,32	Total, de antocianinas	19,14 mg 100 g^{-1}	Antiinflamatorio
Acidez	2,76 g.100 g^{-1}	Compuestos fenólicos totales	5,41 g. 100 mg^{-1}	Control Homeostático
Sólidos solubles totales	5,76 g.100 g^{-1}	Hilocerenina	0,95 g. 100 g^{-1}	Antimicrobiano- Antiproliferativo Antiinflamatorio Antienvejecimiento Hipoglucemiante Antiangiogénico Antiobesisdad Cicatrizante Ansiolítico

Fuente. Gonçalves[15]. Chemical, phytochemical and functional aspects of pitayas *Hylocereus undatus, Hylocereus monacanthus* and *Hylocereus megalanthus*: A review. Brazilian Journal of Health Review, 2021, 4(5):1986-2024 p.1990.

2.2.2. Hepatotoxicidad

2.2.2.1 Consideraciones

El hígado es un órgano de vital importancia y su ubicación estratégica dentro del sistema circulatorio garantiza el primer filtro de la sangre proveniente del tracto gastrointestinal y del espacio abdominal, antes de ser bombeado a la circulación general mediante los pulmones; siendo imposible evitar un contacto íntimo de este órgano con todas las sustancias químicas ingerida por vía oral, administradas por vía intraperitoneal o con los metabolitos reactivos tóxicos biotransformados, presentes en elevadas concentraciones y responsables del efecto deletéreo que subyacen su vulnerabilidad al ataque químico.Por lo tanto, paradójicamente la posición, estructura y funciones de este órgano lo predisponen a una toxicidad química, pese a los múltiples mecanismos de biotransformación y desintoxicación de sustancias endógenas y exógenas que posee[18,19,20].

Los carcinógenos, fármacos, sustancias químicas tóxicas y entre otros xenobióticos, absorbidos a través del tracto gastrointestinal, diluidos en la circulación sistémica y transportados junto con los nutrientes a través de la sangre venosa porta al hígado, quedan expuestos a los hepatocitos, aunque un elevado porcentaje de estos agentes externos pueden permanecer intacto y sin sufrir alguna modificación química alguna, la mayoría pueden ser metabolizados y sufrir el efecto del "Primer Paso", recorriendo el "Circuito Circulatorio Enterohepático" (caracterizado por un movimiento opuesto de la bilis, desde su membrana canalicular hasta el duodeno) y siendo susceptibles a la activación metabólica de la isoforma CYP2E, principal responsable de la súper producción de especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y hepatotoxicidad [21,22,]

Numerosos medicamentos y sustancias químicas tóxicas incluyendo el CCl_4, posterior a su ingesta en la dieta, absorción a través del tracto gastrointestinal y distribución por todo el organismo, en los hepatocitos son activados metabólicamente por las enzimas del CYP450, dando origen a metabolitos inductores de una superproducción de radicales libres, iniciadores de la peroxidación lipídica y la principal responsable de la enfermedad hepática inducida por Tetracloruro de Carbono en animales de

experimentación y ampliamente empleada como un modelo análogo de estudio de la lesión hepática inducida en humanos[23,24,25].

El CCl_4 es un solvente orgánico empleado en la fabricación de agentes de limpieza, barnices, abrillantadores, ceras de caucho e insecticidas, es un líquido volátil con una estructura química que estabiliza y prolonga su permanencia en el medio ambiente de 30 a 100 años aproximadamente, facilitando su fusión con el aire circundante, suelo subterráneo, agua y aumentando el riesgo de contaminación la exposición al solvente, su naturaleza lipofílica facilita su ingesta por inhalación o absorción dérmica y su distribución por todo el organismo, permite su acúmulo en elevadas concentraciones en el hígado, cerebro, riñones, músculos, grasa y sangre. La información de los efectos cancerígenos en humanos es limitada; pero existen evidencias que corroboran la inducción a carcinomas hepatocelulares posterior a una exposición oral, inhalatoria y parenteral del agente hepatotóxico en roedores. La Agencia de Protección Ambiental de EE. UU, clasificó al agente hepatotóxico en el Grupo B2, como un posible agente cancerígeno para los humanos [26,27,28].

El daño hepático por exposición repetida a dosis tóxicas de etanol es un importante problema de salud humana. El riesgo de hepatotoxicidad inducida químicamente aumenta por las exposiciones múltiples y simultáneas que pueden producirse con mezclas químicas en el entorno laboral, medio ambiente o por múltiples terapias concurrentes. La creciente prevalencia de enfermedades virales del hígado es otro factor de interacción que se puede esperar que agrave la hepatotoxicidad de las sustancias químicas. Comprender los mecanismos moleculares y celulares que median estos efectos tóxicos en el contexto de la función y estructura del hígado es un conocimiento importante necesario para predecir la toxicidad evitable y las interacciones adversas[29,30].

Los tóxicos atrapados en la circulación enterohepática tienen una tasa de eliminación bastante lenta y una mayor frecuencia de exposición a los hepatocitos. El retorno de la sangre venosa portal hacia los vasos aferente de las sinusoides hepáticas tiene el efecto adverso de disminuir la presión y la oxigenación en su lado arterial, en comparación con los lechos capilares de otros tejidos. El predominio de enzimas de los hepatocitos,

como el citocromo P450 (CYP450) y la monooxigenasa que contiene flavina (FMO), metabolizan los xenobióticos hidrófobos, una necesidad para su excreción renal y biliar en los compartimentos acuosos. Estas enzimas pueden generar metabolitos tóxicos localmente reactivos si se desacoplan de reacciones de conjugación protectoras. Además, las actividades anabólicas muy activas que ocurren dentro de los hepatocitos hacen que este tipo de células sean especialmente susceptibles a los efectos adversos de sustancias tóxicas que actúan como antimetabolitos o comprometen la producción de energía mitocondrial. La importancia de estas diversas funciones hepáticas para la disponibilidad de metabolitos en órganos críticos como el cerebro hace que los efectos graves de los tóxicos hepáticos amenacen la viabilidad del organismo[31,32].

2.2.2.2 Componentes celulares y organización hepática

El hígado es un tejido heterogéneo compuesto principalmente de hepatocitos parenquimatosos más varios tipos de células no parenquimatosas adicionales. Además, los hepatocitos son funcionalmente diversos dependiendo de su relación posicional con el suministro de sangre aferente de las sinusoides[1].

El parénquima hepático está compuesto por una malla de placas, cada una de las cuales tiene el espesor de un hepatocito (Figura 2). Las placas hepáticas están separadas por sinusoides, una disposición que garantiza que dos superficies de cada hepatocito estén muy cerca del suministro de sangre. En secciones microscópicas bidimensionales, esta organización aparece como filas de cordones de hepatocitos separados por sinusoides casi paralelos. Una región especializada de la membrana plasmática, la membrana canalicular, discurre como una banda alrededor de cada hepatocito a medio camino entre las superficies sinusoidales. Las regiones canaliculares de los hepatocitos vecinos se alinean y se unen mediante uniones intercelulares estrechas para formar canalículos biliares[2,18].

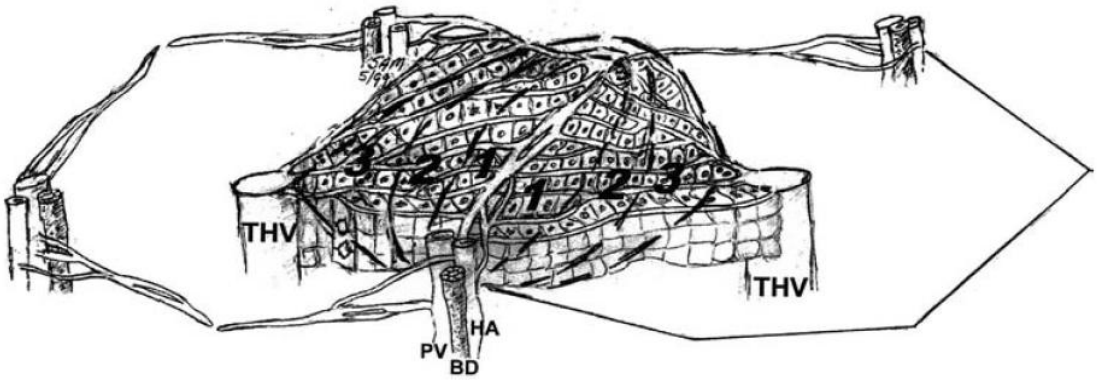


Figura 2. Comparación del lóbulo hepático estructural con regiones acinares funcionales. En el lóbulo hepático está centrada por la vénula hepática terminal (VHT) o vena central (VC), y adopta una forma aproximadamente hexagonal por sus vértices que contiene la tríada portal compuesto por la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y el conducto biliar (CB). El acino hepático se centra en el tracto de vasos sanguíneos que se ramifican desde la arteria hepática y la vena porta de la tríada portal. Los hepatocitos dentro de los acinos se agrupan dentro de las zonas funcionales 1, 2 y 3 ubicadas a distancias cada vez mayores de los tractos vasculares que interconectan con las tríadas portales adyacentes.
Fuente. Wallace A, Meyer S[5]. Molecular and Biochemical Toxicology, Capítulo 26; Hepatotoxicity. Editor; Hodson E, Smart R. p. 671.

Se han propuesto varios modelos organizativos de la estructura del hígado. El más utilizado es el lóbulo definido morfológicamente. El lóbulo de los hepatocitos se visualiza en dos dimensiones con microscopía óptica como un hexágono centrado en la rama terminal de la vena hepática. Los primeros hepatocitos de los cordones irradian provenientes de esta VHT o VC se clasifican en perivenosas o centrolobulillares. En los vértices del hexágono imaginado se encuentran las tríadas portales, tractos de tejido conectivo seccionados transversalmente en los que está incrustado un CB con sus células epiteliales cúbicas distintivas y ramas preterminales de la AH y la VP[26.27].

Los hepatocitos ubicados alrededor de las tríadas portales y siguiendo la circunferencia del lóbulo hexagonal se clasifican como periportales. Los hepatocitos mediozonales intervienen entre los hepatocitos centrolobulillares y periportales. Un concepto anterior definía la heterogeneidad de los hepatocitos con respecto al acino funcional. Los hepatocitos acinares se agrupan en tres zonas que se estratifican concéntricamente alrededor de los vasos distribuidores[27].

La similitud de los hepatocitos intrazonales está determinada por su exposición a una composición sanguínea casi equivalente, mientras que las diferencias de hepatocitos

interzonales reflejan gradientes en los componentes sanguíneos que se sabe que existen a través de las sinusoides. Aunque conceptualmente diferente, se sigue utilizando la nomenclatura del modelo acinar. Existe una equivalencia aproximada entre los hepatocitos periportales lobulares y de la zona acinar 1, los hepatocitos centrilobulares y de la zona 3, y los hepatocitos mediozonales y de la zona 2. Hay un aumento en el tamaño de los hepatocitos de la zona 1 a la zona 3, y un aumento en el contenido de ADN con células diploides (2N) en la zona 1 y un aumento de células poliploidías (4 N) en la zona 3. Se cree que los hepatocitos encontrados en la zona 3 representan hepatocitos diferenciados terminalmente incapaces de sufrir división celular[28].

A. Diferencias regionales de la función lobular

Los gradientes en la función de los hepatocitos se producen en la distancia periportal a perivenosa. Los hepatocitos periportales (zona 1) están expuestos a las concentraciones más altas de oxígeno, hormonas, nutrientes y xenobióticos provenientes del intestino o de la circulación sistémica.La hepatotoxicidad periportal sugiere que el compuesto original puede ser tóxico en sí mismo ya que la zona 1 está expuesta a las concentraciones más altas. La presión parcial del oxígeno (pO_2) es de aproximadamente 65 mm Hg (correspondiente a aproximadamente 9 - 13 % de O_2) en esta zona. Las células son ricas en mitocondrias con más crestas y más largas, y predomina el metabolismo energético oxidativo[2].

La glucosa para administración sistémica a sitios extrahepáticos se sintetiza principalmente en los hepatocitos periportales debido a su enriquecimiento en enzimas gluconeogénicas como la fosfenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). La colocalización de las transaminasas de aminoácidos en los hepatocitos periportales proporciona una fuente de sustratos gluconeogénicos[22].

Por el contrario, los hepatocitos perivenosos (zona 3) están expuestos a sangre con contenido reducido de oxígeno y mayor concentración de productos metabólicos.
La pO_2 perivenosa es de aproximadamente 30 - 40 mm Hg (4 - 5 % de O_2) y las mitocondrias son ricas en matriz y las crestas pobres. En estas células se localizan preferentemente las enzimas de la glucólisis anaeróbica y de la lipogénesis[1].

La expresión regional de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos determina la zona: localización específica del daño tóxico. Muchos hepatotóxicos provocan daño perivenoso porque los Citocromo P450 se localizan preferentemente en los hepatocitos centrolobulillares. Por ejemplo, el paracetamol causa hepatotoxicidad porque el metabolito reactivo NAPQI es producido en esta región por CYP2E1. Los altos niveles de CYPP450 junto con una distribución invertida para el glutatión conjugado (GSH) hacen que hepatocitos perivenosos especialmente susceptibles a los electrófilos reactivos. También existen distribuciones diferenciales para glutatión S - transferasas, UDP - glucuronosiltransferasas, el epóxido hidrolasa y el alcohol deshidrogenasa, que tienen mayor actividad perivenosa; mientras que, la sulfotransferasa predomina en los hepatocitos periportales. La desintoxicación de amoníaco a urea ocurre periportalmente, pero tiene una capacidad limitada. Amoniaco residual que llega a los hepatocitos centrolobulillares se incorpora a la glutamina mediante la glutamina sintetasa perivenosa[25,32].

Los mecanismos que mantienen la especificidad hepatocelular regional metabólica difieren según el proceso. El gradiente periportal a perivenoso del metabolismo de los carbohidratos se puede revertir cambiando la dirección del flujo sanguíneo, por lo tanto, parece depender de la disponibilidad de sustrato y de los eventos de señalización postranscripcional, la represión de la transcripción periportal por influencias hormonales, especialmente hormonas tiroideas y de crecimiento, parece ser responsable de la distribución del citocromo P450. Sin embargo, existe plasticidad para estos sistemas a medida que se producen cambios en el tamaño zonal para adaptarse a las necesidades funcionales. Por el contrario, la expresión de glutamina sintetasa es un fenotipo estable de células perivenosas[28].

B. Células madre del hígado

A diferencia de la mayoría de las células maduras, los hepatocitos diferenciados conservan la capacidad de proliferar. La tasa basal de proliferación de células de hepatocitos es muy baja, pero en condiciones que requieren un aumento de la capacidad hepática, los hepatocitos actuarán como células madre facultativas. Por ejemplo, los hepatocitos entrarán en el ciclo celular casi sincrónicamente después de

la resección quirúrgica hasta que se restablezca la capacidad funcional del hígado. Además, sustancias químicas como el fenobarbital provocarán un aumento de la masa hepática, en parte debido a la hiperplasia[29].

Durante la exposición continua a estas sustancias químicas, los hepatocitos experimentan una proliferación celular transitoria, pero luego regresan a una tasa basal mientras se mantiene una masa hepática aumentada mediante la inhibición de la pérdida celular mediada químicamente. Por el contrario, dosis elevadas de hepatotóxicos inhiben la proliferación de hepatocitos. Si se recibe un estímulo de crecimiento durante la exposición a hepatotóxicos, proliferará otro tipo de células. Son bipotenciales porque pueden diferenciarse en hepatocitos o células epiteliales de los conductos biliares; por lo tanto, se cree que son una verdadera célula madre del hígado. El hígado fetal también es una fuente de células progenitoras con capacidad de colonizar hígados dañados por compuestos hepatotóxicos en experimentos de trasplante en ratas. Un modelo bien definido para la proliferación de HGC es la resección quirúrgica del hígado de ratas durante el tratamiento con el potente hepatotóxico 2-acetilaminofluoreno (2-AAF)[29,30].

C. Células hepáticas no parenquimatosas

Aproximadamente el 30 % de las células del hígado son células no parenquimatosas. Tipos de células ubicadas en los tractos portales interlobulillares incluyen células epiteliales de los conductos biliares y fibroblastos del tejido conectivo. Los que se encuentran dentro del interior del lóbulo son los raros linfocitos asesinos naturales fijos (células fosa) y las células endoteliales más abundantes que recubren las sinusoides, las células de Kupffer y las células estrelladas (también conocidas como células de almacenamiento de grasa o células Ito). La reciente disponibilidad de técnicas de aislamiento y cultivo celular para estos tipos de células ha permitido la caracterización de efectos tóxicos en células no parenquimatosas que son consistentes con la patología tisular. Un ejemplo es la susceptibilidad de las células endoteliales sinusoidales. a la toxicidad por sustancias químicas como la monocrotalina, que causa enfermedad venooclusiva debido a la fibrosis[32,33].

2.3.2.3 Mecanismos de hepatotoxicidad inducida químicamente

El mecanismo más directo de hepatotoxicidad es a través de la interacción específica de una sustancia química con un componente celular clave y la consiguiente modulación de su función. Sin embargo, los mecanismos más comunes implican efectos secundarios de la interacción tóxica. Estos incluyen el agotamiento de moléculas celulares, como el adenosín trifosfato (ATP) y el glutatión (GSH), lesión por radicales libres y oxidantes, en particular a los lípidos de la membrana; unión covalente de metabolitos reactivos a moléculas celulares críticas y colapso de las gradientes iónicas reguladoras. A continuación, se describen los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a tipos específicos de lesiones hepáticas inducidas químicamente[34,35].

A. Hígado graso

Los lípidos que se acumulan en los hepatocitos principalmente como triglicéridos, se producen cuando hay un desequilibrio entre la absorción de triglicéridos extrahepáticos; así como sus precursores y la secreción hepática de triglicéridos que contienen lipoproteínas y catabolismo de ácidos grasos. La principal fuente de lípidos extrahepáticos que llegan al hígado son los ácidos grasos no esterificados que se han movilizado del tejido adiposo y se han unido a la albúmina sérica. Una fuente secundaria de triglicéridos residuales son los quilomicrones originados durante el procesamiento intestinal de los lípidos de la dieta[36,37].

Dentro del hepatocito, los ácidos grasos se sintetizan de novo y se esterifican cuando el acetil CoA y el glicerol están disponibles a partir de la glucólisis. El catabolismo intrahepático de los ácidos grasos se produce principalmente a través de la β-oxidación mitocondrial con una menor contribución de la oxidación peroxisomal. La oxidación de los ácidos grasos β está limitada por la translocación de derivados grasos de acilcarnitina a través del interior de la membrana de las mitocondrias. Los triglicéridos de los hepatocitos se combinan con fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y apolipoproteínas glicosiladas y luego se secretan como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se produce un procesamiento adicional de VLDL en la circulación sistémica para producir otras clases de lipoproteínas con menor contenido de

triglicéridos que se convierten en una fuente para el reciclaje de apoproteínas en el hígado[38,39].

Este proceso de múltiples componentes, resumido en la Figura 3, proporciona muchos sitios de interacción química. El suministro excesivo de ácidos grasos libres (AGL) al hígado parece ser un componente del mecanismo de la esteatosis inducida por CCl_4, etionina y fósforo. Estos agentes desencadenan la lipólisis en el tejido adiposo y provocan un aumento espectacular de los ácidos grasos libres circulantes. En estas condiciones, los triglicéridos se acumulan en el hígado debido a la saturación de la tasa, etapa limitante de la síntesis de VLDL. La movilización de la grasa de depósito del tejido adiposo está bajo el control del eje pituitario-suprarrenal, cuya estimulación desencadena la liberación masiva de catecolaminas que conducen a la activación de la lipasa sensible a hormonas en el tejido adiposo y la movilización de ácidos grasos libres. El estrés sistémico prolongado causado por sustancias químicas como el DDT, la nicotina y la hidracina también estimular este sistema. Al parecer, un mecanismo similar provoca el hígado graso en animales hambrientos tratados con una gran dosis de etanol[40,41].

Dentro del hepatocito, los ácidos grasos se sintetizan de novo y se esterifican cuando el acetil CoA y el glicerol están disponibles a partir de la glucólisis. El catabolismo intrahepático de los ácidos grasos se produce principalmente a través de la β-oxidación mitocondrial con una menor contribución de la oxidación peroxisomal. La oxidación de los ácidos grasos β está limitada por la translocación de derivados grasos de acilcarnitina a través del interior de la membrana de las mitocondrias. Los triglicéridos de los hepatocitos se combinan con fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y apolipoproteínas glicosiladas y luego se secretan como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se produce un procesamiento adicional de VLDL en la circulación sistémica para producir otras clases de lipoproteínas con menor contenido de triglicéridos que se convierten en una fuente para el reciclaje de apoproteínas en el hígado [39,40].

Este proceso de múltiples componentes, resumido en la Figura 3, proporciona muchos sitios de interacción química. El suministro excesivo de ácidos grasos libres (AGL) al hígado parece ser un componente del mecanismo de la esteatosis inducida por CCl_4, etionina y fósforo. Estos agentes desencadenan la lipólisis en el tejido adiposo y provocan un aumento espectacular de los ácidos grasos libres circulantes. En estas condiciones, los triglicéridos se acumulan en el hígado debido a la saturación de la tasa, etapa limitante de la síntesis de VLDL. La movilización de la grasa de depósito del tejido adiposo está bajo el control del eje pituitario-suprarrenal, cuya estimulación desencadena la liberación masiva de catecolaminas que conducen a la activación de la lipasa sensible a hormonas en el tejido adiposo y la movilización de ácidos grasos libres. El estrés sistémico prolongado causado por sustancias químicas como el DDT, la nicotina y la hidracina también estimular este sistema. Al parecer, un mecanismo similar provoca el hígado graso en animales hambrientos tratados con una gran dosis de etanol[41].

B. La fibrosis

La fibrosis hepática se observa con la exposición crónica a hepatóxicos que causan un daño creciente a los hepatocitos y es parte de la respuesta de curación de heridas. La fibrosis crónica provoca una alteración grave de la arquitectura del hígado por el depósito de matriz extracelular (MEC). La fibrosis avanzada altera el flujo sanguíneo adecuado y provoca cicatrices en el hígado que pueden provocar un daño hepático irreversible conocido como cirrosis. La exposición crónica a las hepatoxinas CCl_4, monocrotalina y alcohol son ejemplos de compuestos que causan fibrosis excesiva[42].

La evidencia reciente indica que las células estrelladas hepáticas (HSC) ubicadas en el espacio de Disse desempeñan un papel fundamental en la progresión hacia la fibrosis. Las HSC sufren cambios en número y estructura cuando se activan. Las HSC proliferan y cambian de células en forma de estrella a células similares a fibroblastos que sintetizan y secretan grandes cantidades de ECM, incluidos colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. La activación de HSC ocurre en un proceso que involucra una serie de HSC: factores activadores que incluyen factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y factores de crecimiento de fibroblastos[43].

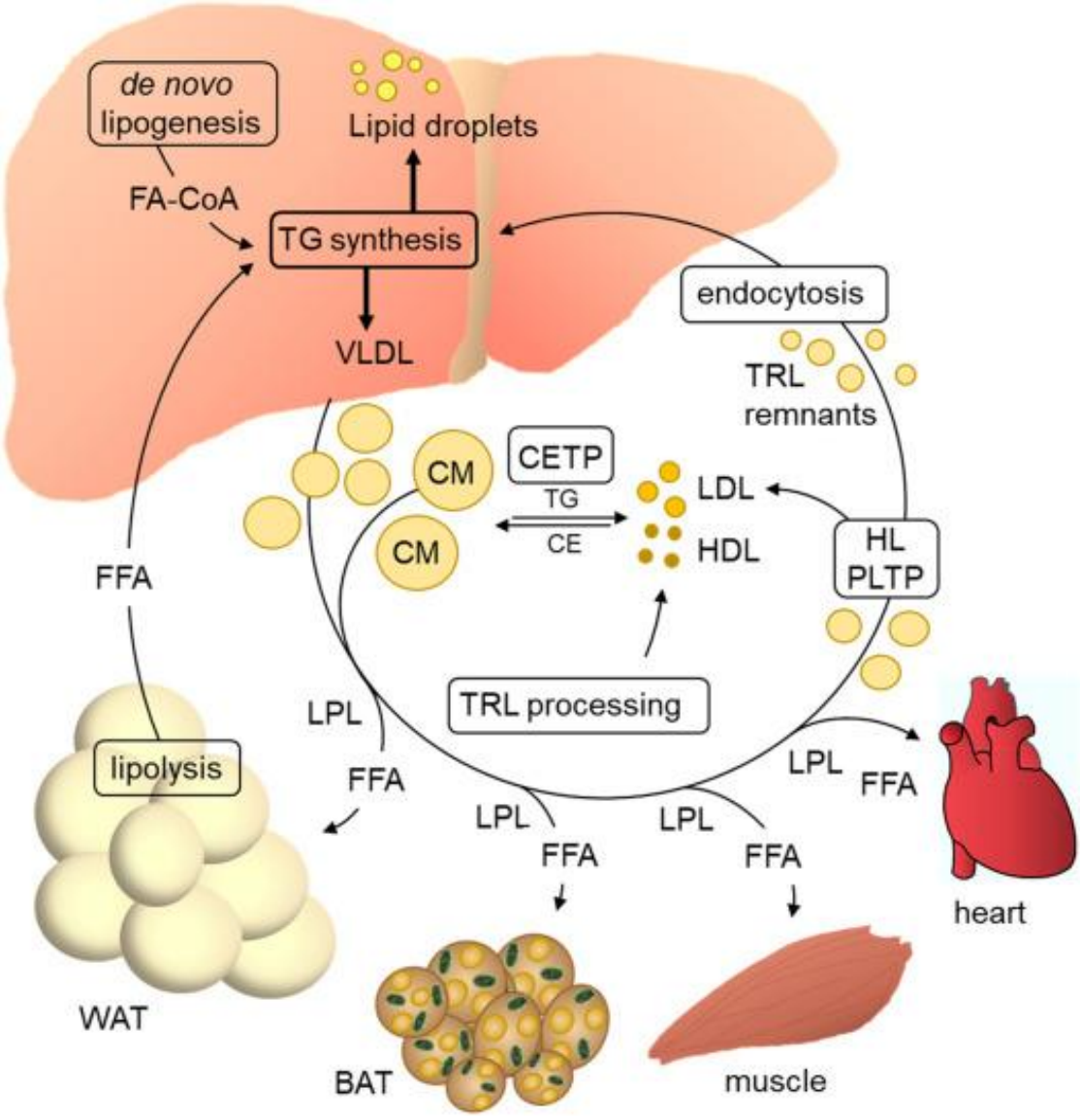


Figura 3. Ciclo de triglicéridos en la patogénesis del hígado graso. El esquema muestra el transporte de ácidos grasos libres desde los depósitos de grasa.
Fuente. Joerg Heeren J., Scheja L[38]. Enfermedad del hígado graso asociada al metabolismo y metabolismo de las lipoproteínas, Metabolismo molecular-2021. Pag 2.

Estos factores activadores se producen a partir de hepatocitos dañados, células inmunes infiltradas y las propias HSC. Por ejemplo, la exposición al etanol conduce a la liberación de TGF β en las células de Kupffer, que activa HSC a mifibroblastos y secreción de ECM. El cese de la lesión hepática por hepatotoxinas puede provocar una reversión significativa de la fibrosis. Se cree que la recuperación de la fibrosis implica que las HSC se vuelvan inactivas o experimenten apoptosis, junto con la degradación de la EMC y la regeneración de los hepatocitos[43].

C. Colestasis

La formación de bilis por hepatocitos depende del transporte de ácidos biliares dependiente de energía hacia la luz canalicular, un proceso multicomponente que implica movimiento vectorial a través de la célula. La presión osmótica generada por los ácidos biliares canaliculares es la fuerza impulsora del componente líquido de la bilis que ayuda a impulsar el flujo de bilis. Los ácidos biliares son absorbidos de la sangre contra un gradiente de concentración mediante proteínas de transporte ubicadas en la membrana sinusoidal de los hepatocitos. El mejor caracterizado de ellos es el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP, símbolo genético SCL10A1), cuya energía se deriva del gradiente descendente de Na^+ que es mantenido por la membrana plasmática Na^+, K^+ - ATPasa. Las proteínas de unión intracelular coordinan el transporte transcelular de ácidos biliares y los elementos citoesqueléticos median el tráfico dentro de las vesículas hacia la membrana canalicular. Los ácidos biliares excretados en la membrana canalicular se producen a través de transportadores del casete de unión de ATP (ABC), como la bomba de exportación de sales biliares (Bsep), que cataliza el movimiento concentrador limitante de la velocidad de la taurocolina hacia el espacio canalicular[44].

D. Necrosis y apoptosis

El último acontecimiento en la muerte celular es la pérdida irreversible de la integridad de la membrana plasmática. Estudios mecanicistas anteriores han enfatizado que la incapacidad de mantener los gradientes de calcio transmembrana es el determinante temprano, iniciando una secuencia irreversible de eventos que conducen a la muerte celular. Sin embargo, nuevas técnicas microscópicas han permitido observar las

relaciones temporales de múltiples eventos al nivel de una sola célula expuesta a un tóxico. Estos elegantes estudios han demostrado que la pérdida de la función mitocondrial con un agotamiento asociado de ATP puede preceder a la elevación de Ca^{2+} citosólico. Por lo tanto, el agotamiento de ATP y la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} son ambos importantes determinantes de la letalidad; y, cuando son extremos, cada uno puede actuar de forma independiente[45,46].

Alternativamente, las respuestas subletales de uno pueden conducir al otro y crear sinergia con él, de modo que el orden temporal sea intrascendente. Se esperaría entonces que una variedad de diferentes tipos de efectos tóxicos primarios convergiese sobre la función mitocondrial y/o el mantenimiento de niveles bajos de Ca^{2}+ citosólico por las bombas de Calcio dependientes de ATP de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico (RE)[47].

La fosforilación de ADP a ATP por las mitocondrias está impulsada por un gradiente electroquímico de protones establecido a través de la membrana mitocondrial interna como consecuencia del transporte vectorial de protones desde NADH y succinato durante la oxidación por la cadena respiratoria. Por lo tanto, los ácidos o bases lipófilos débiles (como el 2,4 - dinitrofenol) que pueden transportar protones a través de las membranas disiparán el gradiente de protones y desacoplarán la oxidación de la fosforilación del ADP. El ADP intramitocondrial puede limitar la velocidad, como lo demuestra la inhibición del transportador de nucleótidos de adenosina mitocondrial por parte del atractilósido. La inhibición de la síntesis de ATP también es consecuencia de la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). La exposición a varios tipos diferentes de efectores tóxicos abre un poro mitocondrial de alta conductividad que permite de manera no específica el paso de moléculas con pesos moleculares < 1,5 kD para dar como resultado el MPT. La participación de dicho poro en la necrosis se sugiere por la protección contra la letalidad de varios tóxicos por parte de la ciclosporina A, un inhibidor de la MPT[47,48].

E. Estrés oxidativo

El metabolismo celular del dioxígeno (O_2) está estrechamente regulado para producir principalmente una reducción de 4 e- a $2O^{2-\cdot}$ Sin embargo, algunas fugas de los

productos de reacción parciales 1e-, ($O_2^{-)}$ el radical superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se producen a partir de procesos como la respiración mitocondrial y la oxidación catalizada por el CYP450. El metabolismo oxidativo peroxisomal de los ácidos grasos también es una fuente importante de H_2O_2 celular endógeno. En condiciones normales, estas vías complementadas con antioxidantes hepatocelulares adicionales como GSH, vitamina E y ascorbato tienen capacidad suficiente para prevenir la oxidación nociva de otros constituyentes celulares[46,47,48].

La exposición a ciertos hepatotóxicos puede aumentar la tasa de producción de intermediarios reactivos del oxígeno de modo que excedan la capacidad de estas vías protectoras. Un grupo estructuralmente diverso de compuestos causa la proliferación de peroxisomas dentro de los hepatocitos de roedores, por lo tanto, eleva los niveles endógenos de H_2O_2 que se escapa de este orgánulo. Los proliferadores de peroxisomas incluyen el agente hipolipidemiante clofibrato, el plastificante ftalato de dietilhexilo (DEHP) y los herbicidas 2,4 - dicloro - y 2,4,5 - tricloro - ácido fenoxiacético (2,4 - D y 2,4,5 - T)[49].

El hígado es particularmente susceptible a sufrir daños por sobrecarga de hierro porque es un lugar importante de almacenamiento de hierro. El hierro suele almacenarse en los hepatocitos asociado con las proteínas ferritina y hemosiderina; sin embargo, el hierro catalíticamente activo puede liberarse del almacenamiento mediante superóxido. La ferritina de hierro también es reducida y movilizada por NADH, que puede desempeñar un papel en el estrés oxidativo inducido por etanol en el hígado. El hierro liberado puede reaccionar con agentes reductores y O_2 para formar superóxido. El superóxido y el H_2O_2 reaccionan con el hierro para formar radical hidroxilo altamente reactivo ($OH^{\bullet}$). Los iones de cobre también pueden catalizar la reacción de Fenton y producir el $OH^{\bullet}$. El superóxido también se produce por transferencia de un solo electrón al O_2 por radicales libres no oxidantes. La formación del radical triclorometano $CCl_3^{\bullet}$ a partir del CYP450, el metabolismo dependiente de CCl_4, contribuye al daño oxidativo de los hepatocitos a través de este mecanismo[49,50,51].

2.2.3 Compuestos que causan daño hepático

Existen varios agentes hepatotóxicos, tales como: drogas, etanol, hidrocarburos alifáticos halogenados, pesticidas, toxinas, etc.[52,53].

2.2.3.1 Tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono es una molécula simple que, cuando se administra a diversas especies, provoca necrosis hepática centrolobulillar (zona 3) e hígado graso. Es un compuesto muy liposoluble y, por tanto, se distribuye bien por todo el organismo, pero a pesar de ello, su mayor efecto tóxico se produce en el hígado, independientemente de la vía de administración. Cabe señalar que tiene otros efectos tóxicos y que existen diferencias entre especies y sexos en cuanto a la toxicidad. La administración o exposición crónica causa cirrosis hepática, tumores hepáticos y también daño renal[18,54].

La razón por la que el hígado es el objetivo principal es que la toxicidad del tetracloruro de carbono depende de la activación metabólica por parte del CYP2E1. Por lo tanto, el hígado se convierte en el objetivo, ya que contiene la mayor concentración de citocromo P450, especialmente en la región centrolobulillar, que es donde el daño es mayor[18,55].

La hepatotoxidad del CCl_4 genera una activación metabólica del citocromo P450 2E1, que en ausencia de oxígeno produce el radical triclorometilo y en presencia de oxígeno un radical altamente reactivo denominado triclorometilperoxi, pudiendo producir fosgeno y cloro electrofílico, el cual es designado como el posible responsable de la destrucción del sistema enzimático del citocromo P450 en la zona centrolobulillar, media y zonas próximas a ella en el hepatocito, siendo influenciando el incremento del oxígeno disponible en el aumento de la intensidad de destrucción, protegiendo curiosamente dicho proceso de una hepatotoxicidad futura, ante la administración de una dosis mayor de CCl_4, siendo un ejemplo de una inactivación enzimática suicida y el CCl_4 de un sustrato suicida, por otro lado una administración de bajas dosis del solvente solo ocasiona hígado graso[18,56].

El mecanismo reductor de funcionamiento del CYP450 frente al solvente, cataliza la adición de un electrón, el cual permite una escisión homólitica y ocasiona la pérdida del ion cloruro y la formación del radical triclorometilo que puede sufrir una o varias reacciones como: la unión covalente a las proteínas y lípidos microsomales, reacción directa con fosfolípidos y colesterol de las membranas y producirá el cloroformo, como resultado de las reacciones de adición de un átomo de hidrógeno extraído de puentes de metileno presentes en los ácidos grasos poliinsaturados y el otro producto será el radical lipídico o tiol, dependiendo de la fuente de hidrógeno, todos ellos generadas en ausencia de oxígeno, por lo tanto se considera al radical triclorometilo como un evento iniciador de la toxicidad o daño, mas no la causa, por su naturaleza poca reactiva (ver Figura 4)[18,57].

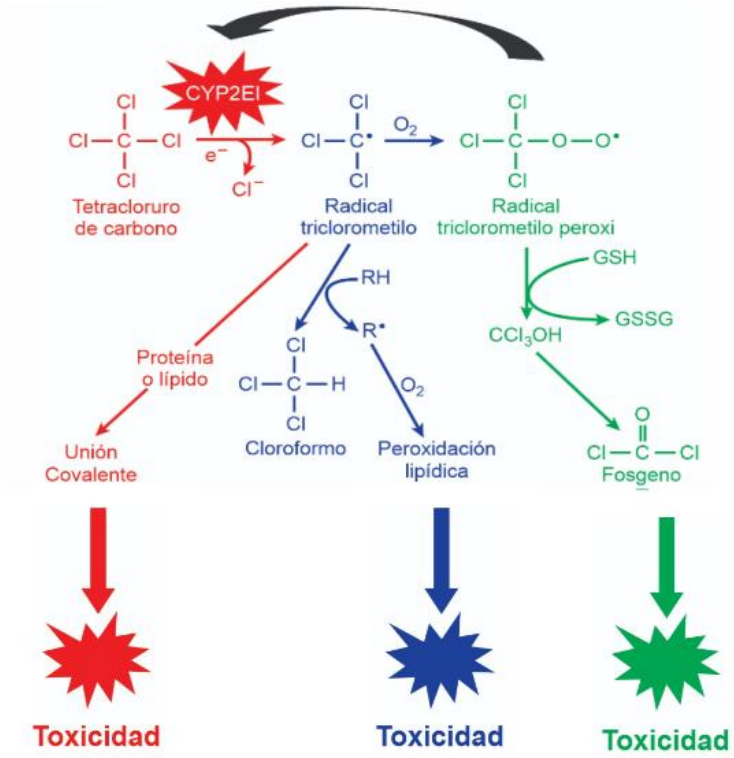


Figura 4. La activación metabólica del tetracloruro de carbono a radical triclorometilo mediadas por enzimas microsomales. Este radical puede reaccionar con oxígeno o extraer un átomo de hidrógeno de un donante adecuado (R) para producir un radical secundario, o reaccionar covalentemente con lípidos o proteínas. Si R es un lípido poliinsaturado, (R), se forma un radical lipídico (R), que puede sufrir peroxidación.
Fuente. Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. p.309[18].

Los hidroxialquenos como el 4-hidroxinonenal, capaces de dañar más allá del RE y generar efectos bioquímicos como la inhibición de la síntesis proteica y de la enzima glucosa 6 fosfatasa, el 4-hidroxinonenal puede reaccionar tanto con la proteína microsomal y el grupo tiol e inhibir las enzimas como último proceso, el incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática *in vitro*, puede estar relacionado con lipoperoxidación, dando como resultado de la descomposición de lípidos insaturados la reducción de ciertos grupos tiol de las proteínas, todos los efectos de este aldehído reactivo también son causados por el propio CCl_4, tal vez los efectos más significativos de los productos de la lipoperoxidación son la reducción del secuestro del Ca^{2+} por el RE, incrementando el Ca^{2+} libre en el citosol, debido a la posible sensibilidad de la bomba de Ca^{2+}a la lipoperoxidación y a las sustancias que interactúan con el grupo tiol[18,58].

Si bien es cierto el radical triclorometilo inicia el primer evento; pero es el radical reactivo peroxitriclorometilo el responsable de la lipoperoxidación, dando origen a los hidroperóxidos lipídicos como resultado de la oxidación de los ácidos grasos insaturados y a una variedad de productos finales como el 4-hidroxinonenal, cuya capacidad de transporte le permite expandir su toxicidad a tejidos distales, generando daño celular y una lesión e inflamación que contribuyen a la degradación de las membranas de los mitocondrias, lisosomas y del retículo endoplásmico, evidenciando los siguientes efectos bioquímicos: disminución de la actividad enzimática del CYP P450 contenida en RE, inhibición de la síntesis de las proteínas, (por reaccionar con el grupo tiol de las proteínas) y de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa, siendo el más relevante el incremento de la concentración Ca^{2+} en el citosol por una reducción de su secuestro en el interior del RE, debido a una afectación de la sensibilidad de la bomba de Ca^{2+} por los productos de la lipoperoxidación[2,18,57].

2.2.3.2 Fases de la lesión del tetracloruro de carbono

Comprender los mecanismos moleculares y celulares que median los efectos tóxicos del CCl_4 dentro del contexto de la función y estructura del hígado, son conocimientos que nos permiten predecir y evitar la toxicidad, al minuto de la intoxicación al alrededor del retículo endoplasmático (RE) se forma un enlace covalente entre el lípido y la proteína microsomal (11:3), siendo los dienos conjugados indicadores de la peroxidación lipídica y a los 5 minutos la presencia de lípidos reflejan una etapa transitoria en la alteración de los ácidos grasos poliinsaturados del RE[58].

A los de 30 min de la intoxicación se percibe a través del microscopio electrónico una lesión en el RE rugoso con la consecuente desprendimiento de sus ribosomas, seguido de una disminución de la síntesis proteica y una depresión de la actividad enzimática de la 6-glucosa fosfatasa y de las enzimas del citocromo P450 y finalmente una inhibición en el secuestro de calcio, durante las tres primeras horas se visualiza la presencia de unas gotitas de grasa, como resultados de la acumulación de triglicéridos a nivel de los hepatocitos y de Ca^{2+} extracelular, una lesión en la membrana del RE Liso, lesión en el lisosoma y en las zonas centrolobulillares del hepatocito, con modificaciones en su estructura intracelular y una eventual ruptura de su membrana plasmática[24,59,60].

Ahora se sabe que la activación metabólica a un radical reactivo puede ser el primer evento, pero la producción de radicales lipídicos son los verdaderos responsables de las reacciones en cadena que conducen a una peroxidación lipídica y de la toxicidad celular, teniendo entre sus objetivos a los lípidos de la membrana, para fragmentarlos y el grupo tiol de las enzimas, pero la interferencia con la homeostasis del calcio es el evento más importante[28,61].

Aunque es evidente que la hepatotoxicidad del CCl_4 genera numerosos cambios bioquímicos y estructurales; no es posible identificarse al evento crítico que ocasiona necrosis celular, posiblemente el evento crucial sería el incremento de la permeabilidad y una eventual ruptura de la membrana plasmática, además de:

- La formación del hígado graso, por una disminución del complejo de lipoproteínas responsables del transporte de lípidos fuera de los hepatocitos.

- Una lesión en el RER que incapacita la síntesis proteica y la activación del CYP2E1, conduciendo a una fibrosis, cirrosis y procesos inflamatorios[62,63,64].

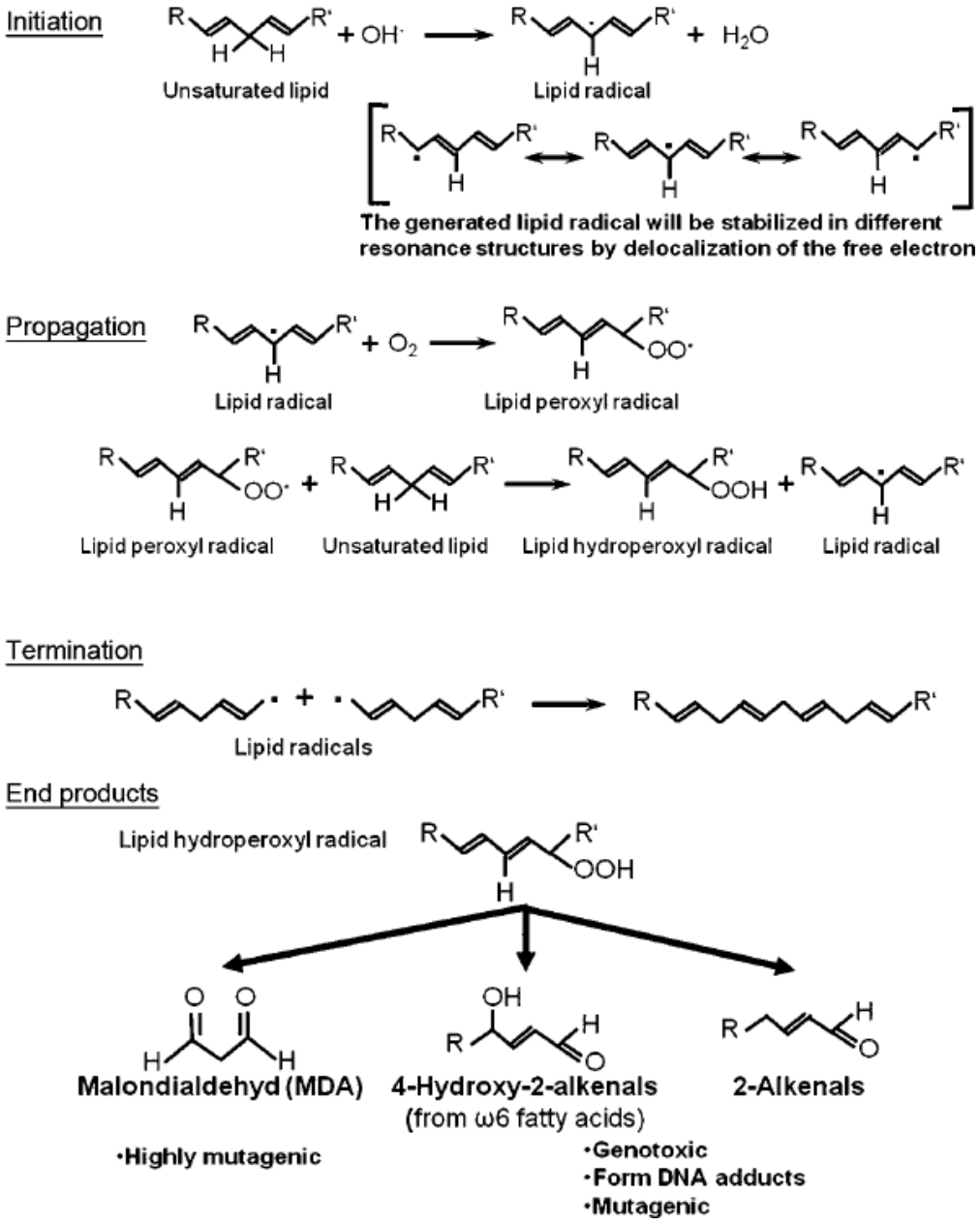


Figura 5. Química de la peroxidación lipídica. Destrucción peroxidativa de un lípido poliinsaturado iniciada por un ataque de radicales libres como el radical triclorometilo ($CCl_3^{\bullet}$)
Fuente. Tomado de Leukocytes and oxidative stress. Asian Journal of Andrology Ralf Henkel, 2011[61].

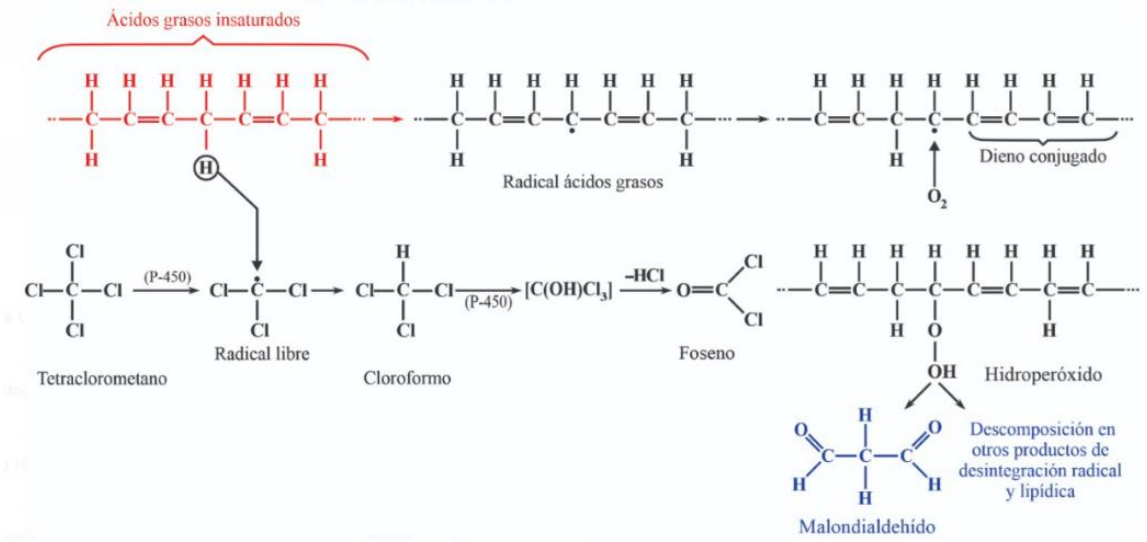


Figura 6. Metabolismo del tetracloruro de carbono. Tras la activación metabólica se forma un radical $CCl_3^{\bullet}$ que extrae protones de ácidos grasos insaturados para formar un ácido graso libre radical. Esto conduce a conjugados dieno. Al mismo tiempo, el O_2 forma un hidroperóxido con el radical C. Tras su descomposición, se ha formado el malondialdehído y otros productos de desintegración. Por el contrario, el radical $CCl_3^{\bullet}$ se convierte en cloroformo, que sufre un metabolismo oxidativo adicional.
Fuente. Tomado de Hodgson. A textbook of modern toxicology. p.162[3].

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

El tipo de estudio fue experimental y el diseño fue aplicado; longitudinal, analítico, comparativo y prospectivo.

Se realizó en el laboratorio del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; mientras que, el estudio histopatológico fue realizado en la Facultad de Medicina, ambas facultades pertenecientes a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

3.2 Recolección e identificación del material vegetal

Los frutos maduros del *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose fueron recolectados en el sector Monterrey del distrito de Paiján (80 m), provincia de Ascope y región La Libertad. La identificación y confirmación taxonómica del fruto fue realizado en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988) y extendiéndose la constancia del espécimen № 048-USM-2019 para futuras referencias, ver anexo 1.

División : Magnoliohyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Caryophyllidae
Orden : Caryophyllales
Familia : Cactaceae
Género : *Hylocereus*
Especie : *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose

Nombres comunes: pitahaya roja, Dragonfruit, Nigth blooming Cereus, Stranberry Pear, Belle of the night (países anglohablantes), Belle de nuit (Francia), Orejona (Nicaragua), Dragon fruit, Distelbrin (Alemania), pitahaya o fruta de dragón (Perú), Conderella Plant, Pitahava, pitahaya (Colombia)[14,15].

3.3 Obtención del extracto

Los frutos frescos de *Hyloceres cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose (4 kg), fueron triturados para la reducción del tamaño y homogenizados en una solución de 1 L de etanol de 96 °GL, para su maceración durante 7 días, en ausencia de la luz y calor, agitando dos veces por día. Posteriormente, el extracto se filtró al vacío con papel Whatman № 42 y se concentró en un evaporador rotatorio a una temperatura de 45 °C. El extracto sólido se conservó en refrigeración para análisis posteriores.

3.4 Estudio fitoquímico

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios en el EEtHm, se realizaron ensayos químicos con determinados reactivos, que permitieron su identificación, calificándose como ausencia o presencia, mediante los ensayos de coloración y/o precipitación con modificaciones, considerando: flavonoides (Shinoda), compuestos fenólicos (cloruro férrico), taninos (cloruro férrico, gelatina), triterpenos y esteroides (Liebermann-Buchard), alcaloides (Dragendorff, Mayer, Wagner), quinonas (Bornträger), saponinas (ensayo de espuma)[66,67,68,69].

3.5 Evaluación de la actividad antioxidante

3.5.1. Método del radical DPPH•

Se aplicó el método propuesto por Brand-Williams[69], basada en la reducción del radical DPPH• por antioxidantes y medida a 517 nm de absorbancia, para ello se preparó una solución madre de 40 mg/100 mL de 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH• Sigma) en metanol y se almacenó protegida de la luz a 4 °C. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400 µL del solvente de la muestra problema (agua) y 800 µL de metanol, posteriormente se colocó en un tubo de ensayo 400 µL de la muestra problema y 800 µL de la solución de trabajo de DPPH• y se agitó. Se dejó en reposo durante 30 minutos protegido de la luz y se leyó las absorbancias a 517 ηm. Las diferentes concentraciones de 20,5; 51,2; 128 y 320 µg/mL se leyeron por triplicado. Adicionalmente debido a que la muestra era ligeramente coloreada se realizó un blanco de muestra para cada concentración al cual se le agregó 400 µL de muestra y se le añadió 800 µL de metanol. Se realizó el mismo procedimiento para el tubo control al cual se le agregó 400 µL de solvente de la muestra problema. Con

los valores de absorbancia obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres ($DPPH^{\bullet}$), mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. } DPPH^{\bullet} - \text{Abas. muestra})}{\text{Abs. } DPPH^{\bullet} - \text{Abs. muestra})} \times 100$$

La concentración efectiva media (IC_{50}) del extracto liofilizado que neutraliza al 50 % de los radicales de $DPPH^{\bullet}$ se obtiene de la recta obtenida al graficar el porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra (μg/mL)[70].

3.5.2 Método del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$

Se aplicó el método descrito por Kuskoski et al.[19] el radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtuvo tras la reacción de $ABTS^{\bullet+}$ (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (25 °C ± 5 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con agua hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,1) a 734 ηm. Se calibró el espectrofotómetro utilizando agua destilada como blanco. Se colocó en un tubo de ensayo 20 μL de la muestra y 980 μL de la solución de trabajo de $ABTS^{\bullet+}$ se agitó y se dejó en reposo durante 7 minutos protegidos de la luz y se leyeron las absorbancias a 754 ηm. Se realizó la lectura de las diferentes concentraciones de muestra (56, 8; 113, 5; 227; 454 y 908 μg/mL) por triplicado. Se realizó el mismo procedimiento para el tubo control al cual se le agregó el solvente (agua) en reemplazo de la muestra. Para la curva obtenida se calculó la regresión lineal, con los resultados se determinó el IC_{50} a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50 % de los radicales libres por el $ABTS^{\bullet+}$[71,72,73].

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. } ABTS^{\bullet+} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. } ABTS^{\bullet+} - \text{Abas. muestra})} \times 100$$

3.6 Evaluación del efecto hepatoprotector

3.6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ejemplares de *Rattus norvegicus* var. *albinus,* hembras con peso de 125 ± 25 g, de 8 a 10 semanas de nacidos, los cuales fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud del Perú; luego fueron trasladadas al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Vegetales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, donde fueron aclimatadas a una temperatura controlada de 22 ± 3 °C, humedad relativa de 55 ± 15 %, ventilación de aire 12 - 18 veces/h y un ciclo de luz/ oscuridad de 12 h de 150 - 300 lux, con acceso libre de alimento y agua[3,27,74].

3.6.2 Tratamiento de los animales

Para los experimentos de estudio preventivo, 48 ratas se distribuyeron por igual en seis grupos[27,56,74].

a. **Grupo I:** donde los animales recibieron aceite de oliva y solución salina que sirvió como vehículo del control.
b. **Grupo II:** donde los animales recibieron EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva.
c. **Grupo III:** donde los animales recibieron por vía oral una mezcla de CCl_4 y solución salina, como control de la intoxicación por CCl_4. La administración aguda de CCl_4 consistió de una dosis oral de 1,2 g/kg de una mezcla de 1:1 (v/v) de CCl_4 y aceite de oliva.
d. **Grupo IV:** donde los animales recibieron dosis de EEtHm a 0,5 mg/kg y CCl_4.
e. **Grupo V:** donde los animales recibieron dosis de EEtHm a 1,0 mg/kg y CCl_4.
f. **Grupo VI:** donde los animales recibieron CCl_4 y silimarina a una dosis de 20 mg/kg, como grupo de tratamiento con silimarina.

3.6.3 Ensayos bioquímicos

Después del tratamiento con EEtHm, se recolectó la sangre de la aorta abdominal de la rata bajo anestesia con pentobarbital sódico, el suero se separó por centrifugación a 2500 rpm a 4 °C durante 15 min. La FAL, TGO, BT, BD, BI, PT, ALB y GLOB,

fueron determinadas por un analizador de sangre automático (modelo ES-102, marca Bioelab, tecnología China) [3,4,5,9,23,27,28,29,52,74].

3.6.4 Estudio histopatológico

Se transfirieron inmediatamente pequeñas muestras de tejido hepático fresco de ratas a una solución de formol al 10 % para una fijación adecuada e incrustaron en parafina para su procesamiento posterior. Se prepararon de forma rutinaria secciones delgadas de parafina de 5 a 6 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Cada muestra fue examinado al microscopio para evaluar la gravedad de las lesiones histopatológicas generadas en los tejidos hepáticos por intoxicación aguda con el CCl_4[12,19,32,34,39,54,55].

3.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar y todas las comparaciones estadísticas se analizaron mediante la prueba de ANOVA seguida de la prueba Posthoc de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró significativo $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Tabla 2. Metabolitos secundarios en el extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm)

Prueba	Metabolitos secundarios	Resultado	Presencia
$FeCl_3$	Compuestos fenólicos	Coloración verde o azul	+++
Lieberman	Triterpenoides	Anillo pardo	+
Burchard	Esteroides	Coloración rojiza a verde	+
Índice de espuma	Saponinas	1 cm persistente	+
Bornträger	Antraquinonas	Color rojo	-
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado naranja	-
Bertrand	Alcaloides	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanco	-
Shinoda	Flavonoides	Coloración rojiza intensa	+++
Gelatina	Taninos	Ligeramente blancuzco	+

Leyenda: Abundante (+++), moderada (++), poca presencia (+), ausencia (-)

Metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose

En la tabla 2, los resultados del Tamizaje Fitoquímico del EEtHm, evidencia una variedad de metabolitos secundarios, entre ellos los flavonoides y compuestos fenólicos y su elevada presencia en el fruto le atribuye una potente actividad antioxidantes por su capacidad de eliminar radicales libres, disminuir la velocidad del proceso del daño oxidativo y obstaculizar la peroxidación lipídica en el hígado, evidenciando a su vez una actividad hepatoprotectora[67,68,69,75,76,77,78.]

Tabla 3. Actividad antioxidante del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) por el método de DPPH•

Concentración del extracto (µg/mL)	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Inhibición (%) DPPH•
0	0,429*	0,005	0
0,833	0,39*	0,003	9,144
1,667	0,353*	0,007	17,869
3,333	0,289*	0,010	32,811
6,667	0,173*	0,004	59,776
IC_{50} (µg/mL)		**5,4415**	

Tabla 4. Resultados de la actividad antioxidante del estándar Trolox por el método del radical DPPH•

Concentración del Trolox (µg/mL)	Promedio Absorbancia	Desviación estándar	Inhibición (%) DPPH•
0	0,484	0,004	0
0,417	0,444	0,011	8,162
0,833	0,41	0,080	15,208
1,667	0,323	0,005	33,283
3,333	0,156	0,009	67,669
IC 50 (µg/mL)		2,480	

En las Tabla 3 y 4 se describen las IC_{50} (concentración mínima inhibitoria al 50 %), para el extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* registró un valor de 39,379 µg/mL y para el Trolox fue de 2,480 µg/mL. El valor de la actividad antioxidante equivalente al Trolox fue 455,756 mg Trolox/g EEtHm mediante el ensayo de DPPH•

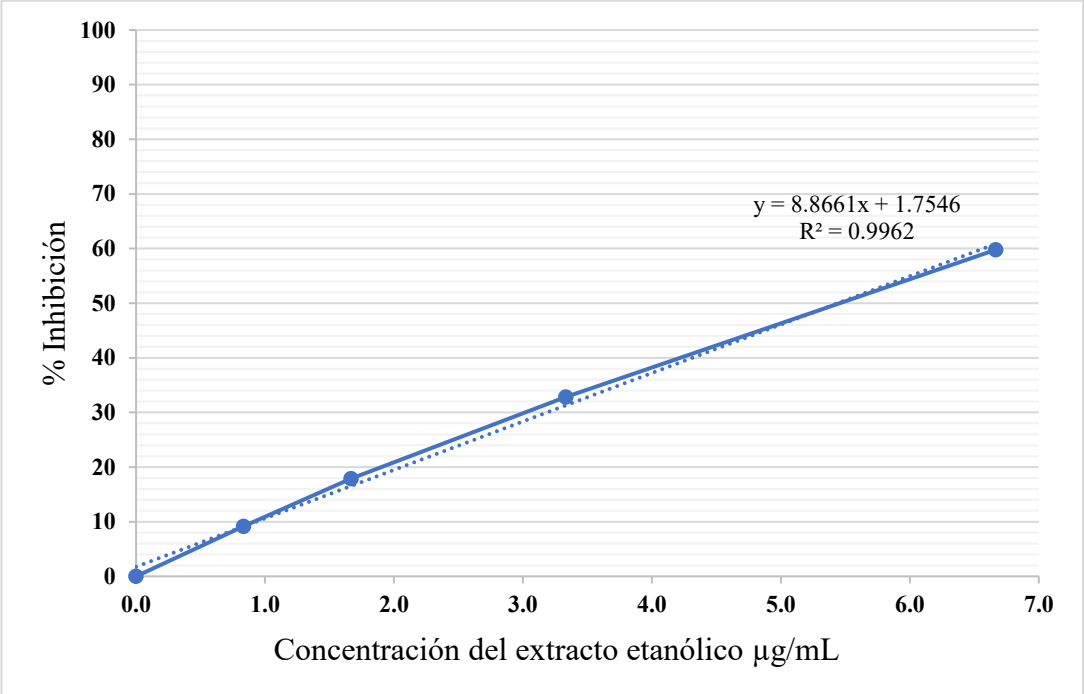


Figura 7. Dispersión entre las concentraciones del extracto etanólico versus el % de inhibición del radical DPPH•

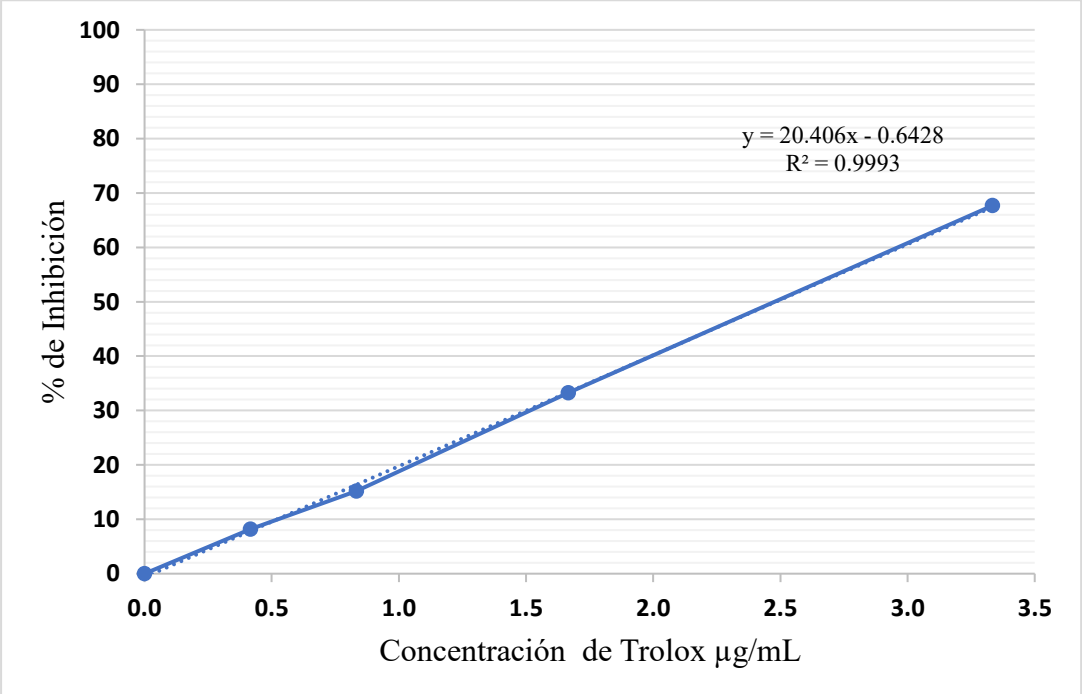


Figura 8. Dispersión entre las concentraciones de la solución estándar de Trolox versus % de inhibición del radical DPPH•

Tabla 5. Actividad antioxidante del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* por el método de $ABTS^{\bullet+}$

Concentración del extracto ((µg/mL)	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Inhibición (%) $ABTS^{\bullet+}$
0	0,737*	0,003	0
20	0,650*	0,003	11,914
40	0,560*	0,009	24,105
80	0,406*	0,014	44,922
120	0,219*	0,006	70,302
IC_{50} (µg/mL)		**86,211**	

Tabla 6. Actividad antioxidante del estándar Trolox por el método $ABTS^{\bullet+}$

Concentración Trolox (µg/mL)	Promedio de absorbancia	Desviación estándar	Inhibición (%) $ABTS^{\bullet+}$
0	0,681	0,003	0
1	0,558	0,003	18,085
2	0,443	0,007	35,03
3	0,344	0,005	49,567
4	0,231	0,005	66,032
IC_{50} (µg/mL)		**2,994**	

La concentración mínima inhibitoria al 50 % (IC_{50}) fue 86,211 µg/mL para **el** extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* y para el trolox fue 2,99 µg/mL. El valor del TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox) fue 34,682 mg trolox/g de EEtHm mediante el ensayo de $ABTS^{\bullet+}$.

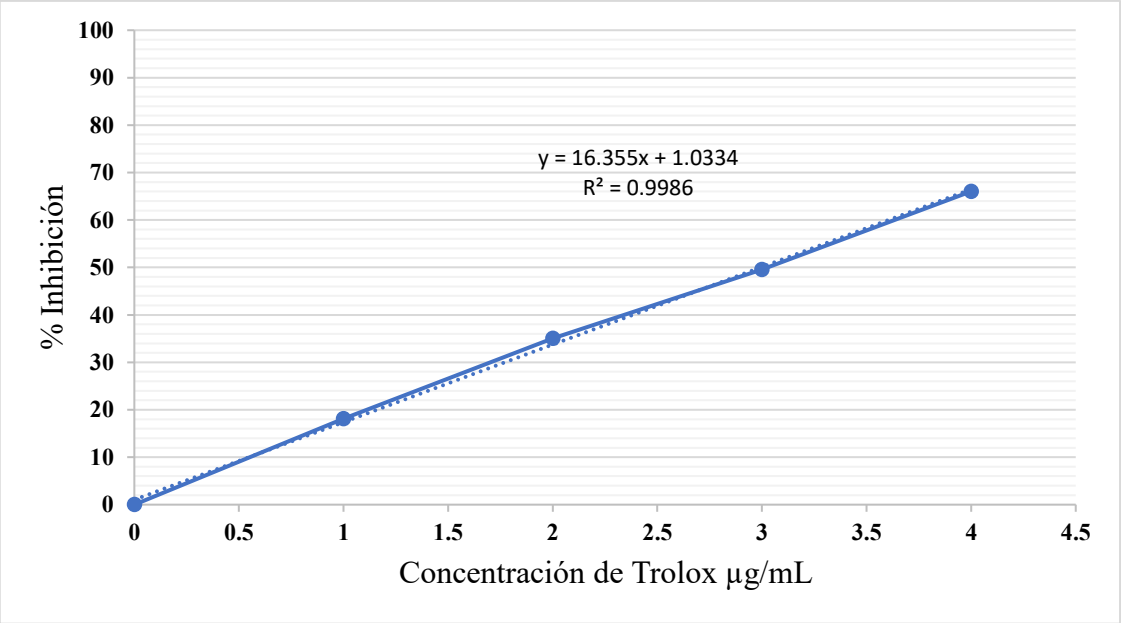


Figura 9. Dispersión entre las concentraciones de la solución estándar de Trolox versus % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$

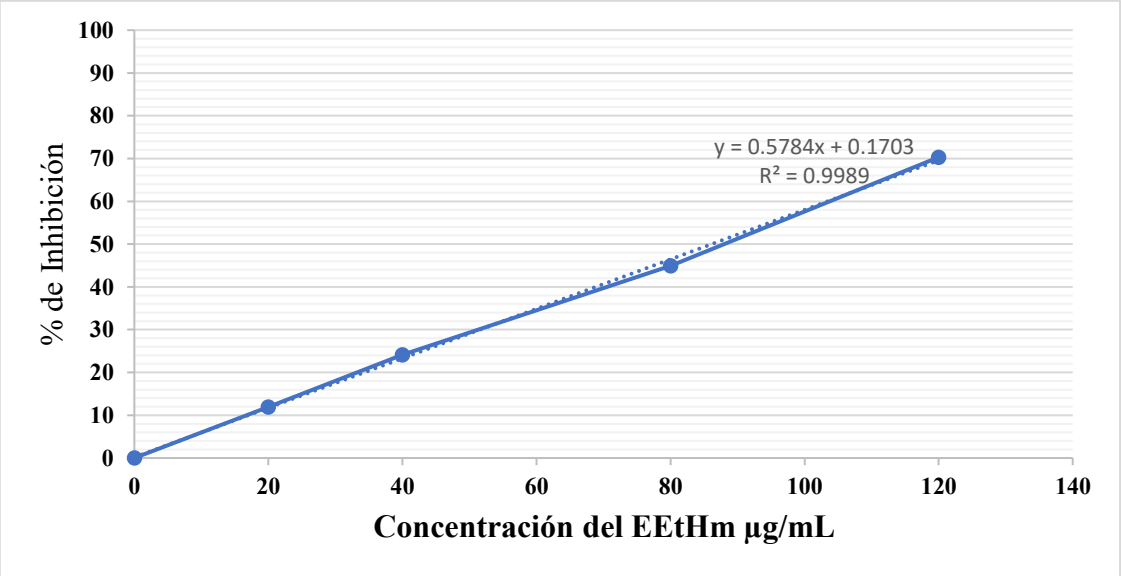


Figura 10. Dispersión entre las concentraciones del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* versus % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$

Tabla 7. Valores de la bilirrubina total (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

	Grupos experimentales y valores de bilirrubina total (mg/dL)					
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	1,41	1,59	3,68	1,91	1,68	1,43
Rn2	1,54	1,52	3,56	1,92	1,63	1,46
Rn3	1,49	1,56	3,51	1,88	1,69	1,49
Rn4	1,41	1,61	3,56	1,86	1,71	1,45
Rn5	1,42	1,63	3,49	1,79	1,66	1,49
Rn6	1,47	1,61	3,61	1,90	1,68	1,42
Rn7	1,43	1,59	3,42	1,85	1,74	1,50
Rn8	1,45	1,62	3,45	1,98	1,76	1,41
Promedio ± DE	1,45±0,05	1,59±0,04	3,54±0,09	1,89±0,06	1,69±0,04	1,46±0,03

DE: Desviación estándar

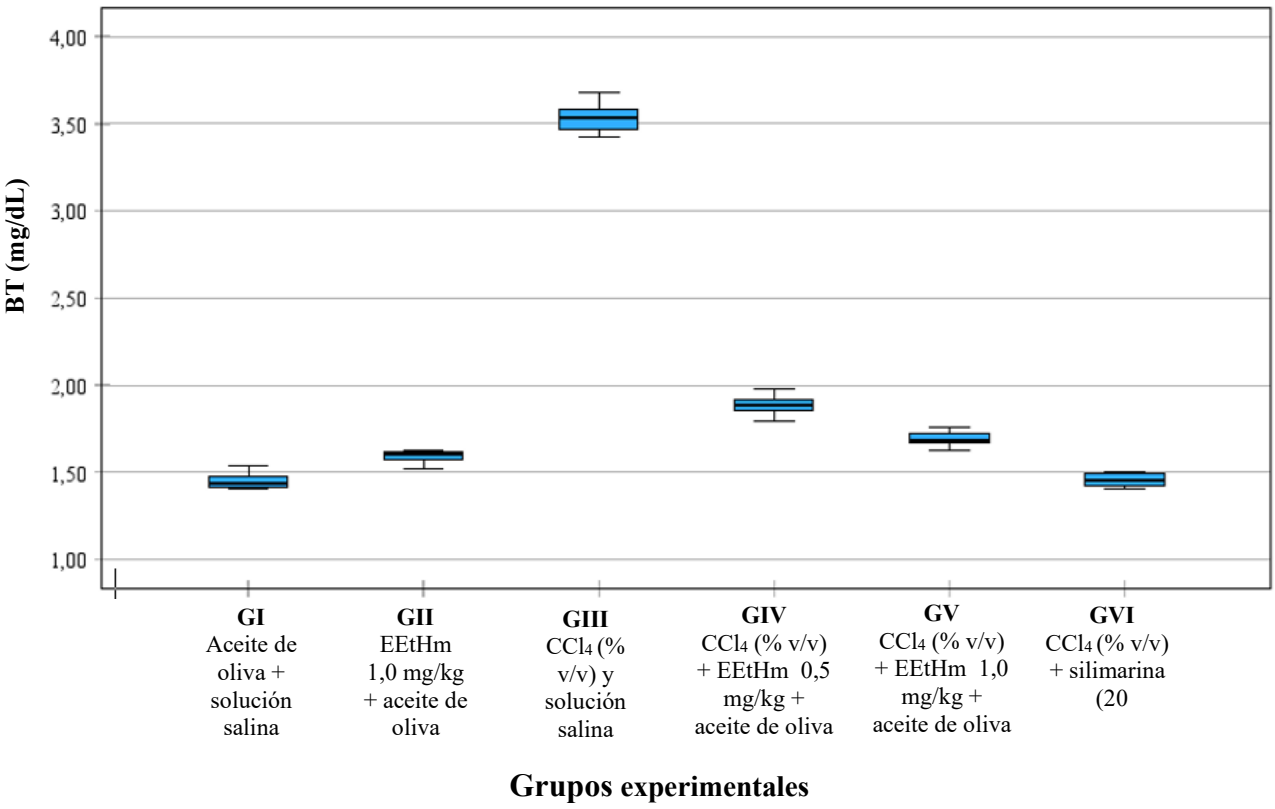


Figura 11. Valores de la bilirrubina total (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 8. Valores de la bilirrubina directa (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

	Grupos experimentales de la bilirrubina directa (mg/dL)					
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	0,52	0,79	1,94	1,12	0,71	0,64
Rn2	0,57	0,78	1,85	1,07	0,71	0,62
Rn3	0,60	0,75	1,83	1,04	0,72	0,63
Rn4	0,55	0,74	1,92	1,13	0,69	0,64
Rn5	0,54	0,71	1,89	1,03	0,73	0,58
Rn6	0,56	0,74	1,77	1,05	0,68	0,61
Rn7	0,51	0,72	1,82	1,06	0,74	0,63
Rn8	0,56	0,73	1,92	1,11	0,71	0,54
Promedio ± DE	0,55±0,03	0,75±0,03	1,87±0,06	1,08±0,04	0,71±0,02	0,61±0,03

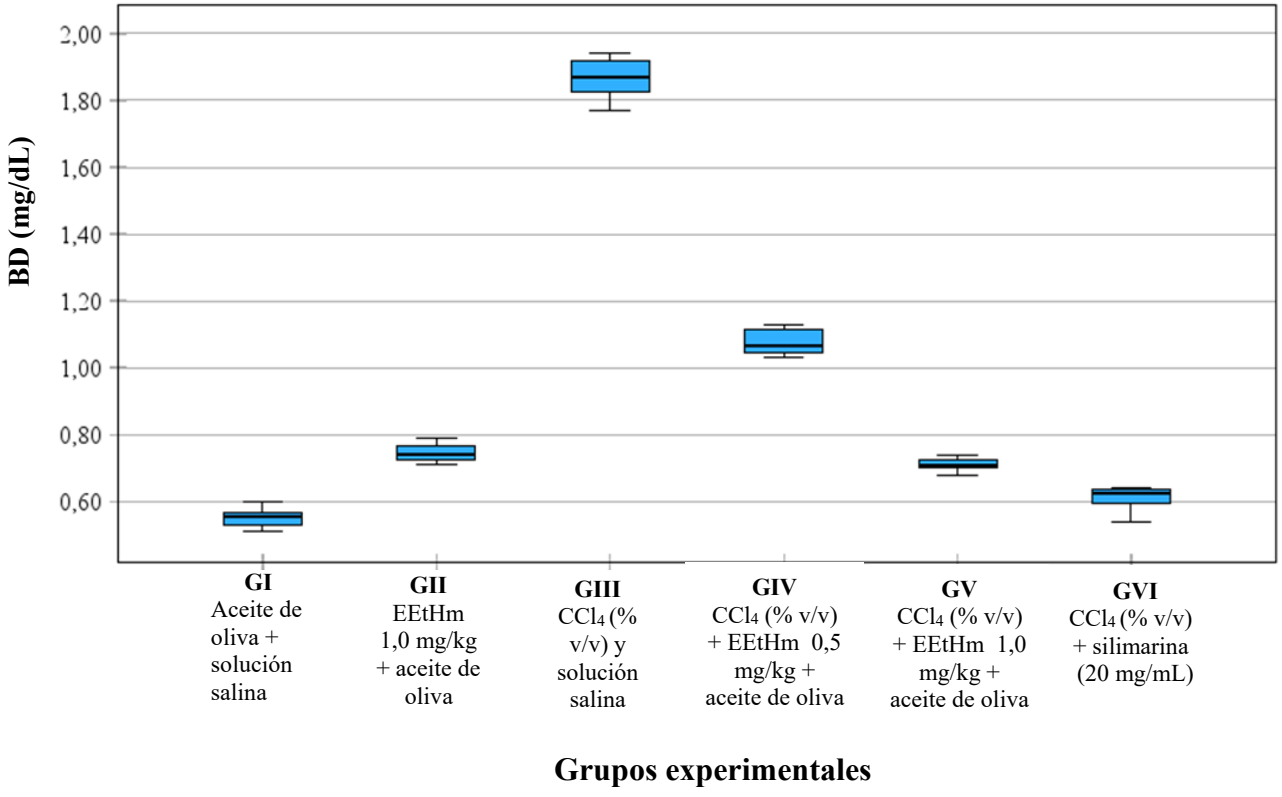


Figura 12. Gráfica de los valores de la bilirrubina directa (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 9. Valores de la bilirrubina indirecta (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

	Grupos experimentales y valores de bilirrubina indirecta (mg/dL)					
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	0,89	0,8	1,74	0,79	0,97	0,79
Rn2	0,97	0,74	1,71	0,85	0,92	0,84
Rn3	0,89	0,81	1,68	0,84	0,97	0,86
Rn4	0,86	0,87	1,64	0,73	1,02	0,81
Rn5	0,88	0,92	1,60	0,76	0,93	0,91
Rn6	0,91	0,87	1,84	0,85	1	0,81
Rn7	0,92	0,87	1,60	0,79	1	0,87
Rn8	0,89	0,89	1,53	0,87	1,05	0,87
Promedio ± DE	0,90±0,03	0,85±0,06	1,67±0,10	0,81±0,05	0,98±0,04	0,85±0,04

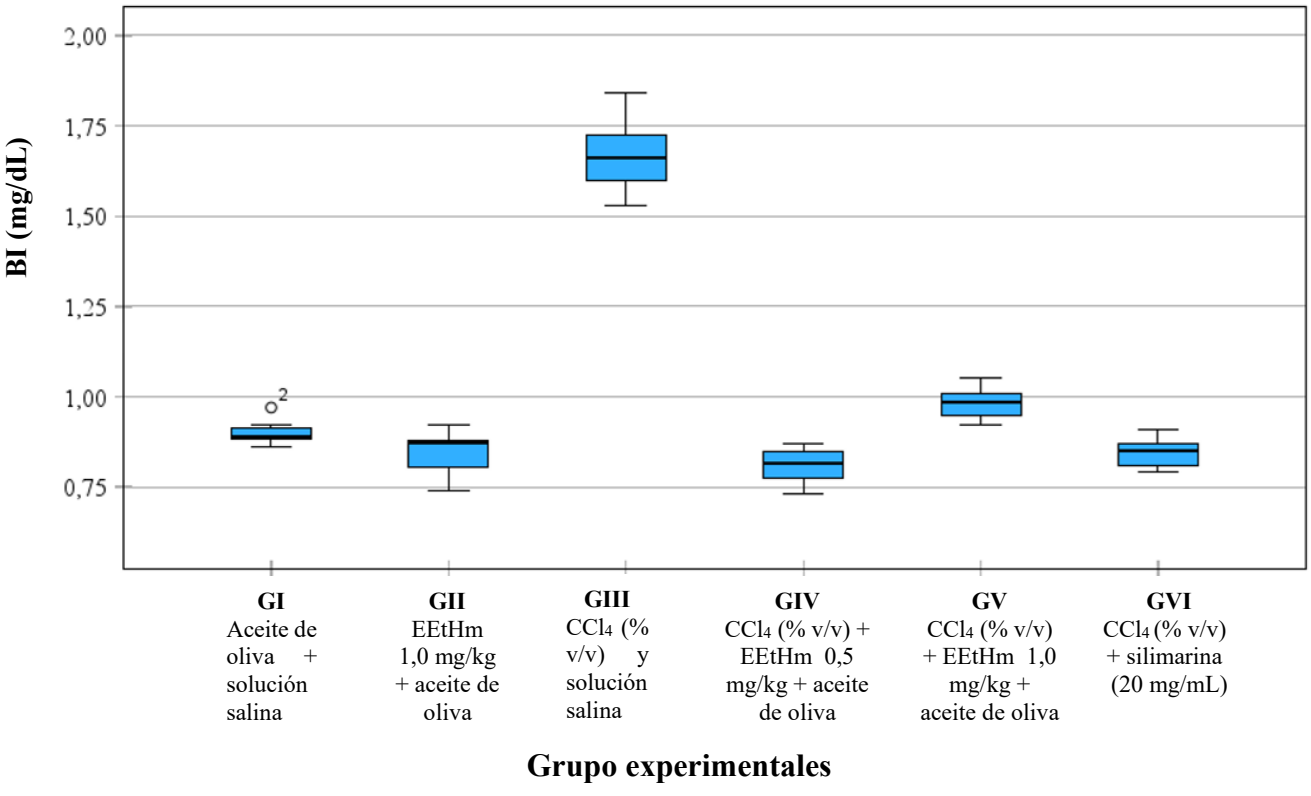


Figura 13. Valores de bilirrubina indirecta (mg/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 10. Valores de las proteínas totales (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

	Grupos experimentales y valores de proteínas totales (g/dL)					
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	7,12	7,39	3,92	5,02	5,45	6,76
Rn2	7,71	7,72	3,88	4,81	5,67	6,29
Rn3	7,39	7,78	3,87	4,90	5,71	6,53
Rn4	7,53	7,66	3,73	4,51	5,66	6,57
Rn5	7,87	7,22	3,58	4,96	5,76	6,89
Rn6	7,79	7,12	3,87	4,42	5,82	6,39
Rn7	7,62	7,65	3,82	4,66	5,51	6,48
Rn8	7,89	7,24	3,61	4,56	5,81	6,93
Promedio ± DE	7,62±0,26	7,47±0,26	3,79±0,13	4,73±0,22	5,67±0,13	6,61±0,23

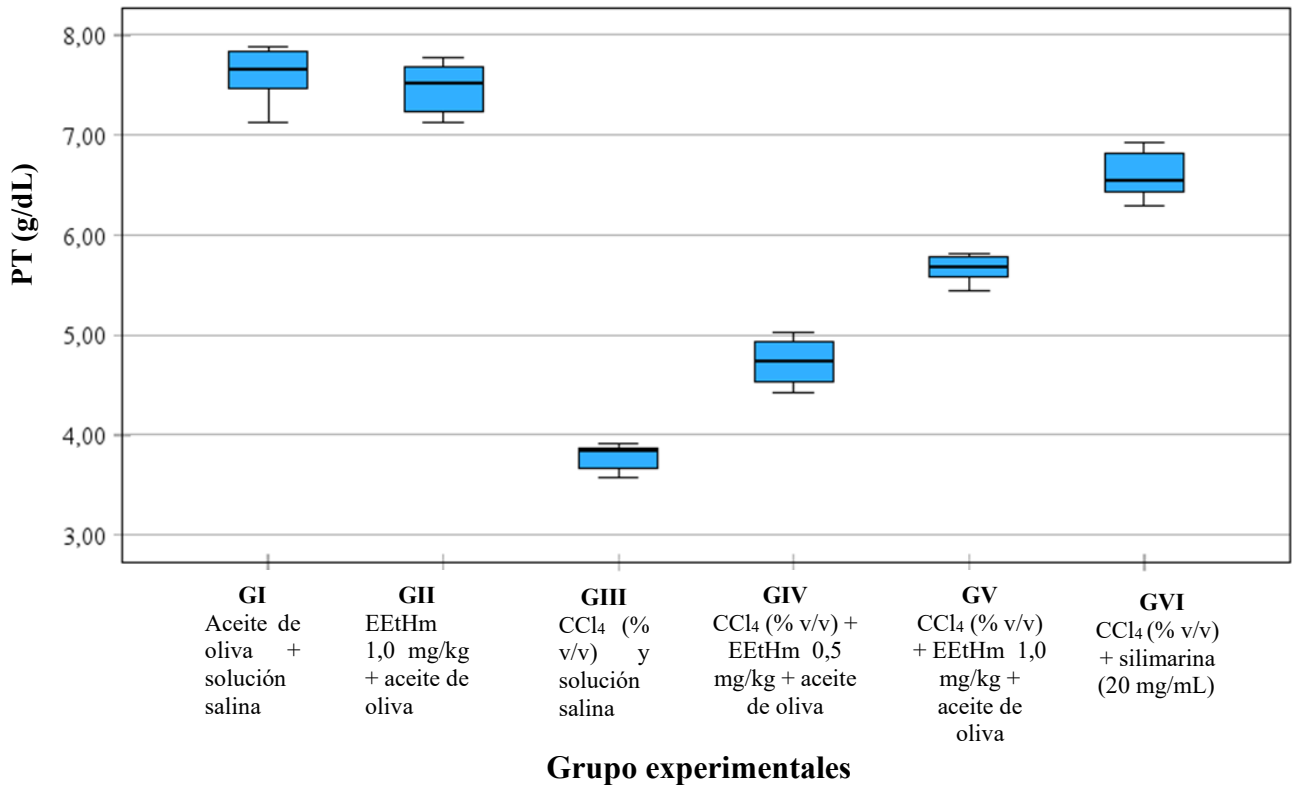


Figura 14. Valores de las proteínas totales (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 11. Valores de la albumina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Grupos experimentales y valores de albumina (g/dL)						
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	4,68	4,69	3,13	3,77	4,21	4,54
Rn2	4,89	4,15	3,26	3,61	4,35	4,58
Rn3	4,54	4,51	3,11	3,75	4,36	4,44
Rn4	4,47	4,43	3,21	3,63	4,17	4,34
Rn5	4,49	4,29	3,17	3,43	4,32	4,31
Rn6	4,65	4,39	3,22	3,49	4,46	4,32
Rn7	4,45	4,27	3,37	3,57	4,56	4,34
Rn8	4,65	4,01	3,12	3,64	4,34	4,46
Promedio ± DE	4,60±0,15	4,34±0,21	3,20±0,09	3,61±0,12	4,35±0,12	4,42±0,10

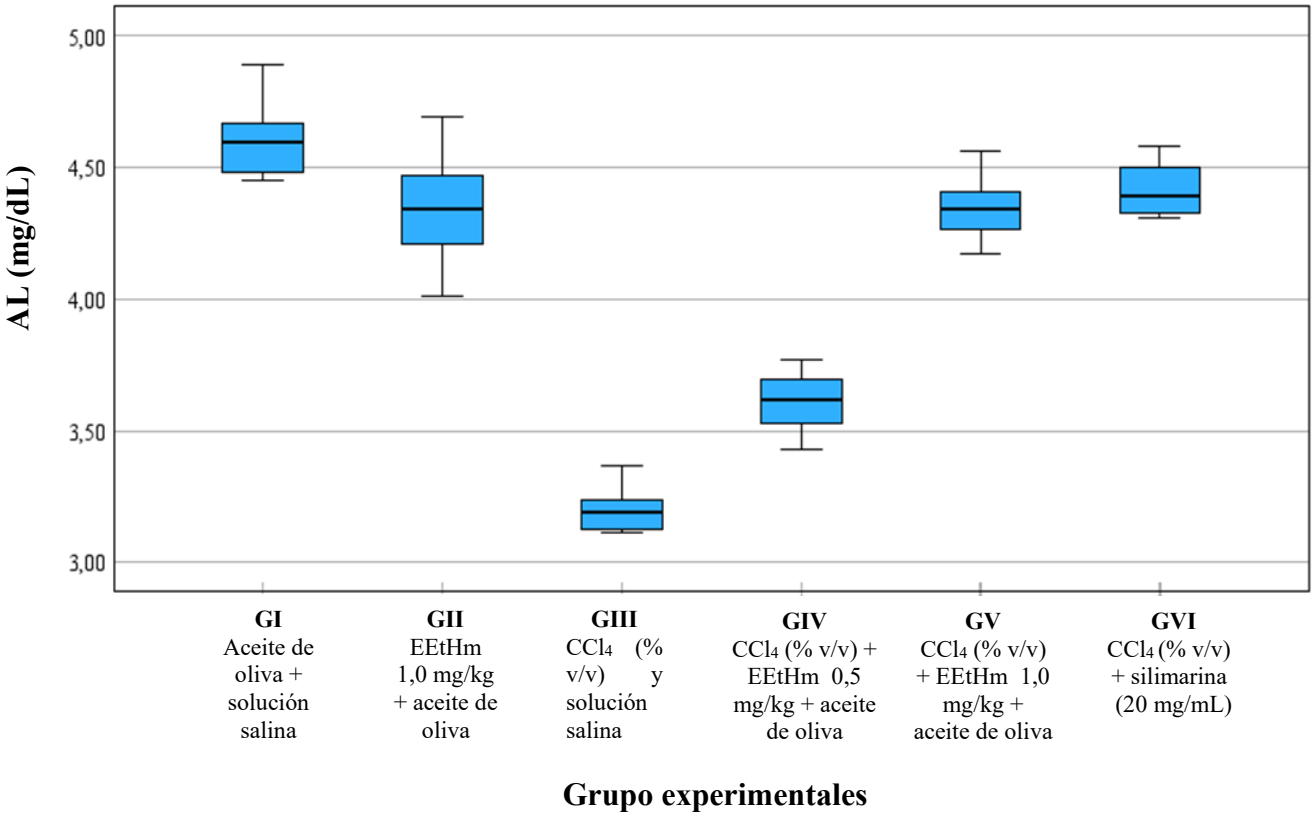


Figura 15. Valores de la albumina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 12. Valores de la globulina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Grupos experimentales de la globulina (g/dL)						
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	2,44	2,70	0,79	1,25	1,24	2,22
Rn2	2,82	3,57	0,62	1,20	1,32	1,71
Rn3	2,85	3,27	0,76	1,15	1,35	2,09
Rn4	3,06	3,23	0,52	0,88	1,49	2,23
Rn5	3,38	2,93	0,41	1,53	1,44	2,58
Rn6	3,14	2,73	0,65	0,93	1,36	2,07
Rn7	3,17	3,38	0,45	1,09	0,95	2,14
Rn8	3,24	3,23	0,49	0,92	1,47	2,47
Promedio ± DE	3,01±0,30	3,13±0,31	0,59±0,14	1,12±0,22	1,33±0,17	2,19±0,26

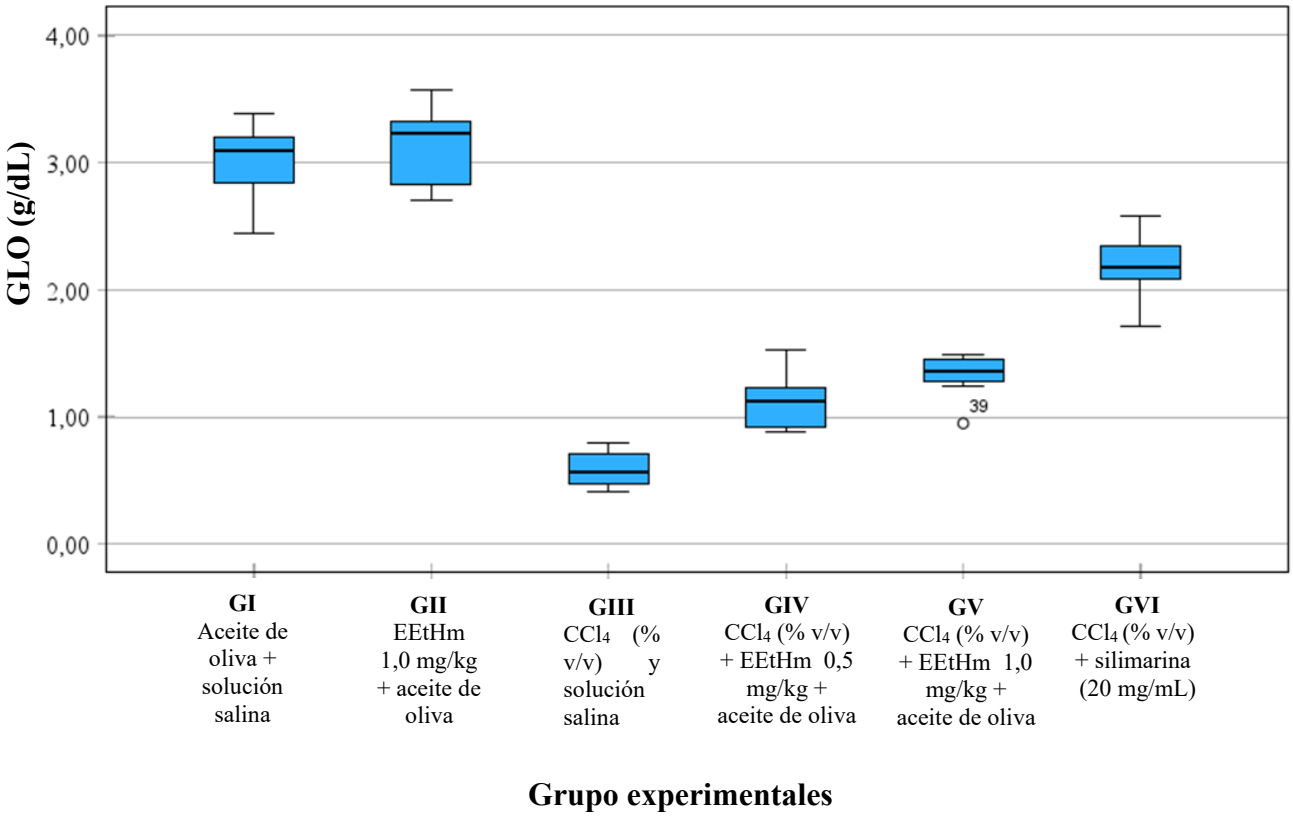


Figura 16. Valores de la globulina (g/dL) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 13. Valores de la fosfatasa alcalina (UI/L), en grupos experimentales (G) de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Grupos experimentales y valores de fosfatasa alcalina (UI/L)						
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	112,22	112,30	387,25	206,60	123,56	115,26
Rn2	106,70	110,48	383,24	219,82	118,55	115,25
Rn3	112,57	109,07	390,72	217,57	117,84	115,67
Rn4	108,21	112,15	388,68	215,71	117,59	118,28
Rn5	113,07	115,77	393,22	213,57	123,23	116,68
Rn6	107,34	105,87	401,67	215,27	112,43	119,20
Rn7	106,64	114,59	390,01	210,49	120,50	114,82
Rn8	109,42	109,93	398,89	208,95	118,56	119,60
Promedio± DE	109,52±2,72	111,27±31,5	391,71±6,07	213,50±4,50	119,03±3,54	116,85±1,92

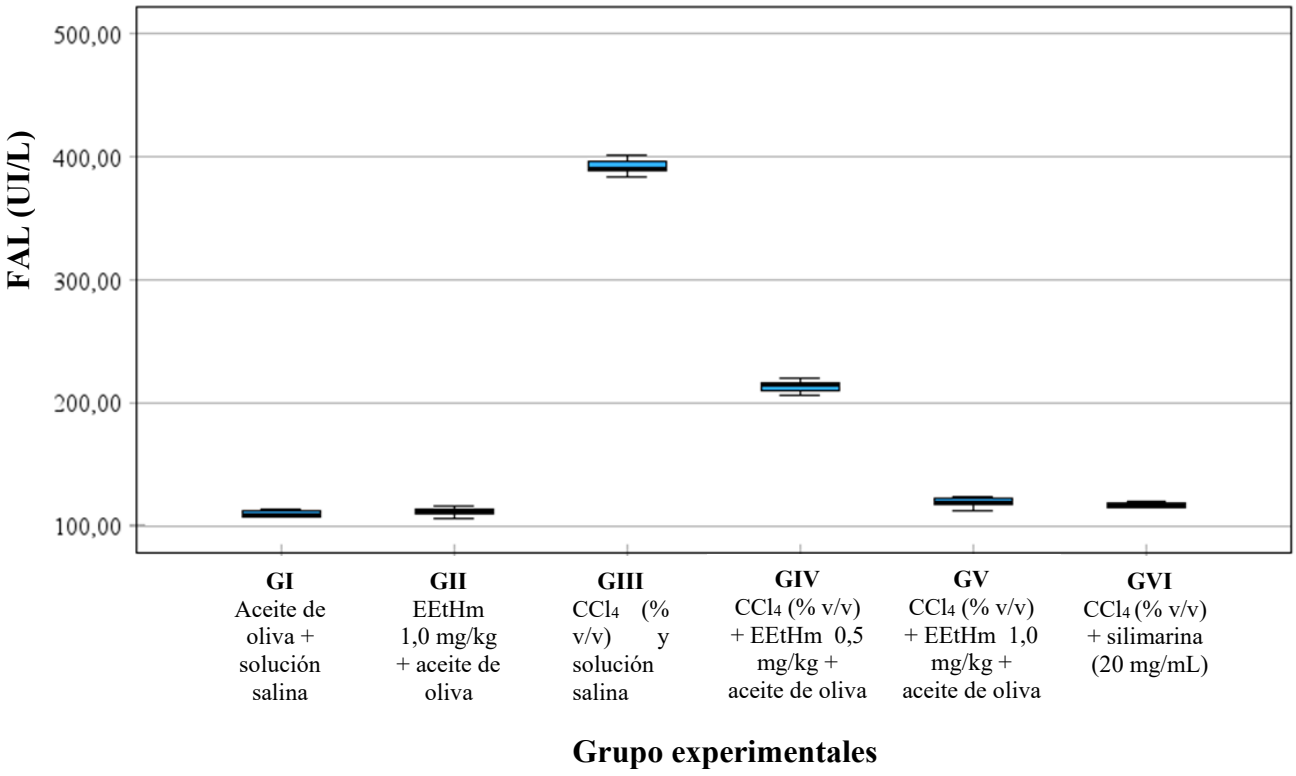


Figura 17. Valores de la fosfatasa alcalina (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina

Tabla 14. Valores de la transaminasa glutámico oxalacética (UI/L) en grupos experimentales (G) de ratas expuestas a diversos tratamientos

Grupos experimentales y valores de transaminasa glutámico oxalacética (UI/L)						
Código espécimen	**GI** Aceite de oliva + solución salina	**GII** EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GIII** CCl_4 (% v/v) y solución salina	**GIV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 0,5 mg/kg + aceite de oliva	**GV** CCl_4 (% v/v) + EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	**GVI** CCl_4 (% v/v) + silimarina (20 mg/mL)
Rn1	89,72	90,51	203,29	151,20	117,46	98,30
Rn2	90,97	89,06	204,55	151,88	120,12	93,60
Rn3	89,78	87,69	198,72	144,31	129,38	100,92
Rn4	91,85	87,27	197,92	154,85	116,87	96,65
Rn5	91,17	87,65	200,6	154,22	116,55	93,58
Rn6	89,90	84,91	205,54	156,29	115,26	93,10
Rn7	89.13	90,78	202,91	153,24	112,03	95,78
Rn8	91,60	92,54	200,67	143,12	100,22	96,83
Promedio ± DE	90,52±1,00	88,80±2,42	201,78±2,73	151,14±4,87	115,99±8,15	96,10±2,69

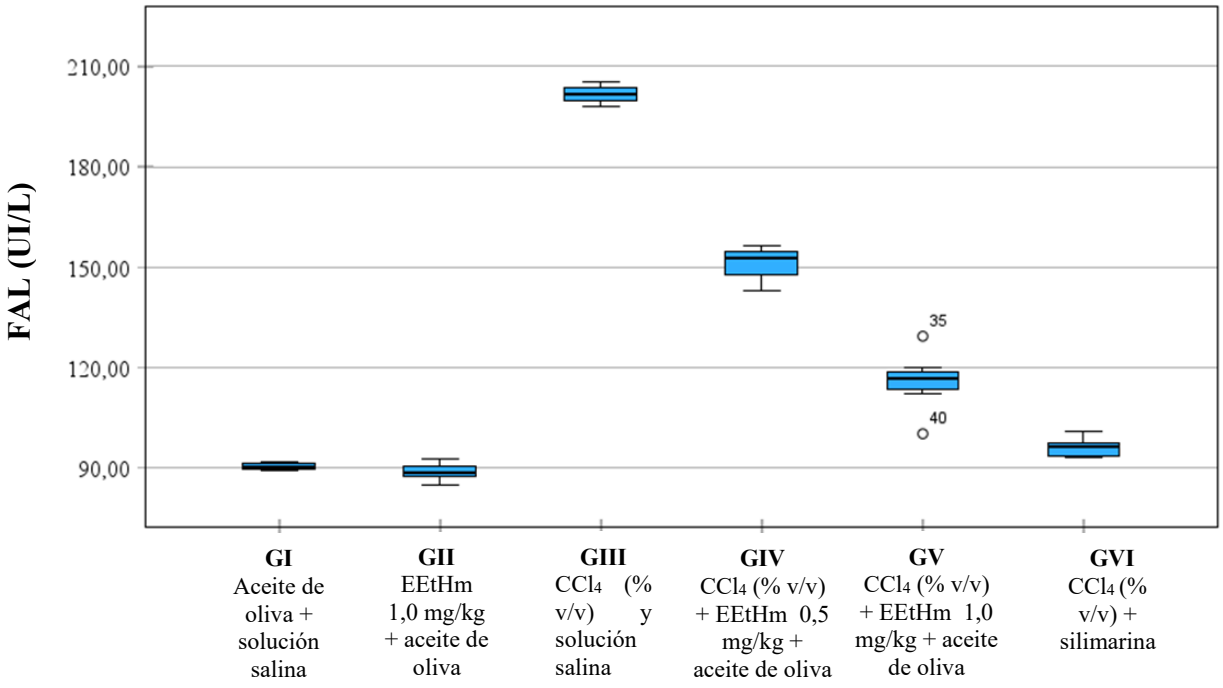


Figura 18. Representación gráfica de los valores de la transaminasa glutámico oxalacética (UI/L) en grupos experimentales de ratas expuestas a diversos tratamientos

Tabla 15. Reporte del efecto del extracto etanólico del *Hylocereus monocanthus* sobre los valores de la BT, BD, BI, PT, ALB, GLO, FAL, TGO, utilizando el modelo experimental del CCl_4

Grupos experimentales	Valores bioquímicos							
	BT (mg/dL)	**BD (mg/dL)**	**BI (mg/dL)**	**PT (mg/dL)**	**ALB (g/dL)**	**GLO (g/dL)**	**FAL (U/dL)**	**TGO (U/dL)**
GI: Control normal	1,410 ±0,065*	0,740 ± 0,054*	0,670 ± 0,071*	6,020 ± 0,981*	4,956± 0,515*	3,026 ± 0,892*	110,49 ± 2,795*	90,74 ± 1,988*
GII: EEtHm 1,0 mg/kg	1,540 ± 0,097*	0,810 ± 0,043*	0,156 ± 0,025*	5,990 ± 0,341*	4,956 ± 0,649*	3,026 ± 0,162*	112,35 ± 3,101*	89,96 ± 2,166*
GIII: Control con CCl_4	2,520 ± 0,089*	1,430 ± 0,146*	0,154 ± 0,057*	3,190 ± 0,493*	5,006 ± 0,609*	3,186 ± 0,795*	390.,78 ± 5,262	201,21 ± 4,2123*
GIV: EEtHm (0,5 mg/kg) + CCl_4	1,890 ± 0,098*	0,740 ± 0,097*	0,252 ± 0,046*	4,710 ± 0,578*	4,554 ± 0,336*	3,656 ± 0,365*	212,77 ± 5,870*	149,36 ± 4,871*
GV: EEtHm (1,0 mg/kg) + CCl_4	1,660 ± 0,175*	0,700 ± 0,011*	0,212 ± 0,098*	5,140 ± 0,836*	4,830 ± 0,884*	3,410 ± 0,480	120,63 ± 3,069*	115,74 ± 5,960*
GVI: Silimarina (50 µg/kg) + CCl_4	1,540 ± 0,164*	0,930 ± 0,023*	0,124 ± 0,066*	5,880 ± 0,799*	4,786 ± 0,753*	2,068 ± 0,191*	115,22 ± 2,121*	95,68 ± 3,580*

Valores promedio ± desviación estándar, por ocho animales de cada grupo. *p<0,05 comparaciones múltiples entre grupos de tratamiento con su respectivo indicador-T

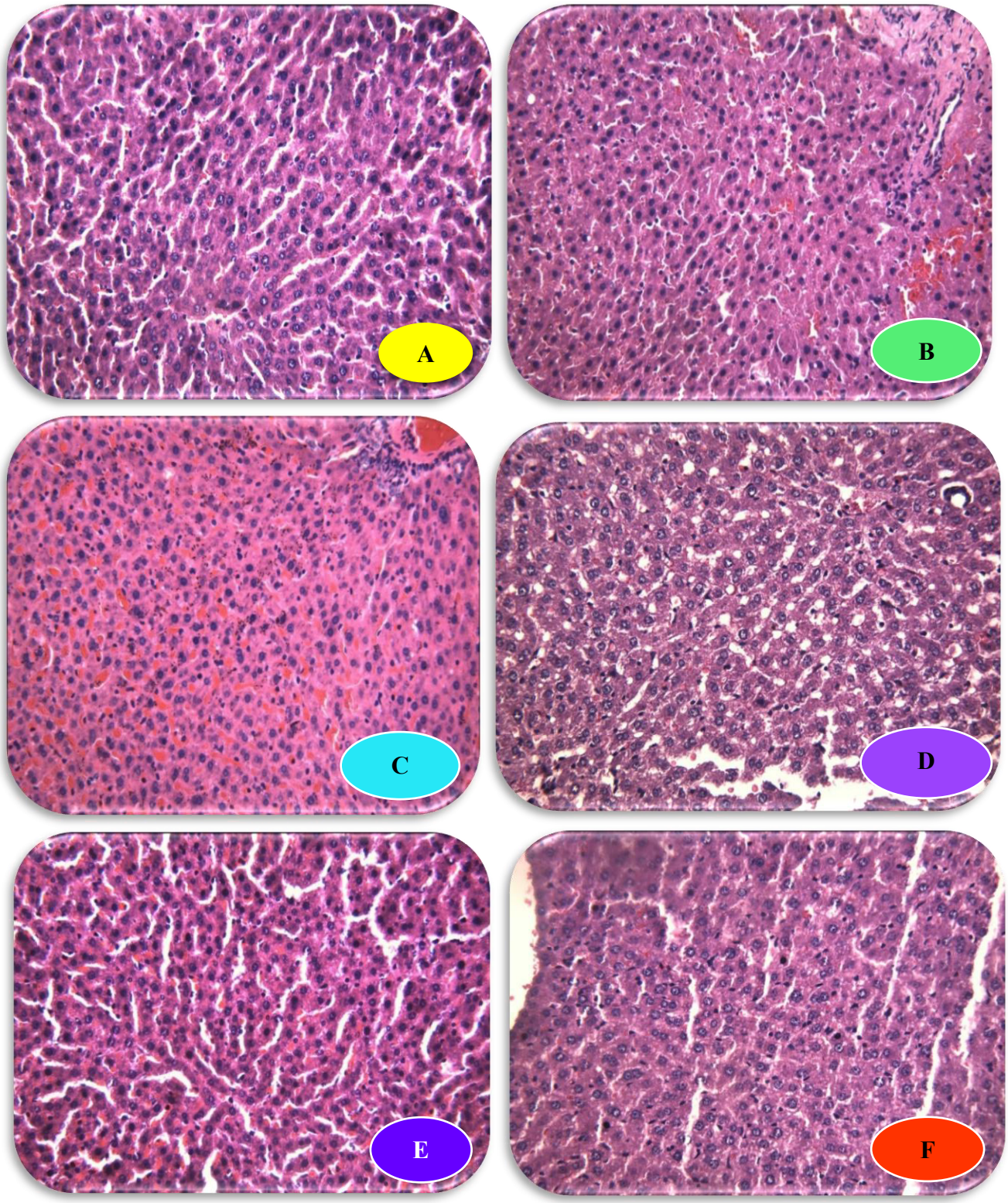


Figura 19. Características histopatológicas del hígado en los experimentos de estudio preventivo. Los tejidos hepáticos se tiñeron con H&E (100x). **A:** *GI. Control normal*; **B:** *GII. EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva*; **C:** *GIII. CCl_4 (%v/v) y solución salina,* **D:** *GIV. EEtHm (0,5 mg/kg) + CCl_4*; **E:** *GV. EEtHm (1,0 mg/kg) + CCl_4*; **F:** *GVI. silimarina (20 mg/kg) + CCl_4*

Fuente. Alfaro-Ayvar JR, Inostroza-Ruiz LA, Castro-Luna AJ. Efecto protector de Hylocereus monocanthus en la hepatotoxicidad aguda inducida por tetracloruro de carbono en ratas. Ciencia e Investigación. 2022. 25(1). p.7[78].

En la figura 19, se visualizan las características histopatológicas del hígado de ratas sometidos a tratamientos con EEtHm, CCl_4 y silimarina. El corte histológico del grupo GI correspondiente al grupo control, evidenció una estructura arquitectónica del hígado impecable, sin lesiones y con una ligera separación de los canalículos de la estación trilobular, el grupo GII correspondiente al grupo control del extracto experimental, mostró un hígado limpio sin lesiones y con canalículos biliares discontinuos, en comparación con el GIII representante del grupo control del hepatotóxico, evidenció una separación entre hepatocitos, una hemorragia intracanalicular y restos sanguíneos en toda la superficie de los hepatocitos edematizados, los grupos experimentales alimentados con EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg) GIV, evidenció una presencia de goticulas de grasa en la superficie del hepatocito y una ligera hemorragia intracanicular y el segundo grupo experimental GV alimentados con EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg, presentó hepatocitos con un ligero edema y una discreta hemorragia intracanalicular, finalmente el grupo GVI mostró un hígado limpio, con una separación de los canalículos, conductos hepáticos y separación de los espacios porta (espacios naturales).

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se planteó como objetivo general evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" (EEtHm) sobre la toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas.

Entre los metabolitos secundaros del extracto etanólico de *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" que se registran en la tabla 2, se destaca una abundante presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, en menor concentración los triterpenoides, esteroides, saponinas y taninos, que son detectados mediante el "tamizaje fitoquímico", una técnica cualitativa relativamente rápida y económica, basado en recciones de coloración y precipitación, la identificación de ciertos compuestos químicos presentes en las plantas nos brinda una información preliminar sobre su potencial biológico y farmacológico; pero no permite cuantificar su concentración e identificar algunas componentes químicos presentes en cantidades de traza o poseer grupos químicas particulares no detectables por la técnica[13,14,15,66,67,68,69,75,]

Otros investigadores como Flores J, realizó un cribado fitoquímico en el *Hylocereus undatus* identificó la presencia de saponinas, flavonoides, glucósidos cardíacos, terpenoides, cumarinas, fenoles, taninos y alcaloides en los extractos preparados[59]. Investigaciones nacionales e internacionales realizadas en variadas especies del *Hylocereus spp* "Pitahaya" reportaron similitudes y variaciones en el contenido de metabolitos secundarios; siendo atribuido a factores como el método de extracción, el empleo de una sección específica de la especie vegetal como la pulpa, cascara, flores, raíz u otra área; así mismo se reportaron diferencias en el contenido de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos del extracto etanólico de los frutos de la misma especie de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya roja", atribuidos a factores climáticos como la humedad, PH, temperatura, altitud, presencia de luz solar, calidad del suelo de cultivo basado en la biodisponibilidad de nutrientes y contenido de contaminantes ambientales[30,41,53,58,].

Un estudio realizado por Pérez et al. (2018) se reportó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en el extracto etanólico del fruto de *Hylocereus polyrhizus* "pitahaya", pero no se detectaron triterpenoides ni esteroides[55]. En otro estudio realizado por Li et al. (2017) se reportó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenoides y esteroides en el extracto etanólico del fruto de *Hylocereus undatus*, otra especie de pitahaya, pero no se detectaron saponinas ni taninos[20]. Estas diferencias pueden atribuirse a factores como el método de extracción, condiciones ambientales, variedad genética y el grado de madurez de los frutos. Por lo tanto, se sugiere desarrollar estudios sistemáticos a posterior que permitan determinar la composición química de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" responsables de las actividades farmacológicas [57,65-69,75-77].

Se evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico del fruto de *Hylocereus cf. monacanthus* " (Lemaire) Britton & Rose (EEtHm) **"**pitahaya roja" mediante los métodos del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ y del radical $DPPH^{\bullet}$**,** los resultados registrados en las tablas 3 y 5, se calcularon a partir de la ecuación de la recta elaborada en función a la reducción del radical asociada a la concentración del extracto como Concentración Inhibitoria Media (IC_{50}), para el ensayo del radical $DPPH^{\bullet}$ se registró un IC_{50} de 39,379 µg/mL del extracto y una concentración de 2,48 µg/mL del control positivo del Trolox, se presentó una capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) de 62,977 mg trolox/g de extracto; mientras que para el ensayo del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ se presentó un IC_{50} del 86,211 µg/mL del extracto, produciendo un efecto parecido una concentración de 2,994 µg/mL del control positivo Trolox , al evidenciar un TEAC de 34,682 mg trolox/g del extracto.

Quipse E. et al. (2021), comparó la capacidad antioxidante de la pulpa y cascara de dos ecotipos de pitahaya mediante el las pruebas de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$, obteniendo un IC_{50} de 2800 µg/mL para el extracto de cascara de *Hylocereus megalanthus*, un IC_{50} de 1680 µg/mL para el extracto de pulpa de *Hylocereus megalanthus,* un IC_{50} de 2530 µg/mL para el extracto de cascara de *Hylocereus monocanthus y* un IC_{50} de 2530 µg/mL para el extracto de pulpa de de *Hylocereus monocanthu*, mediante el test de $DPPH^{\bullet}$ obtuvo un IC_{50} de 183,132 µg/mL para el extracto de cascara de *Hylocereus megalanthus*, un

IC_{50} de 145,033 µg/mL para el extracto de pulpa de *Hylocereus megalanthus,* un IC_{50} de 91,23 g/mL para el extracto de cascara de *Hylocereus monocanthus y* un IC_{50} de 141,569 g/mL para el extracto de pulpa de de *Hylocereus monocanthu* , mientras que para los ensayos de $ABTS^{\bullet+}$, presentando unos valores elevados en comparación al IC_{50} de 86,211 µg/mL determinado en nuestra investigación[77-80].

En base a estos resultados, se puede discutir que el extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus* posee una actividad antioxidante significativa frente a los radicales libres $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$; pero no mayor que el antioxidante sintético de referencia "Trolox"[78]. Estos hallazgos coinciden con los reportes nacionales e internacionales de estudios de evaluación de la capacidad antioxidante de una variedad de especies de *Hylocereus sp*., en el fruto y en otras partes de la planta. A continuación, se presentan algunas comparaciones con dichos estudios:

Según Gutiérrez et al. (2018), el extracto etanólico de la pulpa del fruto de *Hylocereus undatus* mostró un IC_{50} de 18,33 µg/mL frente al radical $DPPH^{\bullet}$ y un IC_{50} de 20,83 µg/mL frente al radical $ABTS^{\bullet+}$, evidenciando una mayor actividad antioxidante que la del extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus* obtenido en este trabajo, asi mismo otros autores mencionan el empleo de una concentración inicial del extracto de 1000 µg/mL, mientras que en este estudio se usó una concentración inicial de 500 µg/mL, lo que podría influir en los resultados[58-60, 62-64].

De acuerdo con Chávez et al. (2017), el extracto acuoso de la cáscara del fruto de *Hylocereus megalanthus* presentó un IC_{50} de 15,8 µg/mL frente al radical $DPPH^{\bullet}$ y un IC_{50} de 19,6 µg/mL frente al radical $ABTS^{\bullet+}$, lo que también sugiere una mayor actividad antioxidante que la del extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus*. No obstante, se debe tener en consideración que los autores emplearon una metodología diferente para la preparación y evaluación del extracto, lo que podría afectar a la comparabilidad de los datos[10,11,16,79].

Conforme a Sandoval et al. (2016), el extracto metanólico de las flores *de Hylocereus costaricensis*, *e*xhibió un IC_{50} de 4,17 µg/mL frente al radical $DPPH^{\bullet}$ y un IC_{50} de 3,33 µg/mL frente al radical $ABTS^{\bullet+}$, demostrando una actividad antioxidante muy superior a la del extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus* obtenido en el estudio precedente. Sin embargo, se debe considerar que al analizar las flores y tallos en el

presente trabajo de investigación, la composición química de estas últimas puede alterar los resultados[51,53, 63,64,80].

Estas comparaciones permiten concluir que el extracto etanólico del fruto de *Hylocereus monacanthus* posee una actividad antioxidante moderada frente a los radicales libres $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$, con una intensidad que variada según la especie, sección de la planta empleada para el análisis, tipo de solvente, ejecución de técnica y una actividad hepatoprotectora asociada a la acción integral de las composiciones químicas complejas que posee como: alcaloides, compuestos fenólicos, triterponoides, saponinas, flavonoides y taninos. Por lo tanto, se recomienda realizar investigaciones sistémicas a futuro que permitan examinar, identificar y aislar las composiciones bioactivas responsables que presentan potentes actividades farmacológicas en beneficio de la salud y de la industria alimentaria[70,79,80].

El radical $DPPH^{\bullet}$ es un radical estable que se reduce al aceptar un electrón o un hidrógeno de un antioxidante y el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ se forma por la oxidación del agente oxidante persulfato de potasio. Ambos radicales tienen una coloración intensa que disminuyen al reaccionar con los antioxidantes y su capacidad antioxidante se mide mediante la espectrofotometría, las similitudes entre ambos métodos se basa en la transferencia de electrones o hidrógenos desde los antioxidantes a los radicales, en un medio acuoso o etanólico y para la expresión de sus resultados en unidades equivalentes, requiere la elaboración de la curva de calibración de un antioxidante de referencia como el ácido ascórbico o el Trolox. La selección del método depende de la naturaleza de la muestra y del objetivo del análisis; debido a que el radical $DPPH^{\bullet}$ es más susceptible a los antioxidantes fenólicos y a sufrir la interferencia en su lectura de pigmentos o metales, con una mayor solubilidad, estabilidad y capacidad de reacción con una variedad de antioxidantes y menor costo que el radical $ABTS^{\bullet+}$, teniendo esta última una mayor velocidad de reacción, resultados más reproducibles y una mayor sensibilidad a los antioxidantes hidrofílicos[11,16,41,70,72,73,78].

Hepatotoxicidad inducida por CCl_4 es el modelo más utilizado para evaluar la actividad hepatoprotectora de los extractos de vegetales y de los fármacos elaborados en

laboratorio, las lesiones patológicas inducidas por el agente hepatotóxico en los animales de experimentación, se asemejan mucho a los síntomas de las enfermedades hepáticas en humanas[40]. El CCl_4 es metabolizado por las enzimas del citocromo hepático P450 en radicales libres hepáticos altamente reactivos como el triclorometilo ($CCl_3^{\bullet}$) y triclorometilperoxilo ($CCl_3O_2^{\bullet}$), inductores de la peroxidación lipídica que afectan las funciones de transporte y permeabilidad de la membrana de los hepatocitos y conducen a la fuga de sus enzimas desde el interior de las células hepáticas a la sangre[66-69].

La presencia de elevados niveles séricos de las aminotransferasas, principalmente la transaminasa glutámica oxalacética (TGO) y la transaminasa glutamato-piruvato (GTP) en las células hepáticas, es un indicativo de una lesión en los hepatocitos[70,71] Además, la peroxidación lipídica puede provocar la producción de aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos e hidroperóxidos de bajo peso molecular. Entre ellos, el malondialdehido (MDA), un aldehído importante resultante de la peroxidación lipídica, utilizado como indicador de daño tisular[72]. Un aumento en el nivel de MDA en el hígado insinuó el aumento del grado de peroxidación que conduce al daño del tejido hepático y al fracaso del sistema de defensa antioxidante[45]. En el presente estudio, se encontró que la administración con LCS en extracto acuoso (W) y LCS en extracto etanólico (E) durante 28 días reduce los niveles séricos de ALT y AST en ratas, e inhibe la formación de MDA en el hígado en comparación con el CCl_4-grupo de toxicidad inducida. Las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en la prevención del daño hepático inducido por CCl_4. Sin embargo, estas enzimas antioxidantes podrían ser fácilmente inactivadas por especies de peróxido lipídico[73]. Los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas están estrechamente relacionados con la capacidad del hígado para hacer frente al estrés oxidativo durante el CCl_4 envenenamiento[3,4,23,27-29,73,74].

El superóxido dismutasa (SOD) es uno de los principales componentes del sistema enzimático antioxidante que puede inhibir la acumulación de radicales libres, ya que puede convertir los aniones superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En nuestro estudio, el pretratamiento con un extracto acuoso (LCS-W) y un extracto etanólico (LCS-E) podría elevar las actividades de la SOD en comparación con la CCl_4-grupos

tratados, lo que sugiere que la EDC tiene la capacidad de mantener las actividades de la SOD en la CCl_4-Hígado dañado. Los resultados anteriores indicaron que la administración de LCS podría mejorar la capacidad antioxidante, mejorar la peroxidación lipídica y prevenir las membranas plasmáticas del daño inducido por CCl_4[74].

La inflamación hepática es un proceso patogénico asociado a lesión hepática inducida por CCl_4 que activa las células de Kupffer y libera factores mediadores inflamatorios, como las citoquinas proinflamatorias TNF-α e IL-1β, lo que resulta en la formación inflamatoria[42]. El TNF-α puede activar linfocitos y neutrófilos, aumentar la permeabilidad de las células endoteliales vasculares y aumentar la liberación de otras citoquinas[43]. Se ha informado que la IL-1β aumenta la secreción de citoquinas proinflamatorias, sensibiliza a los hepatocitos a las señales de muerte, induce la esteatosis hepática y avanza la fibrosis hepática[67].

El CCl_4, es empleado convencionalmente como modelo de estudio *in vitro/in vivo* en animales de experimentación por inducir la toxicidad hepática en modelos de estudio en animales *in vitro/in vivo* y permitir evaluar la actividad hepatoprotectora empleando fármacos de origen vegetal, este agente hepatotóxico es activado por las enzimas del CYP P450 y da origen al radical libre triclorometilo $CCl_3^{\bullet}$ altamente reactivos que reaccionan con las proteínas, macromoleculares celulares y ácidos grasos poliinsaturados y en presencia de oxígeno molecular forman radicales muy tóxicos de triclorometilperoxilo CCl_3O y H_2O_2, O_2^-, OH, con capacidad de alterar y disociar los polirribosomas del retículo endoplásmico, reduciendo la biosíntesis de proteínas y conduciendo a una lesión hepática[75,76,77,70,79]

Los niveles de la bilirrubina total, directa e indirecta de los animales de experimentación que recibieron dosis de 0.5 mg/kg y 1mg/kg del extracto etanólico de los frutos de *Hylocereus monacanthus*, se registraron en la tabla 15 y evidenciaron valores promedios de 1.89 y 1.69 mg/dL de bilirrubina total, 1.08 y 0.71 mg/dL de bilirrubina directa y 0.81 y 0.98 mg/dL de bilirrubina indirecta, respectivamente. Estos resultados sugieren que el extracto etanólico de la pitahaya tiene un efecto protector

sobre el hígado, al reducir el estrés oxidativo y la producción de radicales libres que dañan las células hepáticas[66,69,74].

Los resultados de los niveles de proteínas totales en el suero de los animales tratados con el extracto etanólico del *Hylocereus monocanthus* (EEtHm) a dosis de 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg del extracto, con el grupo de control, grupo con tetracloruro de carbono y el grupo con silimarina (un fármaco hepatoprotector de referencia), se registraron en la tabla 15 y evidenciaron el GV y GVI, evidenciaron un mayor valor de proteínas proteínas totales en el suero, registrando 5.140 mg/dl para el grupo experimental tratado con una dosis de 1 mg/kg y un valor semejante al grupo con silimarina (5,88 mg/dL). El grupo con tetracloruro de carbono evidenció un valor disminuido de 3,190 mg/dL, indicativo de la severidad de la lesión hepática; así mismo el grupo de control y el grupo con extracto etanólico del *Hylocereus monocanthus* sin tetracloruro de carbono, presentaron valores similares (6,020 y 5,999 mg/dL, respectivamente), lo que sugiere que el extracto no tiene un efecto tóxico por sí mismo[56]carencia de toxicidad del extracto etanólico[56,57-60].

Las características histopatológicas que se visualizaron en la figura 19, corresponden al corte del hígado de ratas de los grupos experimentales I, II, III, IV, V y VI sometidos a dosis experimentales del extracto etanólico del *Hylocereus monocanthus* (EEtHm), CCl_4 y silimarina. El grupo GI, correspondiente al grupo control, presentó un hígado sin lesiones, con una ligera separación de sus canalículos y de la estación trilobular, el grupo GII correspondiente al grupo no hepatotóxico alimentados con dieta a base de EEtHm (1,0 mg/kg), evidenció unos canalículos biliares discontinuos con un mínimo nivel de desorden y degeneración de los hepatocitos, permitiendo visualizar una arquitectura hepática sin lesiones. El grupo GIII, correspondiente al grupo del hepatotóxico, presentó una necrosis centrolobulillar hemorragia en el espacio sinusoidal, una profunda separación intracanalicular, acompañado de una degeneración, dilatación, inflamación, restos sanguíneos y restos de grasa (hígado graso) en toda la superficie del hepatocito y la presencia de células inflamatorias infiltrados por los conductos porta. Sin embargo; el corte histopatológicos de los grupos GIV y GV, correspondientes a los animales que recibieron una dieta suplementada con EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg, respectivamente y

acompañada de una administración de aguda de CCl_4 (%v/v), revelando los resultados una marcada protección y mínimas modificaciones en la histología del hepatocito frente al agente hepatotóxico en función a la dosis del extracto, presentando el grupo VI, gotículas de grasa, hemorragia intracanicular y el grupo V, una hemorragia intracanalicular discreta, gotículas de grasas y un edema y necrosis centrolobulillar de menor intensidad que el grupo intoxicado por CCl_4, brindando un mayor nivel protección el daño hepático que el grupo IV; debido a que recibió una mayor dosis del extracto (1,0 mg/kg), siendo respaldado los resultados de los estudios bioquímicos de la funciones hepáticas y finalmente grupo VI, correspondiente al grupo experimental que recibió silimarina y tratamiento agudo de CCl_4, presentó pequeñas gotículas en el hígado, discretas hemorragias y edemas, formación de triángulos por separación de canalículos poco marcados y los resultados de los hallazgos bioquímicos, corroboran las ligeras lesiones histopatológicos. Por lo tanto el resultado del estudio histopatológico del hígado de ratas que consumieron una dieta suplementada con EEHm y que no fueron inducidas a hepatoxicidad por CCl_4, mostraron características histopatológicas normales o con algún signo de toxicidad, en comparación los grupos experimentales que recibieron EEtHm y silimarina y una intoxicación aguda por CCl_4, presentaron lesiones hepáticas y cambios histopatológicos anormales, en menor intensidad que los observados por el grupo control de intoxicación (grupo III), evitando el consumo de la dieta suplementada con EEtHM un incremento del nivel de lesión hepática y brindando una protección hepática, posiblemente por un disminución del nivel destrucción de los polirribosomas permitiendo una restauración rápida e incremento en la síntesis de proteínas, [78,79,80].

La presente investigación, demostró que el extracto etanólico *del Hylocererus monocantus* Lemaire Britton & Rose “pitahaya”, presenta actividad antioxidante por su elevado contenido de flavonoides y compuestos fenólicos; y hepatoprotectora frente al tetracloruro de carbono, evidenciado mediante las pruebas bioquímicas y resultados de los cortes histopatológicos.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios predominantes en el extracto etanólico de *Hylocereus monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose "pitahaya" fueron compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y triterpenoides.

2. El extracto etanólico presentó por el método del radical 2,2-difenilpicrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) una actividad antioxidante moderada comparada al control positivo de Trolox con un TEAC de 455,756 mg Trolox/g extracto etanólico.

3. El extracto etanólico presentó por el método del radical catiónico ácido 2,2'-acino-bis-(3-etiltiazolina- bencenosulfónico-6 ($ABTS^{\bullet+}$) una actividad antioxidante moderada comparada al control positivo de Trolox, con una capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) de 34,682 mg Trolox/g de extracto etanólico.

4. El extracto etanólico a una dosis de 1 mg/kg presentó una buena actividad hetatoprotectora comparada al efecto del control positivo de silimarina, tanto en los ensayos bioquímicos del perfil hepático y los cortes histológicos de hígado.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mohammed A, Ashraf U, Muhammad E, Mominur R, Razibul H, Golam M, *et al*. Protective Effect of Methanolic Extract of *Hylocereus polyrhizus* Fruits on Carbon Tetra Chloride - Induced Hepatotoxicity in rat. Eur J Med Plan [Internet]. 2013 [citado el 10 de setiembre de 2021];3(4):500-7. Disponible en: https://doig.org/10.9731/EJMP/2013/5090
2. Wallace AD, Meyer SA. Hepatotoxicity. En: Smart RC, Hodgson E, edithors. Molecular and Biochemical Toxicology. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. p. 671-92.
3. Andrew D, Sharon A. Hepatotoxicity. En; Hodgson E, editor. A Textbook of Modern Toxicology. 4th. ed. Hobokin: John Wiley & Sons, Inc, 2010. p. 277-303.
4. Favari L, Arce-Díaz C, Ortiz-Martínez J, Pablo-Pérez S, Soto C, Meléndez-Camargo ME. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. Rev Mex Cienc Farm [Internet]. 2013 [citado el 10 de setiembre de 2021];44(4):53-61.. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187001952013000400007&lng=es.
5. Yi-Chun L, Kuei-Mei C, Hsin-Yu H, Pei-Yu H, Jin-Ming H, Hsueh-Hui L *et al*. Hepatoprotective activity of *Chhit-Chan-Than* extract powder against carbon tetrachloride -induced liver injury in rats. J Food Drug Anal [Internet]. 2013 [citado el 10 de setiembre de 2021];30:1-10. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.09.012
6. Well-Yun Y, Yu-Quin L, Haji-Akber A, Xue-Lei X, Totahom Z, Yan M, *et al*. Hepatoprotective activities of a sesquiterpene-rich protection from the aerial part of *Cichorium glandulosum*. Chin Med [Internet]. 2012 [citado el 05 de diciembre de 2021];7:21-33. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23021236
7. Prutha P, Aniruddha B, Kanurakar H. Estudio de la actividad antioxidante y hepatoprotectora del fruto del *Hylocereus undatus* en ratas experimentales. Am J Pharm Teach Res [Internet]. 2020[citado el 23 de setiembre de 2021]; 10(6):135- Disponible en: https://juniperpublishers.com/argh/pdf/ARGH.MS.ID.555846.pdf

8. Cauilan L. Hepatoprotective Potential of *Hylocereus Polyrhizus* (Dragon Fruit) on Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Damages in Albino Wistar Rats. Int. J. Sci [Internet]. 2019 [citado el 11 de diciembre de 2021];46(2):49-61. Disponible en: https://www.gssrr.org/index.php/JournalOfBasicAndApplied/article/view/9135
9. Rajesh M, Latha M. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. J Ethnopharmacol [Internet], 2004[citado el 20 de noviembre del 2021];91:99-104. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.011
10. Tenore GC, Novellino E, Basile A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitahaya (*Hylocererus polyrhizus*) extracts. Journal of Funtional Foods [Internet]. 2012 [citado el 10 de setiembre de 2021];4(1): 129-136. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.003
11. Abd Manan E, Abd Gani SS, Zaida UH, Effendi Halmi MI. Characterization of Antioxidant Activities in Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Pulp Water-based Extract. J Adv Res Fluid Mech Therm Sci [Internet]. 2019 [citado el 10 de setiembre de 2021]; 61(2):170-80. Disponible en: https://www.akademiabaru.com/submit/index.php/arfmts/article/view/2667
12. Berger L. Carbon Tethracloride-Induced morphologic Alterations in Isolated rat hepatocytes. Experminetal and molecular patologic [Internet]. 1987 [citado el 10 de setiembre de 2021]; 46:245-57. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0014-4800(87)90047-5
13. Esquivel P, Araya Y. Características del fruto de la pitahaya (*Hylocererus sp*.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos [Internet]. 2012 [citado el 20 de octubre de 2023]; 3(1):113-129. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327110925_Caracteristicas_del_fruto_de_la_pitahaya_Hylocereus_sp_y_su_potencial_de_uso_en_la_industria_alimentaria
14. Verona-Ruiz A, Urcia-Cerna J, Paucar-Menacho L. Pitahaya (*Hylocereus spp*.): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos biactivos. Sci Agropecu [Internet], 2020 [citado el 16 de octubre de 2021];11(3):439-53. Disponible en: http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16

15. Gonçalves B. Chemical, phytochemical and functional aspects of pitayas *Hylocereus undatus*, *Hylocereus monacanthus* and *Hylocereus megalanthus*: A review. Brazilian Journal of Health Review [Internet]. 2021 [citado el 10 de mayo de 2022]; 4(5):1986-2024. Disponible en: https://doi.org/10.34119/bjhrv4n5-123
16. Tsai Y, Lin Ch-g, Chen W-L, Huang Y-Ch, Chen Ch-Y, Huang K, Yan Ch-H. Evaluation of the Antioxidant and Wound-Healing properties of Extracts from Different Parts of *Hylocereus polyrhizus.* Agronom [Internet]. 2019 [citado el 16 de octubre de 2021];9(1):27. Disponible en: https://doi.org/10.3390/agronomy9010027
17. Martínez I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. ALA[Internet]. 2000[citado el 10 de noviembre del 2023];50(1):5-18. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100001
18. Timbrell J. Biochemical Mechanism of Toxicity: Specific Examples. By John A. Principles of Biochemical Toxicology. 4th. Ed. Informa Healthcare U.S.A, Inc, 2008; p. 293-403.
19. Xu P, Yao J, Ji J, Shi H, Jiao Y, Hao S. Deficiency of apoptosis-stimulating protein 2 of p53 protects mice from acute hepatic injury induced by CCl4 via autophagy. *Toxicol Lett* 2019;316:85–93. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.09.006.
20. Li X, Wang L, Chen C. Effects of exogenous thymosin β4 on carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis. *Sci Rep* 2017;7:5872. Disponible en: https://doi.org/10.1038/s41598-017-06318-5
21. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014: 360438. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2014/360438
22. Vistoli G, de Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 2013;47:3–27. Disponible en: https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348
23. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, Zangar RC, Weitz KK, Poet TS, et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using

gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A* 2000;60:531–48. Disponible en: https://doi.org/10.1080/00984100050082085

24. Faroon O. Toxicological profile for carbon tetrachloride Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services. Public Health Service; 2005.
25. Zubaidi A, Haque M, Shanmugasundara C, Bin A, Mainul H, Shammugasundaram C, Rao M. Clinical Study of Preventive Potentials of Consumption of Buah naga (Cactaceae) Against Paracetamol-Induced Hepatotoxity as well as the Other Associated Biological Effects. Asían J Res Pharm [Internet]. 2012 [citado el 15 de octubre del 2021];2(1):16-23. Disponible en: https://ajpsonline.com/AbstractView.aspx?PID=2012-2-1-5
26. Es Haghi, M, Dehghan, G, Banihabib, N, Zare, S, Mikaili, P, Panahi, F. Protective effects of Cornus mas fruit extract on carbon tetrachloride induced nephrotoxicity in rats. *Indian J Nephrol* 2014;24:291–6. Disponible en: https://doi.org/10.4103/0971-4065.133000.
27. Wang T, Nin-Ling S, Wei-Dong Z, Hui-Liang L, Guo-Cai L, Bo-Jun Y, *et al*. Protective effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. J Ethnopharmacol [Internet]. 2008 [citado el 10 de agosto del 2022];117:300-8.. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.02.010
28. Abdalla E, El-Hadary & Mohamed F, Ramadan H. Hepatoprotective effect of cold -pressed Syzygium aromaticum oil against carbon tetrachloride (CCl4)-induced hepatotoxicity in rats. Pharm Biol [Internet]. 2016 [citado el 11 de diciembre de 2021]; 54(8):1364-722. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262787860_Carbon_tetrachloride_induced_hepatotoxicity_in_rat_is_reversed_by_treatment_with_riboflavin.
29. Deng JS, Chang YC, Wen CL, Liao JC, Hou WC, Amagaya S, et al. Hepatoprotective effect of the ethanol extract of Vitis thunbergii on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities. Journal of Ethnopharmacology [Internet]. 2012 [citado el 18 de octubre de 2023]; 142(3): 795-803. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.003
30. Yang WJ, Luo YQ, Aisa HA, Xin XL, Totahon Z, Mao Y, Hu MY, Xu L, Zhang RP. Hepatoprotective activities of a sesquiterpene-rich fraction from the aerial part

of Cichorium glandulosum. Chin Med [Internet]. 2012[citado el 20 de febrero de 2023]; 29;7(1):21. Disponible en: https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-21

31. Lu X, Zhao Y, Sun Y, Yang S, Yang X. Characterisation of polysaccharides from green tea of Huangshan Maofeng with antioxidant and hepatoprotective effects. Food Chem [Internet]. 2013 [citado el 18 de noviembre de 2023]; 15;141(4):3415-23. Dsiponible en: https://doig.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.058
32. Meng X, Li Y, Li S, Gan RY, Li HB. Natural Products for Prevention and Treatment of Chemical-Induced Liver Injuries. Compr Rev Food Sci Food Saf [Internet]. 2018 [citado el 19 de octubre
33. Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. Expert Rev Mol Med. 3 de febrero de 2012;14:4. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306029/
34. Cenini, G, Lloret, A, Cascella, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019:2105607. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2019/2105607.
35. Rusyn I, Arzuaga X, Cattley RC, Corton JC, Ferguson SS, Godoy P, et al. Key Characteristics of Human Hepatotoxicants as a Basis for Identification and Characterization of the Causes of Liver Toxicity. Hepatology. diciembre de 2021;74(6):3486-96. Disponible en: 10.1002/hep.31999
36. Gugliucci A. Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism: Key Regulators of Their Flux. Journal of Clinical Medicine. 2023;12(13). Disponible en: https://www.mdpi.com/2077-0383/12/13/4399
37. Li Y, Li Z, Ngandiri DA, Llerins Perez M, Wolf A, Wang Y. The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. Front Physiol. 2022;13:826314. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8907745/.
38. Heeren J, Scheja L. Enfermedad del hígado graso asociada al metabolismo y metabolismo de las lipoproteínas. Metabolismo molecular . 01 abril 2021;50(9):2. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238
39. Kamm DR, McCommis KS. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. J Physiol. abril de 2022;600(8):1825-37. Disponible en: 10.1113/JP281061
40. Joerg Heeren, Ludger Scheja, Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism, Molecular Metabolism, Volume 50, 2021, 101238. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238

41. Kang HW. Antioxidant activity of ethanol and water extracts from lentil (*Lens culinaris*). Journal of Food and Nutrition Research [Internet]. 2015 [citado el 16 de febrero de 2023]; 3(10): 667-669. Disponible en: https://doi.org/10.12691/jfnr-3-10-8
42. Delgado ME, Cárdenas BI, Farran N, Fernandez M. Metabolic Reprogramming of Liver Fibrosis. Cells. 20 de diciembre de 2021;10(12). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8700241/
43. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. Cells. 3 de abril de 2020;9(4). Disponible en: 10.3390/cells9040875
44. Boyer JL. Bile formation and secretion. Compr Physiol. julio de 2013;3(3):1035-78. Disponible en: https://doig.org/10.1002/cphy.c120027
45. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun. abril de 2005;73(4):1907-16. Disponible en: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
46. Matuz-Mares D, González-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Meza H. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. Antioxidants (Basel). 20 de abril de 2022;11(5). Disponible en:
47. Cheng J, Nanayakkara G, Shao Y, Cueto R, Wang L, Yang WY, et al. Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. Adv Exp Med Biol. 2017;982:359-70. Disponible en: https://doig.org/10.1007/978-3-319-55330-6_20
48. Zorov, DB, Juhaszova, M, Sollott, SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94:909–50. Disponible en: https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013
49. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. Antioxidants (Basel). 17 de noviembre de 2021;10(11). Disponible en
50. Malhotra, JD, Kaufman, RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged. *Antioxid Redox Sign* 2007;9:2277–93. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782:
51. Inostroza L, Castro A, Hernández E, Carhuapoma M, Yuli R, Collado A, et al. Actividad antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y su

aplicación como colorante para yogur. Cienc Invest [Internet]. 2015 [citado el 15 de octubre del 2021];18(2):83-9. Disponible en: https://doig.org/10.15381/ci.v18i2.13615

52. Chavez-Montes A, Sandoval-Ramírez L, Aranda-González I, et al. Hepatoprotective effect of Opuntia robusta and Opuntia streptacantha fruits against acetaminophen-induced acute liver damage. Nutrients. 2016;8(10):632
53. Zeashan H, Amresh G, Singh S, Rao, CV. Hepatoprotective and antioxidant activity of Amaranthus spinosus against CCl_4 induced toxicity. Journal of ethnopharmacology [Internet]. 2009 [citado el 06 de octubre de 2023]; 125(2): 364-366. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.010
54. Recknagel, RO, Glende, EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *Crit Rev Toxicol* 1973;2:263–97. Disponible en: https://doi.org/10.3109/10408447309082019
55. Pérez-Rojas JM, Cruz C, García-López P, et al. Hepatoprotective effect of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. Food Chem Toxicol. 2014;74:45-51.
56. Wang Y, Tang C, Zhang H. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl_4-induced oxidative liver injury in mice. J Food Drug Anal [Internet]. 2015 [citado el 12 de octubre de 2023]; 23(2): 310-317. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.fda.2014.10.002
57. Manna, P, Sinha, M, Sil, PC. Aqueous extract of Terminalia arjuna prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Compl Alternative Med* 2006;6:33. https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-33.
58. Gutiérrez RM, Flores A, López J, Hernández M. Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total de extractos etanólicos de pitahaya (Hylocereus undatus). Rev Mex Cienc Farm. 2018;49(3):34-40.
59. Flores J, et al. Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus.* Ciencia Agropecuarias [Internet]. 2016;2(1):23-33. Disponible en: https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/992

60. Bhattacharyya, A, Chattopadhyay, R, Mitra, S, Crowe, SE. Oxidative stress: an essential factor in thepathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014; 94:329–54. Disponible en: http://doi.org/10.1152/physrev.0040.2012
61. Henkel F. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian Journal of Andrology (2011) 13, 43–52. Disponible en: https://doi:10.1038/aja.2010.76
62. Unsal, V. Natural phytotherapeutic antioxidants in the treatment of mercury intoxication-A review. *Adv Pharmaceut Bull* 2018;8:365. Disponible en: https://doi.org/10.15171/apb.2018.043.
63. Poljsak, B, Šuput, D, Milisav, I. Achieving the balance between ROS .and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:956792. https://doi.org/10.1155/2013/956792.
64. Nordberg, J, Arner, ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287–312. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00724-9
65. Salem MA, Perez de Souza L, Serag A, et al. Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. Metabolites. 2020;10(1):37. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7023240/
66. Kashanninejad M, Sanz MT, Blanco B, Beltrán S, Niknam SM. Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization. Food and Bioproducts Processing [Internet]. 2020 [citado el 24 de febrero de 2023];124(1):196-207. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.015
67. Plaskova A, Mlcek J. New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. Front Nutr [Internet]. 2023 [citado el 02 de noviembre de 2023]; Disponible en: https://doig.org/10.3389/fnut.2023.1118761
68. Khade OS, Sruthi K, Sonkar RM, Gade PS, Bhatt P. Plant secondary metabolites: Extraction, screening, analysis and their bioactivity. Int J Herb Med [Internet]. 2023 [citado el 22 de octubre de 2023];11(2):01–17. Disponible en: https://doi.org/10.22271/flora.2023.v11.i2a.855
69. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology [Internet], 1995 [citado

el 16 de octubre de 2023]; 28(1):25-30. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

70. Marami LM, Dilba GM, Babele DA, Sarba EJ, Gizaw A, Bune WM, Bayu MD, Admasu P, Mekbeb A, Tadesse M, Abdisa K, Bayisa D. Phytochemical Screening and in-vitro Evaluation of Antibacterial Activities of Echinops amplexicaulis, Ruta chalepensis and Salix subserrata Against Selected Pathogenic Bacterial Strains in West Shewa Zone, Ethiopia. J Exp Pharmacol [Internet]. 2021 [citado el 14 de setiembre de 2023];13:511-520. Disponible en: https://doig.org/10.2147/IEP.S305936
71. Kietzmann, T, Gorlach, A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:474–86. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.03.010
72. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved $ABTS^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 1999;26(9-10):1231-1237. Disponible en: DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
73. Southorn, PA, Powis, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc 1988; 63:381–9. Disponible en: https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)64861-7
74. Vijayakumar, K, Anand, AV. Protective effects of Psidium guajava and its isolated fraction on CCl_4 induced oxidative stress. *Indian J Clin Biochem* 2019;34:324–9. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s12291-018-0752-z
75. Mande DD, Kumbhare MR, Surana AR. Chemical constituents and biological activities of the fruits of *Hylocereus undatus*. International Journal of Pharmacognosy and Pharmaceutical Sciences. 2023;5(2): 25-31. Disponible en: https://dx.doi.org/10.33545/27067009.2023.v5.i2a.129
76. Safira A, Savitri S, Putri A, Hamonangan J, et al. Revisión sobre los aspectos farmacológicos y de salud de Hylocereus o Pitaya: Revista de administración y terapéutica de fármacos. 2021; 11(6): 297-303. Disponible en: https://dx.doi.org/10.22270/jddt.v11i6.5181
77. Quispe E, Chávez Pérez JA, Medina-Pizzali ML, Loayza Gutiérrez L, Apumayta Suárez E. Chemical characterization, polyphenol content and antioxidant capacity of two pitahaya ecotypes (*Hylocereus* spp.). Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín

[Internet]. 2021 [citado el 28 de agosto de 2023]; 74(3), 9723-9734. Disponible en: https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n3.92821

78. Alfaro-Ayvar JR, Inostroza-Ruiz LA, Castro-Luna AJ. Efecto protector de *Hylocereus monocanthus* en la hepatotoxicidad aguda inducida por tetracloruro de carbono en ratas. Ciencia e Investigación. 2022. 25(1):3-9. Disponible en: https://doi.org/10.15381/ci.v25i1.19744
79. Chávez J, Rojas R, Rojas L. Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total de extractos acuosos de cáscara de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*). Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2017;34(2):243-248.
80. Sandoval M, Valenzuela E, Valdés H. Actividad antioxidante *in vitro* y contenido fenólico total de extractos metanólicos de flores y tallos jóvenes de pitahaya roja *(Hylocereus costaricensis*). Rev Cubana Plant Med. 2016;21(1):1-10
81. Halliwell, B. Oxidative stress in dermatology. In: Oxygen species in pathology with special reference to the skin. Marcel Dekker, Inc., New York; 1993:3–11 p.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

Anexo 1

Posición taxonómica de *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA Nº 048-USM-2019

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

La muestra vegetal (fruto) recibida de **JANET ROCIO ALFARO AYVAR**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquimica de la Universidad San Cristóbal de Huamanga, ha sido estudiada y clasificada como: ***Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose**, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: CARYOPHYLLALES

FAMILIA: CACTACEAE

GENERO: Hylocereus

ESPECIE: *Hylocereus cf. monacanthus* (Lemaire) Britton & Rose

Nombre vulgar.: "Pitahaya roja"
Determinado por: Dra. Mónica Arakaki Makishi

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 12 de febrero de 2019

MUSEO DE HISTORIA NATURAL – JEFE – Herbario San Marcos - USM

Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/yhr.

Fuente. Museo de Historia Natural UNMSM, 2019

Anexo 2

Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina total

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	25,606	5	5,121	1832,113	<0,001
Dentro de grupos	0,117	42	0,003		
Total	25,723	47			

Prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: bilirrubina total

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-,1388*	0,026	<0,001	-0,218	-0,059
	CCl_4 (% v/v) y solución salina	-2,083*	0,026	<0,001	-2,161	-2,004
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,434*	0,026	<0,001	-0,0513	-0,355
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-,0241*	0,026	<0,001	-0,320	-0,162
	CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 ug/ml)	-0,004	0,026	1,000	-0,083	0,075
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	aceite de oliva + solución salina	,1388*	0,026	<0,001	0,059	0,218
	CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,944*	0,026	<,0001	-2,023	-1,865
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,295*	0,026	<0,001	-0,374	-0,216
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,103*	0,026	0,005	-0,181	-0,024
	CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	0,135*	0,026	<0,001	0,056	0,214
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	aceite de oliva + solución salina	2,082*	0,026	<0,001	2,004	2,161
	EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	1,940*	0,026	<0,001	1,865	2,023
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	1,649*	0,026	<0,001	1,569	1,728
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	1,841*	0,026	<0,001	1,762	1,920
	CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	2,079*	0,026	<0,001	1,999	2,158

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	aceite de oliva + solución salina	0,434*	0,026	<0,001	0,355	0,513
	EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,295*	0,026	<0,001	0,216	0,374
	CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,649*	0,026	<0,001	-1,728	-1,570
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,192*	0,026	<0,001	0,114	0,271
	CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	0,430*	0,026	<0,001	0,351	0,509
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	aceite de oliva + solución salina	0,241*	0,026	<0,001	0,162	0,320
	EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0.102*	0,026	0,005	0,024	0,181
	CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,841*	0,026	<0,001	-1,920	-1,762
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,193*	0,026	<0,001	-0,271	-0,113
	CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	0,238*	0,026	<0,001	0,159	0,316
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	aceite de oliva + solución salina	0,004	0,026	1,000	-0,075	0,083
	EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,136*	0,026	<0,001	-0,2139	-0,056
	CCl_4 (% v/v) y solución salina	-2,079*	0,026	<0,001	-2,158	-1,999
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,430*	0,026	<0,001	-0.509	-0,351
	CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,238*	0,026	<0,001	-0,316	-0,159

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 3

Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina directa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	S
Entre grupos	9,819	5	.436,926	1,9641	<0,001
Dentro de grupos	0,057	42	0,001		
Total	9,876	47			

Prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: bilirrubina directa

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,194*	0,019	0,000	-0,249	-0,139
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,316*	0,019	0,000	-1,371	-1,261
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,525*	0,019	0,000	-0,580	-0,469
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,160*	0,019	0,000	-0,215	-0,105
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,060*	0,019	0,026	-0,115	-0,005
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	0,194*	0,019	0,000	0,139	0,249
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,123*	0,019	0,000	-1,178	-1,067
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,331*	0,0199	0,000	-0,386	-0,276
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,034	0,0199	0,461	-0,021	0,089
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,134*	0,019	0,000	0,079	0,189
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	1,316*	0,019	0,000	1,261	1,371
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	1,123*	0,019	0,000	1,067	1,177
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,791*	0,019	0,000	0,736	0,846
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	1,156*	0,019	0,000	1,101	1,211
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	1,256*	0,01	0,000	1,201	1,311
GIV:	GI: aceite de oliva + solución salina	0,525*	0,019	0,000	0,469	0,580
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,331*	0,019	0,000	0,276	0,386

CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,791*	0,019	0,000	-0,846	-0,736
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,365*	0,019	0,000	0,309	0,420
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,465*	0,019	0,000	0,409	0,520
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	0,160*	0,019	0,000	0,105	0,215
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,034	0,019	0,461	-0,089	0,021
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,156*	0,019	0,000	-1,211	-1,101
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,365*	0,019	0,000	-0,420	-0,309
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,100*	0,019	0,000	0,045	0,155
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	0,060*	0,019	0,026	0,005	0,115
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,134*	0,019	0,000	-0,189	-0,079
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-1,257*	0,019	0,000	-1,311	-1,201
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,465*	0,019	0,000	-0,520	-0,409
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,100*	0,019	0,000	-0,155	-0,045

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 4

Pruebas estadísticas de ANOVA para bilirrubina indirecta

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,311	5	0,862	259,841	<0,001
Dentro de grupos	0,139	42	0,003		
Total	4,451	47			

Prueba Post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: bilirrubina indirecta

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,055	0,029	0,411	-0,031	0,141
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,766*	0,029	0,000	-0,852	-0,680
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,091*	0,029	0,032	0,005	0,177
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,081	0,029	0,074	-0,167	0,005
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,056	0,029	0,386	-0,029	0,142
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,055	0,029	0,411	-0,141	0,031
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,821*	0,029	0,000	-0,907	-0,735
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,036	0,029	0,805	-0,049	0,122
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,136*	0,029	0,000	-0,222	-0,050
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,001	0,029	1,000	-0,085	0,087
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	0,766*	0,029	0,000	0,680	0,852
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,821*	0,029	0,000	0,735	0,907
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,858*	0,029	0,000	0,772	0,944
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,685*	0,029	0,000	0,599	0,771
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,823*	0,029	0,000	0,737	0,909

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,091*	0,029	0,032	-0,177	-0,005
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,037	0,029	0,805	-0,122	0,049
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,857*	0,029	0,000	-0,944	-0,772
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,172*	0,029	0,000	-0,259	-0,087
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,035	0,029	0,827	-0,121	0,051
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	0,081	0,029	0,074	-0,005	0,167
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,136*	0,029	0,000	0,050	0,222
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,685*	0,029	0,000	-0,771	-0,599
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,173*	0,029	0,000	0,087	0,259
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,138*	0,029	0,000	0,052	0,223
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,056	0,029	0,386	-0,142	0,029
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,001	0,029	1,000	-0,087	0,085
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-0,823*	0,029	0,000	-0,909	-0,737
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,035	0,029	0,827	-0,051	0,121
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,138*	0,029	0,000	-0,224	-0,052

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 5

Pruebas estadísticas de ANOVA para proteínas totales

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	94,126	5	18,825	410,020	<0,001
Dentro de grupos	1,928	42	0,046		
Total	96,054	47			

Prueba Post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: proteínas totales

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,143	0,107	0,767	-0,177	0,462
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	3,830*	0,107	0,000	3,510	4,149
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	2,885*	0,107	0,000	2,565	3,205
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	1,941*	0,107	0,000	1,621	2,261
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	1,010*	0,107	0,000	0,690	1,329
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,143	0,107	0,767	-0,462	0,177
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	3,688*	0,107	0,000	3,368	4,007
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	2,743*	0,107	0,000	2,423	3,062
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	1,799*	0,107	0,000	1,4789	2,119
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,868*	0,107	0,000	0,548	1,187
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	-3,830*	0,107	0,000	-4,149	-3,510
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-3,688*	0,107	0,000	-4,007	-3,368
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,945*	0,107	0,000	-1,265	-0,625
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-1,889*	0,107	0,000	-2,209	-1,569
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-2,820*	0,107	0,000	-3,139	-2,500

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-2,885*	0,107	0,000	-3,205	-2,565
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-2,742*	0,107	0,000	-3,062	-2,423
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	0,9450*	0,107	0,000	0,625	1,265
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,9438*	0,107	0,000	-1,264	-0,624
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-1,875*	0,107	0,000	-2,195	-1,555
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,942*	0,107	0,000	-2,261	-1,621
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-1,799*	0,107	0,000	-2,119	-1,479
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,889*	0,107	0,000	1,569	2,209
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,944*	0,107	0,000	0,624	1,264
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,931*	0,107	0,000	-1,251	-0,611
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,010*	0,107	0,000	-1,329	-0,690
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,867*	0,107	0,000	-1,187	-0,548
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	2,820*	0,107	0,000	2,500	3,139
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	1,875*	0,107	0,000	1,555	2,195
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,931*	0,107	0,000	0,611	1,251

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 6

Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de albúmina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12,176	5	2,435	127,997	<0,001
Dentro de grupos	0,799	42	0,019		
Total	12,975	47			

Prueba Post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: niveles de albúmina

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,260*	0,069	0,006	0,054	0,466
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,403*	0,069	0,000	1,198	1,609
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,991*	0,069	0,000	0,785	1,197
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,256*	0,069	0,007	0,050	0,462
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,186	0,0690	0,096	-0,019	0,392
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,260*	0,069	0,006	-0,466	-0,054
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,143*	0,069	0,000	0,938	1,349
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,731	0,069	0,000	0,525	50,937
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,003	0,069	1,000	-0,209	0,202
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,073	0,069	0,891	-0,279	0,132
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,403*	0,069	0,000	-1,609	-1,198
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-1,143*	0,069	0,000	-1,349	-0,938
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,412*	0,069	0,000	-0,618	-0,207
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-1,147*	0,069	0,000	-1,353	-0,942
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-1,217*	0,069	0,000	-1,423	-1,012

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,991*	0,069	0,000	-1,197	-0,785
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,731*	0,069	0,000	-0,937	-0,525
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	0,412*	0,069	0,000	0,207	0,618
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,735*	0,069	0,000	-0,941	-0,529
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,805*	0,069	0,000	-1,011	-0,599
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,256*	0,069	0,007	-0,462	-0,050
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,003	0,069	1,000	-0,202	0,209
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,147*	0,069	0,000	0,942	1,3534
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,735*	0,069	0,000	0,529	0,941
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,070	0,069	0,910	-0,275	0,136
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,186	0,069	0,096	-0,392	0,019
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	0,073	0,069	0,891	-0,132	0,279
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,217*	0,069	0,000	1,011	1,423
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,805*	0,069	0,000	0,599	1,011
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,070	0,069	0,910	-0,135	0,275

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 7

Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de globulinas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	43,982	5	8,796	149,547	<0,001
Dentro de grupos	2,470	42	0,059		
Total	46,453	47			

Prueba Post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: niveles de globulinas

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,118	0,121	0,925	-0,479	0,245
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	2,426*	0,121	0,000	2,064	2,788
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	1,894*	0,121	0,000	1,532	2,256
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,118	0,121	0,000	1,323	2,047
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	2,543*	0,121	0,000	0,461	1,186
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	0,117	0,121	0,925	-0,245	0,479
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	2,544*	0,121	0,000	2,182	2,906
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	2,011*	0,121	0,000	1,649	2,373
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	1,802*	0,121	0,000	1,441	2,164
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	0,941*	0,121	0,000	0,579	1,303
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	-2,426*	0,121	0,000	-2,788	-2,064
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-2,543*	0,121	0,000	-2,906	-2,182
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-0,533*	0,121	0,001	-0,895	-0,171
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,741*	0,121	0,000	-1,103	-0,379
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-1,603*	0,121	0,000	-1,965	-1,241

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,893*	0,1212	,000	-2,256	-1,532
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-2,011*	0,121	0,000	-2,373	-1,649
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	0,533*	0,121	0,001	0,171	0,894
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-0,209	0,121	0,526	-0,571	0,153
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-1,070*	0,121	0,000	-1,432	-0,708
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,685*	0,121	0,000	-2,047	-1,323
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-1,803*	0,121	0,000	-2,165	-1,441
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	0,742*	0,121	0,000	0,379	1,103
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	0,209	0,121	0,526	-0,153	0,571
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-0,862*	0,121	0,000	-1,223	-0,499
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	-0,824*	0,121	0,000	-1,186	-0,462
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-0,941*	0,121	0,000	-1,303	-0,579
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	1,603*	0,121	0,000	1,241	1,965
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	1,070*	0,121	0,000	0,708	1,432
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	0,862*	0,121	0,000	0,499	1,223

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 8

Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de fosfatasa alcalina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	506 280,950	5	101 256,190	6 700,955	<0,001
Dentro de grupos	634,650	42	15,111		
Total	506 915,600	47			

Prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: niveles de fosfatasa alcalina

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	-1,749	1,944	0,944	-7,551	4,054
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-282,189*	1,944	0,000	-287,991	-276,387
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-103,976*	1,944	0,000	-109,779	-98,174
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-9,511*	1,944	0,000	-15,3135	-3,709
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-7,324*	1,944	0,006	-13,126	-1,522
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	1,749	1,944	0,944	-4,054	7,551
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-280,440*	1,944	0,000	-286,242	-274,638
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-102,228*	1,944	0,000	-108,029	-96,425
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-7,763*	1,944	0,003	-13,564	-1,960
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-5,575	1,944	0,066	-11,377	0,227
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	282,189*	1,94	0,000	276,387	287,991
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	280,440*	1,944	0,000	274,638	286,242
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	178,213*	1,944	0,000	172,410	184,015
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	272,678*	1,944	0,000	266,875	278,479
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	274,865*	1,944	0,000	269,063	280,667
GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de	GI: aceite de oliva + solución salina	103,977*	1,944	0,000	98,174	109,779
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	102,228*	1,944	0,000	96,425	108,029
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-178,213*	1,944	0,000	-184,015	-172,410
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	94,465*	1,944	0,000	88,663	100,267

0,5 mg/kg y aceite de oliva	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	96,653*	1,944	0,000	90,850	102,455
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	9,511*	1,944	0,000	3,709	15,314
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	7,763*	1,944	0,003	1,960	13,565
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-272,678*	1,944	0,000	-278,479	-266,875
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-94,465*	1,944	0,000	-100,267	-88,663
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	2,188	1,944	0,868	-3,615	7,989
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	7,324*	1,944	0,006	1,522	13,126
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	5,575	1,944	0,066	-0,227	11,377
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-274,865*	1,944	0,000	-280,667	-269,063
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-96,653*	1,944	0,000	-102,455	-90,850
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-2,188	1,944	0,868	-7,989	3,615

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 9

Pruebas estadísticas de ANOVA para los niveles de transaminasa glutámico oxalacética

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	79 908,421	5	15 981,684	859,378	<0,001
Dentro de grupos	781,066	42	18,597		
Total	80 689,487	47			

Prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey

Variable dependiente: niveles de transaminasa glutámico oxalacético

Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GI: aceite de oliva + solución salina	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	1,71375	2,156	0,967	-4,723	8,151
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-111,260*	2,156	0,000	-117,697	-104,823
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-60,624*	2,156	0,000	-67,061	-54,187
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-25,471*	2,156	0,000	-31,909	-19,035
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-5,580	2,156	0,123	-12,017	0,857
GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	-1,714	2,156	0,967	-8,151	4,7230
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-112,974*	2,156	0,000	-119,411	-106,537
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-62,338*	2,156	0,000	-68,774	-55,901
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-27,185*	2,156	0,000	-33,622	-20,748
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	-7,294*	2,156	0,018	-13,731	-0,857
GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	GI: aceite de oliva + solución salina	111,260*	2,15	0,000	104,823	117,697
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	112,974*	2,156	0,000	106,537	119,411
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	50,636*	2,156	0,000	44,199	57,073
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	85,789*	2,15	0,000	79,352	92,226
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	105,680*	2,156	0,000	99,243	112,117

GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	60,624*	2,156	0,000	54,187	67,061
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	62,338*	2,156	0,000	55,901	68,774
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-50,637*	2,156	0,000	-57,073	-44,199
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	35,153*	2,156	0,000	28,716	41,589
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	55,044*	2,156	0,000	48,607	61,481
GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	GI: aceite de oliva + solución salina	25,472*	2,156	0,000	19,035	31,908
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	27,185*	2,156	0,000	20,748	33,622
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-85,789*	2,156	0,000	-92,226	-79,352
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-35,153*	2,156	0,000	-41,589	-28,716
	GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (0,05 mg/mL)	19,891*	2,156	0,000	13,455	26,328
GVI: CCl_4 (% v/v) + silimarina (50 µg/mL)	GI: aceite de oliva + solución salina	5,580	2,156	0,123	-0,857	12,017
	GII: EEtHm 1,0 mg/kg + aceite de oliva	7,294*	2,156	0,018	0,857	13,731
	GIII: CCl_4 (% v/v) y solución salina	-105,680*	2,156	0,000	-112,117	-99,243
	GIV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 0,5 mg/kg y aceite de oliva	-55,044*	2,156	0,000	-61,481	-48,607
	GV: CCl_4 (% v/v) + EEtHm a una dosis de 1,0 mg/kg y aceite de oliva	-19,892*	2,156	0,000	-26,328	-13,455

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Anexo 10

Recolección de la muestra de *Hylocereus monacanthus* en el Sector Monterrey, distrito de Paiján, provincia de Ascope, región La Libertad



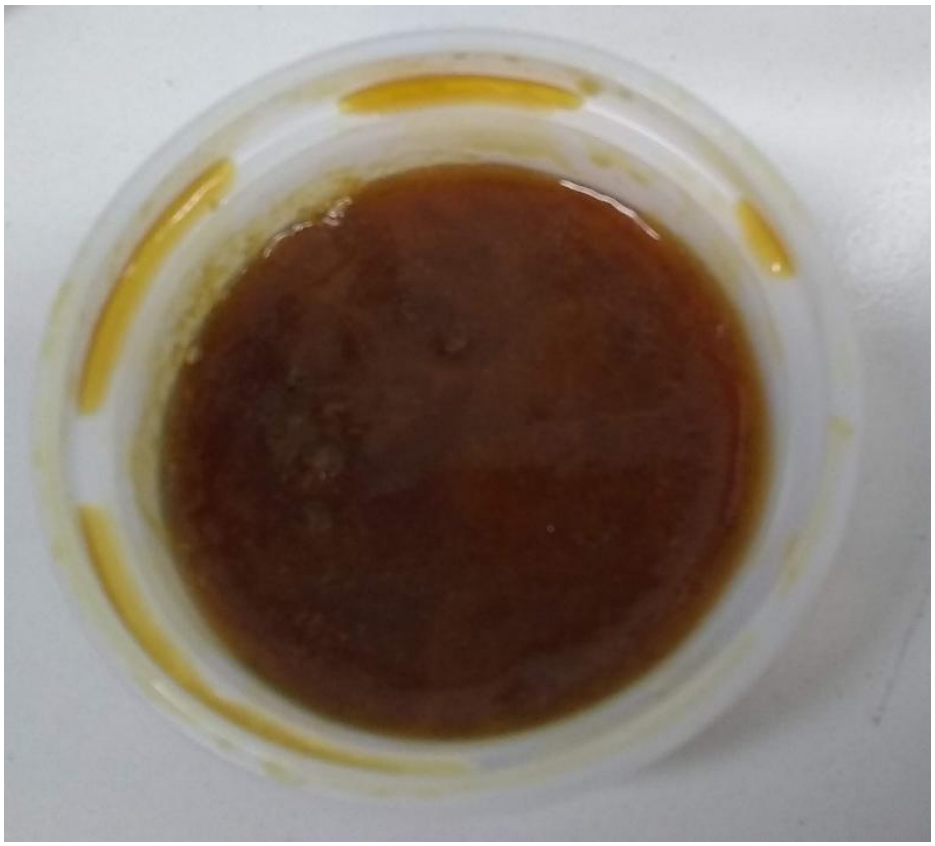
Anexo 11

Muestra de *Hylocereus monacanthus* en el Sector Monterrey, distrito de Paiján, provincia de Ascope, región La Libertad-Perú



Anexo 12

Preparación del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm)



Anexo 13

Preparación de las diluciones del extracto etanólico del *Hylocereus monacanthus* (EEtHm) para medir la actividad antioxidante



Anexo 14

Clasificación de las ratas albinas según el tipo de tratamiento experimental



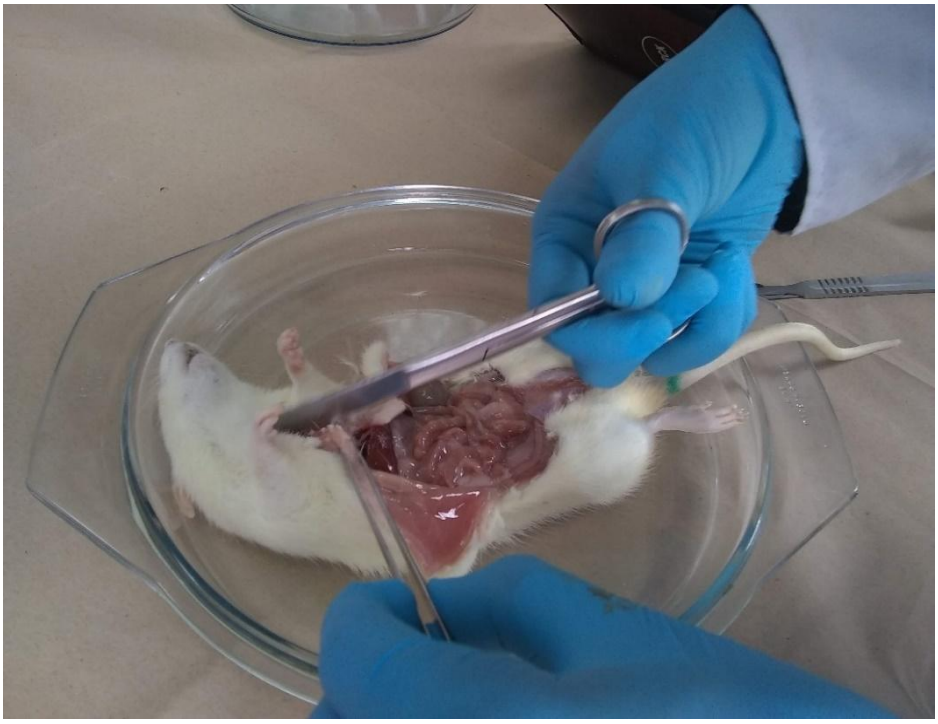
Anexo 15

Rotulado de los contendores del tejido hepático de ratas albinas sometidas a diversos tratamientos experimentales



Anexo 16

Extracción del hígado de una rata albina sometidas a un tipo de tratamiento experimental



Anexo 17

Muestra de hígado de rata albina sometidas a un tipo de tratamiento experimental



Anexo 18

Preparación del contendor del tejido hepático de ratas albinas para su análisis histopatológico



Anexo 19

Centrifugación la sangre de las ratas albinas sometidas a los diversos tratamientos para la determinación de los análisis bioquímicos

