



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Nutrición**

**Efecto protector de la almendra de semillas de  
*Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) en el daño  
hepático inducido por paracetamol en ratones**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición

**AUTOR**

Paul Herz ROSARIO LEÓN

**ASESOR**

Dr. Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2019



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

---

Rosario P. Efecto protector de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) en el daño hepático inducido por paracetamol en ratones [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

NO APLICA

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0002-6224-9165

DNI del autor:

Grupo de investigación:

SALUTARIS CIBUS E PLANTAE

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

FACULTAD DE MEDICINA: CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN

12° 03'28" S Y 77° 01'23" O

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2018-2019 (2 AÑOS)



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Medicina



**Escuela Profesional de Nutrición**

"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad!"

**ACTA N° 031 DE EXAMEN DE TITULACIÓN**  
**MODALIDAD DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el artículo 45° de la Ley Universitaria 30220, el Jurado de Sustentación nombrado por el Comité de Gestión y la Dirección de la Escuela Profesional de Nutrición, conformado por los siguientes Docentes:

*Presidente:* Q.F. Rosa Lorenza Oriondo Gates

*Miembros:* Lic. Marita Lozano Cueva

Lic. María La Barrera Mendoza

*Asesor:* Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Se reunió en la ciudad de Lima, el día lunes 16 de diciembre del 2019, para proceder a evaluar la **Sustentación de Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición** del bachiller:

**Paul Herz Rosario León**

Código de Matricula N° 11010434

**Tesis: "Efecto protector de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) en el daño hepático inducido por paracetamol en ratones"**  
(Aprobado con RD N° 0076-D-FM-2018)

El mencionado bachiller aprueba el examen de titulación, mediante la modalidad de sustentación de tesis, obteniendo la calificación de:

..... *Dieciséis* ..... (En letras)

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad.

*Rosa Lorenza Oriondo Gates*  
.....  
Q.F. Rosa Lorenza Oriondo Gates  
Presidente

*Marita Lozano Cueva*  
.....  
Lic. Marita Lozano Cueva  
Miembro

*María La Barrera Mendoza*  
.....  
Lic. María La Barrera Mendoza  
Miembro

*Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez*  
.....  
Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez  
Asesor



## DEDICATORIA

A mis padres Manuela y Vicente, por su cariño, amor y a la vez brindarme todo su apoyo incondicional durante ésta linda etapa universitaria, que forjaron en mí sus virtudes, para la culminación de mi carrera.

A mis hermanos Carmen, Danilo y Liz, por su aprecio y cariño, ser mis guías educacionales e incorporarme al ámbito de las ciencias de la salud desde muy temprana edad, fieles a sus estilos.

A Johanna, por su comprensión, cariño y amor que perdura en nuestra magnífica química, que con el transcurrir de los años hace que sea de mucha alegría, paz y sobre todo felicidad.

A todos ustedes, con mucho cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Huamán, por aceptar en ser mi asesor. Por sus aportes, conocimientos y consejos durante toda la ejecución de la presente investigación, considerándolo un gran amigo del laboratorio.

Al centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la UNMSM, por el espacio brindado para la ejecución de la investigación.

A la unidad de Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM, por la oportunidad brindada al financiar la presente investigación.

A la M.Sc Ivonne Bernui, por su apoyo desinteresado en el análisis estadístico, brindándome sus conocimientos y consejos en la presente investigación.

Al Dr. Hugo Castro, del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forense “Morgue Central de Lima”, por su apoyo en el procesamiento y las leyendas histológicas.

A los miembros del jurado de sustentación, por su tiempo, aportes y aprobación de la presente investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por su lucha constante en que no decline ante las adversidades durante la redacción de la presente investigación.

A Johanna, por escucharme y motivarme, dándome muchos consejos durante la realización de la presente, ya que sin su apoyo moral no hubiese culminado la actual investigación.

A mis tíos Meligio y María, que son mis segundos padres ocasionales, haciendo que mi niñez sea divertida y competitiva.

A Pier, Vanessa, Franco y Betsabe por ser mis primos y hermanos a la vez, donde compartimos la niñez con mucha algarabía y competitividad.

A mis amigos de la universidad, los “Rs” que con sus palabras, me motivaron a la culminación de la investigación e hicieron que sea inolvidable dicha etapa en San Fernando.

A mis amigos Juan Mollo, Elkin Pérez, Yessenia Carrión y Guillermo Mejía, por brindarme su apoyo durante la ejecución del proyecto, tanto en el laboratorio como en las aulas.

A mis amigos Rafael Vilchez, Pedro Rosario, Yordi Santander, Ángel Yépez y Alan Cárdenas, donde la constante lucha por optimizar el tiempo en horas de estudio, permitieron no rendirme en las aulas sanmarquinas.

## RESUMEN:

**Introducción:** Las enfermedades hepáticas son las primeras causas de demanda efectiva de hospitalización. El hígado, es el órgano que presenta múltiples funciones, entre ellas, la depuración de los fármacos. En su constante actividad, el hígado promueve sistemas internos de protección, que al no ser suficientes generan daño hepatocelular y morbilidades hepáticas. **Objetivo:** Evaluar el efecto protector del consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) inducido a daño hepático por paracetamol en ratones. **Diseño:** Experimental puro, con posprueba y grupo control. **Institución:** Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. **Material Biológico:** Almendra de semilla de *Cucurbita ficifolia* Bouché y 35 ratones machos *Mus musculus* de la cepa Balb/c, de dos meses de edad (27,2 g.  $\pm$  3,2). **Intervenciones:** Se dividió en 5 grupos (n=7), los cuales recibieron tratamiento por 10 días, al sexto día de tratamiento se les suministró paracetamol 300 mg/kg (excepto al G I): G I y G II, suero fisiológico (10 mL/kg); G III, Silimarina (70 mg/kg); los G IV y V, suspensión de almendra 400 mg/kg y 800 mg/kg de *Cucurbita ficifolia* Bouché, respectivamente. **Principales medidas de resultados:** Índice hepático, lipoperoxidación, glutatión reducido (GSH), GSH total, relación GSH/GSSG y estudio histológico. **Resultados:** La suspensión de almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) incrementó los niveles del GSH y la relación GSH/GSSG, existe una menor tendencia en los niveles de lipoperoxidación e índice hepático. A nivel histológico, evidencia regeneración del tejido hepático. **Conclusiones:** El consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) presenta efecto hepatoprotector frente a la toxicidad por paracetamol en ratones.

**Palabras claves:** Hígado, *Cucurbita ficifolia* Bouché, calabaza blanca, chichayo, chilacayote, paracetamol, acetaminofén, lipoperoxidación, glutatión, GSH/GSSG, histopatología.

## **ABSTRACT:**

**Introduction:** Liver diseases are the first causes of effective demand for hospitalization. The liver is the organ that has multiple functions, including drug clearance. In its constant activity, the liver promotes internal protection systems, which cannot have liver damage and liver morbidity. **Objective:** To evaluate the protective effect of the consumption of almonds from *Cucurbita ficifolia* Bouché seeds (white squash) induced to liver damage by paracetamol in mice. **Design:** Pure experimental, with post-test and control group. **Institution:** Biochemistry and Nutrition Research Center, Faculty of Human Medicine, National University of San Marcos, Lima-Peru. **Biological material:** *Cucurbita ficifolia* Bouché seed almond and 35 male *Mus musculus* mice of the Balb/c strain, two months old (27.2 g.  $\pm$  3.2). **Interventions:** It was divided into 5 groups (n = 7), which received treatment for 10 days, on the sixth day of treatment they were given paracetamol 300 mg/kg (except G I): G I and G II, physiological serum (10 mL/kg); G III, Silymarin (70 mg/kg); G IV and V, almond suspension 400 mg/kg and 800 mg/kg of *Cucurbita ficifolia* Bouché, respectively. **Main outcome measures:** Liver index, lipoperoxidation, reduced glutathione (GSH), total GSH, GSH/GSSG ratio and histological study. **Results:** The suspension of almonds from *Cucurbita ficifolia* Bouché seeds (white squash) increased GSH levels and the GSH/GSSG ratio, there is a lower trend in lipoperoxidation levels and liver index. At histological level, evidence of liver tissue regeneration. **Conclusions:** The consumption of the almond seeds of *Cucurbita ficifolia* Bouché (white squash) has a hepatoprotective effect against paracetamol toxicity in mice.

**Keywords:** Liver, *Cucurbita ficifolia* Bouché, white squash, chichlayo, chilacayote, paracetamol, acetaminophen, lipoperoxidation, glutathione, GSH/GSSG, histopathology.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	10
2.1. Hipótesis .....	10
2.2. Objetivo General .....	10
2.3. Objetivos Específicos .....	10
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	11
3.1. Tipo de estudio .....	11
3.2. Tamaño de la muestra .....	11
3.3. Variables .....	11
3.3.1. Variable independiente .....	11
3.3.2. Variable dependiente .....	11
3.3.3. Operacionalización de variables .....	12
3.4. Materiales .....	13
3.4.1. Materiales biológicos .....	13
3.4.2. Reactivos y fármacos .....	13
3.4.3. Equipos e instrumentos .....	13
3.5. Procedimientos experimentales .....	14
3.5.1. Prueba piloto .....	14
3.5.2. Recolección y preparación de la muestra .....	14
3.5.3. Condicionamiento y aclimatación .....	14
3.5.4. Ensayo experimental-método de inducción .....	14
3.5.5. Aspectos morfológicos del hígado .....	15
3.5.6. Aspectos bioquímicos del hígado .....	16
3.6. Análisis estadístico .....	19
3.7. Consideraciones éticas .....	19
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	20
4.1. Niveles de lipoperoxidación .....	20
4.2. Perfil del GSH .....	20
4.4. Índice hepático .....	22
4.4. Descripción histológica .....	22
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	33
6.1. Conclusiones .....	33
6.2. Recomendaciones .....	34
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	35

## **INDICE DE CUADROS**

TABLA N° 1: Niveles de lipoperoxidación y porcentaje de inhibición en tejido hepático según grupo de tratamiento.....	20
TABLA N° 2: Perfil del GSH reducido, GSH total y la relación GSH/GSSG en tejido hepático según grupo de tratamiento .....	21
TABLA N° 3: Índice hepático y porcentaje de inhibición según grupo de tratamiento.....	22

## **INDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1: Microfotografía del hígado de ratón del grupo I (coloración: HE) .....	24
FIGURA 2: Microfotografía del hígado de ratón del grupo II (coloración: HE) .....	24
FIGURA 3: Microfotografía del hígado de ratón del grupo III (coloración: HE) .....	24
FIGURA 4: Microfotografía del hígado de ratón del grupo IV (coloración: HE).....	24
FIGURA 5: Microfotografía del hígado de ratón del grupo V (coloración: HE).....	25
FIGURA 6: Microfotografía del hígado de ratón del grupo V (coloración: TM).....	25

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas representan un importante problema de salud pública a nivel mundial y es responsable de aproximadamente dos millones de muertes anuales<sup>(1)</sup>. El hepatocarcinoma como tal, representa entre el 70 al 90% del cáncer hepático primario, la incidencia estandarizada por edad es 10,1 por cada 100 000 habitantes, siendo mayor en el continente africano y parte de Asia en comparación con Europa, Asia centro meridional y Sudamérica<sup>(2,3)</sup>.

En el Perú, las enfermedades hepáticas son las primeras causas de demanda efectiva de hospitalización<sup>(4,5)</sup>, la cirrosis hepática ocupa el segundo lugar de las morbilidades digestivas y hepatobiliares, considerada como el segundo lugar entre las causas de mortalidad de las defunciones registradas y al hablar de las defunciones generales, ocupa la quinta posición en orden de magnitud<sup>(6)</sup>.

Las enfermedades hepáticas generan costo dependencia para quien lo desarrolla y también para el Estado. La alta prevalencia de éstas enfermedades no solo es su importancia clínica, más si lo son, el eventual progreso a hepatocarcinoma y por último, al paso de una enfermedad terminal. Estos problemas hepáticos causan el ingreso sanatorio, prolongándose la estancia hospitalaria que es producto de la discapacidad por la enfermedad, siendo a menudo asintomática e indolente en el paciente, hasta su posterior complicación<sup>(7,8)</sup>. Dentro de las causas principales se encuentran a la ingesta crónica del alcohol, la enfermedad viral crónica, la predisposición genética y algunos factores de riesgo como el síndrome metabólico, el sexo masculino, la edad avanzada. Se considera una edad promedio de 50 años, para el inicio de la enfermedad<sup>(9)</sup>.

El órgano visceral más exorbitante del cuerpo humano se denomina hígado. En las personas adultas, cuenta con un peso aproximado de 1300 g, siempre es ubicado debajo del diafragma, ocupando una gran zona del hipocondrio derecho, se encuentra circundada por una cápsula fibroelástica llamada Glisson. Desde la percepción anatómica, es dividida en cuatro lóbulos, dos grandes denominados lóbulo derecho y lóbulo izquierdo, además cuenta con dos lóbulos menores, denominados lóbulo caudado y el lóbulo cuadrado. Sin embargo, una porción menor es ubicada en el área epigástrica, sin lugar a dudas conforma la caja torácica, generalmente no puede palparse en personas saludables<sup>(10)</sup>.

El órgano hepático cumple un papel muy importante para el organismo, ya que presenta múltiples funciones, entre ellos de características metabólicas importantes, esencialmente con actividad digestiva, regulador hemostático, cuenta con actividad inmunológica y no menos importante, que actúa de reservorio de nutrimentos. Es un órgano sensible y a su vez susceptible a numerosos procesos inflamatorios, muchas veces producidos por infecciones virales, toxicidad por fármacos, en otros casos por estupefacientes y sus derivados metabólicos, aunque a veces afectado por defectos genéticos <sup>(11)</sup>. Actualmente se sabe que, el hígado es el órgano más activo durante el metabolismo de los fármacos, volviéndose un receptor diana muy vulnerable, sobre todo ante los efectos de dosis elevadas <sup>(12)</sup>.

El lobulillo hepático es la unidad funcional del órgano hepático. Cada lobulillo es estructuralmente cilíndrica, con un diámetro de 0,08 cm a 0,2 cm aproximadamente. El hígado contiene entre 50000 a 100000 lobulillos, el lobulillo hepático está organizado, tal es así, que está conformada por una secuencia de hepatocitos alrededor de una vena central, éstas drenan hacia las venas hepáticas, con dirección hacia la vena cava. Las ramificaciones pequeñas de la vena porta, las terminaciones de los conductos biliares y la arteria hepática, son ubicadas casi al perímetro de los lobulillos. Las placas hepáticas se encuentran divididas por ciertos capilares sinusoidales, que a su vez se encuentran recubiertas por dos tipos de células: las células endoteliales capilares típicas y las *células de Kupffer* <sup>(11,10)</sup>.

Las *células de Kupffer* son células reticuloendoteliales, cuenta con capacidad de eliminar y fagocitar células hemáticas viejas en el torrente portal, en el proceso que fluyen por la sinusoide. Dicho de paso, la acción fagocítica tiene la misión de eliminar bacilos entéricos y ciertas sustancias negativas de los alimentos, algunos fármacos, entre otros, que habitualmente son filtradas hacia el torrente sanguíneo, desde la absorción del intestino. Algunos fármacos y/o medicamentos son bien tolerados y depurados, mientras que otros producen una alteración a las células hepáticas <sup>(11)</sup>.

Un medicamento muy popular y ampliamente utilizado por sus propiedades analgésicas y antipiréticas es el paracetamol o acetaminofén, que puede inducir a hepatotoxicidad cuando se toman en sobredosis. Por lo general, el paracetamol es obtenido en cualquier expendio farmacéutico e incluso sin receta médica, es eficaz y seguro a dosis terapéuticas, muchas veces recomendadas bajo ciertas precauciones del cuadro patológico <sup>(13)</sup>. La categoría sanatoria de esta intoxicación, permanece no solo en su elevada prevalencia, sino también en el fortuito progreso en desarrollar cirrosis y en otras hacia el hepatocarcinoma <sup>(7)</sup>.

---

La sobredosis de paracetamol es la causa común de insuficiencia hepática aguda de adultos y sobretodo de niños, en los Estados Unidos y otros países <sup>(14)</sup>. El consumo a dosis mayores de lo recomendado puede ser tóxico para el hígado, esto ocurre con frecuencia tanto en personas sanas como en personas con alguna patología. Esto se debe a que durante la biotransformación del paracetamol en el hígado, se producen sustancias tóxicas que en pequeña cantidad, como la dosis baja, los sistemas defensivos del propio hígado las neutralizan. Sin embargo, si la dosis fue alta, estas sustancias tóxicas no podrían ser depuradas en su totalidad, produciendo daño a nivel de los hepatocitos <sup>(13)</sup>.

La depuración de los fármacos al pasar por los hepatocitos, implica tres procesos de fase. El proceso de fase I, mediante la alteración o la inhibición química de alguna sustancia. Las enzimas por lo general metabolizan los fármacos, estas enzimas se encuentran en el retículo endoplasmático liso de las células hepáticas, con especial ubicación de las membranas lipofílicas, generando reacciones de oxidación, reducción, hidroxilación, etc. Las reacciones pertenecen a la codificación de una serie de isoenzimas microscópicas denominadas citocromo P450, cada familia de genes se responsabiliza del metabolismo de algunos fármacos <sup>(10)</sup>.

Seguidamente el proceso de fase II, considerando la transformación de sustancias solubles en lípidos a derivados solubles en agua. Este proceso es denominado conjugación, implicado en la actividad enzimática del retículo endoplasmático encajando al fármaco, haciéndolo más hidrosoluble y ejecutar su posterior eliminación, vía urinaria o biliar. Otra alternativa, asociado al citocromo P450 que implica la detoxificación de productos reactivos, usualmente interactúa mediante la vía del Tiol del glutatión. Y por último, el proceso de fase III, la exudación de los fármacos, su actividad metabólica o sus conjugaciones son excretados como parte de la bilis <sup>(10)</sup>.

El paracetamol es metabolizado por enzimas del citocromo P450 a N-acetil-P-benzoquinoneimina (NAPQI), en sobredosis se genera una gran cantidad de NAPQIs, que puede agotar el glutatión reducido (GSH), el excedente de NAPQIs puede unirse a las proteínas mitocondriales, causando disfunción de las organelas (el retículo endoplasmático y el núcleo) <sup>(15)</sup> e incrementando el nivel de estrés oxidativo, lo que lleva a un daño hepatocelular y necrosis hepática centrolobulillar. En este proceso, la sobredosis de paracetamol puede aumentar el nivel de malondialdehído (MDA), el cual es producto de la lipoperoxidación <sup>(14)</sup>.

La biotransformación del paracetamol juega un papel crucial, al reducirse a compuestos menos agresivos durante su paso por el hígado. Éste proceso es denominado detoxificación hepática y es realizado durante la fase II en un 90%, donde son conjugados con el ácido glucurónico, sulfato y cisteína, para su posterior eliminación vía urinaria. En menor proporción, de casi el 3 % se oxidada en la fase I, a través del complejo citocromo P450, incrementando la solubilidad del agente tóxico<sup>(16,17)</sup>, específicamente por la isoformas CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A, el cual producen un compuesto denominado N- acetil benzoquinonemina (NAPQIs) altamente tóxico que posteriormente va reaccionar con el glutatión (GSH), depletándolos constantemente<sup>(18,17)</sup>.

Las manifestaciones clínicas por intoxicación del paracetamol presentan tres etapas. La primera dura aproximadamente 24 horas, con síntomas gastrointestinales, náuseas, vómitos, anorexia, malestar general y algunas veces epigastralgia. Al pasar las horas puede presentar mejoría, pero algunas veces las pruebas de función hepática ya se encuentran alteradas. La segunda etapa se inicia después de las 24 horas, presentando dolor en el hipocondrio derecho y se evidencia el tiempo de protrombina prolongado y de alteraciones de la función hepática. La tercera fase, se presenta de tres a cuatro días el curso con necrosis hepática, ictericia, sangrado, demencia, encefalopatía hepática, acidosis metabólica, alteraciones de las transaminasas, fosfatasa alcalina y compromiso hepato-renal, que conllevan en muchos casos a la muerte, sin embargo; en algunos casos existe fase de recuperación<sup>(19)</sup>.

El daño hepático se relaciona muchas veces con el estrés oxidativo, el cual es desencadenado por la generación de radicales libres. El estrés oxidativo se presenta cuando hay un incremento en la fabricación de radicales libres dentro del organismo, además que la capacidad defensiva de los antioxidantes resulta ser ineficiente, el cual provoca daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular. Existen sistemas enzimáticos en las células, que muchas veces evitan el incremento excesivo de las especies reactivas de oxígeno (EROS), limitando el ataque a daño de las células. La superóxido dismutasa (SOD) neutraliza el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), en tanto que la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH px) dismutan al peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )<sup>(20)</sup>.

El hígado al ser un órgano multifuncional, es muy susceptible a diferentes sustancias, tanto internas como externas. Muchas veces, el hígado cambia la estructura histológica al verse afectado, producto de la alteración se observa presencia de

---

fibrosis y hasta un grado de inflamación localizada en el órgano afectado <sup>(8)</sup>. El diagnóstico de las alteraciones hepáticas se confirman con pruebas bioquímicas (enzimáticas, bilirrubina, tiempo de protrombina), radiográficas, tomografías computarizadas e incluso la biopsia hepática para su diagnóstico definitivo <sup>(9)</sup>.

Una de las complicaciones es la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA), denominado en inglés como non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), actualmente catalogada como una de las morbilidades hepáticas con mayor frecuencia en manifestarse mundialmente <sup>(21)</sup>. A inicios de los 80, descrita de manera prematura por Ludwig y sus colaboradores, manifestando que los pacientes sin ingesta relevante de productos alcohólicos y que sin embargo al evaluar las biopsias hepáticas eran indistinguibles, pero similares a las de una morbilidad hepática alcohólica <sup>(22)</sup>. La EHGNA se manifiesta por muchas alteraciones que van desde la esteatosis simple (sobreproducción de grasa en las células hepáticas) a esteatohepatitis (EHNA), delimitada por el cuadro fibrótico avanzado y propiamente dicho a la cirrosis hepática <sup>(23)</sup>.

Otros fármacos, derivados de productos naturales, como es el caso del compuesto de la silimarina, catalogado como un potente antioxidante hepático. Generalmente éste fármaco neutraliza el estrés oxidativo, reforzando los niveles de antioxidantes de los hepatocitos porque al ser un flavonoglicano, cuenta con una mezcla de ciertos componentes como la silibina, silidianina y silicrisitina, restaurando el tejido celular, así también cumpliendo su efecto antioxidante <sup>(24)</sup>. La silibina incrementa la velocidad de síntesis del RNA ribosomal, estimulando la biosíntesis de proteínas en el hígado <sup>(25)</sup>. Otro fármaco, es la N-acetilcisteína (NAC) mayormente es de uso clínico, sobre todo para el uso de intoxicación por paracetamol. El NAC actúa de dos formas: la primera, sintetizando GSH, debido a que los NAPQI agotan los GSH, éstos se ven inmersos a constantes reacciones por el grupo tiol, bloqueando su progreso tóxico en los hepatocitos. Por otro lado, como sustituto del GSH, actuando en remplazo de los GSH en forma de aducto, a nivel intracelular, evitando así dañar el tejido hepático y reduciendo los niveles de NAPQI tóxicos <sup>(26)</sup>.

Existen factores que pueden condicionar al sistema inmunitario, tanto el déficit o el exceso de nutrientes, como la ingesta calórica, los tipos de grasas, los tipos de vitaminas y por ciertos minerales <sup>(27)</sup>. La dieta juega un papel importante para nuestra salud. El hígado generalmente es afectado por dietas con alto contenido de ácidos grasos saturados (AGS), algunas veces por ácidos grasos trans (AGT) y otras veces por el consumo adicional de fármacos y estupefacientes <sup>(28)</sup>. Sin embargo, las

---

alternativas y búsqueda de agentes nutricionales para la prevención de la depleción de nuestro sistema antioxidante, deben sustituirse constantemente mediante la dieta <sup>(10)</sup>.

En otros, compuestos esencialmente importantes para preservar la salud, como son los polifenoles y flavonoides, fuentes de antioxidantes se encuentran en las frutas, verduras, extractos vegetales <sup>(18)</sup>. Los antioxidantes de la dieta pueden actuar de dos formas. La primera, previniendo la proliferación de exceso de radicales libres (RL), evitando que se produzca un daño celular a futuro y el segundo, posteriormente al daño producido, los compuestos antioxidantes propios de los alimentos que contrarrestan los niveles de RL, evitando la agresión o daño celular <sup>(29)</sup>.

El concepto de alimento nutraceutico, ha sido reconocido como *"aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de uno o varios agente bioactivos de un alimento y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal"* (Arai S. *et al.* 2006). Según el Consejo Internacional de Información sobre Alimentos en el 2008, menciona que los alimentos funcionales, aparte de cumplir su papel nutritivo básico, tienen la capacidad de proporcionar efecto positivo en aras de la salud, evitando el riesgo de sufrir alguna morbilidad <sup>(30)</sup>.

En los últimos años se ha prestado especial interés en nutraceuticos y/o agentes protectores del hígado de origen natural, muchas plantas medicinales, mediante suspensiones y/o extractos para el consumo preventivo de enfermedades <sup>(31)</sup>. Los productos nutraceuticos son "suplementos alimenticios" que son tomados en dosis superiores a las existentes en esos alimentos, y que tienen un efecto favorable sobre la salud, mayor al que podría tener el alimento en su forma de consumo natural <sup>(30)</sup>.

En esencia, los nutraceuticos contienen nutrientes que abarcan una amplia gama de productos, que deben cumplir algunos criterios: como los productos de origen natural, no empapados a métodos que desnaturalicen su condición, aportar beneficios para la salud, beneficios de una o más actividades fisiológicas-preventivas y curativas, además de aportar estabilidad entre los nutrientes que los contiene. (Pérez H. *et al.* 2006) <sup>(30)</sup>.

La *Cucurbita ficifolia* Bouché es de la familia *Cucurbitaceae*, del Género *Cucurbita* L. (1981), cuyo nombre común en el Perú es calabaza blanca, chiclayo o alcayote; en Bolivia, blanca; en Colombia, Auyama; en Estados Unidos, Fig leaf squash y en México, chilacayote <sup>(32)</sup>. Se ha reportado que su producción abarca desde México

hasta Chile y Argentina. Esta especie se distribuye a lo largo de la cadena montañosa de los andes, pasando por el Perú. Se considera que es originaria de los andes peruanos, teniendo en cuenta que los más antiguos registros de semillas de la especie, fueron hallados junto con restos arqueológicos, con una antigüedad aproximada de 4 700 años en Huaca Prieta, en la región de la Libertad <sup>(33)</sup>.

La *Cucurbita ficifolia* Bouché requiere suelos ricos, con buen drenaje y que retengan humedad suficiente, con ambientes soleado, aunque a veces pueden tolerar ambientes adversos pero no heladas (OECD *et al.*, 2012). La siembra es en forma directa, generalmente se depositan de dos a tres semillas en cada hoyo, ésta última de tres a cinco centímetros de profundidad. La *Cucurbita ficifolia* Bouché se caracteriza por presentar un rápido proceso de germinación, a los tres días de imbibición de la semilla. El lapso de crecimiento desde la siembra de las semillas hasta la cosecha de los frutos maduros es de seis a siete meses. En el periodo de la cosecha se extraen los frutos verdes y maduros. (Marco Antonio León *et al.*) <sup>(33)</sup>.

La planta de la calabaza blanca o alcayota (*Cucurbita ficifolia* Bouché), puede llegar a producir hasta 50 frutos, un fruto puede contener hasta 500 semillas aproximadamente <sup>(33)</sup>. Las semillas son de forma piriforme de color negro y con bordes negros generalmente liso o uniforme con un promedio de longitud de 20,1 mm por un ancho de 11,7 mm, teniendo un peso promedio de 25,2 g <sup>(34)</sup>. Las semillas maduras no cuentan con endospermos netamente funcionales. El que completa la cubierta de la semilla es el embrión, las reservas son almacenadas en los cotiledones que están compuestos por lípidos, en pequeños somas esféricos que tienen por nombre esferosomas, además de contener proteínas. La calabaza blanca, especialmente en el fruto, el compuesto con mayor predominio del mesocarpio son los hidratos de carbono, sin embargo, las semillas tienen predominio de proteínas y lípidos, que representan aproximadamente entre el 80-85% del peso seco del embrión <sup>(35)</sup>.

De acuerdo a la composición química de la harina de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché en 100 gramos contiene: 428,7 kilocalorías, 13 g de proteínas, 12,3 g de grasa, 66,5 g de carbohidratos, 68,7 mg de Calcio, 29,9 mg de Sodio, 72 g de Fósforo, 444 mg de Potasio, 470 mg de Magnesio, 0,8 mg de Manganeso, 3,5 mg de Hierro, 3 mg de Zinc <sup>(33)</sup>. Entre ellos, el selenio, el zinc, el manganeso, por ser parte del núcleo activo de las enzimas, mantienen el buen funcionamiento de algunos órganos, de los cuales destaca el órgano hepático. Los minerales de las semillas de las *Cucúrbitas*, están comprometidos con la producción endógena de antioxidantes <sup>(29)</sup>. El aceite de las semillas está compuesto básicamente por ácido oleico, ácido palmítico (Radovich

---

et al., 2011)<sup>(33)</sup>. Además, otras especies de las *Cucúrbitas* reportan la presencia de selenio en el aceite de las semillas<sup>(36,37,38,39)</sup>.

Martínez Aguilar y cols, en el 2011 reportan que las semillas de algunas variedades de *Cucurbitáceas*, como la *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata* (calabaza), mediante la cromatografía gas-líquido, contienen ácidos grasos esenciales, fitoesteroles (beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y estigmastenol) y escualeno<sup>(40)</sup>. Gemrot y cols, en el 2006 manifiestan que las semillas de *Cucurbita pepo* (calabaza) contienen ácidos grasos esenciales, antioxidantes y vitaminas. Por ello, las semillas aportan 51% de grasa, además presenta  $\gamma$ -tocoferol, siendo el 96% de los tocoferoles totales. Pero los tocoferoles de las semillas tostadas contienen 68mg/100g de semilla y las semillas no tostadas presentan 107,4mg/100g de semilla. Sin embargo, las pérdidas del  $\gamma$ -tocoferol fue del 36% y aun así es el más resistente a la oxidación ambiental<sup>(41)</sup>.

En el estudio sobre la composición nutricional de cuatro variedades de semilla de *Cucurbita spp*, presentan una cantidad importante de proteínas que oscila de 29,6 a 29,8 %, los lípidos de 30,4 a 40,8 % y los carbohidratos de 5,9 a 7,2 %. La presencia de ácidos grasos saturados oscila en 19,6 a 25,0% y de los insaturados entre 38,8 a 52,4 %. Dentro de los saturados destacó el palmítico en un 13 a 15,3% y el esteárico en 6,5 a 9,8; de los insaturados el linoléico en 37,8 a 52,6% siendo éste el más predominante, el n-9 oleico en 27,2 a 38,3% y el araquídico en 0,5 a 0,8%, este último confiriéndole su calidad de aceite vegetal comestible<sup>(42)</sup>.

La presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), como son el ácido  $\alpha$ -linolénico en menores cantidades<sup>(39,43)</sup> y el ácido linoléico<sup>(42,43)</sup>, en las almendras de las semillas de las *Cucúrbitas*, cuyas funciones del ácido linoléico es de producir prostaglandinas de serie 1 (PG1), mientras que el ácido  $\alpha$ -linolénico produce las prostaglandinas de serie 3 (PG3), éstos a su vez poseen capacidad antiinflamatoria, reduciendo los cuadros inflamatorios<sup>(44)</sup>.

Eraslam y cols, reportan el efecto antioxidante del aceite de semillas de las cucúrbitas a través de los fenoles, la vitamina E, el  $\beta$ -caroteno y fitoesteroles<sup>(37)</sup>. Otro estudio del extracto acuoso de cuatro semillas de las cucurbitáceas, donde determinaron las concentraciones de fenoles, resveratrol y quercetina, demostraron su capacidad antioxidante<sup>(45)</sup>. El escualeno, es otro compuesto que forma parte del aceite de las semillas, su estructura química está conformado por hidrocarburos alifáticos insaturados, demostrando su capacidad antioxidante<sup>(37,40)</sup>.

Los flavonoides presentes en la dieta <sup>(18)</sup>, entre ellos la quercetina, presentan capacidad antioxidante <sup>(29)</sup>, previniendo la peroxidación lipídica, en ese sentido atenúan los depósitos de colágeno y el proceso de fibrinogénesis a nivel hepático, además de actuar a un 50% más de su capacidad antioxidante a nivel del gen de la regulación del GSH, induciendo la producción de glutatión (GSH), además de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) y alterando vías de expresión de proteínas celulares <sup>(46)</sup>.

Considerando la presente investigación de interés por el bienestar de la salud, debido a que en el Perú las enfermedades hepáticas son las primeras causas de demanda efectiva de hospitalización y a su vez ocupa el segundo lugar entre las causas de mortalidad, que mediante el consumo de la suspensión de almendras se podría contribuir a lentificar las enfermedades hepáticas y sus etapas, además de actuar como coadyuvante al tratamiento convencional. El costo beneficio de este tratamiento es bajo, en comparación con los tratamientos convencionales, porque las semillas de la *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) generalmente son desechadas y no se aprovechan en su totalidad, generando un bajo costo en adquirirlas. Se produce en cantidades suficientes en el norte del país, ya que muchos mercados nacionales son abastecidos por esta región <sup>(34)</sup>.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

El consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) tiene efecto protector en el daño hepático inducido por paracetamol en ratones.

### **2.2. Objetivo General**

Evaluar el efecto protector del consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) inducido a daño hepático por paracetamol en ratones.

### **2.3. Objetivos Específicos**

Determinar el efecto del consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) sobre la morfología del tejido hepático, inducido a daño hepático por paracetamol en ratones.

Determinar el efecto del consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) sobre los indicadores bioquímicos del daño hepático, inducido a daño hepático por paracetamol en ratones.

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo de estudio

Es un estudio experimental puro, diseño con posprueba y grupo control <sup>(47)</sup>.

#### 3.2. Tamaño de la muestra

Se emplearon 35 ratones *Mus musculus* de la cepa Balb/c.

#### 3.3. Variables

##### 3.3.1. Variable independiente

**Almendra de la *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca)**, se encuentra conformada por el endospermo y embrión de la semilla *Cucurbita ficifolia* Bouché, el cual pasará a ser triturado en un mortero y resuspendido en agua <sup>(35)</sup>.

##### 3.3.2. Variable dependiente

**Efecto protector del hígado**, “salvaguardar al hígado de los efectos dañinos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, considerados de gran importancia para ser denominados hepatoprotectores” <sup>(48)</sup>.

### 3.3.3. Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	PUNTOS DE CORTE	ESCALA DE MEDICIÓN
<p><u>Variable independiente:</u></p> <p><b>Almendra de la <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché (calabaza blanca):</b> Endospermo y embrión de la semilla <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché, el cual pasará a ser triturado en un mortero y resuspendido en agua <sup>(35)</sup>.</p>	-----	Suspensión de almendra.	<p>Dosis:</p> <p>* 400 mg/kg.</p> <p>* 800 mg/kg.</p>	Razón
<p><u>Variable dependiente:</u></p> <p><b>Efecto protector del hígado:</b> “Salvaguardar al hígado de los efectos dañinos de hepatotoxinas que el hombre ingiere o contrarrestar las alteraciones de los mecanismos de defensa antirradicalarios” <sup>(48)</sup>.</p>	Bioquímico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• % de variación de la lipoperoxidación.</li> <li>• % de variación del GSH</li> <li>• % de variación del GSH total.</li> <li>• Variación del cociente GSH/GSSG.</li> </ul>	Comparado con el grupo control.	Razón
	Morfológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• % de variación respecto del índice hepático.</li> <li>• Cambios en la citoarquitectura (Cambios cualitativos del tejido hepático).</li> </ul>		<p>Razón</p> <p>Cualitativa</p>

### **3.4. Materiales**

#### **3.4.1. Materiales biológicos**

- ◆ Ratones *Mus musculus* de la cepa Balb/c.
- ◆ Almendra de semilla de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca).

#### **3.4.2. Reactivos y fármacos**

- ◆ Paracetamol (Sigma-Aldrich).
- ◆ 5,5-dihitrio-bis (2-nitrobenzoico ácido)-3-carboxyl-4-nitrophenildisulfide (DTNB) (Sigma).
- ◆ Ácido tricloroacético (TCA) (Scharlaw).
- ◆ Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).
- ◆ Buffer TRIS (Sigma).
- ◆ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Merck).

#### **3.4.3. Equipos e instrumentos**

- ◆ Homogenizador marca: Ultra –Turrax; modelo: IKA-T10BASIC.
- ◆ Espectrofotómetro marca: GREETMED; modelo: NV203.
- ◆ Centrifugadora marca: GREETMED; modelo: GTT119-300.
- ◆ Balanza analítica modelo: RADWG®; modelo: WTB20021.
- ◆ Baño María marca: AVALIER; modelo: VL-32.
- ◆ Estufa marca: Unic´s®.
- ◆ Mortero de porcelana.

### **3.5. Procedimientos experimentales**

#### **3.5.1. Prueba piloto**

En este proyecto se ejecutó la prueba piloto, con el propósito de conocer y depurar los posibles inconvenientes en la administración, los niveles de concentración y las dosis a utilizarse en la suspensión de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché y tanto como las del paracetamol.

#### **3.5.2. Recolección y preparación de la muestra**

Se utilizó semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca), recolectándose en el mercado "Campo Ferial 6 de Junio" en San Juan de Lurigancho - Lima (enero del 2018), dicho mercado es abastecido por la sierra norte del Perú.

Para ello, se seleccionó cierta cantidad de semillas de la calabaza blanca para tostarlo con movimiento constante durante 5 minutos, luego se retiró el tegumento seminal (epispermo) y la cutícula que se encuentra alrededor del endospermo, obteniéndose las almendras de las semillas. Se pesó dosis equivalentes en diferentes concentraciones y se envolvió en papel aluminio, fue almacenado en botellas de color ámbar a temperatura de 4°C. La suspensión de almendra se obtuvo por trituración en un triturador (mortero) de porcelanato, hasta lograr la masa de consistencia fina, para luego ser resuspendida en agua, ésta preparación de la suspensión se hizo minutos antes de la administración.

#### **3.5.3. Condicionamiento y aclimatación**

Se emplearon 35 ratones *Mus musculus* de la cepa Balb/c, de sexo macho, de etapa adulta de dos meses de edad, con peso de  $27,2 \pm 3,2$  g, obtenidos del Bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina, los cuales tuvieron un periodo de siete días en fase de acondicionamiento en jaulas metálicas, en ambiente controlado con temperatura de 20 grados Celsius, ciclando alternadamente de medio día de fase luz y medio día de fase oscuridad. Todos los grupos tuvieron alimentación balanceada y agua *ad libitum*, en el transcurso del tratamiento.

#### **3.5.4. Ensayo experimental-método de inducción**

Al término del período de acondicionamiento, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos (n=7) y donde recibieron las siguientes sustancias durante 10 días, por vía per-oral:

- ◆ **Grupo I:** Recibió suero fisiológico (10 mL/kg).
- ◆ **Grupo II:** Recibió suero fisiológico (10 mL/kg).
- ◆ **Grupo III:** Recibió Silimarina (70 mg/kg).
- ◆ **Grupo IV:** Recibió suspensión de almendra (400 mg/kg).
- ◆ **Grupo V:** Recibió suspensión de almendra (800 mg/kg).

En el día seis del tratamiento, vía per-oral se administró a todos los grupos, excepto al grupo I, una dosis de 300 mg/kg del fármaco paracetamol, hasta el final del ensayo. Al término de los tratamientos experimentales, los ratones estuvieron sometidos a la privación de alimentos y agua, por un lapso de 14 horas antepuesto al sacrificio.

El día del sacrificio se registró el peso de los ratones, posteriormente, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (dosis: 26 mg/kg) vía intraperitoneal, luego se ejecutó la laparotomía para obtener el órgano hepático, el cual fue sumergido en NaCl 0,9% para su lavado, luego se pesó el órgano, posteriormente el lóbulo mayor se seccionó en dos porciones, la primera porción se conservó en formol (10%) en una solución de NaCl 0,9% para el estudio histológico y la segunda porción fue conservado a 4°C para los estudios bioquímicos.

### 3.5.5. Aspectos morfológicos del hígado

#### Determinación del índice hepático

El índice hepático (IH) fue determinado como el porcentaje del peso del tejido hepático respecto al peso del animal, a través de la fórmula:

$$\% \text{ IH} = \frac{W_h}{W_a} \times 100$$

Dónde:

$W_h$ : peso del hígado.

$W_a$ : peso del animal.

Además, se expresó el % de inhibición tomando como referencia al grupo II.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{IH_{G2} - IH_{G_{TTO}}}{IH_{G2}} \times 100$$

$IH_{G2}$ : media del índice hepático del grupo II.

$IH_{G_{TTO}}$ : media del índice hepático del grupo tratamiento.

### **Método Histológico**

La porción almacenada en formol al décimo por ciento (10%) tamponado NaCl 0,9%, fueron fijadas en cera líquida y se hicieron cortes, se usó la tinción hematoxilina eosina como contraste para identificar los elementos celulares y la tricrómica de Masson para identificar la estructura del espacio portal-hepático. Se ejecutó en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forense “Morgue central de Lima”. Las láminas fueron examinadas por el especialista Patólogo, logrando identificar los siguientes semblantes: de la estructura hepática, el espacio portal de Kiev, las células de Kupffer, los conductos biliares y las células hepáticas tanto en forma y núcleo.

#### **3.5.6. Aspectos bioquímicos del hígado**

##### **Determinación de lipoperoxidación**

“Mediante el método de John Buege y Steven Aust en 1978”<sup>(49)</sup> y “modificado por Silvia Suárez en 1995”<sup>(50)</sup>.

**Fundamento:** El malondialdehído, en condiciones ácidas y de temperaturas altas, reacciona 2 moles de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con un mol de malondialdehído, dando paso a un complejo cromógeno o de pigmentación rosada siendo detectado por la espectrofotometría a una longitud de onda de 535 nanómetros, donde su intensidad del color deberá ser proporcional al nivel de lesión hepática.

**Protocolo:** Se tomó 0,3 mL del homogenizado y se agregó 0,6 mL de ácido tricloroacético 20%, luego se llevó a baño María hirviendo por 10 minutos. Finalizado el tiempo, se dejó enfriar y se agregó el 0,9 mL de ácido 2 - tiobarbitúrico 0,67%/HCl 0,25 N y se volvió a llevar a baño María por 20 minutos. Al término del tiempo, se centrifugó a 4000 rpm por el lapso de 15 minutos y leyéndose a 535 nm.

Los cálculos de concentración fueron determinados a través de la fórmula:

$$[\text{TBARS nmol/g}] = \frac{\text{ABS}(\text{Mp} - \text{BI}) \times V_{\text{Rx}} \times V_{\text{H}} \times 10}{\epsilon \times l \times V \times W}$$

VRx: volumen de la reacción 1,8 mL

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V: volumen del homogenizado para reacción 0,3 mL

l: longitud de la cubeta 1 cm

VH: Volumen del homogenizado 5 mL

W: peso del tejido para el homogenizado, aproximadamente 0,5 g

Además se determinó el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación, a través de la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{TBARS}_{\text{G2}} - \text{TBARS}_{\text{TTO}}}{\text{TBARS}_{\text{G2}}} \times 100$$

TBARS<sub>G2</sub>: índice de la media del TBARS del grupo II

TBARS<sub>TTO</sub>: índice de la media del TBARS del grupo tratamiento

### Determinación del perfil glutatión en hígado

Mediante el método de Sadlak y Lindsay <sup>(51)</sup>.

**Fundamento:** Para la determinación del GSH se utilizó el DTNB, los cuales reaccionaron dando la coloración amarilla. Para depurar los grupos sulfhidrilos presente en las glicoproteínas del tejido hepático se utilizó ácido tricloroacético y para evitar la activación de las metaloproteasas se empleó el EDTA, que es un quelante de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ), los cuales son activadores de las enzimas.

**Desproteínizado:** Se tomó 1 mL del homogenizado anteriormente preparado y se agregó 0,8 mL de agua destilada y 0,4 mL de ácido tricloroacético 50%. Se agitó intermitentemente por 10 minutos y luego se centrifugó a 4500 RPM por un lapso de 15 minutos.

**Determinación de GSH reducido:** Del sobrenadante del desproteínizado, se tomó 0,5 mL y se adicionó 2 mL de buffer tris 0,4 mol/L a pH 8,9; inmediatamente se llevó a baño María a 70° C por 10 minutos. Posteriormente se añadió 0,05 mL de DTNB a 0,01 mol/L, se agitó para combinarlo. Luego se leyó en el espectrofotómetro a 412 nm.

Los resultados estuvieron expresados en mg de GSH/g de tejido, a través de la fórmula:

$$[\text{GSH mg/g}] = \frac{\text{Fc} \times \text{Vh} \times \text{VD} \times \text{VRX}}{\text{VHD} \times \text{VSN} \times \text{W}}$$

VHD: Volumen del homogenizado para la precipitación 1mL  
VD: Volumen de desproteinizado 2,2mL  
Vsn: Volumen del sobrenadante 0,5mL  
VRx: Volumen de la reacción 2,525mL  
Vh: Volumen de homogenizado aproximadamente 2,5 mL  
W: peso del tejido a homogenizar. Aproximadamente 0,3 g

Y también fueron expresados en % de incremento:

$$\% \text{ de incremento de GSH} = \frac{(\text{IGS}_t - \text{IGS}_c)}{\text{IGS}_c} \times 100 \%$$

IGS<sub>t</sub>: índice de la media de grupos sulfhidrilos no proteico del tratamiento.

IGS<sub>c</sub>: índice de la media de grupos sulfhidrilos no proteico del control.

**Determinación de GSH total:** Del sobrenadante del desproteinizado se tomó 0,0005 L y se adicionó 0,002 L de buffer tris 0,4 mol/L a pH 8,9 en medio reducido (14 mg de vitamina C / 7 mg de Ac. Glioxílico/14 mL de buffer), inmediatamente se llevó a baño María a 70° C por 10 minutos). Posteriormente se añadió 0,05 mL de DTNB a 0,01 mol/L, se agitó para mezclar. Luego se leyó en el espectrofotómetro a 412 nm.

Los resultados estuvieron expresados en mg de GSH total/g de tejido, a través de la fórmula:

$$[\text{GSH mg/g}] = \frac{\text{Fc} \times \text{Vh} \times \text{VD} \times \text{VRX}}{\text{VHD} \times \text{VSN} \times \text{W}}$$

VHD: Volumen del homogenizado para la precipitación 1mL  
VD: Volumen de desproteinizado 2,2mL  
Vsn: Volumen del sobrenadante 0,5mL  
VRx: Volumen de la reacción 2,525mL  
Vh: Volumen de homogenizado aproximadamente 2,5 mL  
W: peso del tejido a homogenizar. Aproximadamente 0,3 g

Y también fueron expresados en % de incremento:

$$\% \text{ de incremento de GSH} = \frac{(IGS_t - IGS_c)}{IGS_c} \times 100 \%$$

IGS<sub>t</sub>: índice de la media de grupos sulfhidrilos no proteico del tratamiento.

IGS<sub>c</sub>: índice de la media de grupos sulfhidrilos no proteico del control.

### 3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados y ordenados en una hoja de cálculo MS-Excel 2013, por lo que fueron procesados y analizados con el paquete estadístico SPSS v.25.0. Donde se ejecutó la prueba de Shapiro–Wilk o de normalidad, para preferir la prueba estadísticamente adecuada. Al obtener una distribución normal, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de medias, teniendo en cuenta para más de dos muestras independientes y también la prueba *post hoc* T de Dunnett, comparándose el grupo II (control positivo) con los grupos tratados. Sin embargo, al obtener una distribución no normal, se empleó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para muestras independientes y se comparó el grupo II con los demás grupos en tratamiento, mediante la vía de corrección Bonferroni. Posteriormente se utilizó la estadística descriptiva como el promedio aritmético, la desviación estándar y también la variación porcentual, considerándose valores de significancia de un  $p < 0,05$ .

### 3.7 Consideraciones éticas

Las consideraciones éticas fueron las mismas consignadas mediante: “una reflexión consciente sobre el uso y cuidado de los animales en investigación, articulando tanto los conceptos técnicos como los éticos, involucrando lenguajes cotidianos para el científico actual como la calidad, validez y competitividad científica <sup>(52)</sup>. Además, de la Ley N° 30407, cuya finalidad es garantizar el bienestar y la protección de todas las especies de animales vertebrados domésticos o silvestres mantenidos en cautiverio, en el marco de la protección de la vida, la salud de los animales y la salud pública. Además, el Artículo 19: “Los centros de educación superior y especializados, las medidas de bienestar animal utilizados en actos de experimentación, investigación y docencia, basadas en prácticas de manejo, bioseguridad y bioética de acuerdo a la especie animal” <sup>(53)</sup>.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Niveles de lipoperoxidación

Tras la administración de paracetamol 300 mg/kg, en los diferentes grupos II, III, IV y V, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, existe la tendencia de un menor nivel, en los grupos V y IV que fueron tratados con suspensión de almendra a 800 mg/kg y 400 mg/kg respectivamente. Además, el grupo III reportó el máximo nivel de TBARS, en comparación con el grupo II.

Tabla N° 1: Niveles de lipoperoxidación y porcentaje de inhibición en tejido hepático según grupo de tratamiento

	TBARS* <sup>(T)</sup>	% Inhibición
	nmol/g	
Grupo I	29,32 ± 2,35	--
Grupo II	31,28 ± 2,36	--
Grupo III	31,88 ± 3,91	-1,92
Grupo IV	30,57 ± 4,22	2,27
Grupo V	27,27 ± 3,68	12,82

Media ± DE (n=7).

\*  $p > 0,05$ .

<sup>(T)</sup> ANOVA  $p > 0,05$ .

### 4.2. Perfil del GSH

Tras la administración del paracetamol, el grupo V (suspensión almendra 800 mg/kg + paracetamol 300 mg/kg) que reportó incremento del GSH (reducido) al compararse con el grupo I (suero fisiológico 10 mL/kg), presentó diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Seguida de incremento del GSH con el grupo II (suero fisiológico 10 mL/kg + paracetamol 300 mg/kg) y el grupo III (silimarina 70 mg/kg + paracetamol 300 mg/kg), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Mientras que el indicador GSH total, se observó que tras la administración de paracetamol, el grupo II reportó el mayor valor numérico, sin presentar diferencia estadísticamente significativa, seguida del grupo III. Reportando los menores valores en los grupos I y V, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

Al determinar la relación GSH/GSSG, el grupo V reportó el mayor cociente numérico, al compararse con el grupo II y I, donde presentó diferencias estadísticamente significativas con ( $p < 0,05$ ) y ( $p < 0,01$ ), respectivamente. Sin embargo, los menores valores fueron para el grupo I y II, éste último grupo al ser comparado con el grupo I presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Mientras que el grupo III también presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) al ser comparado con el grupo I. El grupo IV presentó diferencias estadísticamente significativas con ( $p < 0,01$ ) y ( $p < 0,05$ ) comparado con el grupo I y V, respectivamente.

Tabla N° 2: Perfil del GSH reducido, GSH total y la relación GSH/GSSG en tejido hepático según grupo de tratamiento

	GSH				
	Reducido*		Total <sup>λ</sup>		Relación <sup>p</sup>
	mg/g	Incremento %	mg/g	Incremento %	GSH/GSSG
Grupo I	25,94 ± 8,14	--	43,95 ± 13,96	--	1,45 ± 0,10 <sup>(b)</sup>
Grupo II	34,83 ± 6,13	--	53,83 ± 10,11	--	1,85 ± 0,10
Grupo III	34,04 ± 6,94	-2,27	50,80 ± 12,23	-5,63	2,15 ± 0,43 <sup>(c)</sup>
Grupo IV	33,36 ± 7,60	-4,22	50,56 ± 13,30	-6,07	2,11 ± 0,60 <sup>(c)</sup>
Grupo V	36,52 ± 8,82 <sup>(a)</sup>	4,85	49,64 ± 13,89	-7,78	3,09 ± 0,90 <sup>(b) (c)</sup>

Media ± DE (n=7).

\*  $p > 0,05$ ; ANOVA  $p > 0,05$ .

<sup>λ</sup>  $p > 0,05$ .

<sup>p</sup>  $p < 0,01$ .

<sup>(a)</sup>  $p < 0,05$  contrastado con el grupo I.

<sup>(b)</sup>  $p < 0,05$  contrastado con el grupo II.

<sup>(c)</sup>  $p < 0,01$  contrastado con el grupo I.

#### 4.4. Índice hepático

El tratamiento de paracetamol 300 mg/kg en los diferentes grupos II, III, IV y V no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, existe la tendencia de un menor índice en los grupos que fueron tratados. Además se observó menores valores del índice, tanto en los grupos V y IV, que recibieron suspensión de almendra a 800 mg/kg y 400 mg/kg respectivamente, con respecto al grupo II. En ese sentido, el grupo III que recibió silimarina 70 mg/kg, produjo menor índice que el grupo IV.

Tabla N° 3: Índice hepático y porcentaje de inhibición según grupo de tratamiento

	ÍNDICE HEPÁTICO* (T)	% Inhibición
	%	
Grupo I	6,21 ± 0,50	--
Grupo II	6,42 ± 0,99	--
Grupo III	6,18 ± 0,68	3,74
Grupo IV	6,31 ± 0,56	1,71
Grupo V	5,54 ± 0,66	13,71

Media ± DE (n=7).

\*  $p > 0,05$ .

(T) ANOVA  $p > 0,05$ .

#### 4.4. Descripción histológica

De acuerdo al estudio histológico, nos presenta:

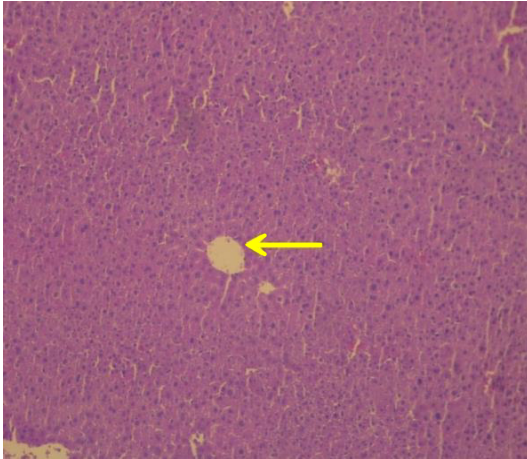
**Grupo I:** La citoarquitectura de los hepatocitos presentaron columnas bien distribuidas, orientadas en relación a la vena centrolobulillar, los hepatocitos con núcleos bien definidos y la cromatina de posición céntrica. La vena centrolobulillar mostró estructura definida y bien conformada. Los vasos sanguíneos con epitelio plano, conservados y con escasos hematíes a nivel intraluminal. El espacio intersticial conservado y dentro de los límites normales. El espacio portal de Kiev conservado, conformado por la triada (arteria, vena y conducto biliar). Los conductos biliares conservados y sin alteraciones del epitelio cúbico.

**Grupo II:** Se evidenció necrosis de la citoarquitectura de los hepatocitos (en la zona 2) con infiltrado de linfocitos y hematíes. Presentó borramiento del núcleo y macronúcleo hepático, con cromatina gruesa y algunos hipercromáticos. Se evidenció alteración y distorsión de la estructura de los lobulillos hepáticos. Los vasos sanguíneos con venas pletóricas aumentadas de lumen y congestivas con infiltración de linfocitos. El espacio intersticial disminuido y con algunas zonas de colapso. El espacio portal de Kiev infiltrado por mononucleares y polimorfonucleares, compuesto por linfocitos. Los conductos biliares hiperplásico y aumento del lumen con distorsión del epitelio cúbico.

**Grupo III:** Se evidenció que en algunas zonas de la citoarquitectura de los hepatocitos presentó necrosis extensa y multifocales, con algunas microvesículas intracitoplasmáticas. Borramiento del núcleo de los hepatocitos, algunos macronúcleos, binucleados e hipercromáticos. Alteración y distorsión de la estructura de los lobulillos hepáticos. Los vasos sanguíneos bien congestivos y pletóricos. El espacio intersticial con leve dilatación en algunas zonas y en otros bien disminuidos, además de presentar pigmentación amarillenta biliar. El espacio portal de Kiev distorsionado, donde hubo infiltraciones linfocitarias y edemas. Los conductos biliares con infiltrado de linfocitos y bien distribuidos.

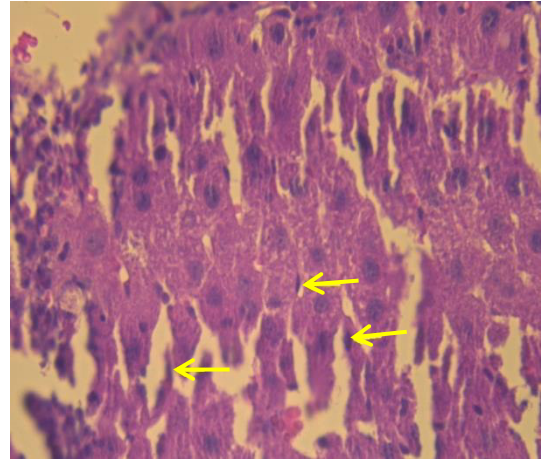
**Grupo IV:** La citoarquitectura de los hepatocitos mostró un área de necrosis en 2/3 de la muestra, presencia de fibroblastos y células viables con ciertas zonas de regeneración. La zona del núcleo presentó macronúcleos hipercromáticos y nucléolos. La estructura de los lobulillos hepáticos con alteración en menos del 35% y distorsión con necrosis en 30% de la muestra. Los vasos sanguíneos con dilatación y congestión de la vena centrolobulillar, presencia de angiogénesis. El espacio intersticial conservado y presencia de células de kupffer aumentada. El espacio portal de Kiev con proliferación de macrófagos e infiltrado linfocitario. Presencia de hiperplasia de los conductos biliares.

**Grupo V:** La citoarquitectura de los hepatocitos mostró un área de necrosis en la zona 3 en un 20% de la muestra, con focos regenerativos. Presencia de binucleación. La estructura de los lobulillos hepáticos recuperados (regenerados). Los vasos sanguíneos con ausencia de angiogénesis. El espacio intersticial con abundantes células de kupffer. El espacio portal de Kiev mostró ausencia de infiltrado linfocitario, de características normales y sin alteraciones. Los conductos biliares únicos presentes y ausencia de infiltrado linfocitario.



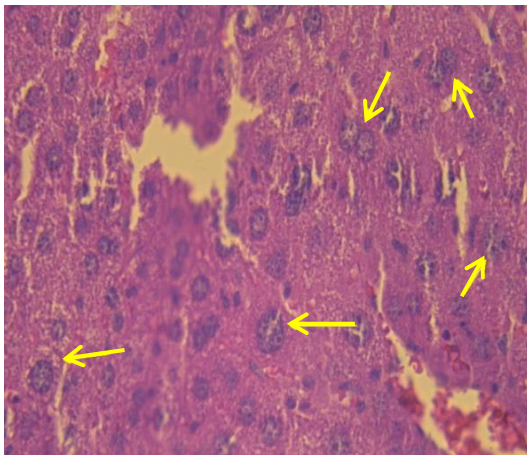
**Figura 1.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo I: Hígado sin tratamiento. Sin alteración tisular. Núcleos bien definidos y posición céntrica. *Flecha:* vena centrolobulillar bien definida y conformada.

Coloración: Hematoxilina eosina (10x).



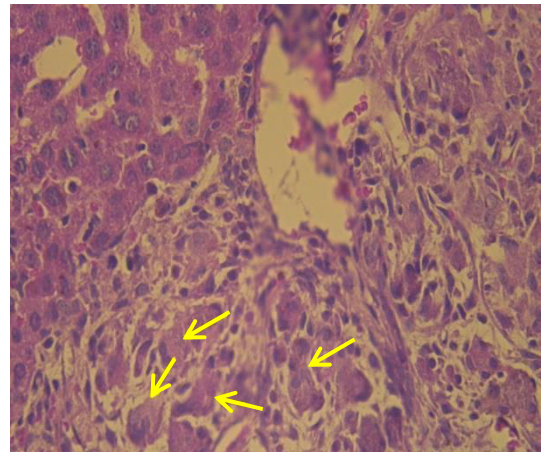
**Figura 2.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo II: Hígado con tratamiento exclusivo de paracetamol. Necrosis de la citoarquitectura. Respuesta inflamatoria en la triada. *Flecha:* células de Kupffer.

Coloración: Hematoxilina eosina (40x).



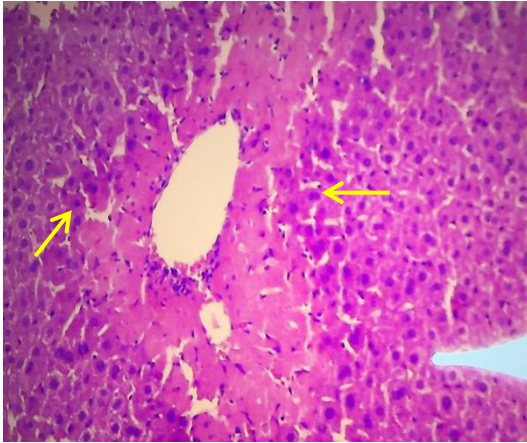
**Figura 3.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo III: Hígado con tratamiento de silimarina y paracetamol. Aumento del tamaño del núcleo, regeneración celular. *Flechas:* regeneración celular, binucleación y macronúcleo hepático.

Coloración: Hematoxilina eosina (40x).



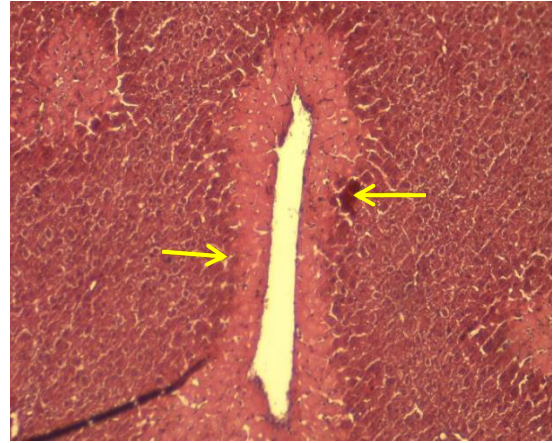
**Figura 4.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo IV: Hígado con tratamiento de suspensión de *Cucurbita ficifolia* Bouché 400 mg/kg y paracetamol. Cuadro regenerativo dentro del área de necrosis por el paracetamol. *Flechas:* división de las células hepáticas, foco regenerativo celular.

Coloración: Hematoxilina eosina (40x).



**Figura 5.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo V: Hígado con tratamiento de suspensión de *Cucurbita ficifolia* Bouché 800 mg/kg y paracetamol. Cuadro de regeneración alrededor de la zona 3 o vena centrolobulillar. *Flechas:* foco regenerativo de las células hepáticas y binucleación.

Coloración: Hematoxilina eosina (40x).



**Figura 6.** Microfotografía del hígado de ratón del grupo V: Hígado con tratamiento de suspensión de *Cucurbita ficifolia* Bouché 800 mg/kg y paracetamol. Lesiones alrededor de la zona 3 o vena centrolobulillar y regeneración multifocal. *Flechas:* lesión y cuadro de regeneración.

Coloración: Tricrómica de Masson (10x).

## V. DISCUSIÓN

El especial interés en buscar agentes protectores, sobre todo de origen natural, para el órgano visceral más grande del cuerpo, como es el hígado, fue el impulso para realizar la presente investigación. En nuestro medio, existe un número reducido de manuscritos de fitoterapia, debido a que el lenguaje de mayor difusión, en el territorio peruano, fue el oral. Probablemente, las informaciones sufrieron distorsiones con el transcurso y pasar de los siglos.

En la presente investigación, tras la administración vía per-oral del paracetamol a una dosis de 300 mg/kg, provocó a nivel microscópico alteración y distorsión de los lobulillos hepáticos, necrosis de la citoarquitectura de los hepatocitos, infiltración de linfocitos y hematíes (Figura 2). Con respecto al índice hepático, no mostró diferencias significativas (Tabla N° 3). En cuanto al perfil bioquímico, reportó mayor nivel de lipoperoxidación, sin alcanzar a ser significativo (Tabla N° 1). Los niveles del GSH y los niveles del GSH Total fueron altos, sin presencia de significancia, sin embargo la relación GSH/GSSG es menor al compararse con el grupo V, mostrando diferencias significativas (Tabla N° 2).

Los resultados obtenidos por el grupo II, guardan relación con la ingesta de paracetamol a dosis elevadas, presentando lesión hepática <sup>(16)</sup> y/o insuficiencia hepática aguda <sup>(14)</sup>. El paracetamol se biotransforma en compuestos menos agresivos, durante el metabolismo de fase II en el hígado. Éste proceso denominado detoxificación hepática se realiza por conjugación con el ácido glucorónico, sulfato y cisteína, para su posterior eliminación por vía urinaria. Sin embargo, en la fase I, el fármaco se hidroxila por el complejo citocromo P450 (isoformas: CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A), incrementándose la solubilidad del agente tóxico <sup>(16,17)</sup>.

En condiciones de intoxicación por paracetamol, se genera una mayor cantidad de N-acetil benzoquinonemina (NAPQI), potencialmente tóxico <sup>(16,17,18)</sup>. Ésta sustancia a su vez produce niveles altos de especies reactivas del oxígeno (ROS), sobre todo radicales libres, donde genera alteraciones en la estructura morfológica del hepatocito, con tendencia a la muerte celular programada o apoptosis <sup>(15,54)</sup>. A nivel histológico, se presencié necrosis de los hepatocitos con presencia de infiltración linfocitaria y hematíes, el cual guarda relación con los niveles altos de lipoperoxidación <sup>(14,16,17)</sup>.

Al crearse un cuadro inflamatorio activan al factor nuclear kappa  $\beta$  (NF-K $\beta$ ), provocando la producción de las citoquinas proinflamatorias <sup>(27)</sup>. La inflamación, la apoptosis y/o necrosis del tejido hepático conllevan al incremento del factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>(12,17)</sup>, el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), éste último actúa como citoquinas profibrótica y activando a las células hepáticas estrelladas (HSC)<sup>(55)</sup>. Dado que, las citoquinas proinflamatorias activan a las células de kupffer y a su vez al reclutamiento de las células inflamatorias (neutrófilos y monocitos), siendo éstas las responsables del incremento del TNF- $\alpha$ , que condicionan la infiltración por neutrófilos como en la necroinflamación, activación macrofágica<sup>(24)</sup>, la apoptosis celular y desarrollando la lesión del tejido hepático<sup>(55)</sup>.

El NAPQI, producido por el CYP es conjugado mediante el grupo tiol (-SH) nucleofílico, del glutatión, que en condiciones de sobredosis del fármaco, los niveles de glutatión se depletan a nivel del hígado<sup>(18,20)</sup>. Esta reacción provoca el desbalance en la formación y regeneración del GSH, dando como resultado el estrés oxidativo<sup>(29)</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio hallamos niveles altos de GSH y GSSG. Se ha reportado que el estrés oxidativo genera incremento de la apoptosis celular, reaccionando con las principales organelas, como las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el núcleo, según Meister, citado por Martínez en el 2006, menciona que dentro de estas organelas, el nivel del GSH se incrementa en la apoptosis, esto puede tener relación con el incremento de GSH en el grupo II<sup>(15)</sup>.

Similares estudios en ratones, como el de Choi y cols, en el 2013, reportan que al inducir al cuadro de la hepatotoxicidad por acetaminofén, generó daño significativo del órgano hepático, manejado a una dosis de 300 mg/kg intramuscular, dando como resultados el incremento de los niveles ALT y AST, pero también elevado niveles del GSH<sup>(56)</sup>, que concuerdan notablemente con nuestro estudio. Bermúdez y cols, en el 2014 indujo a la hepatotoxicidad empleando una dosis mayor de 600 mg/kg de paracetamol, reportando alteraciones de la morfología hepática de los ratones, expresado en el incremento de los indicadores bioquímicos en el plasma (ALT, AST, FAL y bilirrubina total)<sup>(57)</sup>. Hilario y Mejía, en el 2016 indujeron a la toxicidad hepática por paracetamol con dosis de 300 mg/kg, reportando incremento del GSH, el índice hepático, lipoperoxidación y disminución del cociente GSH/GSSG, pero también la presencia a nivel celular, reportando hepatitis tóxica como producto final de la alteración hepática<sup>(58)</sup>.

Otros estudios, Huamán y cols, en el 2013 indujeron a la toxicidad hepática en ratas por paracetamol, con dosificación de 400 mg/kg, reportando daño hepatocelular, corroborado por el incremento de los indicadores bioquímicos como los niveles de lipoperoxidación, bilirrubina total, bilirrubina directa y bilirrubina indirecta, mostrando diferencias significativas<sup>(17)</sup>. Caballero, en el 2014 logró inducir a la toxicidad hepática

en ratas por paracetamol, dosificando 400 mg/kg, reportando daño hepático y por consiguiente el incremento significativo de ALT, AST, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta y niveles de lipoperoxidación (<0,01), con disminución significativa de albumina y proteínas totales <sup>(59)</sup>.

El tratamiento con silimarina 70 mg/kg + paracetamol 300 mg/kg, se observó a nivel histológico extensas zonas de necrosis multifocales y en la citoarquitectura de los hepatocitos. También se observó “borramiento” de los núcleos de hepatocitos, pero con presencia de algunos macronúcleos e hiper cromáticos, además se identificó hepatocitos binucleados (Figura 3). Respecto al espacio intersticial, presentó leve dilatación y algunas muestras evidenciaron zonas bien disminuidas. También presentó pigmentación amarillenta biliar. En cuanto a los niveles de lipoperoxidación e índice hepático (Tabla N° 1 y Tabla N° 3, respectivamente), no presentaron diferencias estadísticamente con el grupo II. Sin embargo, existe incremento en la relación GSH/GSSG frente al grupo I y II, siendo significativo con el primero (Tabla N° 2).

Lo reportado por el grupo III, guarda relación con el efecto antioxidante de la silimarina, ya que su metabolismo es a nivel hepático, también es conocido como un regenerador celular. Generalmente reduce los niveles del estrés oxidativo, disminuyendo el desarrollo del daño hepático inducido por paracetamol <sup>(25)</sup>. La silimarina es una mezcla de al menos siete componentes, que pertenece a los flavonoglicanos, los cuales cumplen el rol de antioxidante. Uno de los componentes es la silibina A, el cual es efectivo como hepatoprotector, mejorando los cuadros de inflamación y disminuyendo los niveles de lipoperoxidación <sup>(60)</sup>. Este flavonoglicano se conjuga mediante su anillo aromático con el grupo oxo, actuando como donador de electrones, expresando de esta forma su capacidad antioxidante <sup>(25)</sup>.

Los rasgos inflamatorios observados en el grupo III fueron menores respecto al grupo II, esto puede estar relacionado a que la silibina A, inhibe la translocación nuclear de las subunidades p50, p65 y a la transcripción del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) dependientes del TNF- $\alpha$ , contribuyendo a la disminución inflamatoria, esto fue evidenciado en la infección por hepatitis viral C, en cultivo de hepatoma humano <sup>(24,25)</sup>, inhibiendo al interferón (IFN $\gamma$ ), la interleucina 2 (IL-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de esta forma reduciendo el cuadro de fibrosis celular <sup>(61)</sup>.

La silibina A también actúa como esteroide natural y aumenta la velocidad de síntesis del RNA ribosomal, por ello estimula la biosíntesis de proteínas en el hígado, lo que implica el desempeño reparador y restaurador de los hepatocitos dañados <sup>(25)</sup>. La

silimarina aumenta la relación GSH/GSSG, el cual es un indicador del estado redox del organismo <sup>(62)</sup>. Un estado redox aumentado está relacionado con la diferenciación y proliferación celular <sup>(15)</sup>, el cual puede estar expresado por la presencia de los hepatocitos binucleados. Estas características probablemente estén asociadas a los niveles altos de la relación GSH/GSSG y a los hepatocitos binucleados, promoviendo así la regeneración hepatocelular.

Los hallazgos encontrados en el grupo III, han sido reportados en estudios similares por Huamán y cols, en el 2013, que administraron silimarina a una dosificación de 300 mg/kg en ratas, logró la inhibición de los niveles de TBARS en tejido hepático y suero ( $p < 0,01$ ) <sup>(17)</sup>. Hilario y Mejía, en el 2016, administraron silimarina 70 mg/kg de dosis, reportando disminución de los niveles de TBARS y glutatión total, sin embargo existe un incremento del GSH, del índice hepático y la relación GSH/GSSG <sup>(58)</sup>. Arnao y cols, en el 2012, administraron silimarina en ratas, por lo que dosificaron 50 mg/kg, al evaluar el efecto hepatoprotector en muestras de suero y hematíes, donde reportaron su efecto antioxidante expresado en la relación superóxido dismutasa y catalasa (SOD/CAT) que fueron similares a sus grupos controles <sup>(18)</sup>. Sin embargo, en otros estudios similares, suministraron silimarina a 25 mg/kg en ratas, donde reportó incremento del tejido hepático comparado con el grupo I <sup>(63)</sup>.

Los grupos IV y V, que recibieron suspensión de almendras de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) más paracetamol, se observaron a nivel histológico un 67% del área con necrosis (grupo IV), con visualización de fibroblastos y células viables con zonas de regeneración. También se evidenció la presencia de macronúcleos hipercromáticos y visualización del nucléolo. La estructura de los lobulillos hepáticos presentó una alteración, menor al 35%, siendo algunos multifocal, con presencia de las células de Kupffer. Mientras que en el grupo V, la evidencia histológica muestra área de necrosis en la zona 3, aproximadamente en un 20%, con focos regenerativos, además se observó presencia de binucleación. Las muestras presentaron recuperación de los lobulillos hepáticos. En el espacio intersticial se observó abundantes células de kupffer, el espacio portal de Kiev fue normal, al igual que los conductos biliares. Los hallazgos del índice hepático y de lipoperoxidación, presentaron menores niveles que el grupo II. La relación GSH/GSSG en ambos grupos fue mayor que el grupo II, siendo significativo solo con el grupo V (Tabla 2).

Las semillas de la *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) contienen ácidos grasos como el ácido oleico y ácido palmítico <sup>(33)</sup> e importantes cantidades de ácidos grasos insaturados (AGI) <sup>(41)</sup>, como son el ácido linoléico, el araquídico, donde un

estudio de cuatro variedades de semillas de *Cucurbita*, reporta el predominio del ácido linoléico <sup>(42,43)</sup> y otro estudio menciona que existe en menor medida el ácido  $\alpha$ -linolénico <sup>(39,43)</sup>. También contiene fitoesteroles y escualeno <sup>(40,39)</sup>, además cuenta con aminoácidos, como el triptófano <sup>(39)</sup>, la metionina, treonina, lisina y arginina, como lo menciona Martínez <sup>(64)</sup>. Otros estudios reportan el contenido de algunos minerales como el calcio, fósforo, hierro, zinc, sodio, potasio, magnesio, manganeso y selenio <sup>(36,37,38,39)</sup>, además de la presencia de algunas vitaminas como la Tiamina (B1), Riboflavina (B2) y otras como la C y E, mencionadas por Lira en 1999 <sup>(65,66)</sup> y las vitaminas D y K, por Casio en el 2000 <sup>(43)</sup>.

El contenido de estos aceites de las semillas de las *Cucúrbitas*, pueden generar cambios fisiológicos de ciertas enzimas, como la glutatión peroxidasa (GSH px), catalasa y superóxido dismutasa, que probablemente se le asocia a su potente actividad de eliminar radicales libres <sup>(37)</sup>. En ese marco, nuestro estudio corroboraría las tendencias de niveles bajos de lipoperoxidación y los niveles altos del GSH de los grupos tratamientos IV y V, contrarrestando la previa inducción del daño hepático con paracetamol, que generó radicales libres como en el grupo II.

La presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en las almendras de las semillas de las *Cucúrbitas*, tales como el ácido  $\alpha$ -linolénico <sup>(39,43)</sup> y el ácido linoléico <sup>(42,43)</sup>, que son productoras de prostaglandinas de la serie 3 (PG3) y prostaglandinas de la serie 1 (PG1), respectivamente. Éstos a su vez poseen capacidad antiinflamatoria, vasodilatadora y pueden actuar como antiagregante plaquetario, reduciendo así el cuadro inflamatorio de algunas enfermedades <sup>(44)</sup>. A partir del ácido  $\alpha$ -linolénico (omega 3) se originan las resolvinas, que controlan las respuestas inflamatorias alteradas mediante la regulación de leucocitos y estimulando la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos <sup>(27)</sup>, en tal sentido, esto podría estar relacionado con los resultados de nuestro grupo V, donde reportamos un menor nivel del índice hepático y bajos niveles de lipoperoxidación.

Los fitoesteroles que poseen las semillas de las *Cucúrbitas* <sup>(40,36)</sup>, tienen la estructura muy similar al colesterol, sus propiedades se asocian a reducir los niveles de colesterol sanguíneo, a reducir el riesgo de padecer algún tipo de cáncer y a mejorar la respuesta inmune <sup>(43)</sup>. Estos aceites poseen capacidad antiinflamatoria, en estudios relacionados con la hipertrofia benigna prostática (HBP) <sup>(36)</sup>. Fruhwirth y cols, en el 2007 reportan su efecto antioxidante, se cree que está relacionado con la prevención de daños severos a la membrana celular, por efecto de los radicales libres <sup>(37)</sup>. Otro componente del aceite de las semillas, es el escualeno <sup>(40)</sup>, se cree que exhibe su

efecto antioxidante favoreciendo a los ácidos grasos insaturados, al proteger las membranas lipídicas contra el daño de los radicales libres, es decir, este efecto inhibitorio sobre la lipoperoxidación es catalizada por las lipooxigenasas <sup>(37)</sup>.

Los flavonoides <sup>(18)</sup>, entre ellos la quercetina, presente en el género de la cucurbita, disminuye los efectos dañinos de los radicales libres (RL), evitando que se produzca daños a nivel celular dentro del organismo <sup>(29)</sup>, además evita que ocurra la peroxidación lipídica. También atenúa el proceso de fibrinogénesis a nivel hepático e induce al proceso de producción de GSH, elevando los niveles <sup>(46)</sup>. En otro estudio, mencionan que la quercetina inhibe la NADPH del sistema citocromo P450 en microsomas hepáticos, de modo que impide a los xenobióticos que logren formar radicales libres (RL) <sup>(67)</sup>. Los flavonoides neutralizan el oxígeno reactivo (aniones superóxido, radicales hidroxilo e hidroperóxidos), bloqueando su acción de dichas sustancias sobre las células. Además, inhiben a las monooxigenasas dependientes del citocromo P450, regulando el papel de la activación de carcinógenos <sup>(46)</sup>.

Gemrot y cols, manifiestan que las semillas de la *Cucurbita pepo* (calabaza), contienen vitaminas como el  $\gamma$ -tocoferol, el cual es un antioxidante <sup>(41)</sup>. En otro estudio, se reportó la presencia de gran aporte de la  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol <sup>(36,68)</sup>, al representar a la vitamina E como el antioxidante más eficiente de naturaleza lipídica y puede estar asociado como protector de cáncer <sup>(68)</sup>. La vitamina E se unirían a los radicales libres para evitar la oxidación de las membranas celulares <sup>(37)</sup>. El  $\alpha$ -tocoferol, implicado en las actividades enzimáticas y de algunas moléculas participantes de la señalización celular y la expresión génica, tanto en la inhibición de la activación de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> del citosol y de la ciclooxigenasa 1, logrando estimular la libertad de las prostaciclina, de modo que se inhibiría la lipoperoxidación <sup>(69)</sup>. En el estudio de Eraslan y cols, sugieren que los compuestos preventivos del daño en diversos órganos (hígado, riñón, bazo, etc.) giran en torno a los compuestos como la vitamina E,  $\beta$ -caroteno y otros compuestos (fenoles, esteroides), que existen en el aceite de semillas de la *Cucurbita pepo* <sup>(37)</sup>.

El contenido del aceite de semillas de la *Cucurbita* contiene  $\beta$ -caroteno, cuya capacidad actúa a nivel enzimático, al interrumpir la actividad de lipoperoxidación producto de la acción de aflotoxinas, en un modelo experimental en 48 ratones. La vitamina A, se unirían a los radicales libres, evitando así la oxidación de los ácidos grasos, propio de las membranas celulares <sup>(37)</sup>. En cierta medida, el  $\beta$ -caroteno es el precursor de retinol, que tiende a formarse más rápido debido a su anillo  $\beta$ -ionona <sup>(70)</sup>. Además, el aceite de semillas de la *Cucurbita* cuentan con carotenoides xantófilos,

como la luteína y la zeaxantina <sup>(36,68)</sup>, asociado al bloqueo de los radicales libres, productos del estrés oxidativo a nivel macular <sup>(71)</sup>.

Los minerales de las semillas de las *Cucúrbitas*, están comprometidos con la producción endógena de antioxidantes <sup>(29)</sup>. El Selenio, es el mineral más importante en la actividad antioxidante, ya que mediante el seleno-proteínas produce el incremento de los niveles de glutatión, al reintegrarse a la glutatión peroxidasa (GSH px). Previene la necrosis hepática, optimiza la respuesta inmune celular y humoral a través de los fenómenos de fagocitosis <sup>(72)</sup>. En efecto, nuestros resultados de los grupos tratados con suspensión de almendras de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) guardan relación con lo antes descrito.

Los grupos tratados con la suspensión, indican mejorías en la estructura histológica, teniendo en cuenta su efecto antiinflamatorio y hepatoprotector en las células HepG2 <sup>(73)</sup>, de modo que se comprueba su efecto en la regeneración del tejido hepático. La visualización a nivel microscópico resalta focos regenerativos en mayor proporción en el grupo V y la prevalencia de hepatocitos con signos de regeneración (Figura 5), donde reportamos la presencia de hepatocitos binucleados.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

- ✓ El consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) presenta signos de regeneración hepatocelular a nivel histológico, siendo de mayor intensidad a una dosis de 800 mg/kg, frente al daño hepático por paracetamol.
- ✓ El consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) presenta efecto protector en los indicadores bioquímicos (GSH, GSH total, GSH/ GSSG, TBARS) al daño hepático frente al paracetamol.
- ✓ Se evidencia que el consumo de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca) presenta efecto hepatoprotector frente a la toxicidad por paracetamol en ratones.

## 6.2. Recomendaciones

- ✓ Determinar y evaluar la actividad enzimática de transaminasas: como la Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), para evaluar la función hepática y ampliar la metodología de los indicadores bioquímicos.
- ✓ Evaluar y cuantificar la actividad enzimática de la Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y la Glutación peroxidasa (GPx) para ampliar la metodología de los indicadores bioquímicos.
- ✓ Ejecutar pruebas sobre DPPH de la almendra de semillas de *Cucurbita ficifolia* Bouché (calabaza blanca), para determinar la capacidad antioxidante.
- ✓ Ejecutar pruebas *in vitro* del hígado, para el estudio del daño hepático inducidos por fármacos a largo plazo.

## VII. REFERENCIAS

1. Jody-Olson. Acute-on-chronic and descompensated chronic liver failure definitions. Epidemiology, and prognostication. Crit Care Clin. 2016; 32: p. 301-9.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; 136: p. E359 - E386.
3. Elizalde-Apestegui y cols. El hepatocarcinoma en la Comunidad Foral de Navarra: estudio de características y evolución en la práctica clínica habitual. An. Sist. Sanit. Navar. 2016; 39(2): p. 249-260.
4. C. Bustíos, M. Dávalos, R. Román, E. Zumaeta. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. Rev Gastroenterol Perú. 2008; 27(3): p. 238-245.
5. Ofelia Castillo, Claudio Flores. Mortalidad por enfermedades digestivas no neoplásicas en la población adulta del Perú, 2010 - 2015. An Fac med. 2019; 80(1): p. 39 - 44.
6. Larico-Bernabé. Características clínicas, complicaciones y evaluación de sobrevida de los pacientes con cirrosis hepática del hospital Hipólito Unanue de Tacna 2010-2012. 2013;: p. 1.
7. Shimada, Hashimoto, Taniai, Hasegawa. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol. 2002; 37(1): p. 154-160.
8. Giraldo, Barraza, Villa, Martínez, García. Caracterización epidemiológica de pacientes con cirrosis en una consulta de gastroenterología en Pereira, Colombia, 2009-2012. Rev. Méd. Risaralda. 2014; 20(2): p. 86 - 94.
9. Detlef Schuppan, Nezam Afdhal. Liver Cirrhosis. Lancet. 2008; 371(9615): p. 838-851.
10. Grossman, Matsson-Porth. Porth Fisiopatología, Alteraciones de la salud. Conceptos Básicos. 9th ed.: Wolters Kluwer; 2014.
11. A Guyton, J Hall. Tratado de Fisiología Médica. In.: El Sevier; 2016.
12. María José Gomez-Lechón Moliner. Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos. An Real Acad Farm. 2017; 83(2): p. 255 - 267.
13. Andrade, Ángela-Muñoz, Raúl J. Paracetamol e hígado. In. Madrid; 2011. p. 276.

14. Wei-Xia, Feng-Lan, Yue-Ying, Bao-Xu. Protective effects of 5-methoxypsoralen against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *World Journal of Gastroenterology*. 2012 Mayo; 18(18): p. 2197-2202.
15. María Martínez, Domingo Barrado, Marcela Zubillaga, Alfredo Hager, Tomas De Paoli, José Boccio. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión, Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2006; 40(1): p. 45-51.
16. A. Dueñas-Laita, A. Dueñas-Ruiz, J. Pérez-Castrillón. Enfermedades por tóxicos: intoxicaciones agudas más frecuentes por medicamentos y drogas. *Medicine*. 2018; 12(69): p. 4043-54.
17. Oscar Huamán, Miguel Sandoval, Elsa Béjar, Zoraida Huamán, Victor Tarazona. Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de Bixa orellana (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2013; 74(4).
18. Inés Arnao-Salas, Silvia Suárez-Cunza, Juan Trabuco-Ricaldi, Ruth Cisneros-Chinchay, María Elena-Rodrigo. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. *An Fac med*. 2012; 73(3): p. 239-44.
19. Roldán, López. Intoxicación por acetaminofén en pediatría: aproximación y manejo. *Univ. Méd. Bogota (Colombia)*. 2012 Enero - Marzo; 53(1): p. 56-67.
20. Banderas-Dorantes. Actividad Hipoglucemiante, Antioxidante Y Antiinflamatoria De Cucurbita ficifolia Bouché, Ibervillea sonorae Greene Y Psacalium peltatum (H.B.K.) Cass., Plantas usadas en el control de la Diabetes Mellitus. 2012 Diciembre.
21. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010; 53(2): p. 372-384.
22. Ludwig J, Viggiano T, McGill D, Oh B. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980; 55(7): p. 434-438.
23. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002; 346(16): p. 1221-1231.
24. Rodrigo Vázquez, Juan Reyes, Cecilia Fernández, Maricruz Anaya, Antonio Rizzoli. Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniomietionina en el tratamiento de hígado graso: revisión sistemática de la literatura. *An Med (Mex)*. 2013 Enero - Marzo; 58(1): p. 37-46.
25. Laura Córdoba. La complejidad de las plantas medicinales: *Cardo mariano*,

- pasado, presente y futuro. Universidad Complutense de Madrid. 2015 Junio;: p. 1-19.
26. Manuel Ramírez, Carmine Pascuzzo, Omaira Batidas. Tratamiento de intoxicaciones por compuestos hepatotóxicos: uso de la N-acetilcisteína y las carboximetilcisteína. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría. 2009 Abril - Junio; 72(2): p. 68 - 72.
27. María García, Héctor Pons. Dieta e inflamación. An Venez Nutr. 2014; 27(1): p. 47-56.
28. Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. Pharmacol Rev. 2008; 60: p. 311 - 357.
29. Luis Delgado, Gabriel Betanzos, Teresa Sumaya. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2010 Setiembre - Diciembre; 50: p. 10-15.
30. Totoy-Burbano. Desarrollo de un alimento nutracéutico como mecanismo coadyuvante a la prevención de neoplasias mamarias. 2013 Abril;: p. 9.
31. Jimenez, Montero, Martinez, García, Pérez. Efecto hepatoprotector del Noni-C® en la intoxicación. Revista Cubana de Medicina Militar. 2015 Enero-Junio; 44(1): p. 24-32.
32. CONABIO. Cucurbita ficifolia (Fig leaf squash). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. .
33. Ministerio de Agricultura y Riego. Salud, energía y proteína cerca de nosotros. Cucurbita ficifolia Bouché. Chiclayo, calabaza. 2013.
34. Guillermo E, Consuelo R, Ángela S, Leopoldo V. Caracterización de frutos y semillas de algunas Cucurbitáceas en el norte de Perú. Rev. Fitotec. Mex. 2014; 37(1): p. 7-20.
35. Nayar, N. M. y T. A. More. Cucurbits. Science Publishers, Enfield, new Hampshire, EUA. 1998.
36. Orestes López, Tania Márquez, Susleby Salomón, María González. Extracción de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2009; 14(2).
37. Gökhan Eraslan, Murat Kanbur, Oznur Aslan, Mürsel Karabacak. The Antioxidant Effects of Pumpkin Seed Oil on Subacute Aflatoxin Poisoning in Mice. Environmental Toxicology. 2011 Diciembre; 28(12): p. 1-8.

38. Nelly Robles. Actividad vermífuga in vitro del aceite de las semillas de Cucurbita maxima Duch "zapallo" y Cucurbita ficifolia Bouché "calabaza" en Eisenia foetida "lombriz de tierra", Ayacucho 2015. 2016;: p. 10.
39. H. Glew, S. Glew, L. Chuang, Y. Huang, M. Millson, D. Constans, D. Vanderjagt. Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Content of Pumpkin Seeds (Cucurbita spp) and Cyperus esculentus Nuts in the Republic of Niger. Plant Foods for Human Nutrition. 2006; 61: p. 51 -56.
40. Martínez, Martínez, Córdova, Valdiviá, Estarrón. Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolémicos en cinco variedades de semillas de Cucurbita maxima y Cucurbita moschata (Calabaza). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(1): p. 72-81.
41. Gemrot, Barouh, Vieu, Pioch, Montet. Effect of roasting on tocopherols of gourd seeds (Cucurbita pepo). Grasas y Aceites. 2006; 57(4).
42. Cravzov, Bloeck, Valenzuela, Giménez, Gruszycki. Componentes nutricionales de cuatro variedades de semillas de Cucurbita Ssp cultivas en la región Centro-Chaqueña, Argentina. Departamento Química Analítica - Universidad Nacional del Chaco Austral. 2012.
43. Sirelkhatim Balla, Asha Mukhtar, Nourelhuda Abdelgalil, Adil Abdalla, Hayat Osman. A Review on Omega-3 and Omega-6 Essential Fatty Acids: Uses, Benefits and their Availability in Pumpkins (Cucurbita maxima) Seed and Desert Dates (Balanites aegyptiaca) Seed Kernel Oils. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2014; 17(12): p. 1195 - 1208.
44. David Aires, Núria Capdevila, María Segundo. Ácidos grasos esenciales. OFFARM. 2005 Abril; 24(4): p. 96 - 102.
45. Marianna Xanthopoulou, Tzortzis Nomikos, Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. Food Research International. 2009; 42: p. 641-646.
46. S. Martínez, J. González, J. Culebras, M. Tuñón. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. 2002; 17(6): p. 271-278.
47. Hernández-Sampieri, Fernnandez-Callado, Baptista-Lucio. Metodología de la Investigación. 6th ed.: McGRAW-HILL; 2014.
48. Selema de la Morena, Martínez-Pérez. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astibilina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. Rev Cubana Plant Med. 1999; 1(4): p. 36.
49. John Buege, Steven Aust. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. 1978; 52: p. 302 - 310.

50. Silvia Suárez. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios. Cybertesis UNMSM. 1995.
51. CYTED/CNP. Metodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 2º ed. Rio de Janeiro. 2001.
52. Carmen-Cardozo, Afife-Mrad. Ética en investigación con animales. Una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. Revista Latinoamericana de Bioética. 2008 Julio-Diciembre; 8(2): p. 46-71.
53. Congreso de La República. Ley N° 30407. Ley de protección animal y bienestar animal. El Peruano. 2016 Enero.
54. Alton Meister. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim et Biophys Acta. 1995; 1271: p. 35-42.
55. Juan Clària, Raquel Horrillo, Marcos Martínez, Eva Morán, Esther Titos, Ana González. Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación. Gastroenterol Hepatol. 2008; 31(10): p. 682-692.
56. Jiwon Choi, Park Kwang, Kim Sung, Jun Ho, Jang Seon. The Ameliorative Effects of L-2-Oxothiazolidine-4-Carboxylate on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. Molecules. 2013; 18: p. 3467 - 3478.
57. Deodelys Bermúdez, María Boffill, Emoe Betancourt, Raylen Escobar, Ignacio Iguualada, Bennia Alonso. Evaluación preclínica de la actividad hepatoprotectora de Ocimum basilicum L. y Allium sativum L. 2014 Febrero; 12(1).
58. Gian Hilario, Pilar Mejía. Efecto hepatoprotector del zumo de cogollo de Cynara scolymus (corazón de alcachofa) en ratones sometidos a intoxicación por paracetamol. 2016.
59. José Caballero-Calampa. EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LA ALMENDRA DE SEMILLAS DE Cucurbita maxima (ZAPALLO MACRE) EN RATAS. 2014.
60. María Jimenez, Gabriel Gutiérrez. Efecto hepatoprotector de plantas medicinales y compuestos naturales contra el daño provocado por fármacos antituberculosos. Rev Mex Cienc Farm. 2015; 46(3).
61. Amir Mohammad, Ali Akbar, Rasoul Samimi, Zohreh Alavi, Esmail Abbasi, Marjan Nasiri. Hepatoprotective property of oral Silymarin is comparable to N-acetyl cysteine in Acetaminophen poisoning. Gastroenterology Research. 2012 Agosto; 5(5): p. 190-194.
62. Instituto Salud Pública de Chile. Silybum marianum L. Cardo mariano. Monografía Oficial Instituto Salud Pública de Chile. 2007.
63. Renán Hañari, Jorge Arroyo, Oscar Herrera, Hernán Herrera. Efecto hepatoprotector del extracto hidroetanólico atomizado del maíz morado (Zea mays

- L.) en lesiones hepáticas inducidas en ratas. *An Fac med.* 2015; 76(2): p. 123-8.
64. Robert Rodríguez, Magda Valdés, Sani Ortiz. Características agronómicas y calidad nutricional de los frutos y semillas de zapallo *Cucurbita* sp. *Revista Colombiana Ciencia Animal.* 2018; 10(1): p. 86-97.
65. Yulisa Balbín. Influencia de la cocción por vía húmeda y seca en las propiedades funcionales de harina de semilla de calabaza. 2018.
66. Ricardo Bressani. Caracterización química y nutricional de la semilla, pulpa y cáscara de chilacayote (*Cucurbita ficifolia*) y aplicaciones en el desarrollo de productos. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2015 Agosto.
67. Gilberto Pérez. Los Flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomedica.* 2003; 22(1): p. 48 - 57.
68. Giuseppe Procida, Bruno Stancher, Francesca Catenia, Marina Zacchigna. Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2012; 93(5).
69. Begoña Olmedilla, Crsitina Córdoba, Ramón Deulofeu, Fernando Granado, Emma Lara, José Ruiz. Evaluación del estatus nutricional de vitamina E. *Rev Lab Clin.* 2017;(317): p. 11.
70. Antonio Meléndez, Isabel Vicario, Francisco Heredia. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* ; 54(2): p. 149 - 155.
71. J. Olea, J. Aragón, M. Zapata, J. Tur. Características de la población con ingesta baja en luteína y zeaxantina en pacientes con degeneración macular asociada a la edad variante húmeda. *ARCH SOC ESP OFTALMOL.* 2012; 87(4): p. 112 - 118.
72. Gertrudis Adrianza, Carolain Murillo. Cáncer-vitaminas-minerales: Relación compleja. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición.* 2014; 64(4): p. 220 - 230.
73. Xochitl Vargas, Gerardo García, Erika Corral, Rubén Román, Elizabeth Hernández. Efecto De *Cucurbita ficifolia* Sobre Marcadores De Daño Hepático En Células HEPG2. *Latinoamericana de Química.* Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2013;: p. 92.