



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

**Efecto protector de la ingesta de cáscara del Citrus
aurantifolia (limón) frente al daño hepático inducido
por etanol en ratones**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición

AUTOR

Cesar Adolfo FLORES VALLE

ASESOR

Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2018



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

Flores C. Efecto protector de la ingesta de cáscara del Citrus aurantifolia (limón) frente al daño hepático inducido por etanol en ratones [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA



Escuela Profesional de Nutrición

"Año del Centenario del Museo de Historia Natural y de la Revista
Anales de la Facultad de Medicina"
"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**ACTA 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: Dr. Segundo Teófilo Calderón Pinillos

Miembros: Dr. Aníbal Jesús Pacheco Gallupe

Q. F. Rosa Lorenza Oriondo Gates

Asesor: Mg. Óscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Se reunió en la ciudad de Lima, el día viernes 15 de junio del 2018, para proceder a evaluar la **Sustentación de Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición** del bachiller:

Cesar Adolfo Flores Valle

Código de Matricula N° 09010081

**Tesis: «EFECTO PROTECTOR DE LA INGESTA DE CÁSCARA DEL CITRUS
AURANTIFOLIA (LIMÓN) FRENTE AL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR ETANOL EN
RATONES»**

(Aprobado con RD N° 0143-D-FM-2016)

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

..... **Dieciocho (18)** (En letras)

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

.....
Dr. Segundo Teófilo Calderón Pinillos
Presidente

.....
Dr. Aníbal Jesús Pacheco Gallupe
Miembro

.....
Q. F. Rosa Lorenza Oriondo Gates
Miembro

.....
Mg. Óscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Asesor

DES/DP/desa

DEDICATORIA

A mis padres:

Julio y Eneyda, por su apoyo en todo momento, así como su confianza depositada en mí por todos estos años y ser ejemplo de esfuerzo, trabajo, honestidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado:

Por el financiamiento de la tesis. Código N° 160104067.

A mi asesor:

El Mg. Oscar Huamán por su constante apoyo, comprensión y paciencia en brindarme sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

El Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición:

Por permitirme ejecutar la tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Ernesto Ruez Gonzáles:

Por su apoyo invaluable en la lectura de cortes histológicos.

A la Escuela Profesional de Nutrición:

Por brindarme la formación profesional.

A los profesores del Departamento Académico de Nutrición:

Por compartir sus conocimientos y ser verdaderos maestros.

A los miembros del Jurado:

Por su tiempo en la revisión y sustentación.

A mis familiares:

A mis hermanos, Joel y Renzo, por las experiencias vividas en familia, a su apoyo y comprensión en todo momento. A mi tío Alejandro por su ayuda en el transcurso de estos años. A Grace por compartirme parte de su tiempo.

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades hepáticas en el Perú constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad. El consumo de etanol aumenta el riesgo de las personas a desarrollar cirrosis hepática y otras enfermedades más. **Objetivo:** Determinar el efecto protector de la ingesta de cáscara del *Citrus aurantifolia* (limón) frente al daño hepático inducido por etanol en ratones. **Diseño:** Estudio analítico, experimental, transversal y prospectivo. **Lugar:** Laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. **Material biológico:** se empleó 40 ratones *Mus musculus* machos adultos. **Intervenciones:** Se utilizaron las cáscaras de *Citrus aurantifolia* (limón), que se obtuvieron por pelado manual, y luego fue secada en estufa a 40° C por 72 horas, se molió en molino y se suspendió en agua con fécula de maíz al 1%. Los ratones fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos (n=7), recibiendo los siguientes tratamientos, por cinco días, vía peroral: grupos I y II suspensión de almidón 1%, grupo III: silimarina 100 mg/kg en suspensión de almidón 1%; grupo IV: cáscara de limón 100 mg/kg y grupo V: cáscara de limón 400 mg/kg. El grupo I recibió en sus bebederos solución de glucosa 5%, mientras que los grupos II-V recibieron etanol al 5% con glucosa 5%. Al sexto día fueron sacrificados. **Principales medidas de resultados:** lipoperoxidación y glutatión en el homogenizado de hígado, descripción histológica. **Resultados:** En los grupos que recibieron las dosis de cáscara de limón presentaron mayores niveles de GSH con respecto al grupo II siendo significativos, se observó también un menor daño a nivel histológico comparado con el grupo II; sin embargo, los niveles de lipoperoxidación en el tejido hepático comparado con el grupo II fueron significativamente mayores. **Conclusión:** La administración del *Citrus aurantifolia* presenta efecto hepatoprotector expresado en el marcador GSH e histológico.

Palabras clave: *Citrus aurantifolia*, limón, hepatoprotección, etanol.

ABSTRACT

Introduction: Hepatic diseases in Peru are an important cause of morbidity and mortality. The consumption of ethanol increases the risk of people to develop liver cirrhosis and other diseases. **Objective:** To determine the protective effect of the ingestion of *Citrus aurantifolia* (lemon) peel against hepatic damage induced by ethanol in mice. **Design:** Analytical, experimental, transversal and prospective study. **Place:** Laboratory of the Biochemistry and Nutrition Research Center. **Biological material:** 40 male *Mus musculus* mice were used. **Interventions:** The shells of *Citrus aurantifolia* (lemon), which were obtained by manual peeling, were used, and then dried in a stove at 40° C for 72 hours, ground in a mill and suspended in water with 1% corn starch. The mice were randomly distributed in five groups (n = 7), receiving the following treatments, for five days, via peroral: groups I and II suspension of starch 1%, group III: silymarin 100 mg / kg in suspension of starch 1%; group IV: lemon peel 100 mg / kg and group V: lemon peel 400 mg / kg. Group I received 5% glucose solution in their drinkers, while groups II-V received 5% ethanol with 5% glucose. On the sixth day they were sacrificed. **Main outcome measures:** lipoperoxidation and glutathione in liver homogenate, histological description. **Results:** In the groups that received the doses of lemon peel had higher levels of GSH with respect to group II being significant, it was also observed a minor damage at histological level compared with group II; however, lipoperoxidation levels in liver tissue compared to group II were significantly higher. **Conclusion:** The administration of *Citrus aurantifolia* has a hepatoprotective effect expressed in the GSH and histological marker.

Keywords: *Citrus aurantifolia*, lemon, hepatoprotection, ethanol

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
2.1. HIPÓTESIS	11
2.2. OBJETIVOS.....	11
III. METODOLOGÍA	12
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	12
3.2. MATERIALES	12
3.3. VARIABLES.....	12
3.4. MÉTODO DE EXPERIMENTACIÓN.....	13
3.4.1. <i>Recolección de la muestra de ensayo</i>	
3.4.2. <i>Obtención y preparación de la suspensión de la cáscara de limón</i>	
3.4.3. <i>Acondicionamiento de la unidad de análisis</i>	
3.4.4. <i>Inducción a la hepatotoxicidad</i>	
3.4.5. <i>Procesamiento de las muestras biológicas</i>	
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
3.6. ASPECTO ÉTICO	18
IV. RESULTADOS	19
4.1. DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4.2. NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN TEJIDO HEPÁTICO	19
4.3. NIVELES DE GLUTATIÓN EN TEJIDO HEPÁTICO.....	20
4.4. ÍNDICE HEPÁTICO	20
4.5. HISTOLÓGICO	21
V. DISCUSIÓN	23
VI. CONCLUSIONES	30
VII. RECOMENDACIONES	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
IX. ANEXOS	46
9.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS Y TRATAMIENTO.....	46
9.2. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA.....	47

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas en el Perú constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, pueden ser agudas o crónicas, local o difusa, leve o grave, así como reversible o irreversible, siendo la hepatitis viral de alta endemicidad en muchas regiones del país y la cirrosis hepática la causa más frecuente de presentación crónica asociada a mortalidad, esta última con una tasa de 15 por cada 100 000 habitantes.^{1,2}

El Perú no escapa a la realidad de la cirrosis hepática causada por alcohol, se ha encontrado que el consumo crónico de alcohol ocurre en el 26,5% de los casos estudiados.³ En un estudio publicado en el 2014 por DEVIDA (Comisión Nacional para el Desarrollo y Vida sin Drogas) se informa que el número de personas con dependencia de alcohol etílico se ha duplicado en los últimos tres años, llegando al 57,1 % de prevalencia de consumo, en la población general de 12 a 65 años de la ciudad de Lima.⁴

El consumo de alcohol aumenta el riesgo de las personas a desarrollar cirrosis hepática y otras enfermedades más. Según la OMS el alcohol provocó la muerte de más de 3,3 millones de personas en el año 2012. El Perú es el sexto país de América Latina con mayor consumo de alcohol, 8,1 L *per cápita*.⁵

El costo de las enfermedades hepáticas en general es variado, debido al espectro amplio de éstas, que van desde el hígado graso simple, reversible, hasta una cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular cuyo tratamiento último es el trasplante del órgano. De gran repercusión es el costo socio-económico debido a que estas enfermedades son una de las primeras causas de defunciones en un porcentaje importante de la población económicamente activa.⁶

El hígado es uno de los órganos más grandes del cuerpo, después de la piel, pesa aproximadamente 1 500 g y contribuye con casi el 2,5% del peso del cuerpo en el adulto. En el periodo fetal tardío este órgano representa el doble en cuanto al porcentaje de peso (5%) y siendo unas de sus funciones la hematopoyética. Desde la infancia en adelante, ocupa mayoritariamente el hipocondrio derecho y

el epigastrio. Se extiende hacia el hipocondrio izquierdo, inferior al diafragma, que lo separa de la pleura, los pulmones, el pericardio y el corazón.⁷

El mantenimiento de la vida es posible con la conservación del 10% al 20% de hígado funcional, tiene gran capacidad de autorregeneración, de modo que la extirpación de éste ocasiona la muerte en tan solo 24 horas. Presenta un papel destacado en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, en el almacenamiento y activación de vitaminas y minerales, la formación y excreción de bilis, la conversión de amoniaco en urea, metabolismo de los corticoesteroides y la acción de filtro y cavidad de inundación.⁸

El hígado dispone de una vascularización particular, la sangre llega vía la de la arteria hepática y la de la vena porta hepática. Esta sangre sale del hígado por las venas hepáticas, voluminosos afluentes de la vena cava inferior. Las modificaciones que experimenta la sangre en el hígado lo convierten además en una virtual glándula de secreción interna con múltiples funciones.⁹

La compleja estructura del hígado se justifica debido a que realiza muchas funciones. Todas estas funciones son llevadas a cabo por células parenquimatosas epiteliales hepáticas, el hepatocito, y dependen de complejas interrelaciones entre la vascularización (ramas de la arteria hepática y la vena porta, sinusoides y venas centrales), los hepatocitos y los sistemas de drenaje biliar (canalículos y conductos biliares hepáticos).¹⁰

El hígado está compuesto por miríadas de lóbulos, los cuales secretan bilis. La bilis es secretada hasta un total de aproximadamente 850 mL diarios. Dado que solo es requerida a intervalos, se almacena en la vesícula biliar, donde se concentra por la reabsorción de agua y se libera cuando es requerida. La bilis no sólo es un “jugo digestivo”, sino también la forma que tiene el cuerpo para deshacerse de los productos de degradación de la hemoglobina, exceso de colesterol y xenobióticos. Este fluido tiene carácter alcalino y es de color verdoso.¹¹

Se encuentra ubicado directamente en el circuito de transporte de las sustancias absorbidas en el intestino, excepto la grasa, todos los nutrientes absorbidos por el tracto gastrointestinal son conducidos inicialmente hacia el hígado por el

sistema venoso portal, lo que le permite ser el primero en estar expuesto a los sustratos metabólicos y a los nutrientes, esto también lo convierte en el primer órgano en sufrir la exposición a las sustancias tóxicas y nocivas absorbidas en el tubo digestivo.¹² Además de sus muchas actividades metabólicas, el hígado almacena glucógeno y, como se mencionó líneas arriba, secreta bilis.⁷

Numerosas placas de células hepáticas irradian desde la vena central. Cada placa hepática suele tener una o más células de espesor, entre las cuales se encuentran los canalículos biliares que se vacían a conductos biliares en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes. En los tabiques interlobulillares se encuentran también vénulas que reciben sangre de la vena porta, desde estas vénulas la sangre fluye a los sinusoides hepáticos, que se encuentran entre las placas celulares hepáticas. En los tabiques se encuentran además arteriolas hepáticas, muchas de las cuales también se vacían en los sinusoides.¹³

La superficie interna de los sinusoides hepáticos está formado por un endotelio fenestrado. Las células de von Kupffer son células fijas de este revestimiento. A causa de su forma, muchas veces estrellada, se les solía llamar “células estrelladas de von Kupffer”, sin embargo, la forma de las células es variable. Las células de von Kupffer poseen prolongaciones citoplasmáticas muy largas que a veces atraviesan el sinusoide.¹⁴

Las células de Kupffer constituyen el sistema fagocítico mononuclear. A través del sistema circulatorio llegan al hígado y colonizan el parénquima hepático, situándose en la superficie o en los lugares de reunión de los capilares sinusoidales. Fagocitan eritrocitos seniles, así como restos celulares y algunos microorganismos. Las células de Kupffer se encuentran en la superficie del endotelio en la luz del sinusoide y no están unidas al endotelio vecino.¹⁵

Las células perisinusoidales (de Ito, llamadas también células estrelladas hepáticas) se encuentran en el espacio de Disse, en la proximidad de los sinusoides hepáticos. Estas células tienen un origen mesenquimatoso, contienen grasa y participan en el almacenamiento y liberación de retinoides, la producción y el recambio de la matriz extracelular y la regulación del flujo de sangre en las

sinusoides. Las células perisinusoidales se encuentran en estadio quiescente no proliferativo, pero pueden proliferar cuando son activadas por las células de Kupffer y los hepatocitos.¹⁶

El hígado recibe el 25% del gasto cardiaco por la vena porta hepática y la arteria hepática. La vena porta hepática lleva al hígado los nutrientes y vitaminas absorbidos en el intestino, donde se recogen, se almacenan y distribuyen.¹⁷

Posee un papel importante en el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas normales de glucosa, sobre todo en el periodo posprandial. El hígado retira el exceso de glucosa de la sangre y lo reincorpora conforme se necesita en un proceso que se conoce como función amortiguadora de la glucosa del hígado. Esta acción se altera en las personas con deterioro de la función hepática por alguna enfermedad y se alcanzan concentraciones posprandiales de glucosa demasiado elevadas. Sin embargo, como el hígado también regula los otros aspectos de la homeostasis de la glucosa, en la insuficiencia hepática existe la hipoglucemia.¹⁸

También regula la cantidad de lípidos en sangre mediante la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los lípidos absorbidos en el intestino son liberados por medio del quilomacrón a la linfa. La lipoproteína lipasa de la superficie celular endotelial de los vasos sanguíneos hidroliza parte de los triglicéridos de los quilomacrónes, liberando ácidos grasos y glicerol, que son captados por los adipocitos, el quilomacrón se transforma en remanente de quilomacrónes ricos en colesterol esterificado que son captados y degradados por los hepatocitos, los cuales forman a partir de ellos la VLDL. A partir de éstas se forman otras lipoproteínas séricas que son el aporte de colesterol y triglicéridos para el resto de los tejidos del organismo.¹⁷

El hígado produce albúmina plasmática y la mayor parte de las globulinas plasmáticas (con excepción de las inmunoglobulinas). Los niveles de globulinas que produce el hígado van de 2,5 a 3,5 g/dL, tienen una amplia variedad de funciones, incluidos el transporte de colesterol y triglicéridos, el transporte de esteroides y hormonas tiroideas, la inhibición de la tripsina, y la coagulación de

la sangre. Los factores de la coagulación I (fibrinógeno), II (protrombina) III, IV, VII, IX y XI, así como el angiotensinógeno, son todos producidos por el hígado.¹⁹

La albúmina sérica es cuantitativamente la proteína más importante que se sintetiza en el hígado, constituye alrededor de 70% de las proteínas plasmáticas totales y es la principal contribuyente de la presión coloidosmótica de la sangre y refleja la cantidad de funcionalidad de la masa del hígado.¹⁹ Dado que la albúmina tiene una vida media larga de 20 días, en todas las enfermedades crónicas del hígado, los niveles de albúmina disminuyen, cuyos niveles normales en sangre son de 3,5 a 5 g/dL.²⁰

La mayor parte del etanol consumido se oxida en el hígado, donde hay dos niveles de catabolismo, el primero para formar el acetaldehído y, el segundo, acetato. En el hígado se realiza la oxidación a través de tres vías enzimáticas, la vía alcohol deshidrogenasa (ADH), presente en el citosol, el sistema enzimático oxidativo de etanol (MEOS, microsomal ethanol oxidizing system) y la vía de las catalasas en los peroxisomas, que en el catabolismo alcohólico es muy poco activa. El producto final de cualquiera de las tres vías es el acetaldehído.²¹

La mayor parte del etanol es oxidado primero hasta acetaldehído por acción del alcohol deshidrogenasa. Posteriormente el acetaldehído, por una nueva oxidación, es convertido en acetato por la aldehído deshidrogenasa. El acetato es activado a acetil-CoA con la ayuda de una acetato-CoA-ligasa con consumo de ATP, lo que posibilita la conexión con el metabolismo intermedio.²²

La velocidad de la degradación del etanol en el hígado está limitada por la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cantidad disponible de NAD⁺ también es un factor limitante. Con concentraciones bajas de etanol se alcanza la velocidad de degradación máxima, por esa razón el nivel de etanol disminuye cuando la velocidad es constante (cinética de orden 0).²²

Este tipo de respuesta hepática al etanol, que es un tóxico, merece especial atención por ser la primera causa de cirrosis en el mundo y aun cuando su patogenia es similar a la provocada por otros tóxicos es importante señalar tres hechos, estimulación directa de las células formadoras de colágeno por el etanol o sus metabolitos, lesión hepatocelular que despierta reacciones inmunológicas

que liberan o activan macrófagos o linfocitos T que elaboran factores de crecimiento, y aumento de la activación de síntesis de enzimas, como la prolil-hidroxilasa y otras.²³

El consumo elevado de etanol durante años produce daños en el hígado, el límite del consumo diario es de unos 60 g en los hombres y de alrededor de 50 g en las mujeres. Estos valores dependen en gran parte del peso corporal, del estado de salud y otros factores.²²

Los altos niveles hepáticos de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ y de acetyl-CoA dependientes del etanol favorecen la síntesis de grasas neutras y de colesterol, por otro lado, su exportación en forma de VLDL también es afectada por el etanol, se produce un almacenamiento de lípidos en el hígado (hígado graso). Este aumento del contenido graso del hígado (de menos del 5% hasta más del 50% de su peso seco) en un primer momento es reversible, sin embargo, en el alcoholismo crónico cada vez más tejido conectivo va reemplazando a los hepatocitos. Finalmente, con la cirrosis hepática el daño llega a un estado irreversible que se caracteriza por la pérdida progresiva de la función hepática.²²

La cirrosis es la consecuencia de la lesión hepática progresiva, ésta enfermedad puede presentarse en un subgrupo de casos de hepatitis crónica que no se resuelven de manera espontánea, o después de repetidos episodios de lesión del hígado aguda, como sucede en el alcoholismo crónico. Las consecuencias de la enfermedad del hígado pueden ser reversibles o irreversibles.²⁴

La fibrosis hepática se presenta en etapas, la primera etapa se caracteriza por un cambio de la composición de la matriz extracelular desde colágeno sin entrecruzamiento, no formador de fibrillas, hacia colágeno, que es más denso y está sujeto a la formación de enlaces cruzado, en esta etapa la lesión del hígado aún es reversible, y la segunda etapa comprende la formación de entrecruzamiento de colágeno subendotelial, proliferación de células mioepiteliales y deformación de la estructura hepática con aparición de nódulos de regeneración. La cirrosis persiste como un estado dinámico en el cual ciertas intervenciones, incluso a esas etapas avanzadas, pueden dar beneficios, como la regresión de tejido cicatrizal y mejoras de los resultados clínicos.²⁴

El estrés oxidativo y sus consecuencias, daño celular, pueden ser reducidas a través de la ingesta de antioxidantes de diversos alimentos, destacando entre ellos frutas y verduras. Estas moléculas, como los flavonoides, están presentes en buena cantidad en los cítricos, como el limón.²⁵

En un estudio realizado por Emim, et al. en el cual administró flavonoides (hesperidina) a nivel subcutáneo en ratas y ratones inducidos a un proceso inflamatorio con carragenina, sustancia inflamatoria en la piel, observó una reducción del edema. Los resultados indican un potencial uso terapéutico de la hesperidina como un agente antiinflamatorio leve.²⁶

González Cruz en su Compilación bibliográfica del Limón persa (*Citrus latifolia*) menciona que éste posee acción terapéutica preventiva y curativa en perturbaciones intestinales y hepáticas, entre otros.²⁷

En un estudio de Karimi et al con el *Citrus aurantium* donde evaluó las propiedades antioxidantes, anticancerígena y antiinflamatoria, los resultados mostraron buena capacidad de captación de radicales libres y la actividad de reducción del potencial férrico. En el ensayo de citotoxicidad se indica el potencial de esta planta medicinal como una fuente terapéutica de compuestos anticancerosos.²⁸

En una investigación de Rocha De Oliveira et al realizada con la quercetina en ratas Wistar se demostró que es capaz de reducir los cambios producidos por estrés oxidativo, generados por bifenilos policlorados, como la peroxidación lipídica, modificaciones en la actividad de enzimas antioxidantes y al ADN del hígado.²⁹

La hepatotoxicidad será inducida por etanol. El hígado es el principal sitio del metabolismo del alcohol, es por ello que es el principal objetivo orgánico inducido por el alcohol.³⁰

El género *Citrus* es originario de los trópicos y subtropicos del este de Asia y del archipiélago indomalayo, región en la cual se encuentran aún numerosas especies silvestres. Sin embargo, ninguna de las especies cultivadas es conocida en estado verdaderamente silvestre, pues los *Citrus* como los plátanos,

son un producto de una domesticación antigua y una larga selección por el hombre. Es un árbol de la familia de las rutáceas cuyo fruto (hesperidio) es el limón. El limón es una planta frutal cuyo nombre botánico es *Citrus aurantifolia*.³¹

La clasificación botánica del limón es la siguiente³²:

Clase: Dicotiledíneas

Sub-clase: Arquiclamídeas

Orden: Geraniales

Sub-orden: Geraniineas

Familia: Rutácea

Sub-familia: Aurantioideas

Género: *Citrus*

Especie: *aurantifolia*

La planta tiene un tamaño que varía de 3 a 6 m de altura con ramas irregulares, de corteza verde y provista de espinas cortas y fuertes. Las hojas son elípticas, coriáceas de color verde mate lustroso de 5 a 10 cm de longitud, terminada en punta y con bordes ondulados o finamente dentado. Las flores son muy olorosas, con los pétalos gruesos y de color blanco, aunque suelen presentar un tinte rosado en su cara exterior.³³

El fruto llamado limón es de pulpa jugosa, perfumada y suave, normalmente es de forma oval y/o esférica. La corteza es delgada, de color amarillo verdoso que cambia a amarillo cuando el fruto ha pasado su estado de madurez comercial. En el interior encontramos una pulpa carnosa, cuyo color va de amarillo a verde, de sabor ácido y jugoso, separada por membranas.³³

El árbol del *Citrus aurantifolia* ha sido ampliamente estudiado y se han hallado los siguientes ácidos: cáprico, caprílico, decanoico, fórmico, hidrocianico, isovalérico, láurico, mirístico, nonanóico, oxálico y esteárico. Los alcoholes encontrados son: decil, dodecil, ergosterol, etílico, metil antranilato, nolil, fenetil y pirocaterol. Aldehídos: acetaldehído, benzaldehído, isovaleraldehído; monoterpenos: borneol, decanal, furfural, carveno, citral. Flavonoides: quercetina. Saponinas; aceite: limoneno. Otros compuestos: tripatamina:

quinolina; carvona, cresol, guayacol, hesperidina, narcotina, noradrenalina; proteína: tiramina.³⁴

Los cítricos, como el limón representan un numeroso grupo de gran importancia en pastelería y repostería, no solo por su utilización como género principal sino también como aromatizantes ya sea con sus zumos, ralladura de cáscara, entre otras, además contrarrestan la oxidación de otras frutas.³⁵

La cáscara del limón se puede confitar o secar para usarla como aromatizantes en postres, helados, aguardientes, licores, o usarla en repostería.³⁶ Ésta también se usa en la elaboración de limonadas.³⁷

En los cítricos la concentración de flavonoides es mayor en el albedo y corazón, seguidos del flavedo, membranas y pulpa, siendo menor en el zumo. La extracción de estos compuestos resulta de mucho interés por parte de la industria alimentaria y farmacéutica. En estudios previos en cáscara de cítricos de diferentes especies, se encontró que el contenido de flavonoides totales oscila en un intervalo de 150 a 478 mg de rutina por cada 100 g de cáscara seca y de 0,3 a 3100,1 mg de quercetina por cada 100 g de cáscara seca.³⁸

La composición química nutricional del jugo de limón por cada 100 g es la siguiente: 30 kcal, 9,3 g de agua, 0,5 g de proteína, 0,2 g de grasa, 9,7 g de carbohidratos, 18 mg de calcio, 14 mg de fósforo y 33,2 mg de vitamina C.³⁹

Los subproductos de los cítricos como la cáscara, entre otros, representan el 50% del peso de la fruta entera original, el darle valor agregado es una manera de dar rentabilidad al proceso de aprovechamiento. De éstos se puede aprovechar los aceites esenciales y la pectina, siendo la última usada en el campo farmacológico como agentes antimetástasis, inmunoestimulantes y antiulcerosos.⁴⁰

Se busca demostrar si la cáscara *del Citrus aurantifolia* (limón) posee la propiedad protectora del hígado por el contenido de flavonoides, ácido ascórbico y otros compuestos, los cuales son agentes antioxidantes que atenúan la acción de los radicales libres y pueden proteger a las células de la peroxidación lipídica.⁴¹ Asimismo, contribuir al conocimiento que se tiene acerca de los cítricos

en el campo de la prevención y control de las enfermedades hepáticas. En ésta se da utilidad a la cáscara del limón, un producto de desecho asequible y que se encuentra presente en muchos hogares.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La ingesta de la cáscara del fruto del *Citrus aurantifolia* (limón) tiene actividad protectora frente al daño hepático inducido por etanol en ratones

2.2. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto protector de la ingesta de la cáscara del fruto del *Citrus aurantifolia* (limón) frente al daño hepático inducido por etanol en ratones.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la ingesta de la cáscara del fruto del *Citrus aurantifolia* (limón) sobre la morfología del tejido hepático frente al daño inducido por etanol en ratones.
- Determinar el efecto de la ingesta de la cáscara del fruto del *Citrus aurantifolia* (limón) sobre los marcadores bioquímicos del daño hepático inducido por etanol en ratones

III. MÉTODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Estudio analítico, experimental, transversal y prospectivo.⁴²

3.2. Materiales

3.2. 1. Material biológico

Ratones machos albinos (*Mus musculus*, cepa Balb/c)

Cáscaras (albedo y flavedo) del *Citrus aurantifolia*

3.2. 2. Equipos e instrumentos

Homogenizador marca: Ultra-Turrax; modelo: IKA-T10BASIC

Centrífuga marca: GREETMED; modelo: GTT119-300

Espectrofotómetro marca: GREETMED; modelo: NV203

Balanza analítica marca: RADWG®; modelo WTB200

Estufa marca: Unic's®

Baño María marca: AVALIER; modelo: VL-32

3.2. 3. Reactivos y fármacos

Etanol absoluto

Ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (Triplitex®)

Ácido 2-tiobarbitúrico

Pentobarbital

Ácido tricloroacético (Scharlaw)

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrato (DTNB)

3.3. Variables

Variable independiente

- Ingesta de cáscara del *Citrus aurantifolia*: Comprende dos zonas, una externa, el flavedo, y otra interna, blanca y esponjosa, que es llamada albedo.⁴³

Variable dependiente

- Efecto protector hepático: Propiedad de proteger al hígado frente a los efectos nocivos de hepatoxinas que se puedan ingerir, así como contrarrestarlas alteraciones en el organismo de radicales libres.⁴⁴

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	CATEGORÍA Y PUNTOS DE CORTE	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable independiente: Ingesta de la cáscara del <i>Citrus aurantifolia</i>	-	Ingesta de la suspensión de la cáscara del <i>Citrus aurantifolia</i>	100 mg/kg 400 mg/kg	Razón
Variable dependiente: Efecto protector hepático	• Morfología del tejido hepático	• Índice hepático • Histológico	Comparados con los grupos controles.	Intervalo
	• Marcadores bioquímicos	• Lipoperoxidación (nmol/g) • Glutación (µg/g)		Razón

3.4. Método de experimentación

3.4. 4. Recolección de la muestra de ensayo

La muestra se adquirió en el mercado de Mayorista del distrito de Santa Anita.

3.4. 5. Obtención y preparación de la suspensión de la cáscara de limón

Los limones fueron lavados y se separó la cáscara, descartando el contenido del fruto. Las cáscaras del limón se colocaron sobre una fuente de vidrio, Pyrex, la cual se llevó a una estufa a temperatura de 40° C por 72 horas. Luego las cáscaras secas se pulverizaron en molino de cuchillas en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El pulverizado fue cernido y se obtuvo un polvo fino. El polvo fino de cáscara de limón se suspendió en una solución de fécula de maíz (almidón) al 1%. Esto fue preparado al momento de la administración, siendo utilizado como vehículo para las dosis de 100 mg/kg y 400 mg/kg.

3.4. 6. Acondicionamiento de la unidad de análisis

Se utilizaron 35 ratones albinos, machos, adultos, con un peso aproximado de 32 ± 5 gramos. Los ratones fueron colocados en jaulas individuales, en un ambiente 22°C de temperatura, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Tuvieron siete días de aclimatación antes de iniciar propiamente la intervención. Todos los grupos recibieron la misma dieta balanceada (dieta normocalórica y normoproteica), adquirida de la Universidad Nacional Agraria de La Molina y agua *ad libitum*.

3.4. 7. Inducción a la hepatotoxicidad

Se aplicó el método empleado por Sandoval (2008)⁴⁵, los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos ($n=7$) recibiendo durante la intervención alimentación balanceada.

El etanol fue preparado a una concentración del 5% v/v y en solución glucosada al 5%, colocado en los bebederos para consumo *ad libitum* en los grupos II al V. El grupo I recibió solamente solución glucosada 5% en bebedero. Todos los grupos recibieron el tratamiento respectivo por 5 días. Los grupos recibieron el siguiente tratamiento vía per oral (cuadro 1).

Tabla 1: Distribución y tratamiento para evaluar la protección hepática

Grupo	Tratamiento Día 1-5
I	Solución de almidón al 1%, 10 mL/kg (vía peroral)
II	Solución de almidón al 1%, 10 mL/kg (vía peroral)
III	Silimarina 100mg/kg en solución de almidón al 1%
IV	Cáscara de limón 100mg/kg en solución de almidón al 1%
V	Cáscara de limón 400mg/kg en solución de almidón al 1%

Concluido el tratamiento se les mantuvo en ayuno de 12 horas, luego fueron anestesiados con pentobarbital sódico (26 mg/kg) e inmediatamente se realizó una laparotomía. Se localizó el ligamento

redondo mayor del hígado y se extrajo el hígado, cortando los ligamentos y adherencias secundarias.

El hígado fue lavado en solución fisiológica (NaCl 0,9%) y luego fue secado con papel absorbente. Posteriormente, se pesó todo el órgano en una balanza analítica. El lóbulo mayor se seccionó en dos porciones de 0,25 g cada uno, uno de ellos fue conservado en formol al 10% en NaCl 0,9% para el estudio histológico y la otra porción conservado a 4°C para la preparación del homogenizado.

3.4. 8. Procesamiento de las muestras biológicas

- **Índice hepático**

Se determinó el índice hepático mediante la relación del peso del hígado afectado y el peso del ratón. Se expresó como porcentaje de tejido con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice hepático} = \frac{W \text{ hígado}}{W \text{ animal}} \times 100$$

- **Estudio histológico**

Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Patología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su tinción con hematoxilina-eosina. Las láminas fueron leídas por el patólogo Dr. Ernesto Raez.

- **Preparación del homogenizado**

Para la preparación del homogenizado se pesó aproximadamente 0,25 g del lóbulo mayor del hígado y se homogenizó con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,02 mmol/L hasta un volumen final de 3 mL, todo el procedimiento se llevó a cabo sobre planchas de gel helado con una temperatura aproximada de 4°C.

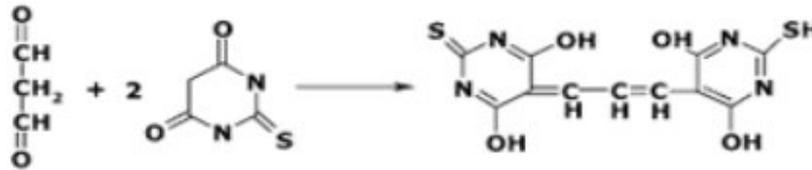
- **Determinación de lipoperoxidación**

Se empleó el método de Buege y Ust (1978) y modificado por Suárez (1995).

Fundamento: El malondialdehído y otros dialdehídos se forman por el ataque de radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. En condiciones ácidas y temperaturas altas

estas especies de dialdehídos reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

La reacción de dos moles de ácido 2-tiobarbitúrico con una mol de dialdehído (malondialdehído) da un color rosado con una absorción máxima a los 532-535 nm.



Formación del complejo malondialdehído. Analytical Methods for Resolving Data From TBA2-MDA Reaction Mixtures

Protocolo: Se tomó 0,3 mL de homogenizado y se agregó 0,6 mL de ácido tricloroacético al 20%. Luego se llevó a baño María hirviendo por 10 minutos, concluido el tiempo se enfrió y se agregó 0,9 mL de ácido 2-tiobarbitúrico al 0,67 en HCl 0,25 N y se volvió a llevar a baño María hirviendo por 20 minutos.

Concluido este tiempo se centrifugó a 4 000 RPM por 15 minutos y se efectuó la lectura a 535 nm por espectrofotómetro.

Los cálculos de concentración de especies reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico se determinaron mediante la fórmula:

$$[TBARS \text{ nmol/mL}] = \frac{ABS(MP - Bl) \times V_{Rx} \times VH \times 10}{\epsilon \times l \times V \times W}$$

V_{Rx} : volumen de la reacción 1,8 mL

ϵ : 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

También se expresa en porcentaje de incremento mediante:

$$\% \text{ Incremento} = \frac{\text{Grupo TTO} - \text{Grupo II}}{\text{Grupo II}} * 100$$

- **Determinación del glutatión (GSH):**

Se empleó el método de Sedlak y Lindsay (1968).

Fundamento: Para la determinación del GSH se utilizó el DTNB [reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis- [2-nitrobenzoico]], los cuales reaccionan dando una coloración amarilla. Para eliminar los grupos sulfhidrilos presente en las glicoproteínas, se utilizó ácido tricloroacético al 50% y para evitar la activación de las metaloproteasas se empleó el EDTA 0,02 mmol/L, que es un quelante de cationes divalentes (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}), los cuales son activadores de las enzimas.

Protocolo: 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 5 minutos y luego se centrifugó a 4500 RPM por un lapso de 15 minutos.

Del sobrenadante se cogió 0,5 mL y se adicionó 2 mL de buffer Tris 0,4 mol/L a pH 8,9 y 0,025 mL de DTNB a 0,01 mol/L, se agitó para mezclar. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro.

Se preparó una curva de calibración de glutatión, con las siguientes concentraciones 3,125; 6,25; 12,5; 25 y 50 $\mu\text{mol GS-NP/mL/g}$ de tejido.

3.5. Análisis estadístico

Los datos fueron ordenados y analizados aplicándose los estadísticos descriptivos como la media o promedio aritmético, la desviación estándar y la variación porcentual. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Para las pruebas paramétricas se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA), para las no paramétricas se utilizó el Test de Kruskal-Wallis. La prueba *pos hoc* utilizada para el ANOVA es la prueba de Tukey y para Kruskal-Wallis fue la prueba U de Mann Whitney.

3.6. Aspecto ético

El tratamiento que se les dio a los animales de experimentación fue provocando el mínimo dolor posible tanto en la aplicación de los medicamentos como en el método utilizado en la extracción del hígado para estudio y posterior sacrificio.⁴⁵ Todas estas medidas son tomando en cuenta en el marco de la Ley de Protección y Bienestar Animal emitida el 8 de enero de 2016.⁴⁶

IV. RESULTADOS

4.1. Del análisis estadístico

El indicador glutatión no posee distribución normal (no paramétrica), por el cual se utilizó para el análisis el Test de Kruskal-Wallis y luego la U de Mann Whitney.

El indicado lipoperoxidación e índice hepático tuvieron una distribución normal (paramétrica), por lo cual se utilizó ANOVA y posteriormente la prueba Tukey.

4.2. Niveles de lipoperoxidación en tejido hepático

El consumo de etanol al 5% del grupo II presentó mayor nivel de lipoperoxidación expresado en TBARS respecto al grupo I, de manera significativa ($p < 0,05$).

El tratamiento con silimarina más etanol al 5% presentó menor nivel de lipoperoxidación de manera no significativa comparado con el grupo II.

La administración de cáscara de limón a dosis de 100 mg/kg y 400 mg/kg en los grupos IV y V, más etanol presentó, significativamente ($p < 0,01$), mayor nivel de lipoperoxidación respecto al grupo II.

Tabla 2: Nivel de lipoperoxidación en homogenizado de hígado de ratones según grupo de tratamiento

Grupo de tratamiento	Lipoperoxidación* nmol/g	% de inhibición**
Grupo I	13,5 ± 1,5 (a)	-
Grupo II	19,8 ± 2,0	-
Grupo III	15,7 ± 5,2	20,7%
Grupo IV	27,0 ± 5,4 (b)	-36,4%
Grupo V	30,8 ± 3,0 (b)	-55,6%

Media ± DE (n=7)

*ANOVA

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

**Comparado con el grupo II

4.3. Niveles de glutatión en tejido hepático

El grupo II tras el consumo de etanol al 5% presentó menor nivel de glutatión respecto al grupo I, de manera significativa ($p < 0,05$).

El tratamiento con silimarina más etanol al 5% produjo un mayor nivel, significativo ($p < 0,01$), de glutatión respecto al grupo II.

La administración de los tratamientos a 100 mg/kg y 400 mg/kg tuvo como resultados un mayor nivel, significativamente ($p < 0,01$), de glutatión respecto al grupo II.

No hubo diferencias significativas entre los niveles de glutatión entre los grupos III, IV y V, siendo el grupo V el de más concentración.

Tabla 3: Niveles de glutatión en homogenizado de hígado de ratones según grupo de tratamiento

Grupo de tratamiento	Glutatión* 10 ² µg/g	% de incremento**
Grupo I	48,9 ± 3,1 ^(a)	-
Grupo II	25,1 ± 2,9	-
Grupo III	42,7 ± 8,3 ^(b)	70,1%
Grupo IV	42,2 ± 8,1 ^(b)	68,2%
Grupo V	44,5 ± 3,3 ^(b)	77,3%

Mediana ± DE (n=7)

*Kruskal-Wallis

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

**Comparado con el grupo II

4.4. Índice hepático

El consumo de etanol al 5% por parte del grupo II aumentó el tamaño del hígado, expresado en el índice hepático, respecto al grupo I, sin llegar a ser significativo.

La administración de silimarina más etanol disminuyó el índice hepático respecto al grupo II, sin ser significativa.

La administración de la cáscara a dosis de 100 mg/kg y 400 mg/kg, grupos IV y V, respectivamente, presentó menor tamaño hepático respecto a los grupos I y II, sin ser significativa.

Tabla 4: Promedio y desviación estándar del índice de crecimiento del tejido hepático

Grupos	Índice hepático* %	% de inhibición**
Grupo I	6,2 ± 0,6	-
Grupo II	6,6 ± 0,4	-
Grupo III	5,7 ± 0,9	13,4%
Grupo IV	5,9 ± 0,6	10,8%
Grupo V	5,6 ± 0,7	15,1%

Media ± DE (n=7)

*ANOVA

**Comparado con el grupo II

4.5. Histológico

Grupo I: En este grupo se observó una estructura moderadamente alterada, los vasos sanguíneos con apariencia normal, conductos biliares semiobstruidos y algunos hepatocitos con núcleos pulverulentos, no presenta vacuolas. Diagnóstico final de hepatitis tóxica leve.

Grupo II: Se presentó estructura alterada con congestión de espacios intersticiales con glóbulos rojos, conductos biliares casi obstruidos, destrucción de membrana de espacio de Disse. Presentaban núcleos picnóticos y coagulados, así como vacuolas. El diagnóstico final fue hepatitis toxica severa.

Grupo III: Estructura conservada. Se apreció el núcleo, la integridad de las membranas del espacio de Disse, así como los canalículos biliares. No presentó vacuolas. Con diagnóstico final de hepatitis tóxica leve.

Grupo IV: Se evidenció una estructura muy dañada, en algunos casos con necrosis grasa con varias vacuolas. Canalículos biliares ocupados y desordenados. Ausencia de membranas del espacio de Disse. Alrededor de vena centrolobulillar presenta espacios en blanco. Con diagnóstico final de hígado grasoso.

Grupo V: Se evidenció vena centrolobulillar con estasis. Desorden marcado en su estructura, mayor tamaño de vacuolas (a gota gruesa), conductos biliares alterados, hepatocitos con núcleos pulverulentos,

ausencia de membrana de los espacios de Disse. Con diagnóstico final de hígado graso.

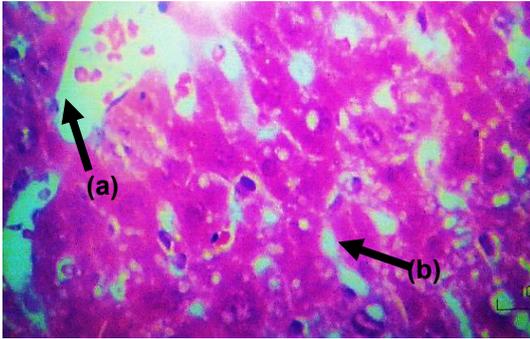


Gráfico 1: Grupo I: (a) vasos sanguíneos conservados. (b) conductos biliares semiobstruidos. Hepatitis tóxica leve.

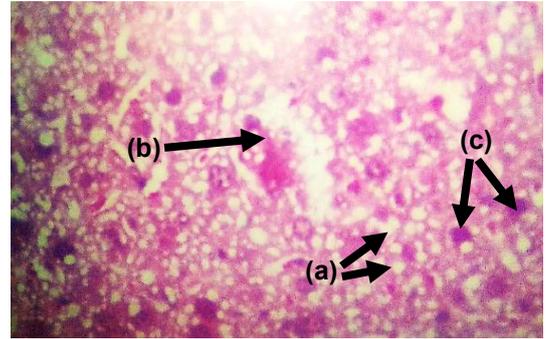


Gráfico 2: Grupo II: (a) gran número de vacuolas. (b) destrucción de la membrana de Disse. (c) núcleos coagulados. Hepatitis tóxica severa.

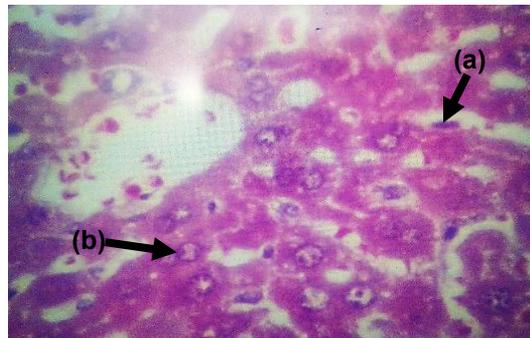


Gráfico 3: Grupo III: (a) mantenimiento de membranas de Disse. (b) integridad del núcleo. Hepatitis tóxica leve.

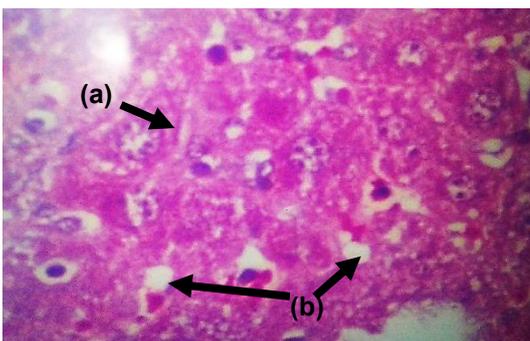


Gráfico 4: Grupo IV: (a) destrucción membrana de espacio de Disse. (b) presencia de vacuolas. Hígado graso.

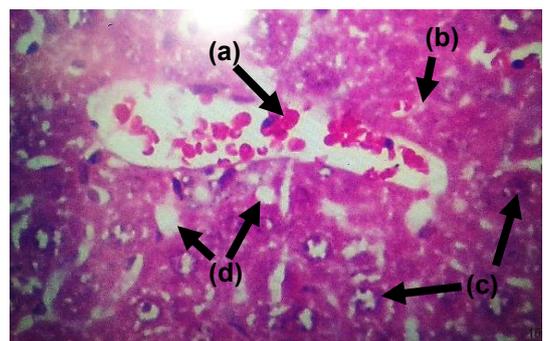


Gráfico 5: Grupo V: (a) vena centrolobulillar con estasis. (b) ausencia de membrana de espacio de Disse. (c) núcleos coagulados. (d) presencia de vacuolas. Hígado graso.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene como una de sus finalidades aportar, con base científica, acerca del uso de un producto que usualmente es desecho en muchos hogares, la cáscara de limón. Este estudio realizado en animales de experimentación nos brinda información respecto al efecto protector sobre el tejido hepático frente a la toxicidad de la ingesta frente al etanol al 5%.

El consumo crónico de etanol es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en los países desarrollados y se está convirtiendo en la principal causa de esta enfermedad en los países en desarrollo.⁴⁸

A pesar de la necesidad mundial de agente protector del hígado contra el etanol, aún no existen medicamentos para satisfacer nuestras expectativas. En consecuencia, se han buscado diversos productos de origen natural con actividades hepatoprotectoras,⁴⁹ es por ello que el interés por la medicina alternativa se ha incrementado de manera significativa, la etnobotánica ha aportado conocimientos empíricos acerca del tratamiento de diversas dolencias y enfermedades,⁵⁰ sobre todo en aquellos pacientes que padecen enfermedades crónicas en donde la eficiencia de la medicina convencional llega a su límite.⁵¹

En nuestro estudio se observó que el grupo que recibió etanol (grupo II) presentó un mayor índice hepático y lipoperoxidación como también un menor nivel de glutatión y un diagnóstico de hepatitis tóxica severa a nivel histológico.

Estos resultados observados en el grupo II están relacionados al efecto de la biotransformación del etanol, que es principalmente metabolizado por tres sistemas enzimáticos, la alcohol deshidrogenasa (ADH), que es una enzima citosólica, el citocromo P450 (CYP2E1), que participa en el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y la catalasa (CAT).^{54,59}

La principal vía de metabolización del etanol está a cargo de la ADH que produce acetaldehído a nivel del hígado.⁵⁶ La acumulación de ésta puede formar aductos con residuos reactivos de las proteínas o moléculas pequeñas, por ejemplo, cisteínas.^{55,58} El acetaldehído posteriormente se metaboliza en acetato a través

de la enzima mitocondrial acetaldehído deshidrogenasa (ALDH),⁵⁵ que emplea NAD⁺ generando NADH⁺ + H⁺, acumulando esta especie reducida.^{54, 57}

Esta relación alterada de NAD/NADH tiene profundos efectos en el metabolismo de los carbohidratos, causando la inhibición del ciclo de Krebs, la cual hace que se desvíe acetyl CoA hacia la síntesis de ácidos grasos consumiendo oxalacetato y como consecuencia se altera la neoglucogénesis,^{59,60} también provoca la inhibición de la β -oxidación, contribuyendo a la patogénesis del hígado graso, que es la etapa inicial de las enfermedades hepáticas alcohólicas⁶⁰ todos estos eventos guardan relación con lo encontrado a nivel histológico y con el incremento del índice hepático.

Además de su acción sobre la síntesis y oxidación de ácidos grasos, el etanol también altera el metabolismo de las gotas lipídicas y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) del hígado,⁵⁵ ya que inhibe la síntesis de fosfatidilcolina.

El etanol incrementa la ceramida la cual activa a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la SREBP-1 (proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1) y ésta inhibe el AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y el PPAR- α (receptor α activado por proliferador de peroxisoma),^{48, 55, 58, 59, 60} que a su vez estimula la síntesis de ácidos grasos. Este alcohol también disminuye la adiponectina, la cual es responsable de la oxidación de los ácidos grasos y de un aumento de los niveles de TNF-alfa en el hígado.⁵⁵ Estas alteraciones bioquímicas guardan relación con lo encontrado a nivel histológico en nuestro estudio.

También se ha observado que la ingesta de etanol disminuye la barrera intestinal, lo que conduce a un aumento de su permeabilidad y la posterior presencia de lipopolisacárido derivado de las bacterias del intestino (LPS) en la sangre portal, que activa TLR4, receptor Toll like (TLR), que están implicados en el reconocimiento de ligandos endógenos relacionados con la respuesta inflamatoria,⁶² en las células de Kupffer conduciendo a la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF-alfa, IL-6)^{59, 63} y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS),^{48,59} que inducen a lesión hepática, jugando un papel significativo en el daño hepatocelular.^{48, 59, 65}

El CYP2E1, una de las enzimas del MEOS, produce especies reactivas de oxígeno (ROS).^{58,59, 64} Esta enzima está ligeramente acoplada con citocromo reductasa; por lo tanto, puede filtrarse electrones al oxígeno para formar O_2^- y catalizar la peroxidación lipídica.^{58, 72} Por lo tanto, aunque O_2^- no es un potente pro-oxidante *per se*, parece ser un iniciador clave del estrés oxidativo durante la exposición al alcohol,⁵⁸ esto puede relacionarse con los resultados hallados en la lipoperoxidación del grupo II.

El glutatión reducido (GSH) es una molécula que se encuentra en el citoplasma de todas las células, especialmente en el hígado en donde se hallan las mayores concentraciones teniendo como funciones la detoxificación de xenobióticos, mantenimiento del balance redox intracelular, función antioxidante, transporte y almacenamiento de cisteína y regulación del crecimiento y la muerte celular.^{54,71,72}

El acetaldehído promueve una mayor utilización/rotación de la GSH mitocondrial⁵⁹ y reduce significativamente las reservas de GSH,⁵⁸ que parece desempeñar un papel importante en la lesión hepática inducida por el alcohol, la formación aumentada de especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS/RNS) y disminución de los niveles de defensas antioxidantes,⁵⁹ como el tocoferol y el ácido ascórbico, contribuyendo así al estrés oxidativo.^{48,65,68} Todo esto puede explicar los resultados observados en el grupo II de nuestro estudio respecto a los niveles bajos de glutatión.

El consumo de etanol produce predominantemente una disminución en el nivel S-adenosilmetionina (SAME) en los hepatocitos y el aumento de dos metabolitos tóxicos, homocisteína y S-adenosilhomocisteína (SAH). Además, el alcohol provoca un cambio en la expresión genética de metionina adenosiltransferasa (MAT), MAT1A a MAT2A, que se correlaciona con los niveles de SAME, GCLC, GST y GPx disminuido, el cual con la hiperhomocisteinemia inducida por el etanol y el estrés de retículo endoplasmático se asocian con una disminución de la defensa antioxidante, la fibrogénesis, la inducción de TNF- α y el aumento de roturas de la cadena de ADN, todos lo mencionado conduce a la lesión hepática,⁶⁰ como lo encontrado en el grupo II a nivel histológico.

El alcohol causa un estado hipermetabólico agudo en el hígado, lo que resulta en una tasa de consumo de oxígeno duplicada, aumentando el gradiente intralobular de oxígeno en el hígado con posterior hipoxia pericentral. Posterior a la disminución de los niveles de alcohol, la reoxigenación aumenta la producción pro-oxidante a través de la hipoxia/reoxigenación. Esto con la disminución de las defensas causado por la hipoxia puede aumentar el estrés oxidativo observado en el hígado después de la exposición al etanol,⁵⁸ mecanismo que podría explicar el estado de la lipoperoxidación en el grupo II.

A nivel histológico en nuestro estudio se reporta que los ratones que solamente recibieron el tratamiento con etanol mostraron mayor daño celular que el grupo sano, congestión de vena centrolobulillar por glóbulos rojos, núcleos picnóticos y pulverulentos, una alteración de la estructura con congestión de espacios intersticiales, estos resultados concuerdan con los estudios histológicos realizados por Mani et al 2016, en cuyo experimento con etanol en ratas se observó aumento del peso del hígado comparado con el grupo control. Además, el hígado de rata alimentado con etanol muestra infiltración con células inflamatorias, cambios micro y macro vesiculares grasos y tríada portal erosionada. Vogt 2007 demostró que la administración de etanol depletaba hasta más de un 50% las concentraciones de glutatión en células hepáticas.^{69,74}

Estos resultados son similares a los encontrados por Sandoval et al. 2008⁴⁵ en los que el grupo de ratones de consumo de etanol al 5% tuvo incrementos (+58,25%) significativos ($p=0,0021$) en el índice hepático a las 72 horas, siendo el mayor. Torres 2016 reportó que los ratones que recibieron etanol al 5% tuvieron un incremento de la masa de tejido hepático comparado con el grupo control de referencia,⁵² estos resultados son consistentes a los hallados por Lipe 2016 en el que hubo un incremento del 34%, comparado con el basal.⁵³

Con respecto al tratamiento con silimarina + etanol (grupo III) se observó un menor índice hepático, así como de la peroxidación lipídica, un aumento de los niveles de glutatión (GSH) y el diagnóstico histológico de hepatitis tóxica leve.

La silimarina es un extracto de las semillas y fruto de la planta de Cardo mariano o *Silybum marianum*, y contiene 7 flavonolignanós (silibina A, silibina B, isosilina

A, isosilina B, silristina, isosililristina y silidianina) y el flavonoide taxifolina; el cual ha sido utilizada en padecimientos hepáticos por su efecto regenerador celular, inhibidor de leucotrienos y efecto antioxidante.^{70,73.}

La actividad hepatoprotectora y antioxidante inherente de la silimarina es causada por la inhibición de las ciclooxigenasas, los leucotrienos y la producción de radicales libres de las células de Kupffer en ratones, así como por su naturaleza fenólica, es capaz de donar electrones para estabilizar radicales libres de las especies reactivas de oxígeno (ROS). También previene la lipoperoxidación de las membranas mejorando la generación de glutatión hepático, al elevar la disponibilidad de cisteína e inducir la síntesis de la misma, al tiempo que inhibe su catabolismo a taurina.⁷⁶

Los datos obtenidos son similares a los observados por Sandoval et al. 2008 en donde la lipoperoxidación en los grupos que recibieron silimarina fue significativamente menor comparado con el grupo que solo recibió etanol, pero no significativamente menor al grupo silimarina + etanol. Los resultados obtenidos por Torres 2016 y Lipe 2016 en los grupos que recibieron solo silimarina tuvieron un incremento de la lipoperoxidación en contraste con Sandoval y nuestros datos obtenidos.^{45,52,53}

En un estudio *in vitro* Brandon-Warner et al. 2010, con un componente de la silimarina, silibinina, en células de carcinoma hepatocelular (HCC) se observó inhibición significativa de los niveles de malondialdehído (MDA), demostrando ser eficaz contra el aumento de la lipoperoxidación, en las células tratadas con etanol,⁷⁶ similar a lo obtenido en el grupo III.

Con respecto a los grupos (IV y V) que ingirieron la cáscara de *Citrus aurantifolia* (limón) en dosis de 100 mg/kg y 400 mg/kg, respectivamente, con etanol, se observó un incremento de tejido hepático, un aumento de los niveles de TBARS, GSH y un diagnóstico histológico de hígado graso en ambos grupos.

En base al análisis por cromatografía líquida de alta resolución, los flavonoides más abundantes encontrados en extractos de *Citrus aurantifolia* fueron apigenina, rutina, quercetina, kaempferol y nobiletin.⁸⁵ Los principales componentes del aceite esencial de limón, extraído por hidrodestilación,

demonstraron ser β -pineno (12.6%), limoneno (53.8%), γ -terpineno (16.5%), terpinoleno (0.6%), α -terpineol (0.4%) y citral (2.5%).⁸³

Los compuestos activos a partir del extracto de hexano de las cáscaras de frutas de *Citrus aurantiifolia* se fraccionó por cromatografía en columna y se obtuvo 5-geraniloxipsoraleno; 5-geraniloxi-7-metoxicumarina; 5,7-dimetoxicumarina; 5-metoxipsoraleno; y 5,8-dimetoxipsoraleno. Posteriormente por cromatografía de gases-espectrometría de masas del extracto del hexano permitió identificar estos principales componentes más 5,7-dimetoxicumarina (15.79%), 3-metil-1,2-ciclopentanodiona (8.27%), 1-metoxi-ciclohexeno (8.0%), corylone (6.93%), ácido palmítico (6.89%), 5,8-dimetoxipsoraleno (6.08%), α -terpineol (5.97%) y umbelliferona (4.36%).^{84,85}

Dong et al. observaron que el tratamiento con quercetina disminuyó los niveles de quimiocina y de malondialdehído, producto final de la peroxidación lipídica, y aumentó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en tejido cerebral de rata.⁷⁴ Vidhya 2009 tuvo resultados similares, además de la elevación de glutatión de manera significativa.⁸⁷

Dhanya R et al. reportaron activación de la síntesis de glutatión y limitación de la peroxidación lipídica (malondialdehído) en células musculares L6. Los resultados demuestran que la naringina contribuyó a la prevención del daño oxidativo.⁸⁸ Similares resultados fueron obtenidos en nuestros grupos experimentales con respecto al glutatión, sin embargo, no fue así con la lipoperoxidación.

Un estudio realizado por Wha et al 2017 (*in vitro*) demostró mantenimiento de la glutatión peroxidasa (Gpx), glutatión reductasa (GR) y elevación el nivel de GSH reducido de parte de los flavonoides (quercetina 3-O-éter metílico, (+)-taxifolina, la isorhamnetina 3-O- β -D-glucósido y la narcisina) de la *Opuntia ficus-indica*.⁴⁹ Similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio con el GSH.

Van Acker 1996 concluye que los bajos potenciales de oxidación (EP/2) y la actividad de quelación de hierro tiene un comportamiento inhibitorio de la lipoperoxidación.⁸⁹

Tras la administración por vía oral de rutina y quercetina (10 y 20 mg/kg) durante cinco días consecutivos se observó una disminución significativa en el daño del ADN en el tiempo posterior a la irradiación gamma en comparación con el grupo de irradiación sola.⁹⁰ En nuestra experimentación se tuvieron resultados similares con respecto al GSH y lipoperoxidación. Este efecto puede ser debido, como señala el autor, a la acción antioxidante de los flavonoides presentes en la muestra.

Choi et al en un estudio en rata señalaron que la concentración del GSH y la actividad del GR disminuyeron en el grupo que recibió vitamina E y quercetina comparado con el que no recibió este flavonoide. Lo que sugiere que este flavonoide puede actuar como prooxidante en el hígado de manera significativa.⁹¹

En un estudio *in vitro* Chobot et al 2013 demostraron la capacidad prooxidante de la quercetina en la mayoría de concentraciones probadas mientras que la rutina se mantuvo como antioxidante.⁹²

Escamilla 2009 mencionó que los flavonoides por los EP/2 presentados pueden reducir el Fe^{+3} y Cu^{+2} para sufrir una autooxidación del radical aroxilo generando O^{-2} que posteriormente genera el radical hidroxilo, lo que guarda relación con lo encontrado en nuestro estudio.⁹³ Pérez 2003, Martínez-Flórez 2002, Da Silva 2002 concuerdan con lo mencionado; asimismo Sahu 1996 demostró en hígados de rata el deterioro de la defensa antioxidante es dependiente de la dosis de los flavonoides.^{94,95,96,97}

En otro estudio Wha et al 2015 en hepatocitos de ratas Sprague Dawley demostraron la capacidad antioxidante (GSH, GR y Gpx) de los flavonoides, quercitrina y tamarixetina 3-O-ramnopiranosido, encontrados en la *Firmiana simplex*,⁹⁸ cuyos resultados fueron similares a los hallados en nuestro estudio con respecto al GSH, donde también presentó incremento.

Dong et al. 2014 observaron que el tratamiento con quercetina disminuyó los signos histológicos de inflamación aguda en los animales tratados de una manera dependiente de la dosis, suprimiendo el reclutamiento de leucocitos.⁷⁴

VI. CONCLUSIONES

- La ingesta de la cáscara de *Citrus aurantifolia* (limón) en ambas dosis presentó efecto protector en el marcador glutatión, concentración significativamente mayor en tejido hepático; en el marcador de lipoperoxidación presentación mayor concentración en el tejido hepático de manera significativa, no presentando efecto protector.
- La ingesta de la cáscara de *Citrus aurantifolia* (limón) en ambas dosis presentó menor índice hepático.
- De lo observado en el presente estudio se puede concluir que la ingesta de la cáscara de *Citrus aurantifolia* (limón) ejerce un efecto hepatoprotector, bajo las condiciones de trabajo, expresado en el marcador GSH e histológico.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de capacidad antioxidante in vitro de la cáscara de *Citrus aurantifolia* (limón).
- Se recomienda realizar la cuantificación de la actividad enzimática de SOD, CAT, GPx, GSSG.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Osorio L, Patiño T, Tagle M, Huayanay L. Percepciones, conocimientos y actitudes sobre enfermedad hepática en adultos sanos que acuden a instituciones de salud de estrato A, B y C. Rev. Gastroenterol. Perú. [Internet]. 2010 [Cited 2017 Jan 25]; 30(2):126-132. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v30n2/a04v30n2>
02. Malpica-Castillo A, Ticse R, Salazar-Quiñones M, Cheng-Zárate L, Valenzuela-Granados V, Huerta-Mercado J. Mortalidad y readmisión en pacientes cirróticos hospitalizados en un hospital general de Lima, Perú. Rev. Gastroenterol. Perú. [Internet] 2013 Dec [Cited 2017 Jan 27]; 33(4): 301-305. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v33n4/a03v33n4.pdf>
03. Bustíos C, Dávalos M, Román R, Zumaeta E. Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. Rev. Gastroenterol. Perú. [Internet] 2007 Set [Cited 2017 Jan 27]; 27(3): 238-245. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v27n3/a03v27n3.pdf>
04. Comisión Nacional para el Desarrollo y Vida sin Drogas. I Estudio sobre prevención y consumo de drogas en la población general de Lima Metropolitana y el Callao [Internet]. Lima. 2014. [Cited 2017 Jan 28]. Available from: http://devida.gob.pe/wp-content/uploads/2015/02/I_Estudio_Lima_Callao_completo.pdf
05. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Ginebra. 2014 May 12 [Cited 2017 Jan 29]. Available from: http://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=2684:informe-mundial-de-la-oms-destaca-los-impactos-negativos-del-alcohol-en-la-salud&catid=1075:noticias-2014&Itemid=900
06. Dávalos M, Rolando N. Hepatitis alcohólica. Rev. Gastroenterol. Perú. [Internet] 1998 [Cited 2017 Jan 28]; 18(2): 151-164. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/gastro/vol_18n2/hepatitis_alcoholica.htm

07. Moore K, Dalley A, Agur A. Anatomía con orientación clínica. 7ma ed. Barcelona (España): Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 421-432.
08. Mahan L, Escott-Stump S, Raymond J. Krause Dietoterapia. 13va ed. Barcelona (España): Elsevier España; 2013. Capítulo 30, Tratamiento nutricional médico en los trastornos hepáticos, biliares y del páncreas exocrino; p. 645-674.
09. Latarjet M, Ruiz A. Anatomía Humana. 4ª ed. Buenos Aires (Argentina): Editorial Médica Panamericana; 2005. Capítulo 109, Hígado; p. 1376-1400.
10. Stevens A, Lowe J. Histología Humana. 3ª ed. Madrid (España): Elsevier España; 2006. Capítulo 12, Hígado; p. 229-242.
11. Le Vay D. Anatomía y fisiología humana. 2ª ed. Barcelona (España): Editorial Paidotribo; 2004. Capítulo 13, Digestión; p. 221-230.
12. Ross M, Pawlina W. Histología, Texto y Atlas correlación con Biología Celular y Molecular. 7ma ed. Barcelona (España): Wolters Kluwer; 2015. Capítulo 18, Sistema digestivo III: hígado, vesícula biliar y páncreas; p. 677-716.
13. Segarra E. Fisiología de los aparatos y sistemas. 1ª ed. Cuenca: Imprenta de la Facultad de Ciencias Médicas; 2006. Capítulo 11, El hígado y la vesícula biliar; p. 98-118.
14. Kuhnel, W. Atlas color de citología e histología. 11ª ed. Madrid (España): Editorial Médica Panamericana; 2005. Capítulo 9, Aparato digestivo; p. 272-339.
15. Fortoul, T. Histología y biología celular. 2ª ed. México D. F. (México): McGraw Hill; 2013. Capítulo 12, Aparato digestivo; p. 223-252.
16. Kierszenbaum A, Tres L. Histología y biología celular. 3ª ed. Barcelona (España): Elsevier; 2012. Capítulo 17, Glándulas digestivas; p. 503-532.
17. Gal B, López M, Martín A, Prieto J. Bases de la fisiología. Madrid (España): Editorial Tébar; 2007. Capítulo 8, Fisiología gastrointestinal; p. 267-318.

18. Barret K. Fisiología gastrointestinal. 1ª ed. México D. F. (México): McGraw Hill; 2007. Capítulo 10, Anatomía funcional del hígado y el sistema biliar; p. 176-194.
19. Ira S. Fisiología humana. 13ª ed. México D. F. (México): McGraw Hill; 2014. Capítulo 18, Sistema digestivo; p. 619-659.
20. Vasudevan D, Sreekumari S, Vaidyanathan K. Texto de Bioquímica. 6ª ed. India: Editorial Jaypee Highlights Medical Publishers; 2012. Capítulo 26, Pruebas de función hepática y gástrica; p. 301-313.
21. Tresguerres J. Fisiología humana. 3ª ed. Madrid (España): McGraw Hill; 2005. Capítulo 63, Fisiología hepática; p. 750-759.
22. Koolman J, Rohm K. Bioquímica, Texto y Atlas. 4ª edición. Madrid (España): Editorial Médica Panamericana; 2012. Hígado; p 314-329.
23. Herrerías J, Díaz A, Jiménez M. Tratado de Hepatología. 1ª ed. Sevilla (España): Universidad de Sevilla; 1996. Capítulo 1, Embriología y anatomía macroscópica del hígado y las vías biliares; p. 3-17.
24. Ganong F. Fisiología médica. 20 ed. México: El Manual Moderno; 2006. Capítulo 26, Regulación de la función gastrointestinal; p. 468-474.
25. Delgado L, Betanzos G, Sumaya T. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y ciencia [Internet]. 2010 Sep-Dec [cited 2017 Sep 19]; 18(50): 10-15. Available from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=67415744003>
26. Emim J, Braga A, Lapa A. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. J Pharm Pharmacol. [Internet]. 1994 Feb [cited 2017 Feb 2]; 46(2): 118-122. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03753.x>
27. González F. Compilación bibliográfica del limón persa (*Citrus latifolia*). Veracruz: Universidad Veracruzana; 2011. Available from: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31059/1/GIzCruz.pdf>

28. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A, Jaafar H. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Feb 2]; 17(2): 1203-1218. Available from: <http://mdpi.com/1420-3049/17/2/1203>
29. Rocha C, Ceolin J, Rocha R, Gonçalves E, Raskopf J, De Freitas L, Hilda I, Morgan-Martins M, Mauriz J, Da Silva J, Reyes J, Possa N. Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats. *Nutr Hosp* [Internet]. 2014 May [cited 2017 Feb 3]; 29(5): 1141-1148. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951996>
30. Rusyn A, Bataller R. Alcohol and toxicity. *J Hepatol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2017 Dec 11]; 59(2): 387-388. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959903/>
31. De Ugarriza S. Terminología comercial agropecuaria [Internet]. Salta: Ediciones de la Universidad Católica de Salta; 2009 [cited 2017 May 19]; 324 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=a9BuV1CEz3IC&pg=PA6&dq=Terminolog%C3%ADa+comercial+agropecuaria&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiOtP3ZopXcAhXluVkkKHYjdAwkQ,44p6AEIJzAA#v=onepage&q=Terminolog%C3%ADa%20comercial%20agropecuaria&f=false>
32. De Jesus M. Guía técnica de cultivo de limón pèrsico [Internet]. Nueva San Salvador: Editorial Maya; 2002 Oct [cited 2017 Apr 16]; 44 p Available from: <http://repiica.iica.int/docs/B0217E/B0217E.PDF>
33. Asociación Macroregional De Productores Para La Exportación. Perfil de mercado del limón (Citrus). Lima (Perú); 2008.
34. Osuna L, Tapia M, Aguilar A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etonobotánico, fotoquímico y farmacológico [Internet]. Barcelona (España): Edicions Universitat Barcelona; 2005 [cited 2017 Mar 15]; 173 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=KxxiKJ9Q_LMC&pg=PA163&dq=Plantas+medicinales+de+la+medicina+tradicional+mexicana+para+

tratar+afecciones+gas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjD1LXlpZXcAhWLbIAKHytCQwQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Plantas%20medicinales%20de%20a%20medicina%20tradicional%20mexicana%20para%20tratar%20afecciones%20gas&f=false

35. Martín A, Martín J, Lozano R. La repostería básica profesional [Internet]. Madrid (España): Editorial Vision Libros; 2007 Jan [cited 2017 Apr 18]; 109 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=phzoDT1EZEQC&printsec=frontcover&dq=La+reposter%C3%ADa+b%C3%A1sica+profesional&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwieyfOCqpXcAhUQxVkkHYIaBFcQ6AEIJzAA#v=onepage&q=La%20reposter%C3%ADa%20b%C3%A1sica%20profesional&f=false>
36. Jordá M. Diccionario práctico de gastronomía y salud. 1a ed [Internet]. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 2011 [cited 2017 Jan 19]; 1389 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=gNJs2yJndykC&printsec=frontcover&dq=Diccionario+pr%C3%A1ctico+de+gastronom%C3%ADa+y+salud&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiD3L2SqZXcAhWCnFkKHbdTB-4Q6AEIJzAA#v=onepage&q=Diccionario%20pr%C3%A1ctico%20de%20gastronom%C3%ADa%20y%20salud&f=false>
37. Richards A. Sorprendentes recetas de limonada para la sed [Internet]. España: Babelcube Inc; 2016 [cited 2017 Apr]; 70 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=UIPqBgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Sorprendentes+recetas+de+limonada+para+la+sed&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiN44Pyp5XcAhUx0FkKHfMBCxkQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Sorprendentes%20recetas%20de%20limonada%20para%20la%20sed&f=true>

38. Moo M, Vargas M, Cuevas L, Moo V, Sauri E. Evaluación del contenido de flavonoides totales en residuos cítricos. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica [Internet]. 2012 [cited 2017 Mar 14]. Available from:
<http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/ixtapa/AutoPlay/Docs/EXTENSOS/CIENCIA%20DE%20LOS%20ALIMENTOS/CAL85VMO20120117.pdf>
39. Reyes M. Tablas peruanas de composición de alimentos [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2009 [cited 2017 Jan 11]; 64 p. Available from:
<http://ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla%20de%20Alimentos.pdf>
40. Rojas J, Perea A, Stashenko E. Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Aug 14]; 16(1): 110-115. Available from:
<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a13.pdf>
41. Benito P, Calvo S, Gómez C, Iglesias C. Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte [Internet]. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2014 [cited 2017 Feb 17]; 819 p. Available from:
<https://books.google.com.pe/books?id=MiiEAWAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Alimentaci%C3%B3n+y+nutrici%C3%B3n+en+la+vida+activa:+ejercicio+f%C3%ADsico+y+deporte&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiAjo74n5XcAhVCnFkKHZQBBxIQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Alimentaci%C3%B3n%20y%20nutrici%C3%B3n%20en%20la%20vida%20activa%3A%20ejercicio%20f%C3%ADsico%20y%20deporte&f=false>
42. Argimon J, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3ª ed. [Internet]. Madrid: Elsevier España; 2004 Jul [cited 2017 Mar 16]; 404 p. Available from:
<https://books.google.com.pe/books?id=XmcP72c60fYC&printsec=front>

cover&dq=argimon+m%C3%A9todos+de+investigaci%C3%B3n+cl%C3%ADnica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi6-_-noJXcAhUDzlkKHQxeDMsQ6AEINDAC#v=onepage&q=argimon%20m%C3%A9todos%20de%20investigaci%C3%B3n%20cl%C3%ADnica&f=false

43. León J. Botánica de los cultivos tropicales. 3a ed. [Internet]. San José: Editorial Agroamérica; 2000 [cited 2017 Jun 21]; 522 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=NBtu79LJ4h4C&dq=Le%C3%B3n+J.+Bot%C3%A1nica+de+los+cultivos+tropicales&source=gbs_navlinks_s
44. Hevia F, Wilckens R, Berti M, Fischer S. Calidad de Cardo Mariano (*Slybum marianum* (L.) Gaertn.) Cosechado en diferentes estados fenológicos. Inf Tecnol [Internet]. 2007 [cited 2017 Jul 28]; 18(5):69-74. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v18n5/art09.pdf>
45. Sandoval M, Lazarte K, Arnao I. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinífera* L (uva). Anales de la Facultad de Medicina [Internet]. 2008 [cited 2017 Jun 6]; 69(4): 250-259. Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1125/933>
46. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón [Internet]. Lima: Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud; 2008 [cited 2017 Mar 16]; 52 p. Available from: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
47. Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. J Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Aug 17]; 27(2): 89-93. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281557/>
48. Wha J, Bum T, Woo H, Wook S, Pyo H, Hyun S. Hepatoprotective Flavonoids in *Opuntia ficus-indica* Fruits by Reducing Oxidative Stress

- in Primary Rat Hepatocytes. Pharmacogn Mag [Internet] . 2017 Jul-Sep [cited 2017 Nov 19]; 13(51): 472-476. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5551367/>
49. Velázquez D, Guyat M, Manzanares K, Aguirre B, Gelabert F. Etnobotánica: Empleo de plantas para uso medicinal. Revista Cubana de Ciencias Forestales [Internet]. 2014 [cited 2017 Aug 24]; 2(1): 35-44. Available from: <http://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/71/234>
50. Miranda M, Huacuja L, López A, Panduro A. Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. Investigación en Salud [Internet]. 2005 Mar [cited 2017 Aug 15]; 7(1): 64-70. Available from: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=14220648004>
51. Torres A. Efecto hepatoprotector del zumo de fruta *Spondias purpurea* (ciruela) variedad roja en ratones inducidos a toxicidad por etanol. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. 46 p.
52. Lipe C. Efecto hepatoprotector del zumo del fruto de *Corryocactus brevistylus* (Sanky) en ratones con daño hepático inducido por etanol. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. 50 p.
53. Gaviria M, Correa G, Navas M. Alcohol, cirrosis y predisposición genética. Revista Colombiana de Gastroenterología [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Feb 15]; 31(1): 27-35. Available from: <https://revistagastrocol.com/index.php/rcg/article/view/70/69>
54. Rasineni K, Casey CA. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. Indian J Pharmacol [Internet]. 2012 May [cited 2017 Feb 11]; 44(3): 299-303. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371448/>
55. Adan A. Bases Biológicas del alcoholismo. Psicología Conductual [Internet]. 1998 [cited 2017 Oct 16]; 6(1): 115-136. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2827097>

56. Aragón C, Miguel M, Correa M, Sanchis-Segura C. Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones* [Internet]. 2002 [cited 2017 Sep 11]; 14(1): 23-42. Available from: <http://www.adicciones.es/index.php/adicciones/article/download/541/533>
57. Beier J, McClain C. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem* [Internet]. 2010 Nov [cited 2017 Aug 17]; 391(11): 1249-1264. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755482/>
58. Zhu H, Jia Z, Misra H, Li R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *J Dig Dis* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Jul 10]; 13(3): 133-142. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297983/>
59. Gyamfi M, Wan Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease: the role of nuclear receptors. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Aug 25]; 235(5): 547–560. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3908670/>
60. Li S, Hong M, Tan H, Wang N, Feng Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 Mar 18]; 2016: 4234061. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192343/>
61. Herrero J. ABC de los «Toll-like receptors»: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Semin Fund Esp Reumatol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2017 Jul 12]; 11(4): 135-143. Available from: <http://elsevier.es/es-revista-seminarios-fundacion-espanola-reumatologia-274-articulo-abc-los-toll-like-receptors-relacion-S1577356610000552>
62. French S, Joan Oliva, French B, Li J, Bardag-Gorce F. Alcohol, nutrition and liver cancer: Role of Toll-like receptor signaling. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 May 25]; 16(11): 1344–

1348. Available from:
<https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842526/>
63. Mandrekar P, Bala S, Catalano D, Kodys K, Szabo G. The Opposite Effects of Acute and Chronic Alcohol on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Are Linked to IRAK-M in Human Monocytes. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2017 Aug 13]; 183(2). Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845821/>
64. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T, Noguchi R, Yoshiji H, Fujimoto M, Fukui H. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 Dec [cited 2017 Mar 16]; 2013: 495156. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872233/>
65. García-Suástegui W, Ramos-Chávez L, Rubio-Osornio M, Calvillo-Velasco M, Atzin-Méndez J, Guevara J, Silva-Adaya D. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017 Jan [cited 2017 Oct 13]; 4680732. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5259652/>
66. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Jun 12] 20(25): 8082–8091. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4081679/>
67. Segado A, Santiago C, Bañares R, Álvarez E, Bandrés F, Gómez-Gallego F. Susceptibilidad genética al desarrollo de hepatitis alcohólica aguda: papel de las mutaciones genéticas en alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y citocromo P450 2E1. *Rev Clín Esp* [Internet]. 2005 Nov [cited 2017 Apr 29]; 205(11): 528-532. Available from: <https://sciencedirect.com/science/article/pii/S0014256505726321>
68. Mani V, Islam A, Arivalagan S, Thomas N, Namasivayam N. Zingerone ameliorates hepatic and renal damage in alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* [Internet]. 2016 Jun [cited 2017 Jun 19]; 6(3): 125-132. Available from: <http://ijnpnd.com/article.asp?issn=2231->

0738;year=2016;volume=6;issue=3;spage=125;epage=132;aui=Ma
ni

69. Vásquez R, Reyes J, Fernández C, Anaya M, Rizzoli A. Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniometionina en el tratamiento de hígado graso: revisión sistemática de la literatura. *An Med Asoc Med Hosp ABC* [Internet]. 2013 Jan-Mar [cited Jul 14]; 58(1): 37-46. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2013/bc131g.pdf>
70. Denzoin L, Soraci A, Tapia M. Homeostasis del glutati6n. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 21]; 47(3): 529-539. Available from: http://scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007
71. Leung T, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Aug 11]; 58(2): 395-398. Available from: [https://journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(12\)00681-2/fulltext](https://journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(12)00681-2/fulltext)
72. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Tabassum M, Wang S, Liu H, Yin Y. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Sep 16]; 8(3), 167. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808895/>
73. Dong Y, Wang J, Feng D, Qin H, Wen H, Yin Z, Gao G, Li C. Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Oct 20]; 11(3): 282–290. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917118/>
74. Vogt B, Richie J. Glutathione Depletion and Recovery After Acute Ethanol Administration in the Aging Mouse. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2007 May [cited 2017 May 11]; 73(10): 1613-1621. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1930162/>
75. Brandon-Warner E, Sugg J, Schrum L, McKillop I. Silibinina inhibe el metabolismo del etanol y la proliferaci6n celular dependiente del etanol en un modelo in vitro de carcinoma hepatocelular. *Cancer Lett*

- [Internet]. 2010 May [cited 2017 Jun 17]; 291(1): 120-129. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3099213/>
76. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna M, Gayosso-de-Lucio J, Morales-González J. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Jul 19]; 6(3): 144–149. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959115/>
77. Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, Rashedinia M, Moshiri M. “Silymarin”, a Promising Pharmacological Agent for Treatment of Diseases. *Iran J Basic Med Sci* [Internet]. 2011 Jul-Aug [cited 2017 Aug 16]; 14(4): 308-317. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586829/>
78. Polyak S, Ferenci P, Pawlotsky J. Hepatoprotective and Antiviral Functions of Silymarin Components in HCV Infection. *Hepatology* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Aug 15]; 57(3): 1262-1271. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3594650/>
79. Ribeiro C, Miranda E, Ribas P, Passos R, Pereira L. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017 Jul [cited 2017 Sep 10]; 23(27): 5004-5017. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526770/>
80. Hellerbrand C, Schattenberg J, Peterburs P, Lechner A, Brignoli R. The potential of silymarin for the treatment of hepatic disorders. *Clinical Phytoscience International Journal of Phytomedicine and Phytotherapy* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Sep 25]; 2:7. Available from: <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-016-0019-2>
81. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Jan 15]; 22(11): 1942. Available from: <http://mdpi.com/1420-3049/22/11/1942/htm>

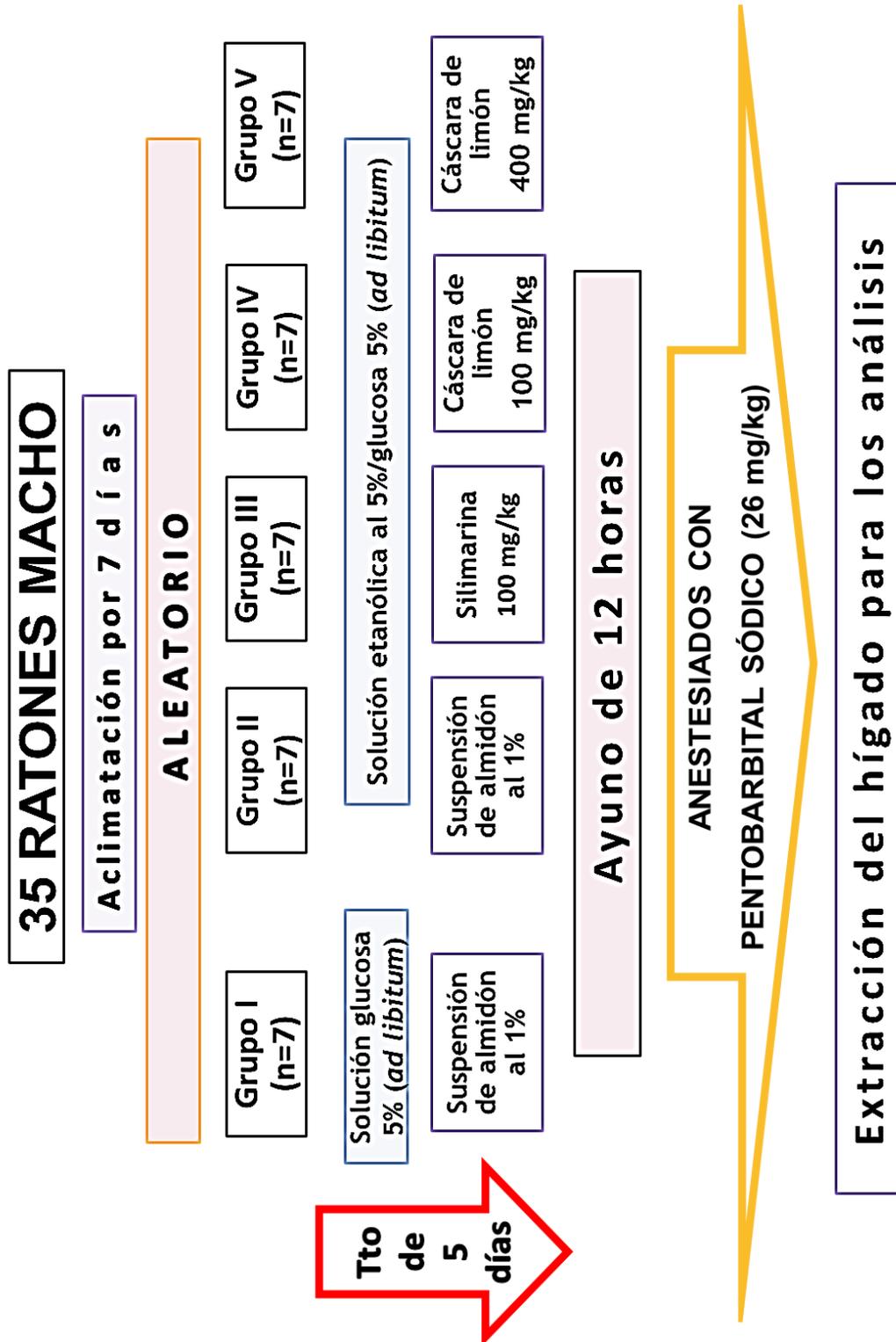
82. Loizzo M, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, De Luca D, Colica C, Menichini F. Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. J of the Science of Food and Agriculture [Internet]. 2012 Dec [cited 2017 Nov 15]; 92(15): 2960-2967. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.5708>
83. Costa R, Bisignano C, Filocamo A, Grasso E, Occhiuto F, Spadaro F. Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. J of Essential Oil Research [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 Nov 20]; 26(6): 400-408. Disponible en: <https://tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2014.964428?scroll=top&needAccess=true>
84. Sandoval-Montemayor N, García A, Elizondo-Treviño E, Garza-González E, Alvarez L, Del Rayo M. Chemical Composition of Hexane Extract of *Citrus aurantifolia* and Anti-Myco bacterium tuberculosis Activity of Some of Its Constituents. Molecules [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Nov 25]; 17(9): 11173-11184. Available from: <http://mdpi.com/1420-3049/17/9/11173>
85. Lv X, Zhao S, Ning Z, Zeng H, Shu Y, Tao O, Xiao C, Lu C, Liu Y. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. Chem Cent J [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Nov 28]; 9: 68. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4690266/>
86. Vidhya A, Indira M. Protective effect of Quercetin in the Regression of Ethanol-Induced Hepatotoxicity. Indian J Pharm Sci [Internet]. 2009 Sep-Oct [cited 2017 Nov 30]; 71(5): 527-532. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866344/>
87. Dhanya R, Arun K, Nisha V, Syama H, Nisha P, Santhosh T, Jayamurthy P. Preconditioning L6 Muscle Cells with Naringin Ameliorates Oxidative Stress and Increases Glucose Uptake. PLoS

- One [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Dec 3]; 10(7). Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492986/>
88. Van Acker S, Van Den Berg D, Tromp M, Griffioen D, van Bennekom W, van der Vijgh W, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1996 [cited 2017 Dec 5]; 20(3): 331-342. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720903>
89. Patil S, Rao N, Somashekarappa H, Rajashekhar K. Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. *Biomed J* [Internet]. 2014 Sep-Oct [cited 2017 Dec 10]; 37(5): 305-313. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25179701>
90. Choi E, Chee K, Lee B. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2017 Dec 10]; 482(1-3): 281-285. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660033>
91. Chobot V, Kubicova L, Bachmann G, Hadacek F. Versatile Redox Chemistry Complicates Antioxidant Capacity Assessment: Flavonoids as Milieu-Dependent Antiand Pro-Oxidants. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Dec 14]; 14(6): 11830-11841. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709758/>
92. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM* [Internet]. 2009 Mar-Apr [cited 2017 Dec 15]; 52(2): 73-75. Available from: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
93. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* [Internet]. 2003 [cited 2017 Dec 23]; 22(1): 48-57. Available from: http://www.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf
94. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* [Internet]. 2002 Aug [cited 2017 Dec 23]; 17(6): 271-278. Available from: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

95. Da Silva J, Hermann S, Heuser V, Peres W, Possa N, González-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2017 Dec 23]; 40(7): 941-7. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065216>
96. Sahu S, Gray G. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* [Internet]. 1996 Jul [cited 2017 Dec 25]; 104(2): 193-6. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665487>
97. Wha J, Yang H, Cho N, Kim B, Choong Y, Hyun S. Hepatoprotective constituents of *Firmiana simplex* stem bark against ethanol insult to primary rat hepatocytes. *Pharmacogn Mag* [Internet]. 2015 Jan-Mar [cited 2017 Dec 29]; 11(41): 55-60. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329633/>

IX. ANEXOS

9.1. Distribución de los grupos y tratamiento



9.2. Esquema de la metodología

