

**ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL****HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *VACCINIUM FLORIBUNDUM* HBK "PUSHGAY" (ERICACEAE) AGAINST OXIDATIVE STRESS INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE****EFFECTO HEPATOPROTECTOR DE *VACCINIUM FLORIBUNDUM* HBK "PUSHGAY" (ERICACEAE) FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO CON TETRACLORURO DE CARBONO**Carmen Medina R.<sup>1</sup>; Orlando Pretel<sup>2</sup>; Tito Urquiaga<sup>3</sup>; Patricia Torres<sup>4</sup> & Carmen Villanueva<sup>5</sup><sup>1,3</sup> Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca- Perú.<sup>2,4</sup> Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo- Perú.<sup>5</sup> LINDE Perú SAC, Perú.

Correo electrónico: carmenmed987@gmail.com

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 235-247.

**ABSTRACT**

The hydroalcoholic extract of the fruit of *Vaccinium floribundum* HBK "pushgay" was tested in *Rattus rattus* variety albinus to determine its hepatoprotective effect against oxidative stress induced by carbon tetrachloride. We worked with 20 rats divided into four groups: negative control, which was inoculated for seven days via orogastric tube, sterile physiological saline (SSFE); positive control, which was inoculated two days via orogastric tube, carbon tetrachloride 1 mL·Kg<sup>-1</sup> body weight and then by five consecutive days SSFE and experimental, consisting of two groups, which were inoculated, via orogastric tube, carbon tetrachloride 1 mL·Kg<sup>-1</sup> body weight for two days and then for five consecutive days, the hydroalcoholic extract of *Vaccinium floribundum* at concentrations of 300 mg·Kg<sup>-1</sup> body weight and 600 mg·Kg<sup>-1</sup> body weight each group respectively. The concentration of free radicals in liver was determined in all groups by the method of thiobarbituric acid reactive substances; also, histological sections were performed to evaluate the hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extract. The average concentrations of free radicals determined in the negative control groups, positive control, and experimental with 300 mg of the hydroalcoholic extract·Kg<sup>-1</sup> body weight and 600 mg of the hydroalcoholic extract·Kg<sup>-1</sup> body weight were, respectively: 6.149; 14.466; 11.794 and 8.786 µg of malondialdehyde.g<sup>-1</sup> of liver, showing statistically significant differences between the groups (P<0.05). It was determined that the group treated with carbon tetrachloride over the hydroalcoholic extract 600 mg·kg<sup>-1</sup> body weight, decreased significantly the amount of free radicals and favored the rapid liver regeneration.

**Keywords:** *Vaccinium floribundum*, hepatoprotective, carbon tetrachloride, oxidative stress.

## RESUMEN

El extracto hidroalcohólico del fruto de *Vaccinium floribundum* HBK “pushgay” fue ensayado en *Rattus rattus* variedad albinus para determinar su efecto hepatoprotector frente al estrés oxidativo inducido con tetracloruro de carbono. Se trabajó con 20 ratas distribuidas en cuatro grupos: control negativo, al cual se le inoculó por siete días, vía sonda orogástrica, solución salina fisiológica estéril (SSFE); control positivo, al cual se le inoculó por dos días, vía sonda orogástrica, tetracloruro de carbono  $1\text{mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal y luego SSFE por cinco días consecutivos y, experimental, conformado por dos grupos, a los cuales se les inoculó, vía sonda orogástrica, tetracloruro de carbono  $1\text{mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal por dos días y luego, por cinco días consecutivos, el extracto hidroalcohólico de *Vaccinium floribundum* a las concentraciones de  $300\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal y  $600\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal a cada grupo, respectivamente. Se determinó en todos los grupos, la concentración de radicales libres en hígado, por el método de las sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico y, asimismo, se realizaron cortes histológicos para evaluar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico. La concentración promedio de radicales libres determinada en los grupos control negativo, control positivo y experimental con  $300\text{mg}$  del extracto hidroalcohólico  $\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal y  $600\text{mg}$  del extracto hidroalcohólico  $\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal fue respectivamente: 6,149; 14,466; 11,794 y 8,786  $\mu\text{g}$  de malondialdehído  $\cdot\text{g}^{-1}$  de hígado, apreciándose diferencia estadística significativa entre los grupos ( $P < 0,05$ ). Se determinó que el grupo tratado con tetracloruro de carbono más el extracto hidroalcohólico a  $600\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal, disminuyó notablemente la cantidad de radicales libres y favoreció la rápida regeneración hepática.

**Palabras clave:** *Vaccinium floribundum*, hepatoprotector, tetracloruro de carbono, estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

El hígado es uno de los órganos más susceptibles de daño por el contacto frecuente que tiene con fármacos, drogas, alcohol, toxinas etc., esto supone una elevada incidencia de enfermedades hepáticas en todo el mundo. Se ha considerado que el cáncer hepático ocupa la séptima posición entre los de mayor incidencia y es la sexta causa de las muertes por cáncer. El tratamiento de las enfermedades hepáticas resulta costoso en varios sentidos porque involucra una serie de alteraciones sistémicas además del gasto económico asociado a la enfermedad y sus complicaciones. Conjuntamente, el uso de fármacos para el tratamiento de las enfermedades hepáticas muchas veces no resulta ser el más indicado ocasionando hepatotoxicidad inducida por fármacos, evento

que agrava aún más la condición patológica (Vargas 2012). La hepatotoxicidad, también llamada enfermedad hepática tóxica inducida por drogas implica daño sea funcional o anatómico del hígado por ingestión de compuestos químicos inorgánicos u orgánicos (Asqui 2012).

Los radicales libres juegan un papel protagónico en la hepatotoxicidad y de protección al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios es de suma importancia, y los agentes que son capaces de hacerlo son llamados hepatoprotectores (De la Morena & Martínez 1999, Andrade 2012).

El estudio de agentes de origen natural como plantas con propiedades medicinales que

disminuyan el daño hepático inducido por sustancias químicas, ha despertado un interés especial (Arnao *et al.* 2012, Jimenez *et al.* 2013).

La familia Ericaceae posee alrededor de 4500 especies a nivel mundial y cerca de 900 en América tropical. Presentan una alta diversidad de géneros y especies, entre ellas *Rhododendron* (con más de 1000 especies), *Erica* (con cerca de 860 especies) y *Vaccinium* (con cerca de 450 especies) (Lagos *et al.* 2010).

Dentro del género *Vaccinium*, es importante destacar a la especie *V. floribundum* HBK, conocida en Cajamarca como pushgay, uva de monte, uva del campo o simplemente uvitas. El pushgay es un fruto silvestre; hasta ahora se ha identificado su presencia únicamente en las provincias de Chota, Bambamarca, Cajamarca, Celendin y San Marcos del departamento de Cajamarca, Perú. Hay indicios de que podría haber grupos de plantas similares, al estado silvestre, en otras partes del Perú. Su hábitat es la franja intermedia o de transición entre las zonas agroecológicas Quechua alta y Jalca, en la sierra norte, en altitudes que van desde los 2 350 a los 3 500 msnm (Tapia & Fries 2007, Machuca 2008).

El uso de plantas medicinales se ha reportado en todo el mundo para el tratamiento de múltiples enfermedades desde épocas ancestrales, sin embargo la mayoría de ellas no cuentan con estudios científicos suficientes que sustenten su uso. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto hepatoprotector de *V. floribundum* frente al estrés oxidativo inducido por tetracloruro de carbono.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material Biológico

Cinco kg de frutos de *V. floribundum*, recolectados de la ciudad de Cajamarca. Veinte

ejemplares de *R. rattus* albinus raza Holtzman, obtenidos del bioterio de la Universidad Cayetano Heredia. Lima.

### Procedimiento

#### Obtención del extracto hidroalcohólico de *V. floribundum*

Se lavó la superficie de los frutos con agua corriente, se desengrasó con una solución de etanol al 70% y después se enjuagó con agua destilada. Los frutos se secaron completamente en estufa a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  por siete días; transcurrido este tiempo, se procedió a molerlos con la ayuda de un molino y se tamizó en tamiz de 250  $\mu\text{m}$  marca Amping Yuansheng Mesh Co.,Ltd. hasta la obtención de un polvo fino. Se procedió a la extracción de los compuestos activos mediante maceración, utilizando frascos ámbar de cierre hermético; se tomó 200g del fruto desecado molido y como solvente 800 mL de una mezcla hidroalcohólica al 70% (metanol – agua bidestilada), la mezcla se agitó por cinco minutos diarios durante 10 días. Luego de transcurrido este tiempo, se filtró al vacío, evaporándose el solvente con el uso de un rotavapor hasta la obtención de un producto pastoso que fue conservado en refrigeración hasta su utilización (Sharapin 2000, Kuklinski 2002).

### Distribución de los grupos de trabajo

Los veinte ejemplares de *R. rattus* variedad albinus raza Holtzman, fueron distribuidos en cuatro grupos de trabajo: el grupo control negativo, tratado sólo con solución salina fisiológica estéril (SSFE); el grupo control positivo, tratado con tetracloruro de carbono (TCC), y los dos grupos experimentales, tratados con tetracloruro de carbono (TCC) más el extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a dos dosis diferentes. Cada grupo fue distribuido por separado en jaulas, con la administración de agua y alimento a libre disposición, luego de una semana de adaptación de los animales, se procedió a la realización del proceso experimental (Favari *et al.* 2007).

### **Preparación y administración de las dosis de solución salina fisiológica estéril (SSFE), tetracloruro de carbono (TCC) y extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a los grupos de trabajo**

A los animales que constituyeron el grupo control negativo, se les administró, vía sonda orogástrica, una dosis de 5mL de SSFE·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal por siete días consecutivos. A los del grupo control positivo, se les administró por dos días, vía sonda orogástrica, 1mL de tetracloruro de carbono·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal y luego SSFE por cinco días consecutivos. A los animales que constituyeron los dos grupos experimentales, se les administró, vía sonda orogástrica, 1mL de tetracloruro de carbono·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dos días y luego, por cinco días consecutivos, el extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a las dosis de 300 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal y 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, respectivamente. Para la dosificación del extracto, se trabajó con una solución de 1000 mg del extracto en 10 mL de agua bidestilada (Mei *et al.* 2012, Calderón *et al.* 2013).

### **Evaluación del efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum***

Luego de concluidos los siete días de dosificación, los animales fueron sacrificados, extrayéndoseles rápidamente el hígado; uno de los lóbulos fue utilizado para la determinación de los radicales libres, el que fue manipulado en condiciones de baja temperatura para evitar cualquier proceso posterior de oxidación y daño y, el otro lóbulo fue colocado en una solución de formol al 10% y enviado para su estudio histológico.

### **Determinación de radicales libres en hígado**

Los radicales libres tienen un tiempo de vida media muy corto, por lo que no es adecuado determinarlos directamente, sino, a través de los productos de su reacción, siendo uno de ellos el malondialdehído (MDA). Para determinarlo, se utilizó el método de las

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), usándose 1,0 g de hígado que fue suspendido y homogeneizado en 5mL de solución Krebs (119mM de NaCl; 4,6mM de KCl; 15mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,5mM de CaCl<sub>2</sub>; 1,2mM de MgCl<sub>2</sub>; 12mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 11mM de glucosa). Luego en un tubo de ensayo, se colocó una alícuota de 0,1 mL del homogeneizado hepático en 1,9 mL de solución Krebs incubando el sistema a 37°C por 30 min, posteriormente para desproteinizar se adicionó 1,0 mL de ácido tricloroacético al 20%, sometién dose a ebullición en baño de agua por 15 min para luego centrifugar a 4000 rpm por 20 min. Se obtuvo el sobrenadante, al cual se le agregó 1,0 mL de ácido Tiobarbitúrico al 1%, sometién dose también a ebullición en baño de agua por 15 min, para luego centrifugar a 4000 rpm por 30 min; finalmente, debido a la reacción del ácido tiobarbitúrico con el MDA, se obtuvo un compuesto cromóforo rosado que se midió en espectrofotómetro a 535nm. Para la determinación de la concentración de MDA en los grupos de trabajo, se utilizó un factor de calibración, obtenido con soluciones patrón de MDA, posteriormente las absorbancias obtenidas en los grupos de trabajo fueron multiplicadas por este factor obtenién dose la concentración de malondialdehído en µg·g<sup>-1</sup> de hígado (Moore & Roberts 1998, Pérez *et al.* 1998, Rozowski *et al.* 2001, Hernández *et al.* 2006).

### **Cortes histológicos de hígado**

Se realizaron cortes histológicos de hígado de los cuatro grupos de trabajo: control negativo, control positivo, experimental con tetracloruro de carbono más el extracto a la dosis de 300 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal y experimental con tetracloruro de carbono más el extracto a la dosis de 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina para observar la disposición del tejido sin daño así como también procesos de degeneración, necrosis, apoptosis y/o regeneración de las células hepáticas (Mei *et al.* 2012).

**Análisis Estadístico de datos:**

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Statgraphics utilizando el programa ANOVA (análisis de varianza), que se basa en el uso de la prueba F para determinar diferencias entre las medias de los tratamientos con una probabilidad de  $P < 0,05$ .

**RESULTADOS**

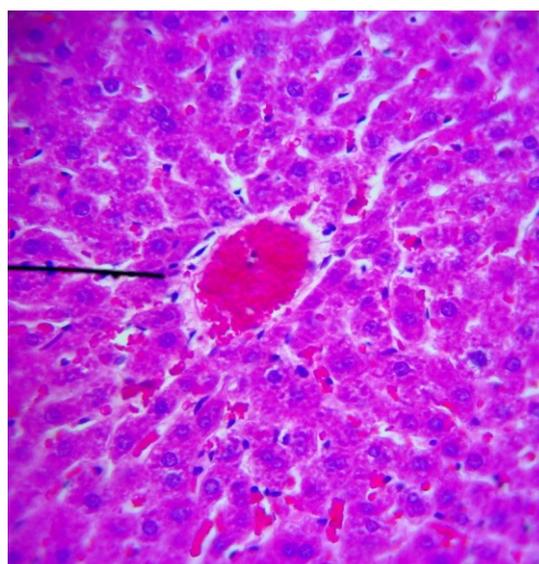
En la tabla 1, se aprecia que la concentración promedio de radicales libres producidos es

mayor en el grupo control positivo, tratado sólo con tetracloruro de carbono, alcanzando un valor de 14, 466  $\mu\text{g}$  de MDA. $\text{g}^{-1}$  hígado. Respecto a los grupos experimentales, es necesario mencionar que el grupo tratado con una dosis de 600 mg del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum*·Kg $^{-1}$  peso corporal redujo notablemente la producción de radicales libres alcanzando un valor de 8,786  $\mu\text{g}$  de MDA·g $^{-1}$  hígado.

En el examen histológico realizado a las

**Tabla 1.** Concentración promedio de radicales libres (malondialdehído en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de hígado), presentes en el grupo control negativo, tratado con solución salina fisiológica estéril, control positivo, tratado con tetracloruro de carbono y los dos grupos experimentales, tratados con tetracloruro de carbono más 300 mg del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum*·Kg $^{-1}$  de peso corporal y 600 mg del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum*·Kg $^{-1}$  de peso corporal respectivamente.

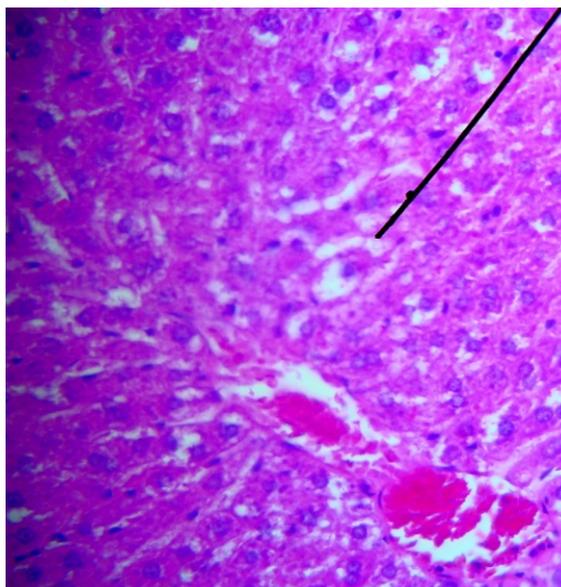
Radicales libres (malondialdehído) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de hígado			
Grupo Control		Grupo Experimental	
C. negativo	C. positivo	300 mg.kg $^{-1}$ peso	600 mg.kg $^{-1}$ peso
5,914	14,180	12,298	9,201
6,720	13,911	12,903	9,543
4,973	16,465	11,492	7,930
6,989	13,306	10,484	8,468
P < 0,05.			



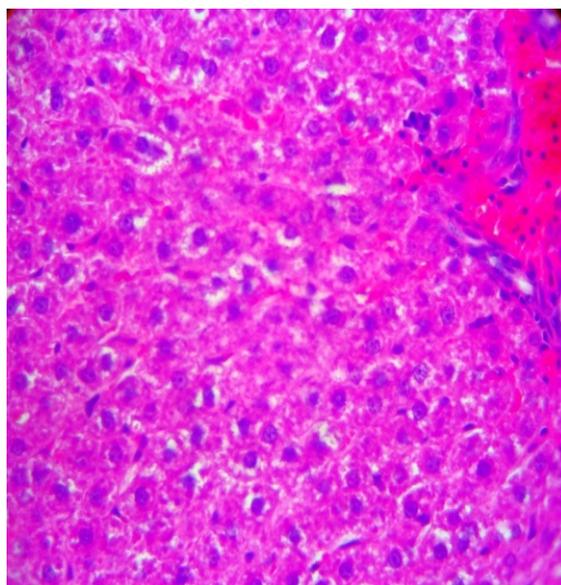
**Figura 1.** Corte histológico de hígado en ratas pertenecientes al grupo control negativo, se aprecia el tejido con aspecto semejante en toda su extensión, sin daño aparente. Tinción hematoxilina y eosina. Observación a 430A.

muestras de hígado de los cuatro grupos, se aprecia en la figura 1, células hepáticas sin daño aparente. En la Fig. 2, se observa el daño ocasionado por el tetracloruro de carbono, se visualiza la acumulación de gotas pequeñas de

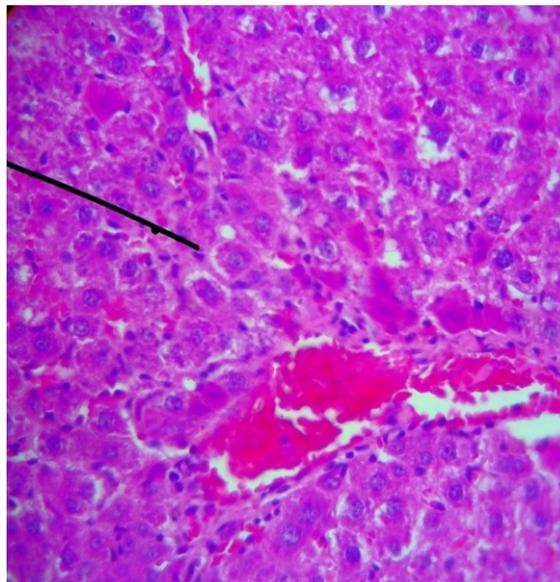
grasa dispersas en el citoplasma de las células hepáticas que aparecen como espacios redondeados de contorno regular e incoloros. Se observan procesos de apoptosis y necrosis de los hepatocitos.



**Figura 2.** Corte histológico de hígado en ratas pertenecientes al grupo control positivo, tratado con tetracloruro de carbono. Diagnóstico: esteatosis hepática microvesicular o degeneración grasa (hígado graso). Tinción hematoxilina y eosina. Observación a 430A.



**Figura 3.** Corte histológico de hígado en ratas pertenecientes al grupo experimental, tratado con tetracloruro de carbono y el extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a la dosis de 300 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal. Tinción hematoxilina y eosina. Observación a 430A.



**Figura 4.** Corte histológico de hígado en ratas pertenecientes al grupo experimental, tratado con tetracloruro de carbono y el extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a la dosis de  $600 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso corporal. Tinción hematoxilina y eosina. Observación a 430A.

En la Figura 3, se observa el proceso de reparación del tejido conjuntivo alterado y células eosinófilas de diverso tamaño, que es característica de las células en proceso de muerte. Existe regeneración hepática en hígado graso (+). Sin embargo, en la figura 4 se destaca la regeneración hepática inducida por el extracto de *V. floribundum* a la dosis de  $600 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso corporal. Se observa el proceso de reparación del tejido conjuntivo alterado y células eosinófilas de diverso tamaño, que es característica de las células en proceso de muerte. Existe regeneración hepática en hígado graso (++)

## DISCUSIÓN

La exposición a un gran número de sustancias extrañas (xenobióticos), tales como contaminantes ambientales y a drogas o fármacos, puede ocasionar un daño celular a

través de la activación metabólica de las especies reactivas de oxígeno o radicales libres de oxígeno (Orellana & Guajardo 2004). Nuestro organismo trata de evitar el daño gracias a sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación, la que se realiza en dos fases: Fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450 y fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena. El objetivo final de ambas fases es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y así facilitar su excreción del organismo a través de la orina o la bilis; sin embargo, estas funciones no siempre resultan adecuadas ya que pueden conllevar a causar daño en el organismo (Orellana & Guajardo 2004, Khan *et al.* 2012a).

Aunque la principal función del citocromo P450 (CYP), con alta actividad metabólica en

el hígado, es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo, que es excretado por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo. Especial mención merece el CYP2E1, que es una de las enzimas CYP más estudiadas tanto en animales como en humanos, debido a su papel en el metabolismo del etanol y por su participación en la activación metabólica de una serie de procarcinógenos, como N-dimetil nitrosamina y de solventes orgánicos como el tetracloruro de carbono. Además de activar procarcinógenos, el CYP2E1 es importante en patología puesto que se ha descrito como una de las enzimas que produce mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido y  $H_2O_2$ ), las que son formadas en presencia o en ausencia de sustrato y que serían los que posteriormente causarían daño tisular (Orellana & Guajardo 2004, Khan *et al.* 2012a).

El tetracloruro de carbono ha sido extensamente usado para estudiar la hepatotoxicidad en animales, convirtiéndose en un modelo experimental que simula el estrés oxidativo en muchas situaciones fisiopatológicas. El hígado es particularmente susceptible al estrés oxidativo, debido a la liberación directa de metabolitos procedentes del tetracloruro de carbono y citoquinas, las cuales propagan una respuesta inflamatoria. El tetracloruro de carbono puede ser metabolizado tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, bajo las primeras condiciones, se forman los radicales libres triclorometilo ( $CCl_3$ ) y el triclorometilperoxi ( $CCl_3O_2$ ) (mucho más tóxico) por acción de oxidasas ligadas al sistema citocromo P450 (CYP2E1) en el retículo endoplásmico (Orellana & Guajardo 2004, Ahmad *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013).

Los radicales libres triclorometilo y triclorometilperoxi ejercen su efecto hepatotóxico al iniciar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares originando más radicales libres del tipo lipoperóxido y peróxido, generándose una reacción en cadena que afecta la permeabilidad de la membrana celular, esto origina trastornos en el transporte de iones, como son ingreso masivo de agua, sodio y calcio con todas las consecuencias deletéreas para las células, que pueden llegar hasta su ruptura y muerte. Además la necrosis celular generada, se potencia por la acción de otras especies reactivas de oxígeno formadas tales como el radical superóxido ( $O_2$ ) y el hidroxilo (OH), de gran efecto oxidante. Durante este proceso también disminuye la cantidad del compuesto antioxidante glutatión, debido a su uso como primera línea de defensa en el secuestro de los radicales libres formados y, también, hay pérdida de la actividad enzimática antioxidante (De la Morena & Martínez 1999, Tillán *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2011, Hamed *et al.* 2012).

El malondialdehído (MDA), metabolito final de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, es considerado como un biomarcador tardío de la acción de los radicales libres (Orellana & Guajardo 2004). De acuerdo a lo observado en la tabla 1, la cantidad de radicales libres expresados en  $\mu g$  de MDA $\cdot g^{-1}$  de hígado, fue notoriamente mayor en el grupo tratado sólo con tetracloruro de carbono ( $P < 0,05$ ), lo que implica una elevada peroxidación lipídica con la abundante producción de radicales libres y un fallo de los mecanismos antioxidantes para prevenir la producción excesiva de estos. Sin embargo, para el caso de los grupos experimentales tratados con tetracloruro de carbono más 300 mg del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* $\cdot Kg^{-1}$  de peso corporal y 600 mg del extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* $\cdot Kg^{-1}$  de peso corporal, se observó una disminución de los radicales libres, la que

fue más notoria a la dosis de 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal.

Estos resultados indican que el fruto de *V. floribundum*, tiene capacidad hepatoprotectora contra el daño inducido por los radicales libres generados en la biotransformación del tetracloruro de carbono, lo que se debe principalmente a su contenido en compuestos antioxidantes, entre los que destacan los compuestos polifenólicos antocianidinas (flavonoides que proporcionan el color negro a los frutos) que tienen una especial habilidad antioxidante ya que actúan como secuestradores de radicales libres y/o quelantes de metales, así como inhibidores de los enzimas oxidantes. Lo benéfico de estos compuestos es que en estudios clínicos, no han reportado efectos adversos y tóxicos (Abreu *et al.* 2008, Souvik *et al.* 2011, Coba *et al.* 2012, Jara *et al.* 2012). Podría indicarse también, tal como se evidencia en trabajos realizados con otros compuestos naturales antioxidantes, incluidos los flavonoides, que el extracto de *V. floribundum*, podría aumentar la actividad de los enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), además de aumentar la cantidad de glutatión reducido (GSH) (Ahmad *et al.* 2011, Soo-Kyong *et al.* 2012).

Existen tres mecanismos de acción bajo los cuales actúan los antioxidantes, y de acuerdo a estos mecanismos se los ha clasificado en: antioxidantes primarios o preventivos, antioxidantes secundarios o secuestradores y antioxidantes terciarios o reparadores. Los antioxidantes primarios previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas más estables antes de que puedan reaccionar y generar un mayor número de éstos, también evitan las reacciones de oxidación al quelar metales tales como el hierro que participa directamente en la formación del radical libre hidroxilo (OH) mediante la reacción de Fenton. Los

antioxidantes secundarios capturan los radicales libres evitando que se produzcan reacciones en cadena, oxidándose a sí mismos en presencia de éstos. Los antioxidantes terciarios son generalmente enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de radicales libres (Roldán 2012).

Al examen histológico, en la figura 1, se puede apreciar que en el grupo tratado sólo con SSFE, el tejido hepático, en toda su extensión, presenta un aspecto semejante, sin daño aparente, con una disposición homogénea de los hepatocitos a diferencia del grupo tratado con tetracloruro de carbono (figura 2), en donde se observa la acumulación de pequeñas gotas de grasa dispersas en el citoplasma de las células hepáticas, las que aparecen como espacios redondeados de contorno regular e incoloros, es posible también observar crecimiento celular con compresión de la microvasculatura de la red capilar de los sinusoides hepáticos debido a la degeneración hídrica o vacuolar; se observan además procesos de apoptosis y necrosis de los hepatocitos, obteniéndose como diagnóstico esteatosis hepática microvesicular (degeneración grasa, infiltración grasa o metamorfosis grasa). Estos resultados concuerdan con los típicos efectos causados por el tetracloruro de carbono, el cual, en hígado, altera la capacidad de los hepatocitos para ligar los triglicéridos a las lipoproteínas transportadoras, originando acumulación intracelular de lípidos y degeneración grasa (hígado graso), además de la formación de metabolitos extremadamente tóxicos (radicales libres), que originan muerte celular y necrosis hepática centro lobulillar, mediado por el sistema enzimático microsomal citocromo P450 mencionado anteriormente (Asqui 2012, Fuentes *et al.* 2012, Khan *et al.* 2012b).

La degeneración celular consiste en una lesión reversible, subletal o submortal con las

siguientes alteraciones estructurales y bioquímicas, que una vez cesado el estímulo ocasionado por el tetracloruro de carbono y bajo condiciones adecuadas, puede la célula volver a la normalidad, sin embargo, cuando se genera lesión a nivel de los lisosomas, la degeneración evoluciona a necrosis tal como puede observarse en la figura 2. El tetracloruro de carbono es una sustancia lipoquímica, que tiene afinidad por las grasas, las hidroliza, se libera y forma el tricloruro de mercurio produciéndose una permeabilidad de la membrana con signo radical, por lo que la célula capta abundante agua y se hincha, produciéndose inicialmente una degeneración del tipo tumefacción celular, seguida a ésta, se produce una degeneración vacuolar o hidrópica, en la que la célula empieza a tener en su citoplasma vacuolas, espacios o huecos por aumento de agua, esas vacuolas son organitos membranosos intracitoplasmáticos que se han dilatado por el agua, finalmente, se produce una degeneración grasa, llamada también infiltración grasa, metamorfosis grasa o esteatosis grasa, debido a la alteración del metabolismo de los lípidos en la célula lesionada (Asqui 2012).

A diferencia de lo observado en la figura 2, en las figuras 3 y 4, correspondientes a los cortes histológicos de hígado de las ratas tratadas con tetracloruro de carbono y el extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* a las dosis de 300 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal y 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, respectivamente, se aprecia buena actividad regenerante del daño ocasionado por el tetracloruro de carbono, siendo más acentuada en el grupo tratado con la dosis de 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, lo que concuerda con la más baja cantidad de radicales libres determinados en este grupo y que, por lo tanto, permite considerar a estos últimos como los principales responsables del daño ocasionado en el hígado. El efecto hepatoprotector del extracto se debe principalmente a las antocianinas presentes, las que, por su acción antioxidante, influyen

directamente sobre los radicales libres derivados del tetracloruro de carbono favoreciendo la regeneración hepática. Es necesario también considerar como otro factor de daño a la reacción inflamatoria desencadenada por el tetracloruro de carbono y que es inhibida por las antocianinas presentes en el extracto hidroalcohólico de *V. floribundum* (Arroyo *et al.* 2012, Osorio 2012).

La limitación que se tuvo al realizar esta investigación fue la obtención del fruto de *V. floribundum* y su transporte desde Cajamarca, así como la adquisición de *R. rattus* por el tiempo empleado y cuidados en su transporte desde Lima.

El extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* HBK presentó efecto hepatoprotector a las dosis de 300 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal y 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal. El extracto hidroalcohólico del fruto de *V. floribundum* HBK a la dosis de 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, presentó el mejor efecto hepatoprotector frente al estrés oxidativo inducido con tetracloruro de carbono.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, O.; Cuellar, A. & Prieto, S. 2008. Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 13: Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000300003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000300003&lng=es&nrm=iso)>.
- Ahmad, S.; Haq, E.; Hamid, A.; Qurishi, Y.; Mahmood, Z.; Ahmad, B.; Masood, A. & Zargar, M.A. 2011. Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. *Complementary and*

- Alternative Medicine*, 11:17  
doi:10.1186/1472-6882-11-17.
- Andrade, J. 2012. *Estudio de la capacidad antioxidante total y contenido de compuestos antioxidantes en mortiño (Vaccinium floribundum) tratado con luz UV-c.* [tesis]. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Carrera de Ingeniería de los alimentos.
- Arnao, A.; Suárez, S.; Trabucco, J.; Cisneros, R. & Elena, M. 2012. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. *Anales de la Facultad de medicina*, 73: 239-244.
- Arroyo, J.; Almora, Y.; Quino, M.; Ruez, E.; Martínez, J.; Buendía, J. Baca, D. & Hañari, R. 2012. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. *Anales de la Facultad de medicina*, 73: 85-91.
- Asqui, M. 2012. *Actividad hepatoprotectora del extracto de diente de león (Taraxacum officinale) en ratas (Rattus norvegicus) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono.* [tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia.
- Calderón, A.; Torres, P. & Pretel, O. 2013. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) sobre radicales libres inducidos en cerebro de rata. *The Biologist (Lima)*, 11: 267-275.
- Coba, P.; Coronel, D.; Verdugo, K.; Paredes, M.; Yugsi, E. & Huachi, L. 2012. Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida*, 16: 5-13.
- De la Morena, G. & Martínez, J. 1999. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1: 36-39.
- Wang, D.H.; Wang, Y.N.; Ge, J.Y.; Liu, H.Y.; Zhang, H.J.; Qi, Y., Liu, Z.H. & Cui, X.L. 2013. Role of activin A in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. *World Journal of Gastroenterology*, 19: 3802-3809.
- Favari, L.; Nava, R. & Meléndez, E. 2007. Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38: 19-25.
- Fuertes, J.; Martí, G. & Sanz, P. 2012. *Hepatopatías tóxicas laborales.* Barcelona. Facultad de Medicina. Escuela Profesional de Medicina del Trabajo.
- Hamed, M.; Ali, S. & Saba, N. 2012. Therapeutic potential of Ginger against renal injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Scientific World Journal*. 840421. doi: 10.1100/2012/840421.
- Hernández, C.; Abreu, J.; Abreu, P.; Colino, R. & Jiménez, A. 2006. Efectos del tratamiento con CPAP nasal en el estrés oxidativo en pacientes con síndrome de apnea del sueño. *Archivos de Bronconeumología*, 42: 125-129.
- Jara, A.; Quiroz, T. & Cazar, M. 2012. *Caracterización nutricional y actividad antioxidante de Macleania rupestris (Joyapa) y Vaccinium floribundum Kunth (Mortiño).* [tesis]. Cuenca: Universidad del Azuay.
- Jimenez, M.; Maceira, M., Martinez, S., Pérez, J. & Montero, T. 2013. Efecto de Noni C sobre el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18: 92-99.
- Khan, R.; Khan, M. & Sahreen, S. 2012a. CCl<sub>4</sub>-

- induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *Complementary and Alternative Medicine*, 12: 178. doi:10.1186/1472-6882-12-178.
- Khan, R.; Khan, M.; Sahreen, S. & Ali, N. 2012. Hepatoprotective activity of *Sonchus asper* against carbon tetrachloride-induced injuries in male rats: a randomized controlled trial. *Complementary and Alternative Medicine*, 12:90. doi:10.1186/1472-6882-12-90.
- Kuklinski, C. 2002. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega S.A.
- Lagos, T.; Ordoñez, H.; Criollo, H.; Burbano, S. & Martínez, Y. 2010. Descripción de frutales nativos de la familia Ericaceae en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4: 9-18.
- Machuca, M. 2008. *Biodiversidad, soberanía alimentaria y desarrollo de mercados alternativos*. Programa Bioandes. Perú.
- Mei, C.; Hsien, C. & Han, L. 2012. Protection of the extracts of *Lentinus edodes* mycelia against Carbon-Tetrachloride-Induced hepatic injury in rats. *Scientific World Journal*. 1586. doi: 10.1100/2012/231586.
- Moore, K. & Roberts, J. 1998. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 8: 659-71.
- Orellana, M. & Guajardo, V. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132: 85-94.
- Osorio, D. 2012. *Efecto hepatoprotector del extracto de las hojas de alcachofa (Cynara scolymus) en ratas (Rattus norvegicus) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono*. [tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Pérez, J.; Sánchez, N. & Bu, M. 1998. Actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de un extracto natural de origen vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3: 19-22.
- Roldán, S. 2012. *Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortiño (Vaccinium floribundum kunth) de la comunidad de quinticusig del cantón sigchos de la provincia de cotopaxi*. [tesis]. Quito: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria.
- Rozowski, J.; Cuevas, A.; Castillo, O.; Marín, P.; Strobel, P.; Pérez, D. et al. 2001. Diferencias en antioxidantes plasmáticos según nivel socioeconómico en mujeres chilenas. *Revista médica de Chile*, 129: 43-50.
- Sharapin, N. 2000. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X Química Fina Farmacéutica. Colombia: Pinzón R, Ed.
- Soo-Kyong, C.; Xian-Hua, Z. & Jung-Sook, S. 2012. Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. *Nutrition Research and Practice*, 6: 3-8.
- Souvik, R.; Santanu, S.; Subhabrota, M.; Balaram, G. & Biswajit, S. 2011. Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 703676. doi: 10.1155/2011/703676.
- Tapia, M. & Fries, A. 2007. *Guía de campo de los cultivos andinos*. FAO y ANPE, ed. Lima: Milenium Digital.
- Tillán, J.; Bueno, V., Carrillo, C., Agüero, S. & Valdés, O. 2009. Actividad hepatoprotectora del extracto acuoso seco de *Boerhavia erecta* L. (tostón) en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14: 29-36.

Vargas, N. 2012. *Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de Geranium shiedeanum [tesis]. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias de la Salud.*

---

Received August 11, 2015.  
Accepted September 17, 2015.