

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

PROGRAMA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



**“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”**

TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER EN
MEDICINA HUMANA:

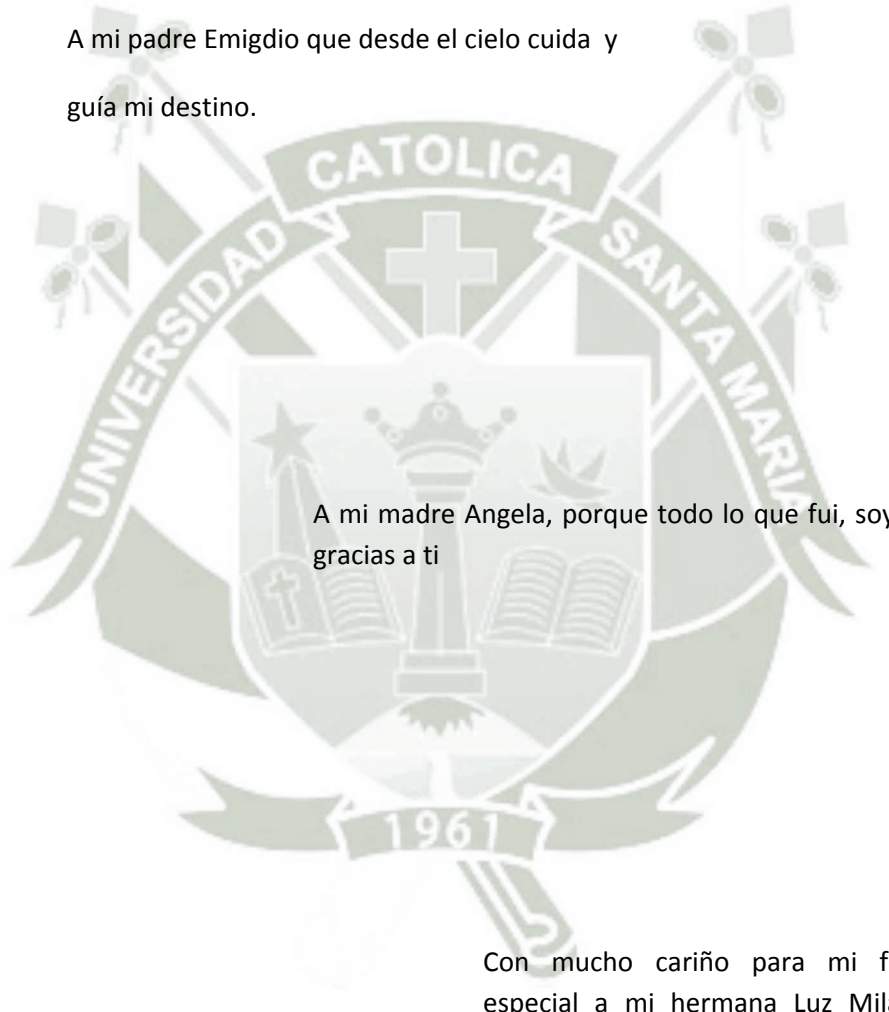
ALDO PALLY SACACA

Para optar el título profesional de
Médico Cirujano

**AREQUIPA – PERU
2013**

A Dios, la Virgen y Divino Niño por iluminar mi camino y permitirme cumplir con la misión que fui deparado en este mundo.

A mi padre Emigdio que desde el cielo cuida y guía mi destino.



A mi madre Angela, porque todo lo que fui, soy y seré es gracias a ti

Con mucho cariño para mi familia en especial a mi hermana Luz Mila por sus consejos y apoyo contante durante mi carrera.

Cada día en lo que haces y en lo que eres se deben expresar tus logros

APA



INDICE GENERAL

Portada	1
Dedicatorias.....	2
Epígrafe.....	3
Índice general.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Capítulo I	
Material y Métodos.....	8
Capítulo II Resultados.....	12
Capítulo III	
Discusión y Comentarios.....	31
Capítulo IV	
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	44
Bibliografía.....	45
Anexos.....	48

RESUMEN

Introducción: El paracetamol es un medicamento muy utilizado en la práctica clínica como antipirético y analgésico, pero que puede producir efectos adversos dentro de los cuales se destaca su hepatotoxicidad a dosis elevadas o por el uso prolongado de este produce necrosis centrolobulillar hepática.; en la actualidad se está proponiendo algunos usos para el Etilendiamino Tetraacetato (EDTA) tales como para quelar metales como el plomo en intoxicaciones, también en el tratamiento de hipercalcemia, etc. Etilendiamino Tetraacetato (EDTA) tendría la propiedad indirecta de actuar como antioxidante para evitar la formación de radicales libres, por lo que en el presente estudio se busco demostrar si Etilendiamino Tetraacetato (EDTA) podría tener un efecto preventivo o regenerativo en una hepatopatía producida por paracetamol.

Metodología: se trabajo con una muestra de 38 ratas formando 6 grupos de 5 ratas, un grupo blanco, un grupo control, dos grupos preventivos a dosis de 1.0 mg/100g otro de 2.0 mg/100g respectivamente, dos grupos regenerativos a dosis de 1.0 mg/100g otro a 2.0mg/100g respectivamente. Se les produjo injuria hepática con paracetamol a dosis de 200mg/100g para evaluación diaria de TGO, TGP.GGT, para finalmente el quinto día sacrificar los animales y obtener muestras para los cortes histopatológicos.

Resultados: El efecto hepatoprotector del Etilendiamino Tetraacetato (EDTA). fue observado a través de la determinación sérica de las transaminasas TGO, TGP, GGT y cortes histopatologicos, donde de puedo observar que EDTA a la dosis de 2,0g/100g de peso ejerce un efecto hepatoprotector preventivo efectivo a nivel hepático en ratas con intoxicación inducida por paracetamol mas no efecto recuperativo, ni regenerativo a nivel histológico.

Palabras Claves: hepatotoxicidad, paracetamol, Etilendiamino Tetraacetato (EDTA), preventivo, regenerativo

ABSTRACT

Introduction: Paracetamol is a drug widely used in clinical practice as an antipyretic and analgesic, but they can cause side effects among which stands high doses hepatotoxicity or prolonged use of this, cause centrilobular hepatic necrosis, currently being proposed for some uses for EDTA as to chelate metals such as lead poisoning also in the treatment of hypercalcemia. EDTA would act as an indirect antioxidant to prevent the formation of free radicals, so in the present study we treat to demonstrate if EDTA could be used as preventive or regenerative in liver disease caused by acetaminophen.

Methodology: we worked with 38 rats, forming 6 groups of 5 rats, with a white group, a control group, and two preventive groups, one at dose of 1.0 mg /100g and the other one at dose of 2.0 mg/100g mg. They were damaged with acetaminophen at dose of 200mg/100g for daily evaluation of TGO, TGP,GGT. finally, the fifth day we sacrificed the animals to obtain histopathological sections.

results: The hepatoprotective effect of EDTA was observed through transaminases determination in serum, like TGO, TGP, GGT, histopathological cuts, where we could observe that EDTA at dose of 2.0 g/100g, EDTA has hepatoprotective effect in liver but not regenerative effect.

Keywords: hepatotoxicity, paracetamol, EDTA, preventive, regenerative.

INTRODUCCION

Dado que el hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de nutrientes, fármacos y otros xenobióticos potencialmente tóxicos que deben atravesarlo antes de alcanzar el torrente sanguíneo y otros tejidos, lo hace particularmente susceptible a los fenómenos de toxicidad química. Se conocen más de mil compuestos que inducen toxicidad hepática; de éstos, los medicamentos son responsables del 40 al 50% de los casos de lesión hepática, y del 25 al 30% de los casos de hepatitis fulminante. (26)

La hepatotoxicidad representa un problema sanitario de primer orden en aumento en las últimas décadas, dado que es una de las principales causas de muerte secundaria a medicamentos y supone la principal causa de retiro de productos farmacológicos del mercado farmacéutico en Europa y en Estados Unidos. (27)

Casi todo el mundo piensa que el paracetamol es seguro, pero lo cierto es que puede provocar graves daños al hígado e incluso insuficiencia hepática aguda si se toma en dosis lo bastante altas. De hecho, en los Estados Unidos constituye una de las principales causas de insuficiencia hepática, siendo responsable de más de 56.000 casos de visitas a urgencias, 2.600 hospitalizaciones y 450 muertes al año. (28)

Existen investigaciones en ratas y ratones que indican que el paracetamol tiene la propiedad de inducir lipoperoxidación y daño irreversible en el hepatocito, probablemente causadas por radicales libres.

Por ello al determinar las transaminasas que son indicadores de la función hepática, sobretudo del nivel de necrosis de los hepatocitos. El nivel normal para TGP de un rata sana es de 60 U/l (29). En este estudio, así como en otros, los niveles de transaminasas se elevan ante la presencia de un hepatotóxico como el paracetamol. Estudios similares de intoxicación hepática demuestran que se elevan los niveles de transaminasas cuando existe lesión en hepatocitos. Al estudiar estos niveles de TGP de las ratas se busco mostrar los niveles altos de transaminasa lo que evidencia daño celular en el hígado inducida por paracetamol y utilizando como modelo experimental en la inducción de daño hepático en roedores y su hepatotoxicidad depende fundamentalmente de la generación de radicales libres, los cuales pueden iniciar un proceso de peroxidación lipídica y administrando el EDTA se busco demostrar su acción como agente

antioxidante indirecto que pueda inhibir estos eventos, por lo que resulta de interés la búsqueda de tratamientos que ayuden a prevenir tales efectos hepatotóxicos.





CAPITULO I

MATERIAL Y METODOS

1. POBLACIÓN Y MUESTRA

Se utilizaron un total de 38 ratas machos *Rattusnorvegicus* de tres meses de edad, y 240 ± 10 gramos de peso corporal como promedio.

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- *Rattusnorvegicus* de tres meses de edad, y 240 ± 10 gramos de peso corporal como promedio.
- Ratas sin ningún signo evidente de enfermedad y con alimentación adecuada.
- Evaluación histopatológico a nivel hepático de una unidad al azar en cada grupo para descartar patología hepática previa.

3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- *Rattusnorvegicus* que no cumplan los criterios de inclusión

4. OBJETIVOS

Objetivo general

1. Determinar el efecto protector del EDTA en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.

Objetivos específicos

- 1) Comparar los niveles de transaminasas antes y después de haber suministrado el EDTA e inducido el daño hepático con paracetamol.
- 2) Comparar los niveles de transaminasas antes y después de inducir el daño hepático con paracetamol y suministrar el EDTA.
- 3) Evaluar el grado de daño histopatológico del hígado en los grupos experimentales.

5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

a. Tipo de estudio

El estudio es de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

b. Estandarización de las condiciones ambientales

Durante los 7 días previos al inicio de la fase experimental, se estandarizaron las condiciones alimentarias, la cual consistieron en 30g de pelex del concentrado para mantenimiento TOMASINO® cada 24 horas, permitiendo a los animales que se alimenten y beban agua *ad libitum*. Manteniéndose a los animales en jaulas, se sometieron a periodos de luz y oscuridad de 12 horas, una temperatura ambiente de 18°C y humedad relativa entre 30 y 60 %.

c. Técnica para determinar el efecto protector y regenerativo del EDTA.

GRUPO BLANCO: Constituido por 5 ratas, que recibieron suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del EDTA después de 30 minutos se administró nuevamente suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del paracetamol. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días

GRUPO CONTROL: Constituido por 7 ratas, que recibieron suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del EDTA después de 30 minutos se les administró paracetamol a dosis de 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

El primer día de administrado el tratamiento, se sacrificó dos unidades experimentales, con la finalidad de asegurar y evaluar el daño hepático por paracetamol a nivel hematológico e histológico para ver si era necesario el reajuste en la dosis de paracetamol.

GRUPO EXPERIMENTAL PREVENTIVO 1: Constituido por 5 ratas, a las cuales se les administró EDTA a dosis de 1.0mg/100g por vía intraperitoneal y después de 30 minutos se provocó la injuria, con la dosis tóxica de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL PREVENTIVO 2: Constituido por 5 ratas, a las cuales se les administrará EDTA a dosis de 2.0 mg/100g por vía intraperitoneal

y después de 30 minutos se provocó la injuria, con la dosis tóxica de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL RECUPERATIVO 1: Constituido por 5 ratas, que recibieron dosis tóxicas de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal, después de 30 minutos se administrará EDTA a dosis de 1.0g/100g por vía intraperitoneal. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL RECUPERATIVO 2: Constituido por 5 ratas, que recibieron dosis tóxicas de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal, después de 30 minutos se administró EDTA a dosis de 2.0 mg/100g por vía intraperitoneal. Se repitió este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

Al final del estudio se sacrificaron los animales previas extracciones de sangre, para evaluar niveles de transaminasas finales y se les extrajo el hígado para el estudio histopatológico.

Antes de iniciar tratamiento alguno se sacrificó al azar una unidad de cada grupo para evaluar y descartar a nivel histopatológico de que no presenten patología hepática previa antes de iniciado el experimento ya que con la evaluación de las transaminasas no se puede descartar algunas patologías previas.



“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 1:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA
OXALACÉTICA (TGO) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	64 ± 5,5	64 ± 11	62 ± 6,4	61 ± 9,5	63 ± 8,2	60 ± 5,1
Control	62 ± 7	98 ± 17	123 ± 11	168 ± 13	233 ± 21	256 ± 18
Preventivo 1,0mg/100g	59 ± 3,1	57 ± 3,7	84 ± 4,1	107 ± 13	188 ± 12	197 ± 19
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05
Preventivo 2,0mg/100g	63 ± 9,6	64 ± 6,1	78 ± 8,7	74 ± 7,5	72 ± 8,0	61 ± 3,3
Significancia	n.s.	n.s.	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,01
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

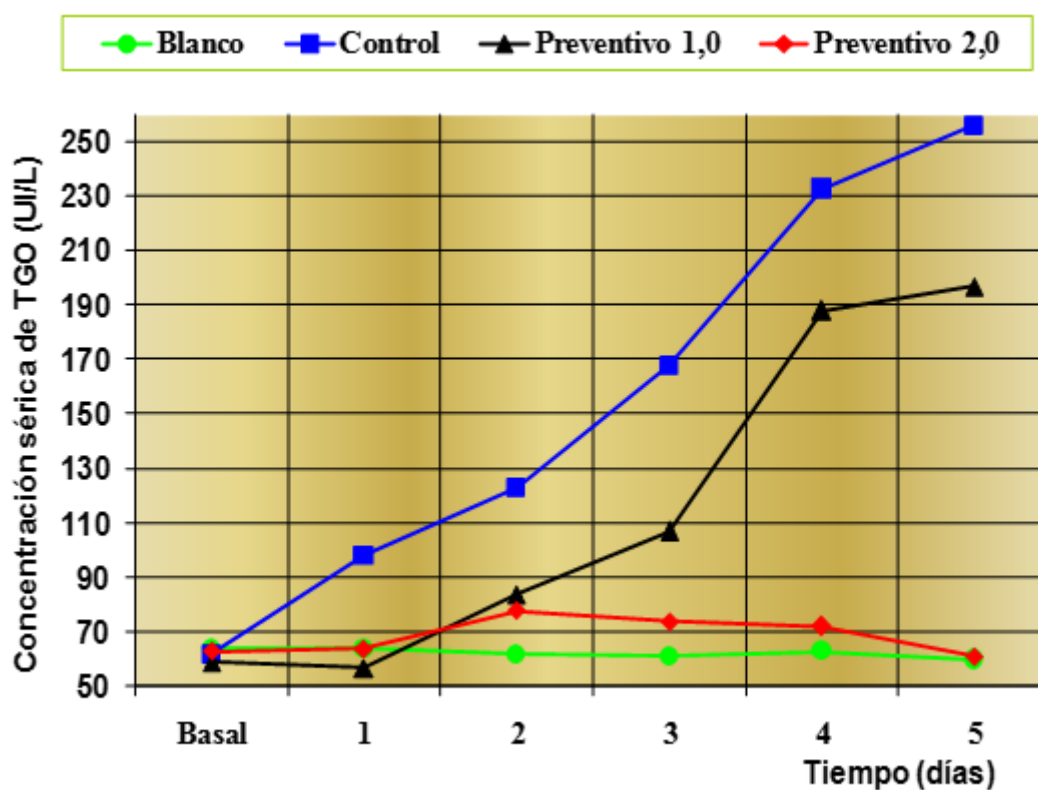
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Transaminasa Glutámica Oxalacética (TGO) o Aspartatoaminotransferasa (AST), en ratas que 30 minutos antes se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto preventivo, donde se observa un grupo blanco con TGO que se mantiene sin cambios, grupo control con aumento significativo en el tiempo, grupo preventivo de 1,0mg/100g donde es solo significativo el quinto día con una P de <0,05, finalmente, un grupo preventivo de 2,0mg/100g el cual es estadísticamente significativo a partir de segundo día con una P de <0,05 y el quinto día con una P de <0,01 el cual es muy significativo.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 1

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA
OXALACÉTICA (TGO) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 2:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA PIRUVICA (TGP) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	32 ± 4,2	29 ± 4,2	28 ± 2,9	31 ± 4,3	32 ± 5,6	33 ± 2,4
Control	33 ± 5,1	85 ± 13	127 ± 11,2	195 ± 23,1	258 ± 31,7	296 ± 32
Preventivo 1,0mg/100g	32 ± 3,3	93 ± 22	115 ± 31	122 ± 38	123 ± 23,1	183 ± 2,3
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P=0,05	P<0,01
Preventivo 2,0mg/100g	34 ± 4,1	44 ± 8,2	42 ± 12	39 ± 13	38 ± 7	39 ± 11
Significancia	n.s.	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,01
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

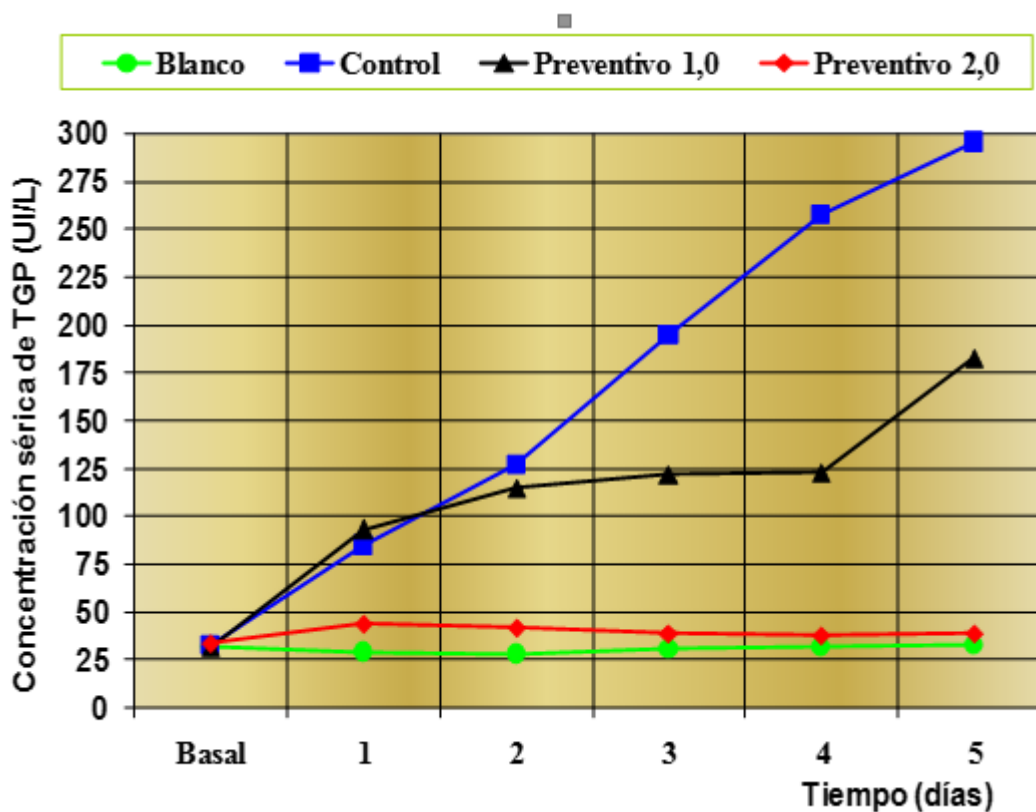
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Transaminasa Glutámica Pirúvica (TGP) o Alanin-aminotransferasa (ALT), en ratas que 30 minutos antes se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto preventivo, donde se observa mismos grupos blanco y control, grupo preventivo de 1,0mg/100g con una significancia en el quinto día con una P de <0,01 y grupo preventivo de 2,0mg/100g el cual es estadísticamente significativo desde el primer día con una P de <0,05 al quinto día con P<0,01.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 2:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA PIRUVICA (TGP) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 3:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA GAMMA GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA (GGT) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	16 ± 1,8	15 ± 3	16 ± 5	17 ± 4	17 ± 6	16 ± 2,9
Control	17 ± 3,2	29 ± 8	42 ± 7	65 ± 8	97 ± 7	132 ± 6
Preventivo 1,0mg/100g	15 ± 1,9	17 ± 2	19 ± 2	24 ± 4	28 ± 3	27 ± 4
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05	P<0,05	P<0,01
Preventivo 2,0mg/100g	17 ± 2	18 ± 3	17 ± 2	18 ± 3	21 ± 3	20 ± 2
Significancia	n.s.	n.s.	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,01
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

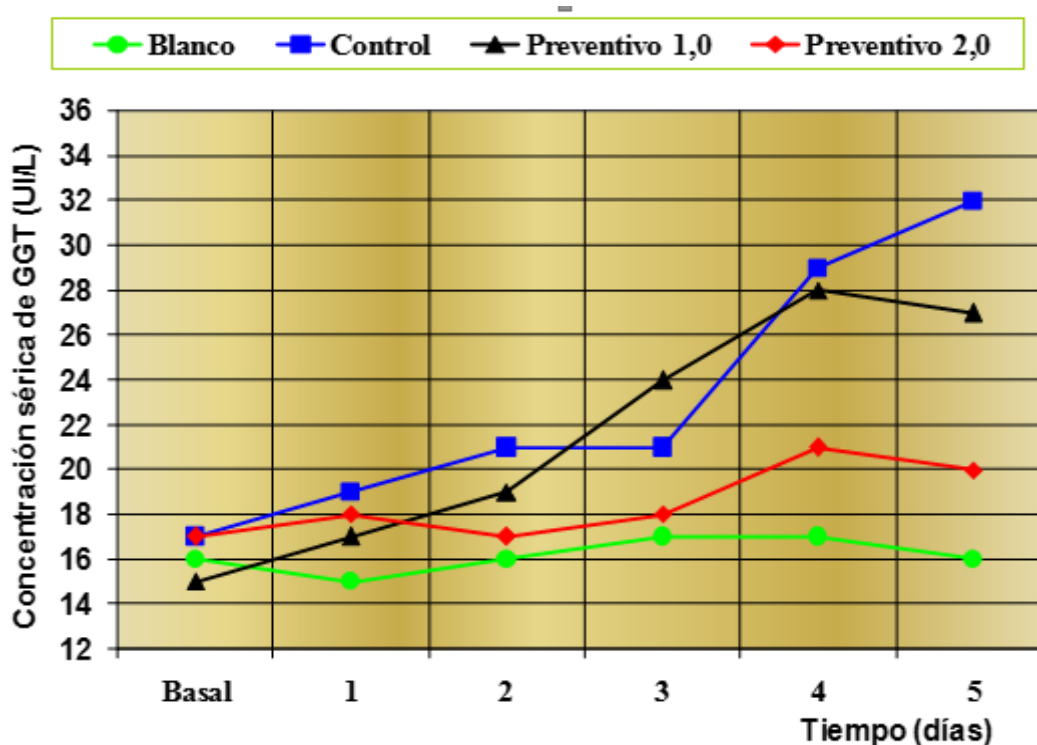
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Gamma Glutamyl-transpeptidasa (GGT) sérica, en ratas que 30 minutos antes se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto preventivo, donde se observa un grupo preventivo de 1,0mg/100g el cual presenta significancia en el tiempo a esta dosis el quinto día con $P<0,01$, en contraste con el grupo preventivo de 2,0mg/100g donde se observa desde el segundo día con $P<0,05$ y el quinto día presenta significancia con una $P<0,01$

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 3:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA GAMMA GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA (GGT) PARA EVALUAR EL EFECTO PREVENTIVO DEL EDTA.



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 4:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA
OXALACÉTICA (TGO) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	64 ± 5,5	64 ± 11	62 ± 6,4	61 ± 9,5	63 ± 8,2	60 ± 5,1
Control	62 ± 7	98 ± 17	123 ± 11	168 ± 13	233 ± 21	256 ± 18
Recuperativo 1,0mg/100g	57 ± 3,1	78 ± 5,7	108 ± 9,1	157 ± 12	199 ± 25	241 ± 16
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Recuperativo 2,0mg/100g	68 ± 4,6	84 ± 5,5	98 ± 7,7	124 ± 9,3	178 ± 11	226 ± 13
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

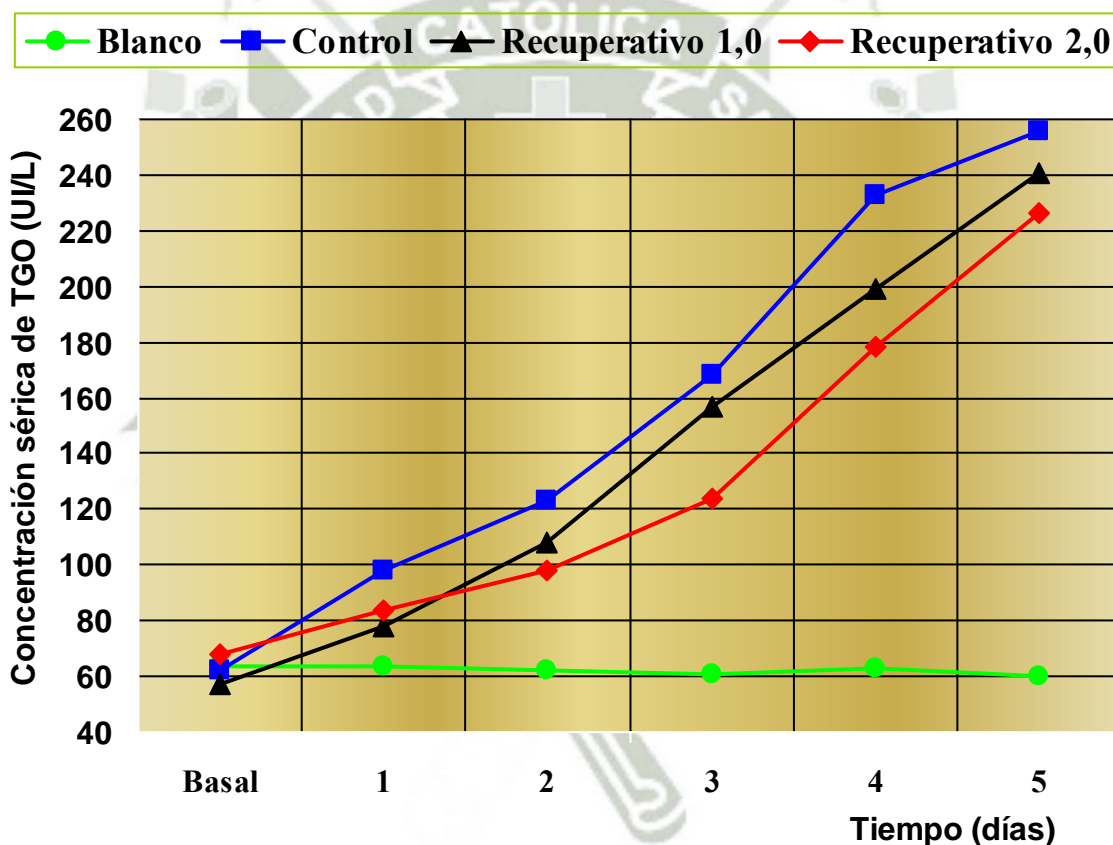
Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Transaminasa Glutámica Oxalacética (TGO) o Aspartatoaminotransferasa (AST), en ratas que después de 30 minutos de su administración se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto recuperativo, donde se observa ausencia de significancia en el tiempo en ambas dosis recuperativos.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 4

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA
OXALACÉTICA (TGO) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.

CUADRO 4



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 5:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA PIRUVICA (TGP) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	32 ± 4,2	29 ± 4,2	28 ± 2,9	31 ± 4,3	32 ± 5,6	33 ± 2,4
Control	33 ± 5,1	85 ± 13	127 ± 11,2	195 ± 23,1	258 ± 31,7	296 ± 32
Recuperativo 1,0mg/100g	34 ± 2,1	83 ± 9	125 ± 13	182 ± 23	223 ± 28	271 ± 26,3
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Recuperativo 2,0mg/100g	38 ± 4,7	73 ± 8	92 ± 18	109 ± 28	186 ± 17	220 ± 14
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

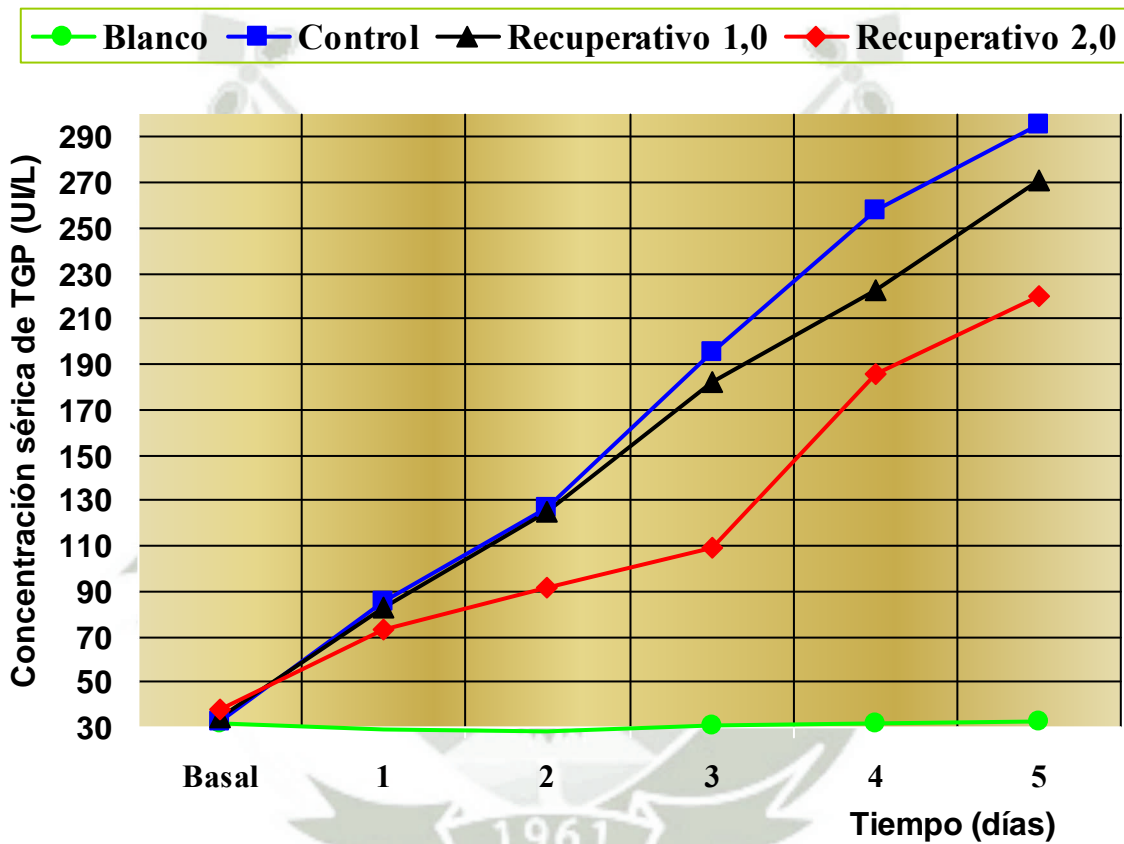
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Transaminasa Glutámica Pirúvica (TGP) o Alaninaminotransferasa (ALT), en ratas que 30 minutos antes se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto recuperativo, donde se observa que no es significativo en ambas dosis, salvo el quinto día con una p de <0,05.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 5:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICA PIRUVICA
(TGP) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 6:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA GAMMA GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA (GGT) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.

GRUPOS	TIEMPO EN DÍAS					
	Basal	1	2	3	4	5
Blanco	16 ± 1,8	15 ± 3	16 ± 5	17 ± 4	17 ± 6	16 ± 2,9
Control	17 ± 3,2	19 ± 8	21 ± 7	21 ± 8	29 ± 7	32 ± 6
Recuperativo 1,0mg/100g	18 ± 1,4	17 ± 3	22 ± 3	22 ± 5	24 ± 7	29 ± 6
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Recuperativo 2,0mg/100g	15 ± 4	17 ± 3,3	20 ± 2	19 ± 3,2	20 ± 4,6	22 ± 3
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05
N	5	5	5	5	5	5

Fuente: Elaboración propia.

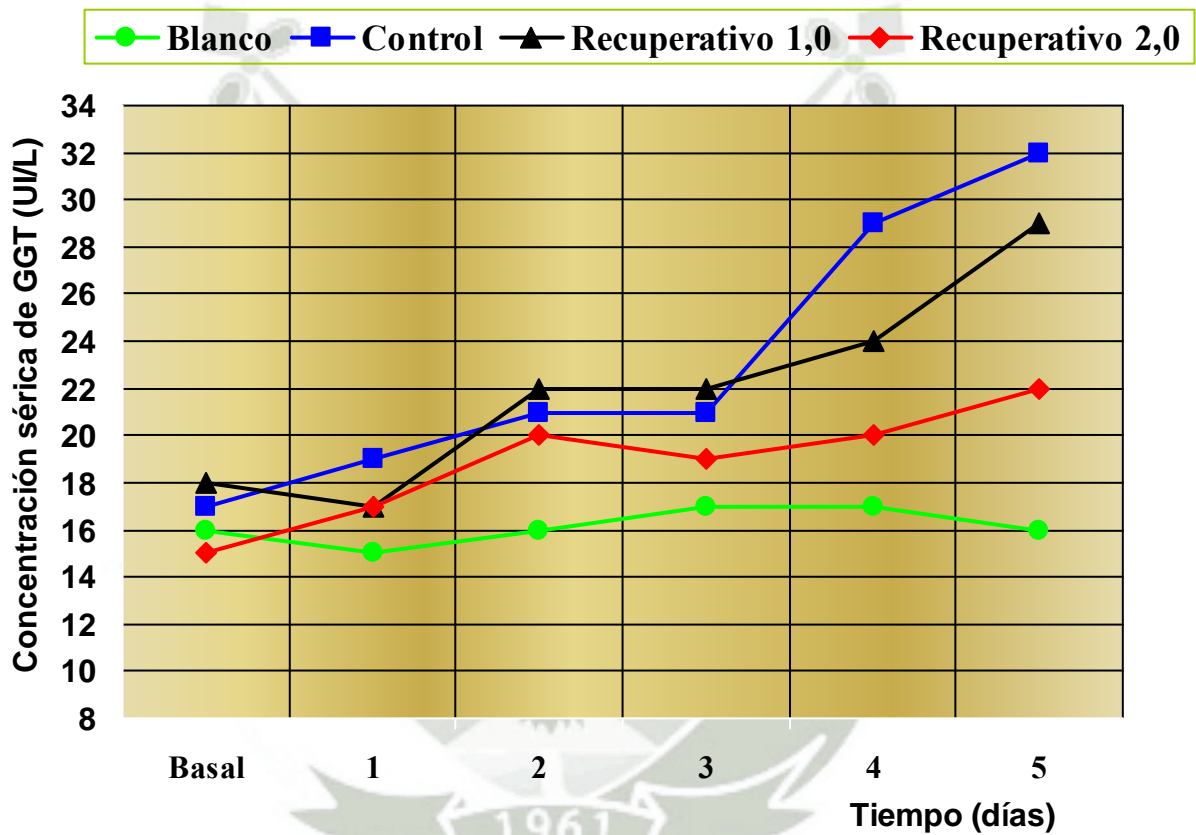
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero ± Desviación Estándar.
- Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparación dos grupos (control versus cada dosis de EDTA).
- n.s.: no significativo.

Evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol sobre la actividad sérica de la Gamma Glutamil-transpeptidasa (GGT) sérica, en ratas que 30 minutos antes se les inyectó EDTA en dos dosis crecientes para observar su efecto regenerativo, nuevamente se observa significancia solo el quinto día a dosis de 2,0mg/100g con una p de <0,05.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

CUADRO Nº 6:

EVOLUCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE LA GAMMA GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA (GGT) PARA EVALUAR EL EFECTO RECUPERATIVO DEL EDTA.



Fuente: Elaboración propia.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

TABLA Nº 7:

COMPARACIÓN EN % DEL EFECTO PREVENTIVO VERSUS RECUPERATIVO DE LAS
TRANSAMINASAS.

Grupo de Estudio	TRANSAMINASA		
	TGO %	TGP %	GGT %
Blanco	0	0	0
Control	100	100	100
Preventivo	99,5	97,72	75,0
Recuperativo	15,31	28,0	62,5

Fuente: Elaboración propia.

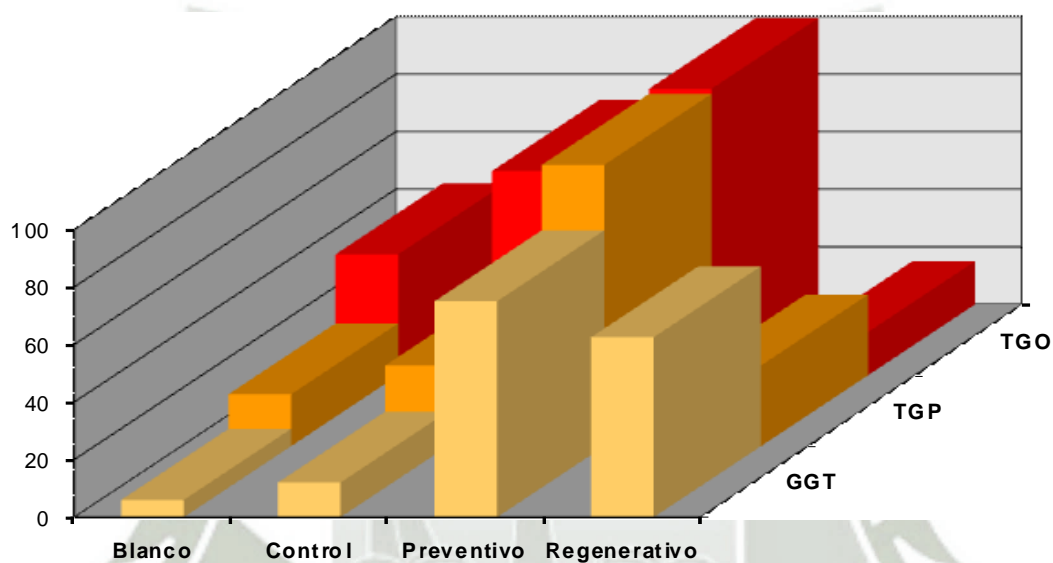
- La actividad de la transaminasa TGO se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero.
- La actividad de la transaminasa TGP se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero.
- La actividad de la transaminasa GGT se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L) de suero x 100.
- Se realizó el análisis estadístico de los promedios obtenidos con cada transaminasa mediante análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de especificidad de Tukey modificada, con una exigencia de $p < 0,01$.

Muestra el efecto preventivo versus regenerativo del EDTA a dosis de 2,0mg/100g, sobre las transaminasas TGO, TGP y GGT correspondientes al 5to día de estudio. Donde se puede ver en la tabla el TGO tiene un 99.5 % de efecto preventivo, en comparación de un 15,31 % de efecto regenerativo, de igual manera con respecto al TGP con un 97,72 % de efecto preventivo con respecto a un 28,0 % de efecto regenerativo, por ultimo vemos a nivel del GGT con un 75,0 % de efecto preventivo con respecto 62,5 % del efecto regenerativo con lo que podemos concluir que EDTA tiene más efecto preventivo que regenerativo los cuales se pueden ver en la tabla 7 salvo a nivel del GGT que también tiene un efecto regenerativo algo significativo el ultimo día , con respecto a las otras transaminasas.

“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”

GRAFICO

COMPARACIÓN EN % DEL EFECTO PREVENTIVO VERSUS RECUPERATIVO DE LAS
TRANSAMINASAS



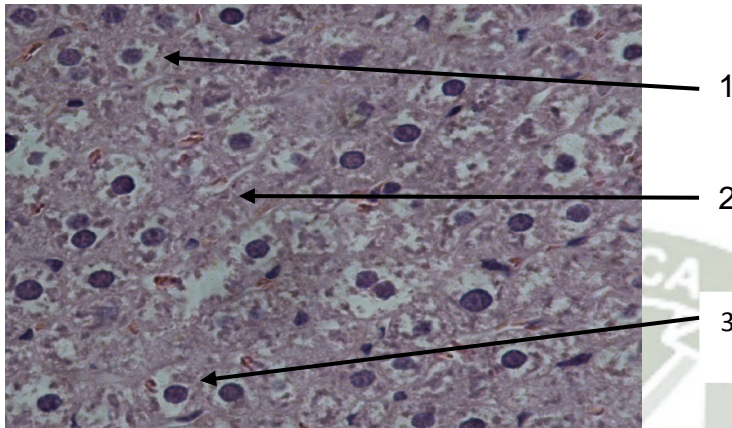
Fuente: Elaboración propia.

CORTES HISTOLOGICOS

FOTOGRAFÍA 1.

Hígado de rata perteneciente al Grupo Blanco (normal)

1. La disposición celular es pareja
2. No existe necrosis.
3. La disposición de los hepatocitos mantienen un patrón

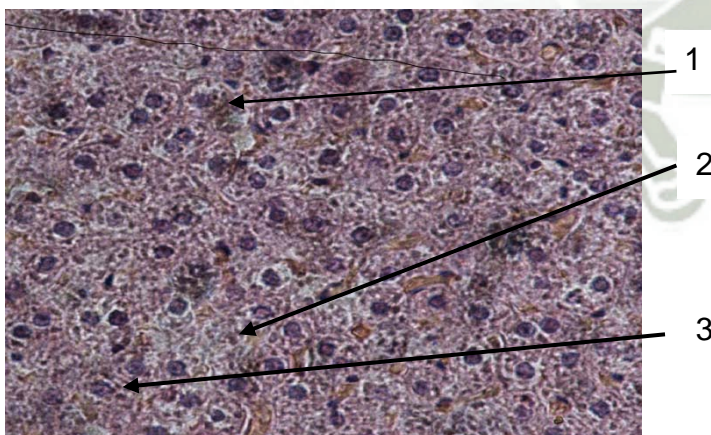


Coloración hematoxilina-eosina (40x)

FOTOGRAFÍA 2.

Hígado de rata perteneciente al Grupo Control (con paracetamol)

1. Se observa necrosis, inflamación severa.
2. Restos nucleares dispersos
3. Hipertrofia de células de Kupffer

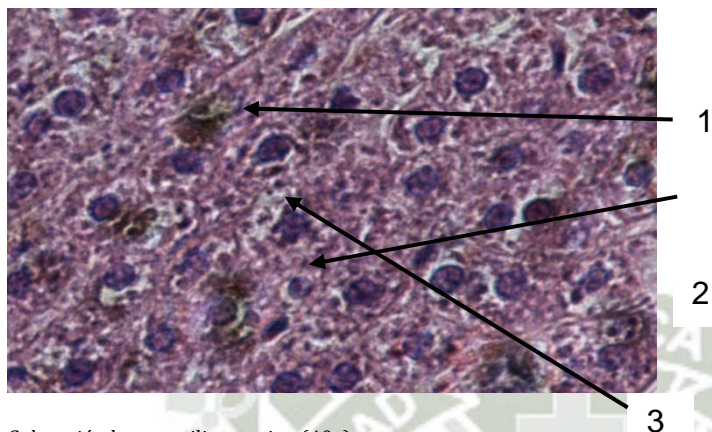


Coloración hematoxilina-eosina (40x)

FOTOGRAFÍA 3.

Hígado de rata perteneciente al Grupo Preventivo (1.0)

1. Presenta signos de necrosis moderada en áreas no confluentes.
2. Recuperación de la disposición de los hepatocitos
3. Células de Kupffer con aparente normalidad

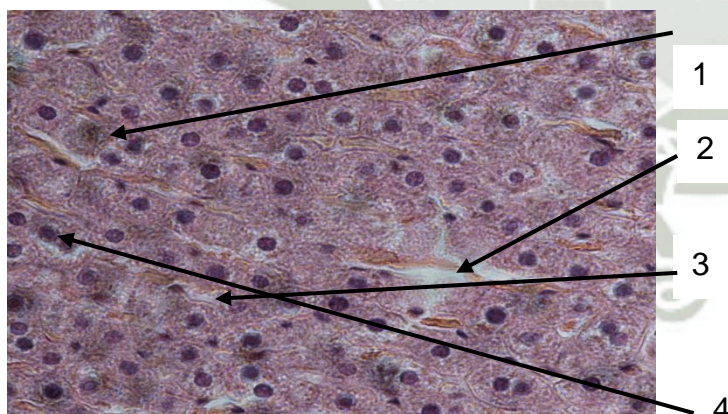


Coloración hematoxilina-eosina (40x)

FOTOGRAFÍA 4.

Hígado de rata perteneciente al Grupo Preventivo (2.0)

1. Presenta ligeros signos de necrosis.
2. Los espacios portales casi normales
3. Células de Kupffer normales
4. Regeneración de hepatocitos (binucleados)

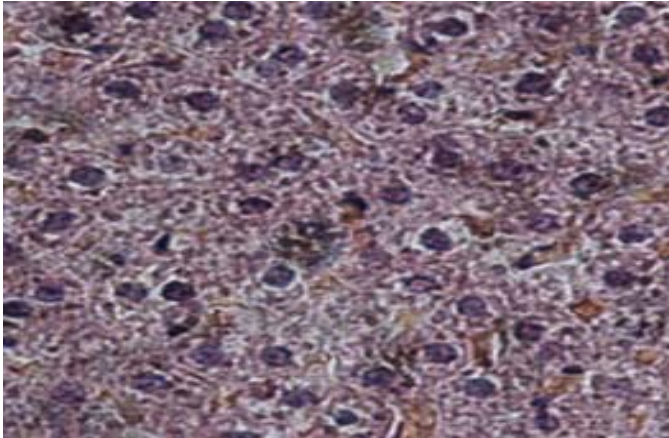


Coloración hematoxilina-eosina (40x)

FOTOGRAFIA 5

Hígado de rata perteneciente al Grupo Recuperativo (1.0)

1. Se observa necrosis, inflamación severa.
2. Restos nucleares dispersos
3. Hipertrofia de células de Kupffer

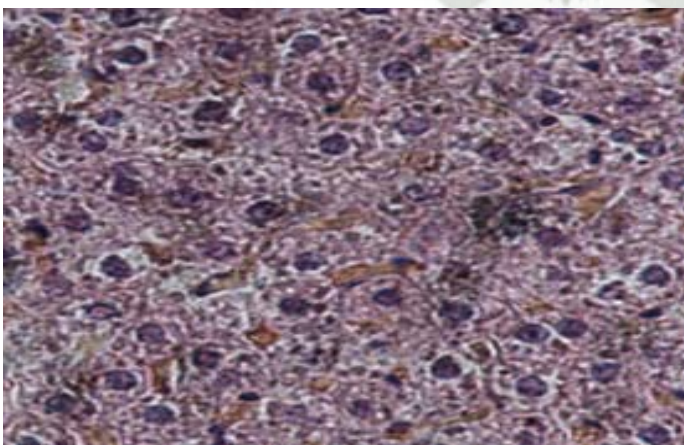


Coloración hematoxilina-eosina (40x)

FOTOGRAFIA 6

Hígado de rata perteneciente al Grupo Recuperativo (2.0)

1. Se observa necrosis, inflamación severa.
2. Restos nucleares dispersos
3. Hipertrofia de células de Kupffer



Coloración hematoxilina-eosina (40x)

En la observación macroscópica de los hígados injuriados con paracetamol, se observó una ligera palidez superficial. Mientras que los hígados de los grupos preventivos

permanecieron sin alteraciones. Los hígados de ratas blanco (sin tratamiento) no presentaron alteraciones histológicas. En cambio, en las ratas intoxicadas con paracetamol (control) se observó signos de necrosis severa. Mientras que, los hígados de ratas tratadas con EDTA 1,0mg/100g mostraron signos de necrosis entre ligera a moderada. Mientras que la observación histológica de los hígados de ratas tratadas con EDTA 2,0 mg/100g permanecieron sin alteraciones o con signos de necrosis leve acompañado de regeneración celular marcada. Por otro lado, los hígados de los grupos recuperativos no se observa regeneración alguna con respectivas dosis los cuales se asemejan a los del grupo control.





CAPITULO III
DISCUSION Y COMENTARIOS

DISCUSION Y COMENTARIOS

En la presente sección se evalúa el efecto hepatoprotector y regenerador de los diferentes tratamientos realizados con dos dosis de EDTA, frente a la intoxicación hepática inducida por paracetamol en ratas obteniéndose los siguientes resultados: La evaluación del peso de los animales al inicio de los experimentos y al final de los mismos, vemos que el peso corporal sufrió un ligero aumento alrededor del 3% no significativo. El peso absoluto de los hígados, tampoco mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (datos no presentados).

TABLA 1: muestra la evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través de la TGO sérica, en animales que previamente se les administró (30 minutos antes) dos dosis crecientes de EDTA para observar su efecto preventivo. Primero, observamos un grupo blanco, constituido por 5 ratas, que a la prueba basal de TGO presenta $64 \pm 5,5$, luego, se les administro por vía intraperitoneal suero fisiológico en lugar de paracetamol, se observa leve disminución en el tiempo, los cuales se mantienen entre los parámetros normales, el primer día con un TGO de 64 ± 11 al quinto día con un TGO de $60 \pm 5,1$, que sirve como parámetro comparativo con los demás grupos. En cambio, el grupo control también constituido por 5 ratas, que reciben paracetamol a dosis de 200mg/100g, vía intraperitoneal en lugar de suero fisiológico, al análisis diario de TGO en sangre durante los cinco días, muestra a partir del primer día un aumento significativo, el primer día con 98 ± 17 hasta el quinto día con 256 ± 18 , hecho que también se obtuvo con estudios anteriores donde también llegaron a demostrar que el paracetamol a dosis elevadas produce incremento de las transaminasas. Luego se observa un primer grupo preventivo constituido por 5 ratas, a los cuales solo se les administra media dosis de EDTA 1,0mg/100g, en dos dosis crecientes para observar su efecto preventivo, podemos observar que presenta una basal correspondiente a $59 \pm 3,1$ el cual se encuentra entre los valores normales. Luego vemos el TGO en sangre durante los cinco días, midiendo cada día el TGO, el primer día con $57 \pm 3,7$ hasta el quinto día con 197 ± 19 , empleando la prueba paramétrica de Mann-Whitney vemos que los cuatro primeros días no es significativo salvo el quinto con $P < 0,05$ lo que nos demuestra que a media dosis de EDTA 1,0mg/100g no tiene valor preventivo significativo. finalmente en el grupo preventivo 2 de dosis completa de EDTA 2,0mg/100g también constituido por 5 ratas, se tomo una basal que corresponde a $63 \pm 9,6$, se administro por vía intraperitoneal EDTA en dosis 2,0mg/100g para

observar su efecto preventivo a dosis de 2,0mg/100g, que al análisis de TGO en sangre durante los cinco días, muestra el primer día un TGO de $64 \pm 6,1$ hasta el quinto día con $61 \pm 3,3$, con una variación leve de incremento entre el primero y segundo día, que luego va descendiendo hasta quinto día, hasta llegar a sus valores normales, empleando la prueba paramétrica de Mann-Whitney podemos ver que es significativo el efecto protector a esta dosis de EDTA 2,0mg/100g a partir del segundo día con $P < 0,05$ igual al tercer día, el cuarto y quinto día de con $P < 0,01$ que son altamente significativos.

TABLA 2: muestra la evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través del TGP sérico, en animales que preventivamente se les administró (30 minutos antes) dos dosis crecientes de EDTA para observar el efecto preventivo. Como ya se ha descrito en la tabla anterior el grupo blanco consta de 5 ratas que nos sirve como referencia para comparar en este caso el nivel de TGP, en el cual encontramos una basal de $32 \pm 4,2$; luego se les administra solo suero fisiológico vía intraperitoneal donde se observa que los niveles de TGP sérico en los cinco días presentan ligera variación pero siempre se encuentran entre los valores normales; el primer día presenta $29 \pm 4,2$ y el quinto día presenta $33 \pm 2,4$. En cambio, el grupo control constituido por 5 ratas, que luego de tomarse la muestra del basal que corresponde a $33 \pm 5,1$, se les administra exclusivamente paracetamol a dosis de 200mg/100g vía intraperitoneal, proceso que se sigue haciendo a diario, para medir TGP a nivel sérico, donde presenta un aumento significativo desde el primer día con un TGP de 85 ± 13 hasta quinto día con 296 ± 32 . Donde se ve aumento significativo en el tiempo, hecho que coincide con estudios similares realizados donde también demuestran que el paracetamol es muy nocivo para el hígado a dosis elevadas. Sin embargo, En el grupo preventivo 1 constituido por 5 ratas, previa muestra basal que corresponde a $32 \pm 3,3$ el cual se encuentra entre los parámetros normales, se les administra por vía intraperitoneal EDTA en dosis 1,0mg/100g (dosis media) para luego administrar el paracetamol a dosis elevada de 200mg/100g midiendo a diario los niveles de TGP donde se observa que los niveles aumentan considerablemente en el transcurso del tiempo el primer día presenta 93 ± 22 y el quinto día $183 \pm 2,3$, a la vez aplicando la prueba estadística se puede observar que los tres primeros días el efecto preventivo con esta dosis no es significativo salvo el quinto día con una diferencia significativa de un valor de P de $< 0,01$ lo que nos indicaría también que al igual que en la tabla 1 que a dosis de 1,0mg/100g EDTA no presenta efecto preventivo considerable. Finalmente, en

el grupo preventivo 2 también constituido por 5 ratas, previa a procedimiento se toma una basal que corresponde a $34 \pm 4,1$ UI/L para luego administrar por vía intraperitoneal EDTA en dosis $2,0\text{mg}/100\text{g}$ para así poder evaluar su eficacia en lo preventivo a dicha dosis, que al análisis de TGP en sangre durante los cinco días, se evidencia ligero aumento durante los dos primeros días para luego disminuir; al aplicar la prueba no paramétrica de Mann-Whitney donde a partir del primer día hay una diferencia significativa con un valor de P de $<0,05$ durante los dos primeros días luego con una p de $<0,01$ con lo que nos demuestra que EDTA a dosis de $2,0\text{mg}/100\text{g}$ administrado 30 minutos antes de la administración del paracetamol tiene efecto hepatoprotector preventivo.

TABLA 3: muestra la evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través de la GGT sérica, en animales que preventivamente se les administró (30 minutos antes) dos dosis crecientes de EDTA, para observar su efecto preventivo de EDTA, en esta tabla nos muestra nuevamente los grupos ya descritos anteriormente, mismo grupo blanco, donde se toma una basal de GGT de $16 \pm 1,8$ el cual nuevamente permanece invariable en el tiempo. Seguido, se observa el grupo control, con un aumento en el tiempo, el primer día con 19 ± 8 al quinto día con 132 ± 6 , al igual que en las pruebas de transaminasas anteriores. Mismo grupo preventivo 1 con dosis de $1,0\text{mg}/100\text{g}$ ya descrito con anterioridad, se toma una basal que corresponde a $15 \pm 1,9$, que igualmente presenta un aumento creciente en el tiempo el primer día con 17 ± 2 hasta el quinto día con 27 ± 4 , una vez aplicada la prueba estadística, nos demuestra nuevamente que no existe diferencia estadísticamente significativa con esta dosis de EDTA. En cambio, en el grupo preventivo 2 con dosis $2,0\text{mg}/100\text{g}$ se evidencia un ligero aumento en el tiempo primer día con 18 ± 3 al quinto día con 20 ± 2 donde estadísticamente de evidencia diferencia significativa, el segundo día con un valor de p de $<0,05$ al quinto día con $P<0,01$, con lo que podemos concluir que EDTA a dosis de $2,0\text{mg}/100\text{g}$ presenta efecto hepatoprotector preventivo, porque el incremento de GGT no varía en forma significativa en el tiempo.

En nuestro estudio, el incremento del nivel sérico de transaminasas que observamos en aquellas ratas que recibieron el tratamiento con paracetamol constituye una prueba sérica del daño hepático que ha ejercido este medicamento. Dicho efecto se corrobora con el estudio histopatológico, que permite mostrar signos de necrosis hepatocelular severa. Se ha descrito, en otros trabajos, que una sobredosis de paracetamol causa una

necrosis hepática aguda, ocasionada, por productos derivados del metabolismo del paracetamol. Además, el grupo de ratas al que se le administró FHP, compuesto que tiene propiedades hepatoprotectoras, mostró mayormente necrosis entre moderada y severa, presentando, así mismo, los mayores valores en AST, ALT y GGT, lo que nos indicaría muy poca o ninguna protección hepática contra el daño inducido por paracetamol, que genera radicales libres en su mecanismo de acción. En cambio, las ratas tratadas con perejil no mostraron mayores alteraciones tisulares. Esta observación mantiene correlación con los niveles de transaminasas, principalmente con GGT y ALT, donde hay diferencia estadísticamente significativa, que fueron los más bajos, lo que indicaría que este alimento ejerció un mejor efecto hepatoprotector

El incremento bioquímico aislado de la enzima hepática gamma-glutamyl transpeptidasa es la reacción hepática a fármacos más frecuente y traduce un fenómeno de "inducción enzimática microsomal" sin repercusión patológica. Este hallazgo es especialmente común con la medicación antiepiléptica (difenilhidantoína y fenobarbital), pero muchos otros fármacos como la rifampicina y las benzodiazepinas pueden también causarla. En cambio, el aumento de transaminasas se produce por muerte de los hepatocitos y es una medida semicuantitativa sensible de lesión hepática. . (13)

TABLA 4: muestra la evolución a través del tiempo el efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través de la TGO sérica, en animales que posterior a su administración (30 minutos después) se les suministró dos dosis crecientes de EDTA, para observar el efecto regenerativo de EDTA, nuevamente, aquí se observa el mismo grupo blanco y grupo control, ya descritos con anterioridad, los cuales sirven de referencia y para comparar estadísticamente con los dos grupos regenerativos. Grupo regenerativo 1, a dosis EDTA de 1,0mg/100g, con TGO basal de $57 \pm 3,1$, que se encuentra entre los valores normales, luego se observa un incremento significativo del TGO, el primer día con $78 \pm 5,7$ hasta el quinto día con 241 ± 16 , con aumento similar al grupo control, aplicando la prueba estadística comparativa entre el grupo control y grupo regenerativo 1, se evidencia que no presenta valor significativo en los cinco días, lo que nos indica que a esta dosis de EDTA no presenta efecto regenerativo. Finalmente, el grupo regenerativo 2, a dosis EDTA de 2,0mg/100g, con un TGO basal de $68 \pm 4,6$, luego nuevamente se observa incremento de TGO en el tiempo, casi igual al grupo control, el primer día con $84 \pm 5,5$ hasta el quinto día con 226 ± 13 , el cual al aplicar la

prueba estadística de Mann-Whitney también se observa en el tiempo, sin valor significativo, lo que demuestra que EDTA no presenta efecto regenerativo con ambas dosis; demostrado séricamente porque la elevación de las transaminasas muestran una elevación a través del tiempo durante el experimento.

TABLA 5: muestra la evolución a través del tiempo el efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través de la TGP sérica, en animales que posterior a su administración (30 minutos después) se les suministró dos dosis crecientes de EDTA, para observar el efecto regenerativo de EDTA, nuevamente, mismo grupo blanco, mismo grupo regenerativo. Grupo regenerativo 1 a dosis de 1,0mg/100g, con un basal de $34 \pm 2,1$ el cual está entre los parámetros normales para TGP, también se observa un incremento en el tiempo, similar al grupo control, con un valor de TGP de 83 ± 9 el primer día, hasta el quinto día con $271 \pm 26,3$, con aumento casi similar al grupo control, una vez aplicada la prueba estadística de Mann-Whitney, se observa nuevamente que no es significativo. Finalmente, el grupo regenerativo 2, a dosis de 2,0mg/100g, también con un TGP basal entre los parámetros normales, se observa aumento el primer día con 73 ± 8 hasta el quinto día con 220 ± 14 , estadísticamente presenta el último día una p de $<0,05$, nuevamente se observa un efecto regenerativo no significativo, a dosis completa salvo el último día. Con lo que podemos concluir que EDTA en ambas dosis no posee efecto regenerativo previa administración de paracetamol; lo que podemos inferir que realizado el daño hepático por paracetamol es irreversible, a lo que se puede agregar como se demuestra en el experimento preventivo si tiene resultados en este aspecto mas no posee efecto regenerativo.

El presente estudio mostró que en las ratas estaban presentes las características del daño hepático inducido por paracetamol a dosis elevadas, no tuvo efecto irreversible como efecto experimental regenerativo, lo que permite afirmar que el modelo es válido en esta especie y en las condiciones experimentales en que se realizó.

Los resultados obtenidos demuestran que administrados por vía intraperitoneal a ratas antes previno el daño hepático, y no el efecto regenerativo, asociado a este modelo.

TABLA 6 muestra la evolución a través del tiempo del efecto hepatotóxico del paracetamol observado a través de la GGT sérica, en animales que posterior a su administración (30 minutos después) se les suministró dos dosis crecientes de EDTA

para observar su efecto regenerativo. Se observa nuevamente un grupo blanco y un grupo control ya descritos en ocasiones anteriores, para así poder hacer la comparación estadística, donde nos permite comparar estadísticamente el primer grupo regenerativo a dosis de 1,0mg/100g con el grupo control, donde nuevamente no es significativo el efecto regenerador de EDTA a esta dosis demostrado mediante GGT. Finalmente, haciendo la comparación estadística con el grupo regenerador 2,0mg/100g versus el grupo control, observamos que solo el último día nos da una $p < 0,05$, por lo tanto se puede concluir que en este estudio experimental el efecto regenerativo de EDTA no es significativo.

Por otra parte, ha mostrado marcado efecto antioxidante indirecto en modelos experimentales, efecto que pudiera contribuir a explicar, al menos parcialmente, los presentes resultados. Un estudio previo demostró la acción hepatoprotectora del D-002 en el daño hepático inducido por CCl_4 , modelo en el cual el mecanismo de daño hepático se relaciona con el proceso de PL. (18) Tomando en cuenta la contribución de la PL a la hepatotoxicidad inducida por paracetamol y la capacidad del D-002 de prevenir la PL inducida por diversos agentes en ratas, resulta lógico concebir una asociación entre ambos efectos. Numerosos estudios han demostrado la estrecha relación que existe entre el daño hepático inducido por paracetamol y el estrés oxidativo, así como que la oxidación de este agente es una reacción generadora de especies radicales que modifican la actividad de enzimas antioxidantes.²⁸ Siendo el D-002 una sustancia con efectos antioxidantes como se plantea anteriormente, es lógico pensar en la acción inhibitoria de este en el estrés oxidativo provocado por el paracetamol. El análisis previene de manera similar los efectos hepatotóxicos del paracetamol. (19)

TABLA 7: muestra el efecto preventivo versus regenerativo del EDTA a dosis de 2,0mg/100g, sobre las transaminasas TGO, TGP y GGT correspondientes al 5to día de estudio. Donde se puede ver en la tabla el TGO tiene un 99,5 % de efecto preventivo, en comparación de un 15,31 % de efecto regenerativo, de igual manera con respecto al TGP con un 97,72 % de efecto preventivo con respecto a un 28,0 % de efecto regenerativo, por último vemos a nivel del GGT con un 75,0 % de efecto preventivo con respecto 62,5 % del efecto regenerativo con lo que podemos concluir que EDTA tiene más efecto preventivo que regenerativo los cuales se pueden ver en la tabla 7 salvo a

nivel del GGT que también tiene un efecto regenerativo algo significativo el último día, con respecto a las otras transaminasas.

En la observación macroscópica de los hígados injuriados con paracetamol, se observó una ligera palidez superficial. Mientras que los hígados de los grupos preventivos permanecieron sin alteraciones. Los hígados de ratas blanco (sin tratamiento) no presentaron alteraciones histológicas. En cambio, en las ratas intoxicadas con paracetamol (control) se observó signos de necrosis severa. Mientras que, los hígados de ratas tratadas con EDTA 1,0mg/100g mostraron signos de necrosis entre ligera a moderada. Mientras que la observación histológica de los hígados de ratas tratadas con EDTA 2,0mg/100g permanecieron sin alteraciones o con signos de necrosis leve acompañado de regeneración celular marcada.

A los cortes histológicos en este estudio se realizó una evaluación anatomopatológica del hígado postmortem al momento del sacrificio de rata perteneciente al Grupo Control (con paracetamol) antes de la fijación en formol y los resultados muestran la presencia de focos de hemorragia, congestión, restos nucleares, hipertrofia de las células de kupffer y necrosis hepatocelular severa, en el grupo control; en Hígado de rata perteneciente al Grupo Preventivo (1.0), donde presenta signos de necrosis moderada, recuperación de la disposición de los hepatocitos, células de kupffer aparentemente normales, en hígado de rata perteneciente al grupo preventivo con coloración hematoxilina-eosina (40x) (2,0) presenta signos de necrosis ligera, espacio portal normal, células de kupffer normales, regeneración de hepatocitos binucleados. Este resultado concuerda con el hallado por Sisamón y cols. (20) donde en el análisis macroscópico de hígados expuestos a paracetamol se observan zonas de hemorragia, congestión y necrosis.

Los estudios histopatológicos nos permiten determinar la patología exacta de las enfermedades hepáticas así como los verdaderos cambios celulares debido al tratamiento. En el análisis histopatológico de un hígado de rata normal se observan venas centrolobulillares permeables, definidas y con pared regular. La presencia de hematíes en las venas es mínima y el parénquima hepático se nota uniforme y es posible observar los lobulillos hepáticos con los espacios sinusoidales permeables (23). El paracetamol en dosis tóxicas induce muerte de los hepatocito y produce cambios eosinófilos, necrosis centrolobulillar en hepatocitos caracterizado por coagulación y

colapso de hepatocitos con pérdida de núcleos, infiltrado inflamatorio y cambios grasos (24).

Respecto al análisis microscópico de este estudio se observaron las características tisulares principales de daño hepático como son congestión de la vena centrolobulillar, congestión de los sinusoides hepáticos, degeneración grasa, características de los núcleos sobretodo de la cromatina (21-22).

Se observó marcado aumento de núcleos densos hipercromáticos en el grupo control respecto de los grupos experimentales tratados con EDTA, esto probablemente se deba a una respuesta del núcleo a la injuria externa. Se encontró mayor número de venas centrolobulillares congestionadas en el control que en los grupos experimentales. Se vio aumento marcado de vacuolas grasas intracelulares en las muestras del grupo control. Sin embargo, los grupos tratamiento con EDTA no presentan signos de degeneración grasa alguna. Se observa que los sinusoides hepáticos de los grupos experimentales de EDTA y blanco están permeables lo que indica buena función hepática comparado con la congestión pasiva de los sinusoides del grupo control que evidencian lesión hepática por inflamación. Esto sugiere que el EDTA evita la inflamación y las reacciones nocivas que derivan de ésta ante una toxicidad inducida por paracetamol.

El efecto hepatoprotector del EDTA fue observado a través de la determinación sérica de las transaminasas TGO, TGP y GGT. Así, con respecto a los niveles séricos de la transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), conocida hoy en día como aspartato aminotransferasa (AST), inicialmente no hubo diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un $p < 0,05$, pero se pudo observar que la administración oral del EDTA a partir del segundo día (dosis 2,0) presentó diferencia significativa con respecto al control para el mismo día. El daño con el paracetamol (Grupo Control) produjo mayores niveles de TGO (256 ± 18 U/L día 5) que el grupo blanco ($60 \pm 5,1$ U/L), presentando los menores niveles (valores no significativos) hasta el día 2. En cambio, al comparar el grupo preventivo al cual se le administró EDTA 2,0 mg/100g de peso con el grupo control (paracetamol), sí se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$, prueba Mann-Whitney) (Tabla 1) a partir del 4 día. En lo referente a los niveles séricos de actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), conocida hoy en día como alanina aminotransferasa (ALT), tampoco se pudo observar diferencia significativa los primeros 3 días, pero a partir del día 4 hasta el día 5 alcanzó

un ($P=0,05$ y $p<0,01$ respectivamente) para el EDTA (1,0) y un $p<0,01$ a partir de 3 días para el EDTA (2,0) como grupos preventivos.

Podemos concluir que el EDTA tiene efecto protector hepático frente a la intoxicación aguda por paracetamol, probablemente debido a su efecto antioxidante. El efecto protector hepático se evidencia por los niveles de enzimas hepáticas (TGP), análisis anatomopatológicos del hígado postmortem y análisis histopatológicos de tejido hepático.

El efecto protector hepático de EDTA parece estar relacionado directamente con su concentración pero falta realizar estudios que demuestren la cantidad óptima de EDTA para ejercer su efecto protector hepático. Es necesario hacer más estudios para demostrar el mecanismo de acción del efecto protector del EDTA que probablemente sea debido a una acción antioxidante directa. Además, hasta el momento no existen estudios sobre el efecto del tratamiento coadyuvante en enfermedades hepáticas en personas.

Finalmente, podemos concluir por nuestro estudio, que el EDTA a la dosis de 2,0mg/100g de peso ejerce un efecto antioxidante y hepatoprotector preventivo efectivo a nivel hepático en ratas con intoxicación inducida por paracetamol, evidenciado a través de TGO, TGP y GGT así como por las observaciones histopatológicas.

La terapia de quelación es un tratamiento vía intravenosa (IV) de una solución química de ácido etilendiaminotetraacético, o EDTA. Se utiliza para el tratamiento de envenenamiento agudo y crónico tirando de toxinas (incluyendo metales pesados tales como plomo, cadmio y mercurio) desde el torrente sanguíneo. El quelato palabra viene de la raíz griega chele, que significa "garra". EDTA tiene una garra como la estructura molecular que se une a los metales pesados y otras toxinas.

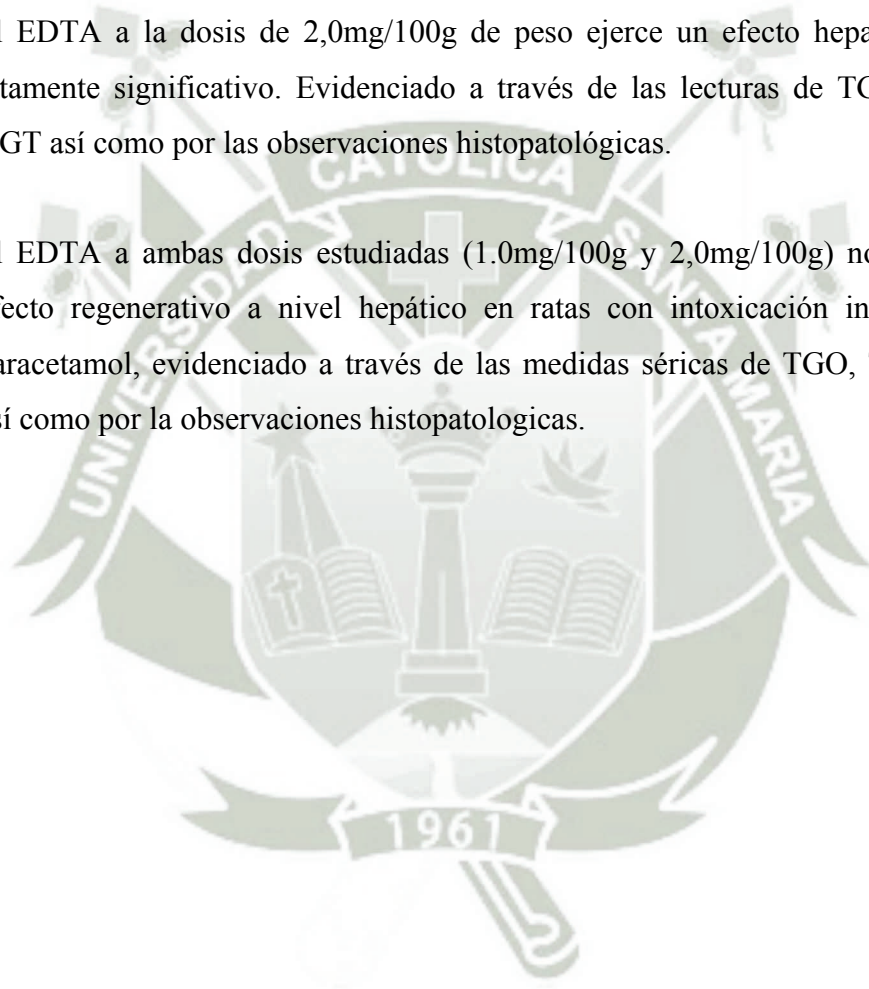
La terapia de quelación con EDTA es aprobado por los EE.UU. Food and Drug Administration (FDA) como tratamiento para la intoxicación por plomo metálico y pesado. También se utiliza como tratamiento de emergencia para la hipercalcemia (niveles excesivos de calcio) y el control de las arritmias ventriculares (ritmos cardíacos anormales) asociados con esta enfermedad. (25)



CAPITULO VI
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. El paracetamol a la dosis empleada produjo daño hepático irreversible.
2. El EDTA a la dosis de 1.0mg/100g de peso no ejerce un efecto hepatoprotector preventivo efectivo en ratas con intoxicación inducida por paracetamol, observado a través de las transaminasas TGO, TGO, GGT así como por las observaciones histopatológicas.
3. El EDTA a la dosis de 2,0mg/100g de peso ejerce un efecto hepatoprotector altamente significativo. Evidenciado a través de las lecturas de TGO, TGP y GGT así como por las observaciones histopatológicas.
4. El EDTA a ambas dosis estudiadas (1.0mg/100g y 2,0mg/100g) no ejerce un efecto regenerativo a nivel hepático en ratas con intoxicación inducida por paracetamol, evidenciado a través de las medidas séricas de TGO, TGP, GGT así como por la observaciones histopatológicas.



RECOMENDACIONES:

1. Realizar estudios con rigurosidad científica con humanos por parte de investigadores de la comunidad científica, tomando en cuenta tanto la dosis como la toxicidad del Etilendiamino Tetraacetato (EDTA) con la finalidad de demostrar su posible aplicación a los seres humanos dada su efectiva acción hepatoprotectora a la par de la mayor incidencia actual de cirrosis.
2. Publicar los resultados del presente trabajo en una revista indexada como el CICA a través de la facultad de Medicina Humana de la UCSM, para que futuros trabajos realizados por los estudiantes de medicina involucren nuevos métodos que ayuden a encontrar nuevos tratamientos para la hepatotoxicidad u otros.



BIBLIOGRAFÍA

1. Soza A. Hepatitis tóxica: acentaminofeno y otras. *Gastr Latinoam* 2004; 15 (2):158-162
2. Bhaskar VH, Balakrishnan N. Protective effects of Pergularia daemia roots against paracetamol and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol.* 2010; 48(11):1265-72.
3. Mukherjee M, Bhaskaran N, Srinath R, Shivaprasad HN, Allan JJ, Shekhar D, Agarwal A. Anti-ulcer and antioxidant activity of GutGard. *Indian J Exp Biol.* 2010;48(3):269-74.
4. Abdel-Salam O, Bódis B, Karádi O, Szolcsáyi J and Mózsik G. Modification on aspirin and ethanol induced mucosal damage in rats by intragastric application of resinifatoxin. *Inflammopharmacology.* 2005;3(2):135-47.
- 5.** Ruth DeBusk *et al.* (2002). "Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)". Retrieved 2007-07-25.
- 6.** Calcium Disodium Versenate (Edetate Calcium Disodium) Injection [Graceway Pharmaceuticals, Llc]". *Dailymed.nlm.nih.gov.* Retrieved 2013-01-01.
- 7.** Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products". *Accessdata.fda.gov.* Retrieved 2013-01-01.
- 8.** Home > Medical Reference > Complementary Medicine > EDTA overview". *University of Maryland Medical Center.* Retrieved 16 December 2009.
- 9.** Green, Saul; Wallace Sampson (December 14, 2002). "EDTA Chelation Therapy for Atherosclerosis And Degenerative Diseases: Implausibility and Paradoxical Oxidant Effects". *Quackwatch.* Retrieved 16 December 2009.
- 10.** Trial to Assess Chelation Therapy (TACT) - Full Text View". *ClinicalTrials.gov.* Retrieved 2013-01-01.
11. Gordon GF. EDTA and chelation therapy: history and mechanisms of action - an update. *Clin. Pract. Altern. Med.* 2001; 2:36-45

12. Prescott L, Critchley J. Intravenous N-acetilcisteína: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Brit Med J.* 2009;2:1097-100.
13. Davidson D, Eastham W. Acute liver necrosis following overdosage of paracetamol. *Brit Med J.* 2006;2:497-9.
14. Menéndez R, Amor AM, González RM, Jiménez S, Mas R. Inhibition of rat microsomal lipid peroxidation by the oral administration of D-002. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:85-90.
15. Molina V, Valdés S, Carvajal D, Arruzazabala ML, Menéndez R, Mas R. Antioxidant effect of D-002 on gastric mucosa of rats with injury induced experimentally. *J Med Food.* 2001;4(2):479-83.
16. Pérez Y, González RM, Amor AM, Jiménez S, Menéndez R. D-002 on antioxidant enzymes in liver and brain of rats. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas.* 2002;53(1):3-5.
17. Ray S, Milltown NJ, Bagchi D, Omaha NE. Prevention and treatment of acetaminophen toxicity with Grape Seed Proanthocyanidin Extract. Patent No: US 6,245,336 B1. Jun 12, 2001.
18. Mendoza S, Noa M, Pérez Y, Mas R. Antioxidant effect of D-002 on liver damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. *J Med Food.* 2007;10:379-83.
19. Domínguez MA, Muñoz O, García RV, Vázquez M, Gallegos J, Cruz JS. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. *Bol Latinoam Carib Plant Med Arom.* 2010;9(1):13-9.
20. P. Munné, J.J. Saenz Bañuelos, J.J. Izura, G. Burillo-Putze, S. Nogué. Intoxicaciones medicamentosas (II). Analgésicos y anticonvulsivantes. *Anales Sis San Navarra* 2003; 26(1): 65-97.
21. Padilla P, Torreblanca J, Ferrándiz J, Asato H. Esteatohepatitis no alcohólica: reporte de los primeros casos del HNGAIESSALUD. *Rev.gastroenterolol.P Perú* 2000; 20(1):33-40

22. Robbins, Stephen y Coulter, Mary. Patología Estructural y funcional. Adaptaciones celulares, lesión celular y muerte celular 2003;7(2):19-29.
23. P. Munné, J.J. Saenz Bañuelos, J.J. Izura, G. Burillo- Putze, S. Nogué. Intoxicaciones medicamentosas (II). Analgésicos y anticonvulsivantes. Anales Sis San Navarra 2003;26(1): 65-97.
24. Soza A. Hepatitis tóxica: acentaminofeno y otras. Gastr Latinoam 2004; 15 (2):158-162
25. Chappell LT. Should EDTA chelation therapy be used instead of long-term clopidogrel plus aspirin to treat patients at risk from drug-eluting stents? *Altern Med Rev.* 2007 Jun;12(2):152-8. Review.
26. Gómez E. U., Agudelo Y, Berrouet M, C., Escobar I. E.(2008). Toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos.[versión electrónica] *Rev. médica Iatreia* 21(1), 41-48.
27. Tejada C. F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. [versión electrónica]. *Rev.Clinica de Medicina y Farmacia.* 3(3), 177-191
28. Highleyman L, Franciscus A. (2009). El hígado: el paracetamol y el hígado. [versión electrónica] HCSP. 2.1 (1), 2.
29. Troncoso LV. Efecto antioxidante y hepatoprotector del Petroselinum sativum (perejil) y de una mezcla de vitaminas antioxidantes (A, E, C) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol [tesis doctoral] Lima, Perú: Universidad Nacional

ANEXOS



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



PROYECTO DE INVESTIGACION

**“EFECTO PROTECTOR Y REGENERATIVO DEL ETILENDIAMINO
TRETAACETATO (EDTA) EN RATAS CON DAÑO HEPÁTICO
INDUCIDO POR PARACETAMOL, AREQUIPA 2013”**

Proyecto de Investigación presentado por:

ALDO PALLY SACACA

Para optar el título profesional de Médico Cirujano

AREQUIPA – PERU

2013

PREAMBULO

El aumento de enfermedades hepáticas a nivel mundial responde a una transformación en el cambio de estilo de vida de las personas. La exposición a toxinas hepáticas, el consumo de alcohol, el sedentarismo y los malos hábitos alimenticios también han contribuido al aumento de las patologías hepáticas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), informa que la neoplasia maligna más frecuente en el hígado es el carcinoma hepatocelular (CHC), y con una incidencia cada vez mayor. El CHC es la quinta causa más frecuente de cáncer en el mundo, con más de 560.000 nuevos casos al año y además es la tercera causa más importante de mortalidad por cáncer, con aproximadamente un millón de muertes por año en el mundo. (17)

En el Perú, las enfermedades hepáticas constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, 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 (6).

Según el MINSA, las principales causas de mortalidad por sexo en el departamento de Arequipa en el año 2010, incluyen en el sexto lugar a las enfermedades del hígado con una incidencia total de 3.9% (98 casos masculinos 4.9% y 49 casos femeninos 2.7%). (11)

Dado que el hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de nutrientes, fármacos y otros xenobióticos potencialmente tóxicos que deben atravesarlo antes de alcanzar el torrente sanguíneo y otros tejidos, lo hace particularmente susceptible a los fenómenos de toxicidad química. Se conocen más de mil compuestos que inducen toxicidad hepática; de éstos, los medicamentos son responsables del 40 al 50% de los casos de lesión hepática, y del 25 al 30% de los casos de hepatitis fulminante. (8)

La hepatotoxicidad representa un problema sanitario de primer orden en aumento en las últimas décadas, dado que es una de las principales causas de muerte secundaria a medicamentos y supone la principal causa de retiro de productos farmacológicos del mercado farmacéutico en Europa y en Estados Unidos. (14)

Casi todo el mundo piensa que el paracetamol es seguro, pero lo cierto es que puede provocar graves daños al hígado – e incluso insuficiencia hepática aguda – si se toma en dosis lo bastante altas. De hecho, en los Estados Unidos constituye una de las principales causas de insuficiencia hepática, siendo responsable de más de 56.000 casos de visitas a urgencias, 2.600 hospitalizaciones y 450 muertes al año. (9)

Existen investigaciones en ratas y ratones que indican que el paracetamol tiene la propiedad de inducir lipoperoxidación y daño irreversible en el hepatocito, probablemente causadas por radicales libres. (15)

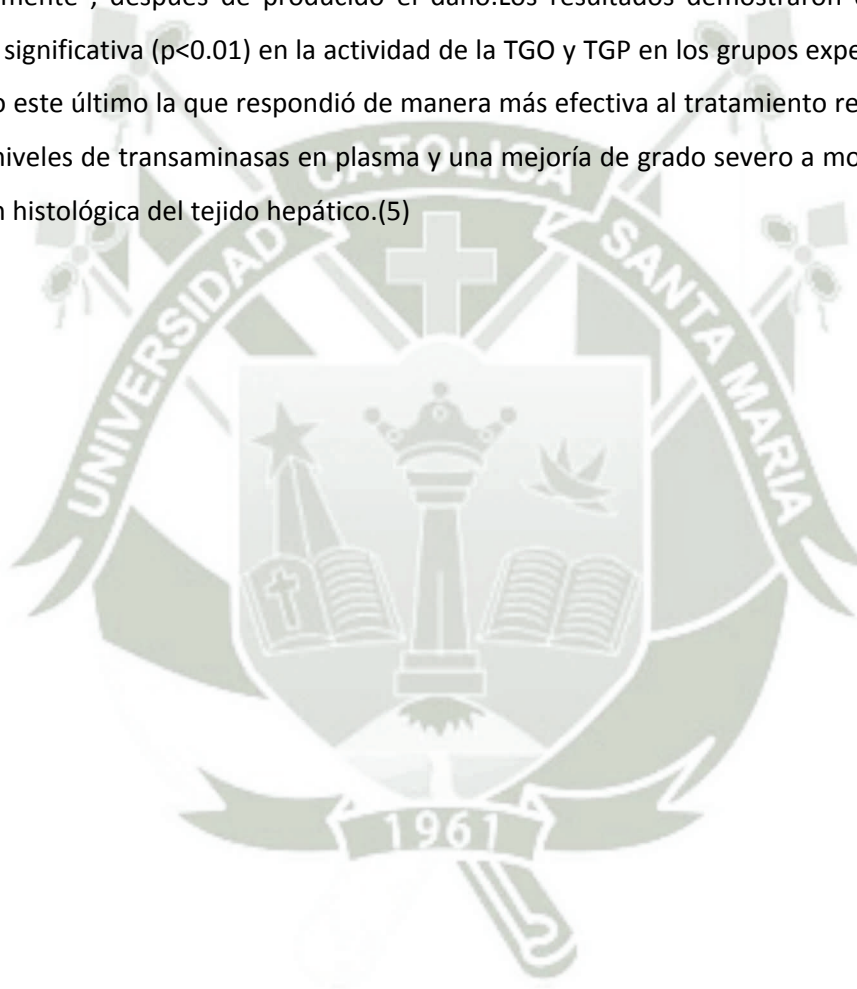
Desde tiempos remotos hasta la actualidad, se ha propuesto el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos para problemas hepáticos dentro de la creencia popular. Éstas plantas han sido utilizadas por la medicina folklórica como remedios caseros, y ya en la actualidad se han llegado a comprobar científicamente sus propiedades hepatoprotectoras en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol, como es el caso del perejil (*Petroselinumsativum*), donde al mismo tiempo se comparó su eficacia con un hepatoprotector farmacológico (FHP: Purinor®) . Al término del período experimental, los animales fueron sacrificados y los resultados mostraron que el perejil ejerce mayor defensa que el FHP, frente a la acción nociva del paracetamol, evaluado por AST (aspartatoaminotransferasa), ALT (alaninaaminotransferasa) y GGT (gamma glutamiltransferasa). Histopatológicamente, no se observó signos de necrosis severa en el grupo tratado con perejil , hecho que si ocurrió con el grupo tratado solo con paracetamol y en el grupo al que se administró adicionalmente FHP, llegando a la conclusión que el perejil ejerce un mayor efecto antioxidante y hepatoprotector que el FHP.(15)

Otro estudio de parecida metodología, demuestra que el extracto acuoso de boldo (*Peumusboldus*), ejerce un efecto protector hepático ya que se evidencia una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los niveles de transaminasas (TGP) entre grupos .El grupo control obtuvo 196.6 U/L (TGP) mientras que los experimentales como máximo 55.6 U/L. En el análisis histopatológico de tejidos hepáticos, las muestras control evidencian signos de lesión hepática, degeneración grasa, congestión sinusoidal centrolobulillar y necrosis celular; sin embargo, los grupos experimentales no presentan signos de lesión celular y hay ausencia de inflamación. (12)

En ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/Kg/2v/semana, se estudió el efecto hepatoprotector de *Rosmarinusoficinalis L.* “romero”. Donde se observó que existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en la actividad de TGO y TGP de las ratas en los diferentes grupos de evaluación. Se aplicó tratamientos con extracto acuoso de *Rosmarinusoficinalis L.* “romero” a dosis de 0.5 g/Kg/día, 1.0 g/Kg/día y un tratamiento con Hepabionta a dosis de 4.29 mg/Kg/día. Los resultados mostraron que el tratamiento a dosis de 1.0 g/Kg/día disminuyeron efectivamente los niveles de TGO y TGP, esto se debería a los principios activos de *Rosmarinusoficinalis L.* “romero” como

el ácido clorogénico, ácido oleoico, ácido ursólico, ácido cafeico, tiamina, niacina, taninos, etc., que regenerarían la citoarquitectura de los hepatocitos dañados por el tetracloruro de carbono. (16)

Se evaluó la actividad protectora y curativa de *Erithroxylum coca* "coca" en ratas con daño hepático provocado por tetracloruro de carbono a dosis a 0.5 ml/kg/2v/semana .El grupo 1 con tratamiento preventivo, recibió extracto acuoso de *Erithroxylum coca* "coca" a dosis de 1.0/kg/día, previos a la inducción de insuficiencia hepática, mientras que a los grupos experimentales 2 y 3 (curativos), recibieron el extracto a diferentes dosis 0.5 y 1.0 g/kg/día respectivamente , después de producido el daño.Los resultados demostraron que sí existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en la actividad de la TGO y TGP en los grupos experimentales 2 y 3, siendo este último la que respondió de manera más efectiva al tratamiento registrando los menores niveles de transaminasas en plasma y una mejoría de grado severo a moderado en la evaluación histológica del tejido hepático.(5)



I. PLANTEAMIENTO TEORICO:

1) PROBLEMA DE INVESTIGACION:

1.1. Enunciado del problema:

¿Existe un efecto protector del EDTA en ratas con intoxicación hepática por Paracetamol?

Descripción del problema:

1.2.1.- Área de conocimiento:

General: Ciencias de la Salud.

Específica: Medicina Humana.

Especialidad: Medicina

Línea: Hepatología



1.2.2.- Análisis y operacionalización de variables:

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN	INDICADOR	VALOR O CATEGORÍA	ESCALA
Solución de EDTA	Efecto quelante sobre el hierro	Dosis del EDTA según Peso Corporal.	1.0 g/100g de PC	ORDINAL
			2.0 g/100g de PC	
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN	INDICADOR	VALOR O CATEGORÍA	ESCALA
Transaminasa glutámicooxalacética (TGO o AST)	Conjunto de enzimas del grupo de las transferasas , pues transfieren grupos amino desde un metabolito a otro, generalmente aminoácidos .	Concentración de enzima marcadora de daño en el citosol y mitocondria del hepatocito.	UI/L (unidades internacionales /litro)	RAZON
Transaminasa glutámico-pirúvica (TGP o ALT)	La elevación sérica de transaminasas se correlaciona con el vertido a la sangre del contenido enzimático de los hepatocitos afectados, utilizándose como indicador para detectar posibles patologías en las funciones del hígado.	Concentración de enzima marcadora de daño en el citosol del hepatocito.		
Gamma glutamiltranspeptidasa (γ-GT / GGT)		Concentración de enzima marcadora de daño hepático específica para estrés oxidativo.		
Diagnóstico histopatológico		Grado de daño hepático a nivel microscópico	Ausente Leve	ORDINAL

del hígado			Leve a Moderado Moderado Severo	
------------	--	--	---	--

1.2.3.- Interrogantes básicas:

- a) ¿Cuál es el efecto protector del EDTA en ratas con daño hepático inducido por paracetamol?
- b) ¿Cuáles son los niveles de transaminasas antes y después de haber suministrado el EDTA e inducido el daño hepático con paracetamol?
- c) ¿Cuáles son los niveles de transaminasas antes y después de inducir el daño hepático con paracetamol y suministrar el EDTA?
- d) ¿Cuál es el grado de daño histopatológico del hígado en los grupos experimentales?

1.2.4.- Tipo de investigación: experimental sobre el efecto protector del EDTA en ratas con intoxicación hepática por Paracetamol

1.2.5.- Nivel de Investigación: Es un estudio de investigación prospectivo, longitudinal de tipo experimental

1.2. JUSTIFICACIÓN

El hígado es un órgano fundamental en la vida y tiene una participación importante en muchos procesos fisiológicos esenciales. Una de sus principales funciones es biotransformar una amplia variedad de sustancias endógenas y exógenas, como fármacos y toxinas, en subproductos inocuos.

Está bien demostrado que enfermedades hepáticas con alta incidencia como la cirrosis, hígado graso no alcohólico (NAFLD), hepatitis virales y el carcinoma hepatocelular, alteran la fisiología, el metabolismo y la citoarquitectura del hígado. En estos estados fisiopatológicos prevalecen estrechamente procesos oxidativos y la liperoxidación de las membranas celulares (estrés oxidativo). La protección y pronta recuperación del hígado es de suma importancia para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Nuestro país posee una importante biodiversidad vegetal en su territorio y la cultura de los pueblos se ha caracterizado por el uso directo de las plantas sin más modificación que la provocada por su deshidratación y decocción; estableciendo tradicionalmente alternativas viables para ayudar a resolver sus problemas de salud sobre todo en aquellos grupos desfavorecidos social y económicamente.

Actualmente el tratamiento con plantas medicinales, considerado una práctica de la medicina alternativa, está siendo cada vez más aceptada y su aceptación es más significativa en países desarrollados como el Reino Unido, alcanzando un auge insospechado. A pesar de tener una larga historia de saber popular, ha sido menospreciada por los profesionales de la salud en especial médicos. La información científica sobre la utilidad de las plantas, hace que el nutricionista como agente de salud, tome ventaja y se vea cada vez más obligado a tener un conocimiento serio y objetivo sobre la utilidad real de las mismas.

Por su parte el EDTA constituye un quelante del hierro así como de otros cationes divalente que permite bloquear el efecto tóxico de ciertas drogas como el paracetamol.

Por lo anteriormente mencionado, este trabajo pretende contribuir a incrementar los conocimientos del profesional en salud con la finalidad de que obtenga más herramientas a su favor y pueda plantear, en este caso, un enfoque terapéutico que coadyuve a solucionar diversas patologías hepáticas o a mejorar los efectos colaterales de la medicina ortodoxa.

2. MARCO CONCEPTUAL:

2.1. DEFINICIONES:

HEPATOPROTECTOR: Es aquel agente o sustancia que tiene principios activos protectores, los cuales aumentan el nivel de detoxificación hepática, evitando la sobrecarga de las vías de conjugación, disminuyendo así el daño hepático.

HEPATOREGENERADOR: Es aquel agente o sustancia que tiene principios activos antioxidantes, que actúan después de provocado el daño hepático, bloqueando los radicales libres, protegiendo de forma eficaz la estructura y función de las células del hepatocito promoviendo así la síntesis proteica.

2.2 PARACETAMOL:

El paracetamol o acetaminofén es una droga analgésica-antipirética que se comercializa libremente sin necesidad de prescripción médica.

FARMACOLOGÍA

El acetaminofén, introducido en la medicina desde 1893 por von Mering, es un metabolito activo de la fenacetina, analgésico derivado de la anilina (una tintura).

Posee efectos analgésicos y antipiréticos pero su mecanismo de acción no se ha explicado satisfactoriamente.

A diferencia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) presenta una acción antiinflamatoria débil, inhibe pobremente a la ciclooxigenasa (COX), principalmente en el sistema nervioso central y no interactúa en la activación de los neutrófilos.

Se absorbe rápido por el tubo digestivo, alcanzando concentraciones máximas a los 30-60 min; su vida media es de 2 hs; se distribuye uniformemente en los líquidos corporales. (18)

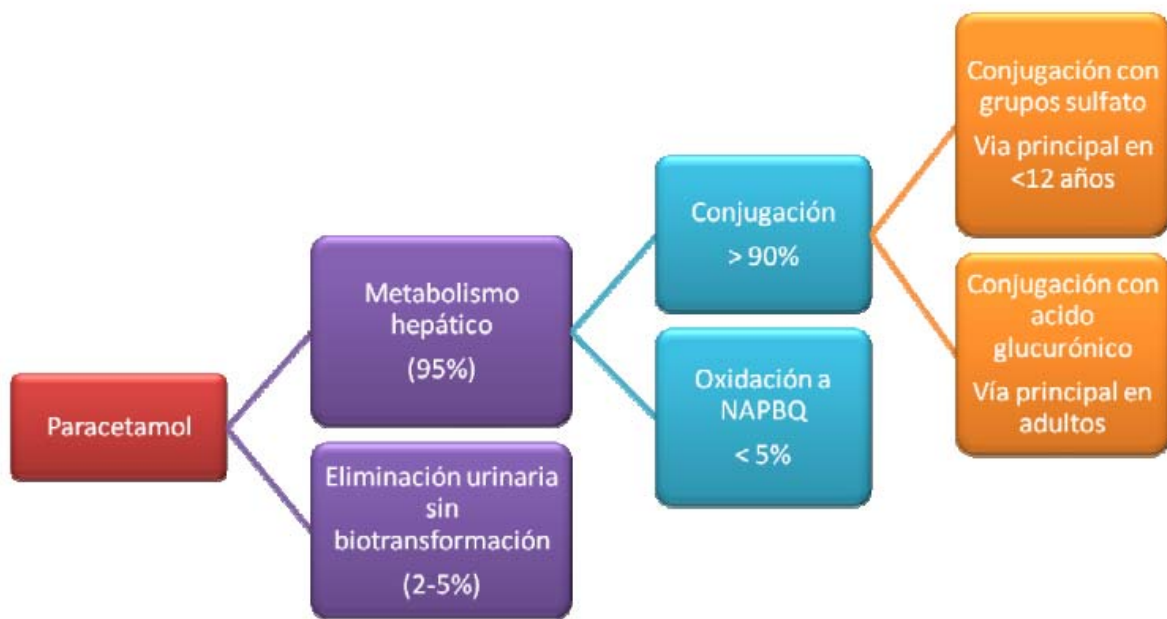
METABOLISMO

Cuando el paracetamol es administrado a dosis terapéuticas en adultos, el 95% es metabolizado en el hígado y el resto se excretan inalterada por la orina.

El paracetamol presenta metabolismo hepático por conjugación con ácido glucurónico (60%), ácido sulfúrico (35%). Una pequeña parte del fármaco (5%) se N-hidroxila por el citocromo P450 (CyP) 2E1 hasta formar N-acetil p-benzoquinoneimina (NAPQI) que interacciona con los

grupos sulfidrilos del glutatión. El NAPQI normalmente es detoxificado (reducido) por el glutatión y la unión a grupos sulfidrilos.

En dosis terapéuticas el acetaminofén suele ser bien tolerado; ocasionalmente surgen erupciones cutáneas (urticaria, eritema); rara vez se asocia con fiebre medicamentosa, metahemoglobina, y hay reportes aislados de neutropenia, y pancitopenia, puede producir déficit de glucosa-6 fosfato-dehidrogenasa. Sus tres efectos adversos más severos son la toxicidad hepática por intoxicación aguda, el coma hipoglucémico y la nefropatía asociada al consumo crónico. (18)



TOXICIDAD:

La dosis requerida para producir toxicidad es desconocida, pues ésta varía en función de la actividad del citocromo P-450 (que es variable entre las personas), cantidad de glutatión, y su capacidad de regeneración. Sin embargo, en varios estudios retrospectivos se sugiere que puede existir toxicidad con dosis únicas superiores a 250 mg/Kg de peso, pero se prefiere aceptar una dosis menor para definir el riesgo de toxicidad, quedando ésta en una sola dosis de 7,5 g o más en adultos o 140-150 mg/Kg en niños. (20)

El acetaminofén presenta efectos tóxicos dependientes de la dosis, causando necrosis de los hepatocitos predominantemente en la región centrolobulillar, correspondiente a la zona 3 del acino hepático de Rappaport 2 (fig. 1)

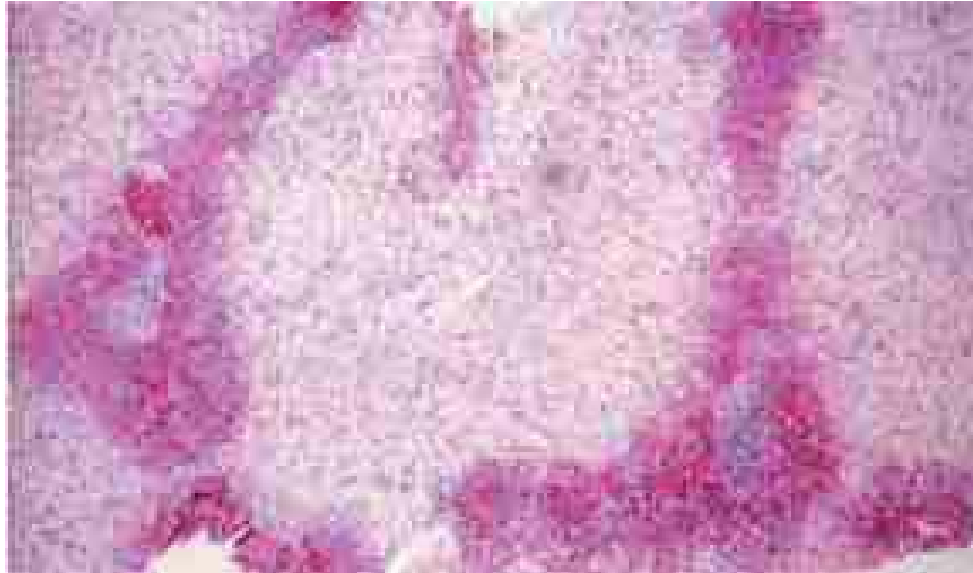
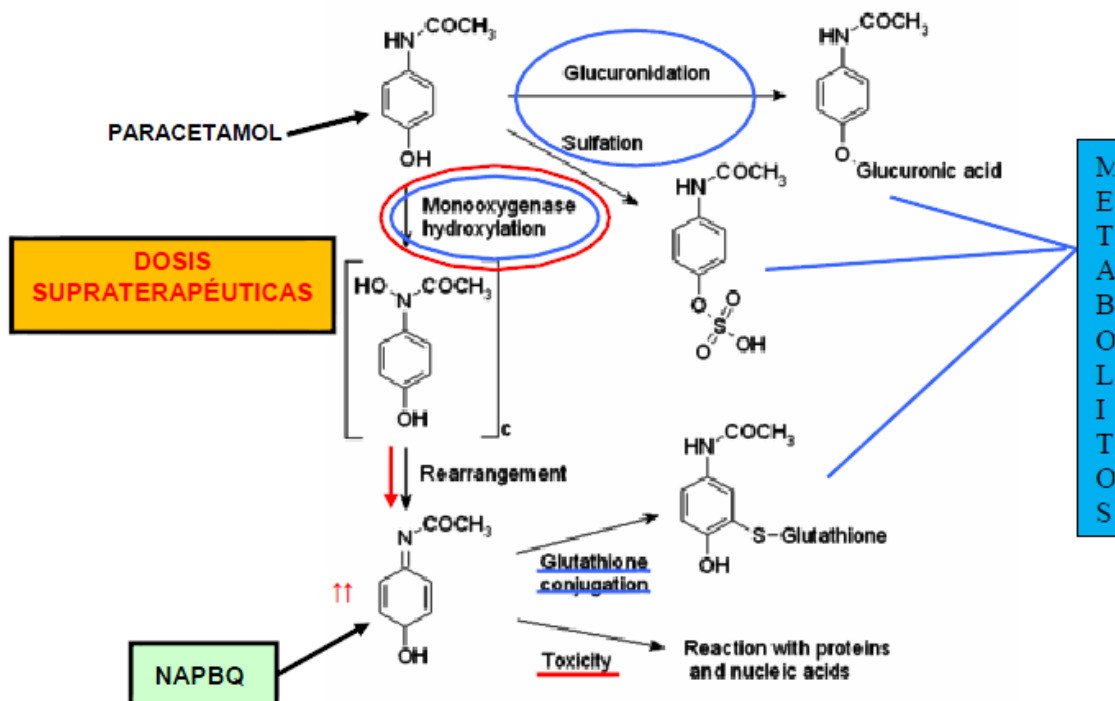


Figura N° 1. Necrosis centrolobulillar severa con conservación de los espacios portales y los hepatocitos periportales.

Las bases de la toxicidad por paracetamol están bien estudiadas. Al ingerir dosis grandes de la droga el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera cantidades de NAPQI capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. Este metabolito ejerce su toxicidad al unirse de forma covalente a macromoléculas y produciendo radicales libres, desarrollando necrosis hepática en tan sólo 12 horas (21). En mucha menor medida, el mismo proceso puede ocurrir en el riñón y contribuir a la nefrotoxicidad.

La toxicidad es mayor cuando se asocian inductores del citocromo P450 (etanol -CYP2E y CYP3A -; fenobarbital -CYP2B y CYP3A-, carbamacepina, fenitoína, rifampicina, zidovudina) o aquellos que compiten en la conjugación (dicumarol, morfina, prednisona, salicilatos, estrógenos) incrementando la formación del metabolito tóxico.

El consumo crónico de etanol, que también provoca lesión centrolobulillar, altera el metabolismo del paracetamol por dos mecanismos. Por un lado, agota las reservas de glutatión *per se*, disminuyendo la capacidad de detoxificación del NAPQI. Además, como inductor del citocromo P450 (CYP2E1 Y CYP1A2) incrementa la transcripción de este grupo enzimático, aumentando la proporción de la droga que es convertida en NAPQI. (22)



EPIDEMIOLOGÍA

El primer caso reportado de hepatotoxicidad por paracetamol fue en el año 1966, Inglaterra.

La toxicidad por paracetamol afecta mayoritariamente a personas de mediana edad (42 años), más frecuentemente en mujeres.

La sobredosis con paracetamol es la causa más frecuente de insuficiencia hepática aguda (40%), seguida de las reacciones idiosincráticas (12%), desplazando a las de origen viral (HVA y HVB). En un 20% se desconoce la etiología.

Acetaminofen es usado y vendido como analgésico para los alcohólicos por causar menos gastritis que la aspirina. Los alcohólicos presentan un riesgo mayor de consumir paracetamol y de exceder las dosis recomendadas.

Sin embargo, queda claro que esta asociación empeora la toxicidad hepática y este riesgo está pobremente reconocido por los médicos y los organismos reguladores. (23)

Inglaterra, en 1998, ante el gran número de muertes por año debidas a sobredosis con AINEs y paracetamol (en ese país asociado con más de la mitad de los casos de insuficiencia hepática), se legisló la disminución de la cantidad de comprimidos por venta y la inclusión de advertencias sobre la toxicidad en el envase. Esta medida disminuyó la morbi-mortalidad (20%), así como el número de trasplantes hepáticos relacionados con la ingesta de paracetamol (50%).

2.3 ETILENDIAMINO TETRAACETATO (EDTA)

Etilendiamino tetraacetato (EDTA) en la actualidad es utilizado para quelar metales como el plomo en intoxicaciones, quelante de calcio en el tratamiento de hipercalcemia y anticoagulante en bancos de sangre así como para remover el hierro en exceso a consecuencia de excesivas transfusiones sanguíneas en el tratamiento de talasemias, así mismo el EDTA podría actuar como agente antioxidante indirecto ya que se une al hierro que es el precursor de los radicales libres de oxígeno el cual produce daño produciendo lipooxidación de las membranas celulares de los hepatocitos.

1. Técnica para inducir daño hepático en las unidades experimentales

Fundamento:

El paracetamol presenta efectos tóxicos dependientes de la dosis, causando necrosis de los hepatocitos predominantemente en la región centrolobulillar (1)

Las bases de la toxicidad por paracetamol están bien estudiadas. Al ingerir dosis grandes de la droga, el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera cantidades de NAPQI (N-acetil-p-benzoquinonemina) capaces de agotar las reservas hepáticas de glutatión. Este metabolito tóxico se acumula fijándose por enlace covalente a aminoácidos de enzimas y otras proteínas hepáticas a las cuales inactiva, produciendo radicales libres, desarrollando necrosis hepática (2).

Procedimiento:

Se inducirá toxicidad hepática en las unidades experimentales con paracetamol a dosis de 200 mg/kg de peso corporal administrado por vía intraperitoneal durante 5 días.

Determinación del rendimiento de la extracción

Fundamento

La determinación del porcentaje de sólidos solubles conocido como %RE (de porcentaje de rendimiento de extracción) se basa en el método gravimétrico. El cuál consiste en la determinación de la diferencia de peso al evaporar todo el solvente del extracto obtenido.

1. MÉTODOS

1.1.Extracción de sangre y análisis de laboratorio:

Antes de la administración de tratamientos, se determinara los niveles basales de transaminasas, para ello se someterá a las unidades experimentales a previo ayuno de 12 horas, para posteriormente extraer la muestra de sangre de la cola por el método de Archer, en el cual se limpia la cola de la rata con alcohol puro y algodón, luego se calienta la cola con un previo masaje para extraer la sangre en un capilar.

Al término del periodo experimental, los animales, serán sometidos a previo ayuno de 24 horas y se le extraerá sangre por el método anteriormente mencionado. Luego se procederá a determinar las concentraciones finales de TGO, TGP y GGT.

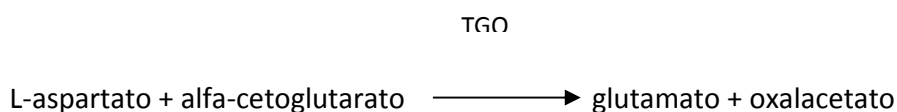
1.2.Determinación de Transaminasa Glutámico-oxalacética(TGO) yTransaminasa glutámico-pirúvica (TGP)

Método

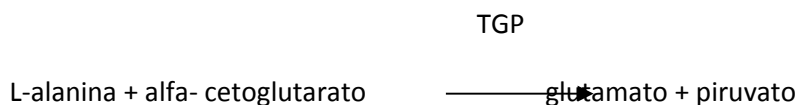
Métodocolorimétrico según Reitman y Frankel para la determinación de la transaminasa glutámica-oxalacética (TGO) y transaminasas glutámica pirúvica (TGP) en suero.

Fundamento del método

La TGO cataliza la siguiente reacción:



La TGP cataliza la siguiente reacción:



El piruvato o el oxalacetato formado, reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciendo en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Preparación de reactivos

Sustrato TGO: solución conteniendo 100 mmol/L de L-aspartato y 2 mmol/L de alfa-cetoglutarato en buffer fosfato 100 mmol, pH 7,4.

Sustrato TGP: solución conteniendo 200 mmol/L de L-alanina y 2 mmol/L de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mmol/L, pH 7,4. Ambos sustratos están listos para usar.

Reactivo 2,4-DNFH: solución conteniendo 1 mmol/L de 2,4 DNFH en HCl 1 mmol/L listo para usar.

Diluyente para enzimas concentrado: solución de Na (OH) 0,4 mol/L, preparar diluyendo a 1 litro con agua destilada según las instrucciones del rótulo. Es estable a temperatura ambiente. Estándar: listo para usar.

Procedimiento

En dos tubos de fotocolorímetro marcados B (blanco) y D (desconocido) colocar:		
	B	D
Sustrato (TGO o TGP)	100 μ l	100 μ l
Incubar 5 minutos a 37 °C en Baño María y agregar:		
Suero	-	20 μ l
agua	20 μ l	
Incubar 30 minutos a 37 °C en Baño María y agregar:		
Reactivo de color (2,4-DNFH)	100 μ l	100 μ l
Incubar 10 minutos a 37 °C en Baño María, luego agregar:		
NaOH 0,4 mol/L	1 ml	1 ml
Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 2 minutos, leer en fotocolorímetro con filtro verde (500-550 nm) en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero D.O con agua destilada.		

Cálculo de los resultados empleando tablas de conversión

Este cálculo se basa en la absorbancia del cromógeno y los valores de actividad enzimática pueden deducirse de las tablas de conversión, siempre que las lecturas se efectúen en cubetas de caras paralelas y los aparatos cumplan las siguientes condiciones de medida:

Longitud de onda : 505nm

Semiancho de banda : ≤ 8 nm

Espesor de cubeta : 1,00 cm

Valores normales en ratas (según Altman y Raymund, 1969) (5)

TGO= Valor Promedio 55.4 Valor referencial 5-80 UI/L

TGP= Valor Promedio 25.2 Valor referencial 5-80 UI/L

Determinación de Gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT)

Método

Se usa el método cinético Wiener para la determinación de Gamma-glutamyltranspeptidasa en suero.

Fundamento

La gamma-glutamyltranspeptidasa es una carboxipeptidasa que cataliza la siguiente reacción:



La actividad enzimática se mide leyendo la velocidad de color amarillo de la p-nitroanilina a 405 nm.

Preparación de reactivos

Buffer: Solución de glicilglicina 60 mmol/l tamponada con buffer tris 0.1M para pH final 8.2 (a 25°C).

Sustrato: Tubos conteniendo 12 umoles de Gamma-glutamyl p-nitroanilida y estabilizantes. Cada tubo de sustrato permite efectuar una determinada cinética.

Procedimiento

En una cubeta mantenida a la temperatura seleccionada colocar:	
Sustrato (reconstituido)	3 mL
Incubar unos 3 minutos. Luego agregar:	
Muestra	200 uL
Mezclar rápidamente y proseguir de inmediato la incubación (3 minutos). Ajustar la absorbancia a un valor de referencia (0.200 o 0.300 D.O). Registrar la absorbancia a los 1,2 y 3 minutos. Determinar la diferencia promedio de absorbancia ($\Delta A/\text{Min.}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	

Cálculo

$$\gamma\text{-glutamyl-transpeptidasa (U/L)} = \Delta A/\text{Min} \times 1.616$$

1.EVALUACIÓN HISTOLÓGICA POR METODO DE HARRIS

a) Obtención de la muestra

Los animales serán sacrificados por dislocación cervical.

Después de sacrificado el animal, inmediatamente se procederá a extraer de ellos, el hígado.

Fijación

El proceso de fijación preserva los tejidos deteniendo la autólisis y a la vez permite que los tejidos permanezcan sin cambios apreciables luego de subsecuentes tratamientos. La fijación se hará inmediatamente después de obtenidos los trozos de los órganos ya que cualquier demora seca el tejido y acelera la autólisis.

Las muestras se fijaran en formol al 10% por 24 horas, seguidamente se hacen los cortes necesarios, los cuales deberán tener un grosor de 3 a 5 mm., los mismos que se colocaran nuevamente en formol al 10% por una hora, debidamente etiquetados o rotulados para ser colocados en el autotecnichon.

Deshidratación y aclaración

Deshidratación

Para remover toda el agua de las muestras (tejidos), se tiene el siguiente recorrido:

Agua corriente,	1 hora
Alcohol 70%	1 hora
Alcohol 80%	1 hora
Alcohol 90%	1 hora
Alcohol 95%	1 hora
Alcohol 100%	1 hora
Alcohol 100%	1 hora

Aclaración:

En Xilol puro I por 1 hora

En Xilol puro II por 1 hora

a) Inclusión

Las muestras procedentes del xilol II se sumergirán en recipientes con parafina, este proceso de sumergir el tejido en una sustancia firme tal como la parafina es el medio de inclusión más utilizado con más frecuencia. Una vez incluidos los tejidos en la parafina I se lleva la muestra a la estufa a una temperatura de 60° C por espacio de 1 hora se trasladan a parafina II, también a temperatura de 60° C por espacio de 1 hora para luego proceder al bloqueo de las muestras.

Corte

Una vez extraídos los tejidos de la parafina, se procederá a la orientación e inclusión de tejidos en los moldes (placas de Leukart) con parafina diluida (caliente), para la orientación de la muestra se usa pinzas.

Los bloques formados se llevarán a refrigeración por espacio de 1 hora, para endurecer la parafina lo cual favorece con el corte de las muestras, se procede al corte mediante el micrótopo deslizante.

El corte de las muestras nos permitirá obtener “las cintas” de las mismas. Estas cintas mediante pinzas se colocaran en un flotador de tejidos (que contiene agua caliente: Baño María 50°C). El Baño María extiende los cortes histológicos (evitar la presencia de arrugas y aire atrapado); una vez bien extendidos los cortes, estos se colocan en las laminas portaobjetos recubiertas con albumina de Mayer (que favorece la adhesión de los cortes).

Coloración con Hematoxilina – Eosina

Para teñir los cortes histológicos adheridos en los portaobjetos se seguirán los siguientes pasos:

Empezaremos colocando las laminas portaobjetos en el xilol (xilol I) por 15 minutos para eliminar la parafina de los cortes; luego se pasará al otro recipiente con xilol (xilol II) para completar la eliminación de la parafina. Después de las láminas se trasladaran a los alcoholes de una batería de hidratación:

Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Alcohol 70%	1 minuto
Agua corriente,	1 minuto

Luego se procederá a la coloración siguiendo los siguientes pasos:

Hematoxilina de Mayer,	5 minutos
Agua corriente,	10 minutos
Agua destilada,	1 minuto
Eosina,	20 segundos
Alcohol 70%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto
Alcohol 100%	1 minuto

Finalmente se procederá al montaje (final de los cortes teñidos) usando unas gotas de bálsamo de Canadá y laminillas cubreobjetos. Se dejará secar el bálsamo para luego hacer las evaluaciones correspondientes y etiquetar las láminas. (10)

Diagnostico histopatológico:

El diagnostico histopatológico de las muestras obtenidas se realizará en el laboratorio de Anatomía Patológica. Esta evaluación histopatológica se realizara en cada una de las láminas permanentes del hígado para cada tratamiento.

**INDICADOR DE ACTIVIDAD HISTOLOGICA MODIFICADA
.NIVELES NECROINFLAMATORIOS**

Daño ausente	0
Leve (focal, algunas áreas portaes)+	1
Leve –moderada (focal, mas áreas portaes)++	2
Moderado (continuo menos del 50%) +++	3
Severo (continuo más del 50%) ++++	4

FUENTE:IshakK.G (1998)

2) ANALISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En el ámbito local:

Ninguno

En el ámbito nacional

Ninguno

En el ámbito internacional

Ninguno

3) OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

2. Determinar el efecto protector del EDTA en ratas con daño hepático inducido por paracetamol.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4) Comparar los niveles de transaminasas antes y después de haber suministrado el EDTA e inducido el daño hepático con paracetamol.
- 5) Comparar los niveles de transaminasas antes y después de inducir el daño hepático con paracetamol y suministrar el EDTA.
- 6) Evaluar el grado de daño histopatológico del hígado en los grupos experimentales.

4) HIPOTESIS

El EDTA disminuye los niveles de transaminasas TGO, TGP y GGT; protege y regenera la citoestructura del hígado de *Rattus norvegicus* con daño hepático inducido por paracetamol.



II. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. MUESTRA DE ESTUDIO

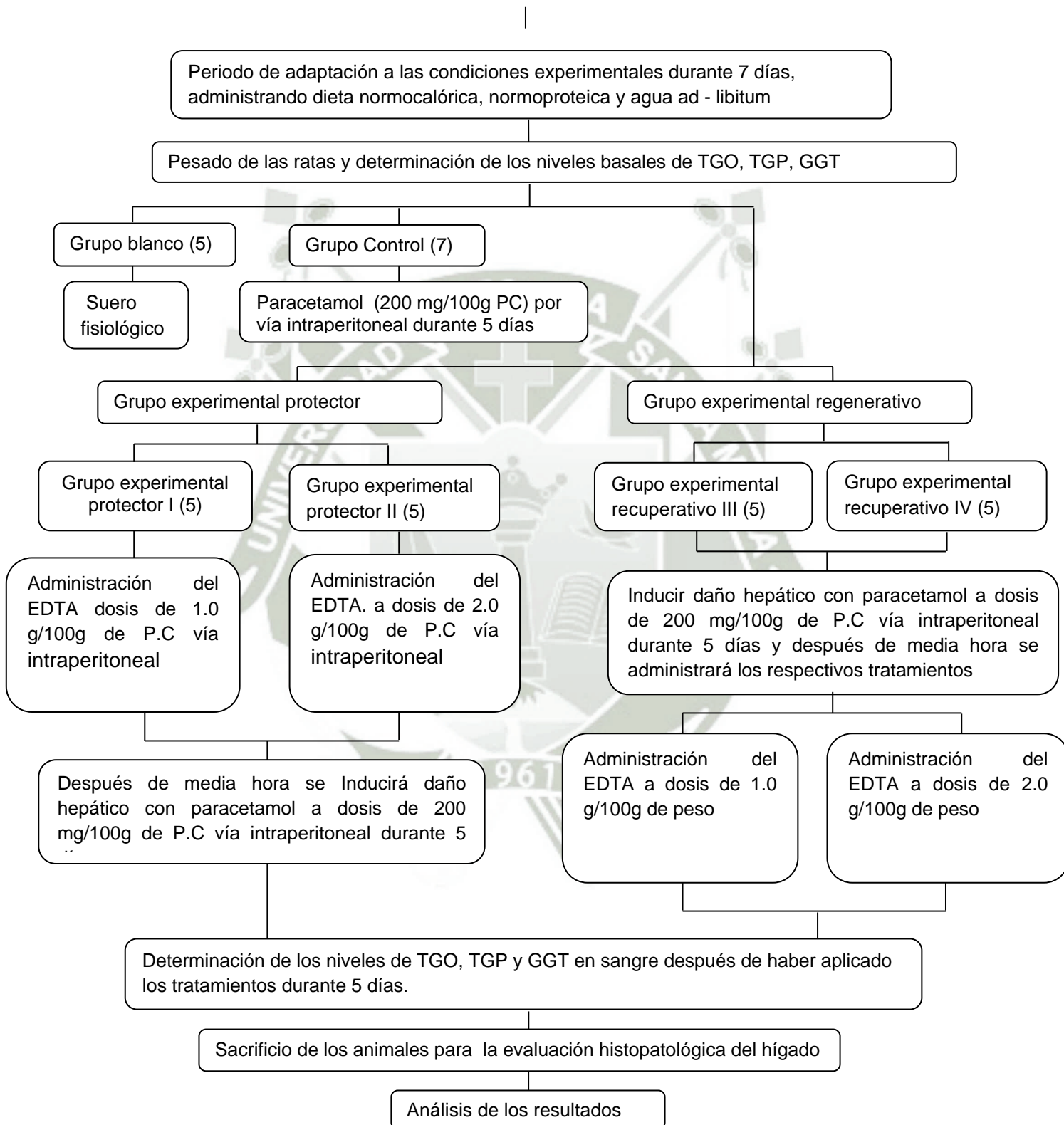
Se utilizará un total de 38 ratas machos *Rattus norvegicus* de tres meses de edad, y 240 g de peso corporal como promedio, lo que constituye una muestra por conveniencia del investigador.

La obtención de la muestra se hará por muestreo aleatorio simple, ya que se escogerá a las ratas que cumplan con los criterios de interés para el experimento y se dividirá al azar en 6 grupos de 5 ratas, exceptuando el grupo control al cual se le añadirá 2 ratas para evaluar hematológica e histológicamente el grado de daño hepático por paracetamol.



3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Muestra: son 38 ratas machos *Rattus norvegicus* divididos en 5 grupos de 5 ratas cada uno y un grupo de 7 ratas



4. TÉCNICAS

a. Estandarización de las condiciones ambientales

Durante los 7 días previos al inicio de la fase experimental, se estandarizarán las condiciones alimentarias, la cual consistirán en 30g de pelex del concentrado para mantenimiento TOMASINO® cada 24 horas, permitiendo a los animales que se alimenten y beban agua *ad libitum*. Manteniéndose a los animales en jaulas, se someterán a periodos de luz y oscuridad de 12 horas, una temperatura ambiente de 18°C y humedad relativa entre 30 y 60 %.

b. Técnica para determinar el efecto protector y regenerativo del extracto acuoso de *Schinus molle L.*

GRUPO BLANCO: Constituido por 5 ratas, que recibirán suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del EDTA después de 30 minutos se administrará nuevamente suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del paracetamol. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días

GRUPO CONTROL: Constituido por 7 ratas, que recibirán suero fisiológico por vía intraperitoneal en lugar del EDTA después de 30 minutos se administrará paracetamol a dosis de 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

El primer día de administrado el tratamiento, se sacrificará dos unidades experimentales, con la finalidad de asegurar y evaluar el daño hepático por paracetamol a nivel hematológico e histológicamente y si fuese necesario se realizará un reajuste de la dosis de paracetamol.

GRUPO EXPERIMENTAL PROTECTOR 1: Constituido por 5 ratas, a las cuales se les administrará EDTA a dosis de 1.0g/100g por vía intraperitoneal y después de 30 minutos se provocará la injuria con la dosis tóxica de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL PROTECTOR 2: Constituido por 5 ratas, a las cuales se les administrará EDTA a dosis de 2.0mg/100g por vía intraperitoneal y después de 30

minutos se provocará la injuria, con la dosis tóxica de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL RECUPERATIVO 1: Constituido por 5 ratas, que recibirán dosis tóxicas de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal, después de 30 minutos se administrará EDTA a dosis de 1.0g/100g por vía intraperitoneal. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

GRUPO EXPERIMENTAL RECUPERATIVO 2: Constituido por 5 ratas, que recibirán dosis tóxicas de paracetamol 200mg/100g por vía intraperitoneal, después de 30 minutos se administrará EDTA a dosis de 2.0 g/100g por vía intraperitoneal. Se repetirá este procedimiento una vez al día, durante 5 días.

Al final del estudio se sacrificarán los animales previas extracciones de sangre, para evaluar niveles de transaminasas finales y se les extraerá el hígado para el estudio histopatológico.

1. RECURSOS

a) Recursos humanos

- Bachiller en Medicina
- Asesor
- Colaboradores

b) Recursos biológicos

- EDTA
- *Rattus norvegicus* variedad SpragueDawley.

c) Equipos

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Estufa
- Cocina Eléctrica
- Espectrofotómetro
- Microscopio

- Rotavapor
- Agitador

d) Recursos de laboratorio

- Bagueta
- Embudo
- Hojas de bisturí
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Gradilla
- Mortero
- Papel filtro
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Soporte universal
- Termómetro
- Vaso precipitado
- Matraz
- Micropipetas
- Fiolas
- Varilla
- Probeta
- Luna de reloj

e) Reactivos

- Kit para TGP, TGO, GGTValk. Sensibilidad 95%, especificidad 98%.
- Paracetamol
- Formol

f) Material anexo

- Sonda orogástrica
- Jaula metálica
- Algodón
- Agua destilada

- Alcohol
- Esparadrapo
- Espátula

g) **Recursos Financieros**

- Autofinanciado



2. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	Setiembre 2012				Octubre 2012				Noviembre 2012				febrero 2013				marzo 2013			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Revisión de la bibliografía	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
2. Formulación del proyecto.	■	■	■	■																
3. Presentación y revisión					■	■	■	■												
3. Diseño experimental									■	■	■	■								
5. Tabulación de datos													■	■	■					
6. Análisis de resultados													■	■	■					
7. Presentación del informe final																	■	■	■	■



BIBLIOGRAFIA:

1. Agapito T, Sung I. (2000). *Fitomedicina: 1100 plantas medicinales*. Lima, Perú: Editorial Isabel I.R.L
2. Insel PA. *Acetaminophen. Goodman&Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ma Ed. McGraw-Hill 2000;677.*
3. Akiskal H. S., Alexander J. K., Alexson C. G., Altman R. D., Anderson K. E., Apatoff B. R., et al. (2006). *El manual Merck de información médica para el hogar*. [versión electrónica] Barcelona. Recuperado de: http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_10/seccion_10_114.html
4. Alva A, Bonilla P, Arroyo J. (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle L.* “molle” en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. [versión electrónica] *Revista Ciencia e Investigación*12(1), 29-36. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/v12_n1/pdf/a05v12n1.pdf
5. Byrne Y, Paredes C. (2010). Efecto protector y curativo de extracto acuoso de *Erythroxylum coca* en *Rattus norvegicus* var. SpragueDawley con insuficiencia hepática inducida con tetracloruro de carbono. [Tesis de grado]. Universidad Nacional De San Agustín. Arequipa, Perú.
6. Farfán G, Cabezas C. (2002). Mortalidad por enfermedades digestivas y hepatobiliares en el Perú.[versión electrónica]*Revista de Gastroenterología del Perú*. 22 (4), 310-323. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292002000400007&lng=es&nrm=iso.
7. Fuentes A, Gutiérrez B. (2008). Determinación de la actividad antibacteriana In vitro e In vivo del extracto de *Schinus molle L.* (molle). [tesis de grado]. Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
8. Gómez E. U., Agudelo Y, Berrouet M, C., Escobar I. E.(2008). Toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos.[versión electrónica] *Rev. médica Iatreia* 21(1), 41-48. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-07932008000100005&script=sci_arttext

9. Highleyman L, Franciscus A. (2009). El hígado: el paracetamol y el hígado. [versión electrónica] HCSP. 2.1 (1), 2. Recuperado de: http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/sp_factsheets/Paracetamol.pdf
10. Linch, Raphael, Mellor, Sapre, Inwood. (1979). Métodos de laboratorio. Editorial Interamericana. México
11. Ministerio de Salud. Principales causas de mortalidad departamento de Arequipa, 2010. Lima: Perú. recuperado de: <http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/Mortalidad/Macros.asp>
12. Ochoa C., Granada C., Chapoñan M., Borja R., Borjas P., Ortiz J. y col. (2008). Efecto protector de *Peumus Boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. [versión electrónica] *Rev. Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*; 13(1), 20-25. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/cimel/v13_n1/pdf/a05v13n1.pdf
13. Schuppan D, Afdhal N. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet* Mar 8; 371(9615), 838-851.
14. Tejada C. F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. [versión electrónica]. *Rev. Clínica de Medicina y Farmacia*. 3(3), 177-191. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000300006&lng=es.
15. Troncoso L., Guija E. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinumsativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. [versión electrónica.] *Anales de la Facultad de medicina*. 68(4), 333-343. Disponible en: [URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832007000400008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832007000400008&lng=es&nrm=iso).
16. Vásquez C. (2007). Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el daño inducido por tetracloruro de carbono, sobre TGO y TGP y cambios histológicos en el hígado de *Rattus norvegicus* var. Spraguedawley [tesis de grado]. Universidad Nacional De San Agustín, Arequipa, Perú
17. World Health Organization. The world health report 2003: Shaping the future. Geneva: GHO.
18. Howard, C. M., Thomas, R. C. (1998). Acetaminophen. En: *Viccellio P Emergency Toxicology. 2 da Ed. Lippincott-Raven. 559-80.*

19. Sisamon, I. (2003). acerca de la hepatotoxicidad del paracetamol . *Revista del Hospital Privado de Comunidad.* (6), 2
20. Russo, D. K. (2002). Artículo Paracetamol. Recuperado de: http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol8Numero5/Articulo.pdf
21. William, M. L. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* (349), 474-85.
22. Thummel, K. E., Slattery, J.T. (2000). Ethanol and production of the hepatotoxic metabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 67(6):591-9.
23. Keith, H., Ellen, T. (2001). Effects of legislation restricting pack sizes of paracetamol and salicylate on self poisoning in the united kingdom: *before and after study* BMJ. (322), 1-7.



ANEXOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA N° :

GRUPO : CONTROL

TRATAMIENTO :DOSIS:

DATOS	FECHA	PESO INICIAL	TGO BASAL	TGP BASAL	GGT BASAL
RATA 1					
RATA 2					
RATA 3					
RATA 4					
RATA 5					
RATA 6					
RATA 7					