



ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

MORPHOMETRIC STUDY IN A HEPATOPROTECTION MODEL WITH THREE MEDICINAL PLANTS

ESTUDIO MORFOMÉTRICO EN UN MODELO DE HEPATOPROTECCIÓN CON TRES PLANTAS MEDICINALES

Pedro Sánchez¹; Marisabel García¹; Migdalia Rodríguez²; Iván Triana¹ & Elena Menéndez¹

¹ Universidad de Ciencias Médicas Dr Serafin Ruiz de Zárate Ruiz, Villa Clara. Cuba.

² Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. La Habana. Cuba.

Email: migdaliarr@infomed.sld.cu

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 407-417.

ABSTRACT

Morphometry is useful for the investigation in diverse specialties, including histology. An analytical study was carried out in the University of Medical Sciences of Villa Clara, to describe the morphometric modifications of the liver after the administration of extracts of *Allium sativum* L., *Ocimum basilicum* L, and *Mentha x piperita* L. in a hepatoprotection model before acute toxicity was induced by paracetamol. Groups of animals that received doses of 200 and 400 mg·kg⁻¹ of weight of the aqueous extracts of the plants were evaluated with a hepatic damage group and another control group without treatment. The study was carried out in liver samples fixed in 10% neutral formol. The imaging was performed with a Canon digital camera coupled to an Optech binocular microscope (objective 40X), using the morphometric system ImageJ. The hepatocytes of the three zones of the hepatic lobes of Rappaport were studied. There were not significant morphometric alterations among the groups, although there existed variations among some analyzed variables. The nucleus area / cytoplasm area remained within normal limits and no differences in the number of sinusoides were number. The groups with the doses of 400 of *O. basilicum* and 200 of *A. sativum* presented the morphometric values of greatest similarity to the control group without treatment; it coincides with those attributed with a greater liver protective effect. It is recommended to use hepatotoxicity models that evaluate the morphometric alterations that occur 5 days from the exposure to the toxin.

Keywords: liver protection model, medicinal plants, morphometry, toxic.

RESUMEN

La morfometría resulta útil para la investigación en diversas especialidades, entre ellas la Histología. Se realizó un estudio analítico en la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, para describir las modificaciones morfométricas del hígado luego de la administración de extractos de *Allium sativum* L., *Ocimum basilicum* L. y *Mentha x piperita* L. en un modelo de hepatoprotección ante toxicidad aguda inducida por paracetamol. Se evaluaron grupos de animales que recibieron dosis de 200 y 400 mg·kg⁻¹ de peso de los extractos acuosos de las plantas con un grupo de daño hepático y otro grupo control sin tratamiento. El estudio se realizó en muestras de hígado fijadas en formol neutro al 10%. Se realizó la captación de imágenes con cámara digital Cannon, acoplada a microscopio binocular Optech (objetivo 40X), con el sistema morfométrico ImageJ. Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del lobulillo hepático de Rappaport. No se encontraron alteraciones morfométricas significativas entre los grupos, a pesar de existir variaciones entre algunas variables analizadas. La relación área núcleo/área citoplasma se mantuvo entre los límites normales y no se encontraron diferencias en el número de sinusoides. Los grupos con las dosis de 400 de *O. basilicum* y 200 de *A. sativum* presentaron los valores morfométricos de mayor similitud al grupo control sin tratamiento, lo que se correspondió con aquellos de mayor efecto hepatoprotector atribuido. Se recomienda emplear modelos de hepatotoxicidad que evalúen las alteraciones morfométricas transcurridos 5 días de la exposición al tóxico.

Palabras clave: modelo de hepatoprotección, morfometría, plantas medicinales, tóxico.

INTRODUCCIÓN

El hígado constituye el centro fundamental de transformación de sustancias endógenas y exógenas del organismo humano, elimina agentes potencialmente tóxicos y participa en la síntesis y distribución de nutrientes incorporados al metabolismo. Sus funciones son vitales, con gran capacidad de metabolización de productos químicos, por ello, la afectación de cualquiera de sus funciones trae como consecuencia graves alteraciones en el metabolismo corporal y en su homeostasis (Angosto 2008). El hígado funciona como un verdadero ecosistema, en el cual, los diversos componentes de su unidad estructural están funcionalmente interrelacionados y responden en forma unitaria a la agresión (Medina *et al.* 2012). El daño inducido al hígado por compuestos químicos diversos, causa en muchas ocasiones

un severo desorden funcional así como a nivel de la estructura macroscópica y microscópica del órgano (Jiménez & Kuhn 2012). Un ejemplo clásico de una sustancia que con su uso excesivo causa estos trastornos, es el paracetamol o acetaminofén, muy usado como analgésico y antipirético por su bajo costo y amplia disponibilidad (Puiguriguer *et al.* 2010).

La estructura del acino hepático trata de interpretar el funcionamiento del hígado. Se describe a los hepatocitos en tres zonas elípticas, la zona periportal, la zona intermedia y la zona perivenosa, lo que se emplea habitualmente en la descripción de las lesiones degenerativas del mismo, así como en las regeneraciones y efectos tóxicos en el parénquima. Las lesiones hepáticas por isquemia o exposición a sustancias tóxicas, se pueden explicar por la interpretación de las lesiones en estas tres zonas (Angosto 2008).

Buscar medicamentos para proteger al hígado de los efectos nocivos de sustancias hepatotóxicas que el hombre puede ingerir, o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicálicos, es de suma importancia y los agentes que son capaces de hacerlo son llamados hepatoprotectores (Wen *et al.* 2013).

Si se acude a la Fitoterapia como alternativa terapéutica, se hace referencia a los flavonoides, los cuales ocupan un lugar cimero en la actualidad, por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores. Las plantas *Allium sativum* L., *Ocimum basilicum* L. y *Mentha x piperita* L. se encuentran dentro del grupo de plantas medicinales con acción hepatoprotectora atribuida y/o comprobada (Ramos 2011, Toledo *et al.* 2014).

Mentha x piperita es conocida como menta o toronjil de menta. El género *Mentha* está representado aproximadamente por treinta especies que pertenecen a la familia Lamiaceae. Esta especie se considera un híbrido natural, cultivada actualmente en gran parte de América y en muchos otros países. *O. basilicum* es conocida comúnmente como albahaca blanca. El género *Ocimum* está representado por más de 150 especies de la familia Lamiaceae (Labiatae) y tiene una amplia distribución geográfica por todas las regiones de clima tropical y subtropical. *A. sativum* es conocido comúnmente como ajo. Pertenece a la familia de las Liliáceas y aunque posee un origen incierto, se le considera oriundo de Asia Central desde donde se extendió a toda Europa y luego hacia América (Ramos 2011, Toledo *et al.* 2014).

Estas plantas están ampliamente distribuidas en Cuba y son conocidas y aplicadas por practicantes tradicionales, médicos con conocimientos de Medicina Natural y Tradicional y población en general. Se han

desarrollado estudios farmacológicos preclínicos para corroborar el efecto hepatoprotector de las mencionadas especies, pero los mismos carecen de la morfometría, basada en los sistemas computacionales actuales, que brinde toda la información histológica para respaldar en detalle la acción demostrada. El empleo de mediciones morfométricas permite obtener datos cuantitativos de gran valor pronóstico para evaluar daños celulares presentes en varias enfermedades (Hamabe *et al.* 2013). El estudio de variables morfométricas como el área nuclear y del citoplasma resulta de gran utilidad para evaluar los efectos de los extractos de las plantas medicinales señaladas como posibles protectores hepáticos (Vertemati *et al.* 2012). La cuantificación histo-morfológica precisa y objetiva permite la correcta evaluación de modelos experimentales, y contribuye al diagnóstico y valoración pronóstica de enfermedades así como la validación de propiedades medicinales atribuidas a diversas especies medicinales (Rosas *et al.* 2010). Por todo esto, se realizó un estudio con el objetivo de describir las modificaciones morfométricas del hígado producidas luego de la administración de extractos de *A. sativum*, *O. basilicum* y *Mentha x piperita* L. en un modelo de hepatoprotección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico con enfoque cuantitativo en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas Dr Serafín Ruiz de Zárata Ruiz de Villa Clara, Cuba, en el período comprendido desde septiembre 2011 hasta diciembre 2014.

La muestra se obtuvo de un experimento realizado en la Unidad de Toxicología Experimental de dicha Universidad para la evaluación de la actividad hepatoprotectora sobre un modelo de insuficiencia hepática

aguda inducida por paracetamol en ratones (Toledo *et al.* 2014). En este modelo se emplearon 10 animales por grupo (distribuidos aleatoriamente en ocho grupos experimentales), ratones adultos machos de la línea NMRI, de seis semanas de edad y con un peso vivo comprendido entre 24 y 30 g. Se emplearon extractos blandos de tres plantas elaborados por el Laboratorio Provincial de Plantas Medicinales de Villa Clara como sustancias con propiedades hepatoprotectoras atribuidas, y sobre la base de los sólidos totales se prepararon las soluciones de estudio garantizando las dosis de ensayo de $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso vivo. Los grupos I y II fueron tratados con *O. basilicum* L, a dosis de $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente. Los grupos III y IV recibieron $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de *M. x piperita*, y los grupos V y VI fueron tratados con las mismas dosis pero de *A. sativum*. El grupo VII se conformó como control de daño hepático (recibió paracetamol) y el grupo VIII como grupo control sin tratamiento al no recibir administración con los extractos vegetales de estudio ni ser expuesto al paracetamol (control negativo).

Técnicas y procedimientos

El estudio de morfometría hepática se realizó a partir de muestras de hígado fijadas en formol neutro al 10%, y procesadas por la técnica clásica de inclusión en parafina de dichos grupos de animales. Los bloques fueron cortados a 5 μm de grosor y se prepararon láminas que se colorearon con hematoxilina y eosina bajo control de pH. Se procedió a la realización del examen morfométrico de la muestra comenzando por la separación, clasificación y ordenamiento de las láminas. Se realizó la captación de imágenes con una cámara digital Cannon G11 semiprofesional, acoplada a un microscopio binocular Optech (objetivo 40X), digitalizadas para efectuar las mediciones con el sistema morfométrico ImageJ 1.44p del National Institute of Health, USA (Ferreira & Rasband 2012). Las opciones

de cálculo fueron área y conteo.

Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del lobulillo hepático de Rappaport: periportal, intermedia y perivenosa. Se midieron 10 células por cada zona y se analizaron las variables morfométricas: Área núcleo (AN); Área citoplasma (AC); Relación área núcleo/área citoplasma (AN/AC), y Densidad de los sinusoides hepáticos (conteo de todos los sinusoides que aparecieron en la imagen digitalizada, tantas veces como la imagen lo permitió).

El estudio que sirvió de base para el análisis morfométrico se ejecutó teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio en Farmacología y Toxicología Experimental y todas las actividades se ejecutaron según lo establecido por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO) y sujetos a las inspecciones programadas por la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), (PNO/REG/0004, PNO/ASC/0004). Se cumplieron los principios éticos de la experimentación animal así como las normas de Bioseguridad y Bioética establecidas para este tipo de estudio (Barrios *et al.* 2011). La investigación fue respaldada por los avales del Comité de Ética de la Investigación y de la Comisión Científica de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se mostró la relación área núcleo/área citoplasma en los ocho grupos de animales empleados en la investigación, distribuidos en los dos grupos de tratamiento con extractos de las tres plantas medicinales, el grupo con daño hepático y el grupo control. La media de estos resultados se encontró en valores cercanos a 0,3 en todos los casos.

Tabla 1. Estadísticas descriptivas de la relación área núcleo/área citoplasma de los grupos que recibieron extractos de plantas medicinales, el de daño hepático y el control negativo.

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<i>Ocimum b.</i> 200	240	0,05	0,43	0,23	0,07
<i>Ocimum b.</i> 400	270	0,09	0,61	0,25	0,08
<i>Mentha x p.</i> 200	360	0,06	1,03	0,28	0,11
<i>Mentha x p.</i> 400	330	0,05	0,48	0,23	0,07
<i>Allium s.</i> 200	270	0,1	0,51	0,27	0,09
<i>Allium s.</i> 400	270	0,06	0,41	0,22	0,06
Daño hepático	240	0 1	0,54	0,28	0,08
Sin tratamiento	420	0 1	1 48	0,27	0,10

La aplicación de pruebas paramétricas y no paramétricas al análisis del número de sinusoides no demostró diferencias entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación del número de sinusoides entre los grupos que recibieron extractos de plantas medicinales, el de daño hepático y el control negativo.

Grupos	N	Rango promedio	Media
<i>Ocimum b.</i> 200	24	138,29	13,71
<i>Ocimum b.</i> 400	27	115,11	13,11
<i>Mentha x p.</i> 200	36	107,94	12,50
<i>Mentha x p.</i> 400	33	115,56	13,15
<i>Allium s.</i> 200	27	112,57	13,04
<i>Allium s.</i> 400	27	127,63	13,48
Daño hepático	24	115,73	13,13
Sin tratamiento	42	131,68	13,6

Kruskal-Wallis
Chi-cuadrado = 5,086
p = 0,649

Anova
F = 1,074
p = 0,381

Todos los grupos fueron comparados entre sí, a través del análisis de los valores de las áreas núcleo y área citoplasma en las tres zonas definidas (periportal, perivenosa e intermedia). El empleo de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en la

comparación realizada entre los grupos por área, zona y planta, mostró diferencias significativas entre todos ($p < 0,05$), con excepción del área del núcleo en la zona perivenosa del *A. sativum* como se mostró en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre los grupos por áreas, zonas y plantas.

Planta	Zona					
	Periportal		Perivenosa		Intermedia	
<i>Ocimum basilicum</i>	Área	X ² = 62,262	Área	X ² = 9,302	Área	X ² = 24,856
	núcleo	p = 0,0	núcleo	p = 0,026	núcleo	p = 0,0
	Área	X ² = 55,313	Área	X ² = 55,726	Área	X ² = 47,849
<i>Mentha x piperita</i>	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,0
	Área	X ² = 21,061	Área	X ² = 8,863	Área	X ² = 47,209
	núcleo	p = 0,0	núcleo	p = 0,031	núcleo	p = 0,0
<i>Allium sativum</i>	Área	X ² = 44,102	Área	X ² = 28,631	Área	X ² = 91,068
	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,0
	Área	X ² = 10,587	Área	X ² = 5,598	Área	X ² = 9,252
<i>Allium sativum</i>	núcleo	p = 0,014	núcleo	p = 0,133	núcleo	p = 0,026
	Área	X ² = 30,822	Área	X ² = 48,874	Área	X ² = 12,244
	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,0	citoplasma	p = 0,007

Nota: Cada celda representa la comparación no paramétrica entre los grupos siguientes: Planta con dosis 200 mg·kg⁻¹. Planta con dosis 400 mg·kg⁻¹. Grupo con daño hepático. Grupo sin tratamiento.

La Tabla 4 mostró los resultados del análisis de varianza (Anova) aplicado a los grupos que emplearon *O. basilicum*, por zona para área núcleo y área citoplasma. Las comparaciones internas entre los grupos (pruebas de Tukey y Tamhane) arrojaron diferencias significativas para los 4 grupos por área y zona, con medias diferentes y p asociadas a las F < 0,05. En cada

celda se nombraron los grupos de comportamiento similar al grupo sin tratamiento (control) cuya p > 0,05. Se constató que el grupo de *O. basilicum* a 400 mg·kg⁻¹ fue el que presentó valores similares al grupo control tanto en el área núcleo como en el área citoplasma de las zonas perivenosa e intermedia.

Tabla 4. Análisis de varianza para los grupos de *Ocimum basilicum* por zona para área núcleo y área citoplasma.

Zona	Área núcleo		Área citoplasma	
	Periportal	F=19,328	p=0,0	F=26,683
	<i>Ocimum b 200</i>	p=1	Daño hepático	p=0,47
Perivenosa	F=3,70	p=0,012	F=19,16	p=0,0
	<i>Ocimum b 400</i>	p=0,573	<i>Ocimum b 400</i>	p=0,285
	Daño hepático	p=0,358	Daño hepático	p=0,997
Intermedia	F=8,94	p=0,0	F=17,91	p=0,0
	<i>Ocimum b 400</i>	p=0,999	<i>Ocimum b 400</i>	p=0,986
			Daño hepático	p=0,252

Nota: Cada celda representa la comparación entre los grupos siguientes: *Ocimum basilicum* con dosis 200 mg·kg⁻¹. *Ocimum basilicum* con dosis 400 mg·kg⁻¹. Grupo con daño hepático. Grupo sin tratamiento.

Un análisis similar se realizó en la Tabla 5 para los grupos de *M x piperita L*. El análisis de varianza aplicado a estos grupos por zona para área núcleo y área citoplasma y las comparaciones internas entre los grupos (pruebas de Tukey y Tamhane) arrojaron

diferencias significativas para los 4 grupos por área y zona, con p asociadas a las F < 0,05. Se constató que el grupo de daño hepático presentó valores similares al grupo control en el área citoplasma de las tres zonas así como en el área núcleo de la zona perivenosa.

Tabla 5. Análisis de varianza para los grupos de *M. x piperita* por zona para área núcleo y área citoplasma.

Zona	Área núcleo		Área citoplasma	
Periportal	F=10,521 <i>Mentha x p</i> 400	p=0,0 p=0,861	F=16,438 Daño hepático	p=0,0 p=0,47
Perivenosa	F=3,70 <i>Mentha x p</i> 400 Daño hepático	p=0,012 p=0,916 p=0,358	F=19,16 Daño hepático	p=0,0 p=0,997
Intermedia	F=21,80	p=0,0	F=32,47 Daño hepático	p=0,0 p=0,431

Nota: Cada celda representa la comparación entre los grupos siguientes: *Mentha x piperita* con dosis 200 mg·kg⁻¹. *Mentha x piperita* con dosis 400 mg·kg⁻¹. Grupo con daño hepático. Grupo sin tratamiento.

La Tabla 6 mostró el análisis de varianza para los grupos de *A. sativum*. En la zona perivenosa para el área del núcleo no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). En el resto de las áreas y zonas se encontraron valores de $p < 0,05$, lo que demostró la existencia de diferencias entre los grupos. Puede observarse en cada celda de la tabla aquellos grupos que

presentaron un comportamiento similar al grupo sin tratamiento: los grupos de *A. sativum* a 200 y 400 mg·kg⁻¹ en el área núcleo de las zonas periportal e intermedia, y los grupos de *A. sativum* a 200 mg·kg⁻¹ y el de daño hepático en el área citoplasma de las tres zonas analizadas.

Tabla 6. Análisis de varianza para los grupos de *A. sativum* por zona para área núcleo y área citoplasma.

Zona	Área núcleo		Área citoplasma	
Periportal	F=2,96 <i>Allium s</i> 200 <i>Allium s</i> 400	p=0,032 p=0,164 p=0,487	F=12,619 <i>Allium s</i> 200 Daño hepático	p=0,0 p=1 p=0,47
Perivenosa	F=2,456	p=0,063	F=16,428 <i>Allium s</i> 200 Daño hepático	p=0,0 p=0,385 p=0,997
Intermedia	F=4,189 <i>Allium s</i> 200 <i>Allium s</i> 400	p=0,006 p=0,521 p=1	F=3,88 <i>Allium s</i> 200 Daño hepático	p=0,009 p=0,366 p=0,283

Nota: Cada celda representa la comparación entre los grupos siguientes: *Allium sativum* con dosis 200 mg·kg⁻¹. *Allium sativum* con dosis 400 mg·kg⁻¹. Grupo con daño hepático. Grupo sin tratamiento.

DISCUSIÓN

El análisis de la relación entre área núcleo/área citoplasma resulta importante para evaluar el

mantenimiento de una estructura estable en los tejidos. El resultado obtenido en cada grupo de un valor cercano a 0,3 (tabla 1) coincidió con los reportes de la literatura donde se plantea que la relación núcleo/citoplasma varía de un

tipo celular a otro, y que se presenta en la mayoría de las células en una relación de 1: 3 a 1: 5 (Iglesias *et al.* 2010).

El análisis del número de sinusoides es otra de las variables que debe ser medida en un análisis morfométrico del tejido hepático (tabla 2). Al comparar los resultados obtenidos en cada grupo con los del grupo control sin tratamiento no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo que nos indica que a pesar de haberse afectado la relación área núcleo/área citoplasma, no existieron alteraciones en el número de sinusoides con la presencia del agente hepatotóxico en una exposición aguda. Esto coincide con los análisis realizados por otros autores donde se plantea que los daños estructurales en el hígado ante la presencia de un tóxico se evidencian en las exposiciones a mediano y largo plazo (Kumar *et al.* 2012). El paracetamol (Tylenol) es un analgésico que se detoxifica en el hígado mediante sulfatación y glucuronidación, y pequeñas cantidades son convertidas mediante oxidación catalizada por el citocromo P-450 en un metabolito electrofílico altamente tóxico. Cuando se ingieren grandes cantidades del fármaco se produce una depleción de glutathion reducido (GSH) y entonces se acumulan los metabolitos tóxicos en la célula, se destruyen macromoléculas nucleofílicas y se unen de forma covalente a las proteínas y ácidos nucleicos. El descenso en la concentración de GSH unido al enlace covalente de los metabolitos tóxicos, aumenta la toxicidad del fármaco, dando lugar a una necrosis masiva de las células hepáticas, habitualmente 3 a 5 días después de la ingesta de dosis tóxicas (Kaushik *et al.* 2013).

El modelo empleado en esta investigación para el análisis morfométrico de las plantas con efectos hepatoprotectores se basó en un modelo de hepatotoxicidad aguda por paracetamol, con la administración única de una dosis tóxica y el sacrificio de los animales 24 h después (Toledo *et al.* 2014). El autor

consideró que esta única administración y el breve lapso de tiempo transcurrido para efectuar el análisis no fueron suficientes para evaluar alteraciones estructurales de las células hepáticas a nivel morfométrico, siendo solamente detectables alteraciones histopatológicas reversibles como la esteatosis hepática macrovacuolar y algunas alteraciones no reversibles de necrosis paracelular y centrolobulillar en el grupo que recibió paracetamol, que si bien son indicadores de la toxicidad hepática, no resultan suficientes cuando se trata de realizar un análisis comparativo entre grupos que hayan recibido además otras sustancias que pudieran enmascarar o modificar estos resultados.

La comparación entre los grupos que emplearon extractos de plantas medicinales, el de daño hepático y el grupo control sin tratamiento mediante la prueba de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas entre todos para las variables área núcleo y área citoplasma (tabla 3). Esto representó una contradicción si se tiene en cuenta que cada grupo que empleó una dosis del extracto de la planta se comparó con el grupo control sin tratamiento y con el grupo de daño hepático, pero se debe recordar que las estadísticas descriptivas de los grupos no mostraron diferencias morfométricas detectables, lo que se atribuyó a que el modelo experimental empleado, si bien resultó útil para evaluar hepatoprotección a partir de valores bioquímicos e incluso algunos histológicos, no resultó ideal para determinar alteraciones morfométricas. Existen muchos trabajos de investigación que emplean el modelo de hepatotoxicidad inducida por paracetamol a través de indicadores bioquímicos e histológicos, pero no realizan morfometría, la que muestra sus patrones de alteración evidentes a partir de los 3 a 5 días de administrado el tóxico (Guevara-Vásquez *et al.* 2014, Clara *et al.* 2012).

El análisis por cada grupo que empleó

extractos de plantas medicinales (al analizar el comportamiento de las variables área núcleo y área citoplasma) que se mostró en las tablas 4, 5 y 6, reveló valores diferentes para cada planta. En el caso de *O. basilicum* (tabla 4), los valores con mayor similitud a los del grupo control se obtuvieron con la dosis de 400 mg·kg⁻¹, lo que coincidió con los resultados obtenidos en otros estudios (Toledo *et al.* 2014). Situación similar se encontró con el uso de *M. x piperita* en la tabla 5, pues la dosis de 400 mg·kg⁻¹ también fue la que presentó comportamiento similar al grupo control. Varios estudios previos ya han validado el efecto de plantas utilizando las dosis mencionadas (Valarezo 2012), aunque existen algunos autores que han realizado sus investigaciones considerando otros parámetros (Mestanza & Armas 2014, Kaushik *et al.* 2013). Es importante destacar que estas consideraciones se realizaron para la variable área núcleo fundamentalmente, pues la variable área citoplasma no presentó alteraciones morfométricas destacables en el grupo de daño hepático, relacionado esto con las características ya analizadas del modelo experimental empleado en esta investigación. *A. sativum* (tabla 6) mostró resultados similares a los del control en la dosis de 200 mg·kg⁻¹. El análisis de los resultados de estas tres tablas demostró que los efectos a obtener no siempre se encuentran en relación directa con las dosis empleadas, pues los principios activos presentes en los extractos, los mecanismos de acción, la posible saturación de receptores farmacológicos, entre otros muchos elementos pueden modificar los efectos de las sustancias (Brunton & Chabner 2012).

En la literatura médica se reportan diversos comportamientos al evaluar la relación dosis-efecto hepatoprotector de plantas medicinales, por ejemplo: la administración de *Bidens pilosa* L. (romerillo) a las dosis de 150 mg·kg⁻¹, 300 mg·kg⁻¹ y 600 mg·kg⁻¹ posee un efecto dosis independiente, mientras la evaluación de un extracto acuoso de las hojas de *Peumus*

boldus (J. I Molina, 1782) a las dosis de 80 mg·kg⁻¹, 120 mg·kg⁻¹ y 160 mg·kg⁻¹ arroja un comportamiento dosis-dependiente, obteniendo la mayor actividad con la dosis mayor (Ochoa *et al.* 2008). También la administración de *Amaranthus spinosus* L. a las dosis de 100 mg·kg⁻¹, 200 mg·kg⁻¹ y 400 mg·kg⁻¹, posee un efecto dosis-dependiente incrementado la actividad con la dosis (Zeashan *et al.* 2008).

Tampoco se encontró un predominio de alteraciones por zonas en el estudio analizado. Esto no se correspondió con lo reportado en la literatura donde se plantea que las lesiones producidas por paracetamol deben afectar primeramente la zona perivenosa (Ross *et al.* 2012). Se conoce que esta zona constituye el sitio principal de desintoxicación de alcohol y fármacos y sus células son las primeras en sufrir necrosis isquémica centrolobulillar, relacionado con la presencia de enzimas de la glucólisis, las del metabolismo de lípidos y de sustancias tóxicas. Estos resultados fueron atribuidos a las características del modelo experimental de hepatotoxicidad aguda empleado, que no resulta ideal para evaluar alteraciones morfométricas (Kumar *et al.* 2012).

El estudio demostró que el modelo de hepatotoxicidad aguda inducida por paracetamol, que se basa en una administración única del tóxico y el sacrificio del animal 24 h después, no resulta idóneo para determinaciones de morfometría, pues las alteraciones estructurales de la arquitectura lobulillar del hígado se hacen evidentes al transcurrir un período mayor de tiempo. Para los estudios morfométricos deben emplearse modelos en los que los animales se encuentren expuestos a dosis repetidas del tóxico y que sean sacrificados luego de tres a cinco días de dicha exposición. No se niega el valor del modelo de hepatotoxicidad aguda por paracetamol como modelo experimental, pues el mismo ha sido demostrado en numerosos

estudios, pero basado en determinaciones enzimáticas, bioquímicas e histológicas no morfométricas.

No se demostraron alteraciones morfométricas en el hígado luego de la administración de los extractos de plantas en el modelo de hepatotoxicidad aguda por paracetamol empleado. La relación área núcleo/área citoplasma se mantuvo entre los límites normales con la utilización de los extractos de plantas, y el número de sinusoides no mostró diferencias entre los grupos del estudio. Los grupos que emplearon las dosis de 400 mg·kg⁻¹ de *O. basilicum* y 200 mg·kg⁻¹ de *A. sativum* presentaron los valores morfométricos de mayor similitud al grupo control sin tratamiento, lo que se correspondió con aquellos de mayor efecto hepatoprotector atribuido.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Morfofisiología de la Universidad Médica Dr Serafin Ruiz de Zárate de Villa Clara, Cuba y al Centro de Toxicología Experimental adjunto a la propia Universidad por toda la cooperación prestada. A Pedro Rojas y a Alfredo Tito Santana por su ayuda desinteresada e imprescindible para la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angosto, M.C. (ed.) 2008. *Bases celulares y moleculares de la regeneración hepática*. Madrid: Instituto de España.
- Barrios, E.E.; Espinoza, M.; Leal, U.; Ruiz, N.; Pinto, V. & Jurado, B. 2011. Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salus [revista en la Internet]*, 15: 28-34.
- Brunton, L. & Chabner, B. (eds.) 2012. *Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México: McGraw-Hill.
- Clara, M. V.; Puig, M. N.; Castaño, S. M.; Yera, A. O.; Hernández, N. M. & Carrero, E.G. 2012. Efectos del D-002 sobre la hepatotoxicidad inducida por paracetamol en ratas. *Revista Cubana de Toxicología*, 1 En : http://bvs.sld.cu/revistas/anu/vol_1_1_12/tox03111.htm leído el 20 de agosto del 2015.
- Ferreira, T. & Rasband, W. 2012. *The ImageJ User Guide*. USA. National Institutes of Health.
- Guevara-Vásquez, A.M.; Tello, C. M.; Rodríguez, E. M. & Julca, R. Y. 2014. Efecto del infuso de *Petroselinum sativum* sobre la insuficiencia hepática inducida en *Rattus norvegicus* var. *albinus*. *Pharmaciencia*, 2: 39-47.
- Hamabe, Y.; Hirose, A.; Yamada, S.; Uwabe, C.; Okada, T.; Togashi, K.; Kose, K. & Takakuwa, T. 2013. Morphology and morphometry of fetal liver at 16-26 weeks of gestation by magnetic resonance imaging: Comparison with embryonic liver at Carnegie stage 23. *Hepatology Research*, 43: 639-647.
- Iglesias, B.; Rodríguez, I.; Valentí, J.; Pomares, E.; Dovale, A. & Rodríguez, T. 2010. *Histología. Células y Tejidos*. Universidad Médica de La Habana. La Habana.
- Jimenez, M. R. & Kuhn, G.R. (eds.) 2009. *Toxicología Fundamental*: Ediciones Díaz de Santos. Sevilla.
- Kaushik, P.; Mathur, M.; Rawat, N.; Saxena, T.; Mobar, S. & Meena, P. 2013. Study of *Menta piperita* against gamma radiation in mice. *Oxid Antioxid Medicine Science*, 2: 285-295.
- Kumar, V.; Abbas, A.K. & Aster, J.C. (eds.) 2012. *Robbins Basic Pathology* Philadelphia: Saunders.
- Medina, M. B. H.; Gutiérrez, M. G.; Valdivia, P. M. & Machado, A. S. 2012. *Estudio morfométrico del hígado de ratas wistar*

- en un modelo experimental de Hiperlipidemia. Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. La Habana: Infomed.*
- Mestanza, J. C. & Armas, E. A. T. 2014. Efecto del extracto acuoso de la *Ocimum basilicum L* (albahaca) en el crecimiento bacteriano de la *Escherichia coli*. Revista ECIPerú, 10: 36-44.
- Puiguriguer, F.; Barceló, M.B.; Castanyer, P. & Nogué, X. 2010. Valoración del riesgo de hepatotoxicidad en la intoxicación aguda por paracetamol cuando no es posible aplicar el nomograma de Rumack-Matthew. *Emergencias*, 22: 365-368.
- Ramos, E. F. 2011. *Evaluación del efecto hepatoprotector del aceite esencial de Mentha piperita L. en el daño hepático experimental inducido por tetracloruro de carbono*. Tesis. (Programa profesional de Farmacia y Bioquímica). Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. 36 p.
- Rosas, C.; Vásquez, B. & Sol, M. D. 2010. Histological and Histochemical description of the liver of the Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *International Journal of Morphology*, 28: 151-156.
- Ross, M.; Kaye, G. & Paulina, W. (eds.) 2012. *Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Toledo, D. B.; Cárdenas, M. B.; Morgado, E. B.; Román, R. E.; Correa, I. I. & Cárdenas, B.A. 2014. Evaluación preclínica de la actividad hepatoprotectora de *Ocimum basilicum L.* y *Allium sativum L.* *Medisur*, 12: 51-62.
- Valarezo, D. C. O. 2012. *Efecto hepatoprotector del extracto de las hojas de alcachofa (Cynara scolymus) en ratas (Rattus norvegicus) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono*. Bioquímica farmacéutica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Vertemati, M.; Moscheni, C.; Petrella, D.; Lamperti, L.; Cossa, M.; Gambacorta, M. & Maria Goffredi, L. V. 2012. Morphometric analysis of hepatocellular nodular lesions in HCV cirrhosis. *Pathology - Research and Practice*, 208: 240-244.
- Wen, Y.F.; Zhao, J.Q.; Bhadauria, M. & Nirala, S.K. 2013. Baicalin prevents cadmium induced hepatic cytotoxicity, oxidative stress and histomorphometric alterations. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65: 189-196.
- Zeashan, H.; Amresh, G.; Singh, S. & Rao, C. 2008. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3417-3421.

Received August 19, 2015.
Accepted September 14, 2015.