

Evaluación del potencial hepatoprotector de la *Mentha piperita* L previo a la inducción de hepatotoxicidad con acetaminofen

[Evaluation of hepatoprotective potential of *Mentha piperita* L before induction of hepatotoxicity with acetaminophen]

Deodely BERMÚDEZ-TOLEDO¹, Raylen ESCOBAR-ROMÁN^{1,2}, María BOFFILL-CÁRDENAS³, Emoe BETANCOURT-MORGADO¹, Ignacio IGUALADA-CORREA³ & Bennia ALONSO-CÁCERES¹

¹Centro de Toxicología de Villa Clara. CENTOX –VC, Santa Clara, Cuba

²Universidad de Ciencias Médicas de Santi Spíritus, Cuba

³Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”, Santa Clara, Cuba

Contactos / Contacts: Raylen ESCOBAR-ROMÁN - E-mail address: raylener@ucm.ssp.sld.cu

Abstract: A preclinical pharmacological study was conducted to evaluate the hepatoprotective effect of *Mentha piperita* L. against paracetamol induced toxicity. Adult male NMRI mice who were administered orally soft plant extracts in doses of 200mg/kg and 400mg/kg, three consecutive days prior to the induction of hepatotoxicity were used. Clinical signs of toxicity, hepatic biochemical parameters and morphological analysis of the liver was evaluated. The biochemical parameters analyzed showed significant differences, but none of the two groups showed a similar untreated control group behavior. No macroscopic changes in the liver were confirmed. Microscopically, the study groups with *Mentha piperita* L. showed mild to moderate damage with significant differences from the untreated control group. The evaluation of hepatoprotective potential on the *M. piperita* L. extract at doses studied did not behave as hepatoprotective agent.

Keywords: hepatic enzymes, hepatotoxicity hepatoprotective, *Mentha piperita* L.

Resumen: Se realizó un estudio farmacológico preclínico para evaluar el efecto hepatoprotector de *Mentha piperita* L. frente a la toxicidad inducida por el paracetamol. Se emplearon ratones adultos machos NMRI a los que se administró por vía oral extractos blandos de la planta a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, tres días consecutivos previos a la inducción de la hepatotoxicidad. Se evaluaron los signos clínicos de toxicidad, parámetros bioquímicos hepáticos y el análisis morfológico del hígado. Los parámetros bioquímicos analizados mostraron diferencias altamente significativas, pero ninguno de los dos grupos presentaron un comportamiento similar al grupo control no tratado. No se confirmaron alteraciones macroscópicas del hígado. A nivel Microscópico, los grupos en estudio con *Mentha piperita* L. presentaron daños de leves a moderados con diferencias significativas respecto al grupo control no tratado. Se puede afirmar que según la evaluación del potencial hepatoprotector del extracto de *M. piperita* L. a las dosis estudiadas no se comportó como agente hepatoprotector.

Palabras clave: enzimas hepáticas, hepatoprotección, hepatotoxicidad, *Mentha piperita* L

Recibido | Received: 21 de Abril de 2014

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 18 de Mayo de 2014.

Publicado en línea | Published online: 30 de Noviembre de 2014

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: D Bermudez-Toledo, R Escobar-Rromán, M Boffill-Cárdenas, E Betancourt-Morgado, I Igualada-Correa, B Alonso-Cáceres. 2014. Evaluación del potencial hepatoprotector de la *Mentha piperita* L previo a la inducción de hepatotoxicidad con acetaminofén. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 13(6): 545 – 556.

INTRODUCCION

El hígado constituye el principal centro de biotransformación y eliminación de agentes potencialmente tóxicos, además de su participación en la síntesis y distribución de nutrientes incorporados al organismo. Las funciones que desempeña este órgano son únicas y vitales pues a pesar de que casi todos los tejidos tienen, hasta cierto grado, la capacidad de metabolizar estos productos químicos, el hígado es por excelencia el principal lugar de depuración de sustancias endógenas y exógenas, de ahí que cualquier modificación en alguna de sus funciones traería graves consecuencias para la vida (Guyton & Hall, 2011).

Es un órgano susceptible a fenómenos de toxicidad química debido principalmente a su función y localización anatómica. Si además tenemos en cuenta la creciente cantidad de productos químicos que el hombre consume diariamente a través de los alimentos, el agua, los vegetales y medicamentos; es de esperar una sobrecarga de sus sistemas detoxificantes y por consiguiente la degradación de determinados compuestos necesarios para la biotransformación y eliminación de estas sustancias ajenas al metabolismo celular conocidas como xenobióticos (Murray *et al.*, 2010).

La ingestión de compuestos químicos u orgánicos que implican daños funcionales y/o estructurales al hígado provocan hepatotoxicidad o enfermedad hepática tóxica inducida. Su diagnóstico se hace infrecuente debido a la ausencia de parámetros clínicos o de laboratorio específicos de este desorden (Ramírez *et al.*, 2009).

El Paracetamol, acetaminofén o Tylenol como también se le conoce, es uno de los medicamentos más usados por sus propiedades analgésicas y antipiréticas, además de bajo costo y amplia disponibilidad, lo que ha conllevado a frecuentes casos de sobredosificación y por consiguiente de hepatotoxicidad. Este fármaco induce una reacción tóxica directa a nivel hepático que aunque sus manifestaciones clínicas tempranas son leves e inespecíficas, su pronóstico depende en forma importante de su diagnóstico oportuno (Arundel & Lewis, 2007).

Por ello, la búsqueda de alternativas naturales de tratamiento orientadas a proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicálicos, es un elemento importante en las investigaciones médico-farmacéuticas (Matkowski *et al.*, 2008).

La Fitoterapia constituye una alternativa farmacológica para resolver de manera complementaria e integral las necesidades primarias de salud. Como consecuencia del desarrollo de nuevos procesos químicos de síntesis se ha hecho improbable explotar las potencialidades de un inmenso número de especies vegetales que sin duda alguna, encierran una amplia diversidad de compuestos químicos desconocidos que podrían llegar a tener un gran valor terapéutico (Castro, 2006).

Tanto el Parlamento Europeo como La Organización Mundial de la Salud (OMS) han adoptado resoluciones que ponen de manifiesto la necesidad de racionalizar el empleo de los productos derivados de las plantas medicinales con el objetivo de limitar la prescripción, de aquellos productos de fitoterapia que carezcan de estudios previos para avalar su uso, o de plantas de las que no se conocen suficientemente los riesgos de su utilización (FDA, 2000; ICH, 2005) Por lo que corresponde a la ciencia moderna conducir el estudio de la medicina tradicional por métodos científicos que comprueben la eficacia farmacológica en cada caso.

La práctica etnomédica refiere el uso de especies como la *M. piperita* L para el tratamiento de afecciones hepáticas, y avalan su eficacia farmacológica (Sharma *et al.*, 2007; Kamal & Nermien, 2011; Kaushik *et al.*, 2013)

Considerando que una sobredosis de paracetamol es capaz de generar un modelo experimental de hepatotoxicidad; y que la medicina tradicional refiere el empleo de la especie *M piperita* L como protector hepático (Castro, 2006; Godínez & Volpato, 2008) resulta importante la evaluación farmacológica preclínica de estas especies que corrobore su uso tradicional para prevenir el daño hepatocelular.

Este trabajo científico parte de la hipótesis de que los extractos blandos obtenidos a partir de la parte aérea de la especie *M piperita* L. posee el efecto hepatoprotector atribuido por la medicina tradicional; y para ello el objetivo fundamental se basa en evaluar mediante un estudio preclínico la actividad hepatoprotectora de esta especie en un biomodelo de toxicidad inducido por paracetamol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio farmacológico, *in vivo*, en el Centro de Toxicología de Villa Clara perteneciente a la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, donde se utilizaron ratones adultos machos de la línea

NMRI, de 6 semanas de edad y con un peso corporal comprendido entre 24 y 30 gramos suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). El período de cuarentena se extendió por 7 días y una vez finalizado se procedió a la parte experimental.

El consumo de alimentos y agua fue a libre demanda, siendo esta última de calidad apta para el consumo humano. El alimento fue retirado 12 horas antes de la administración del producto de ensayo y suministrado 2 horas posterior a la administración.

La recolección de las partes aéreas de *Mentha piperita* L. se realizó en horas tempranas de la mañana en los Huertos "Octubre Victorioso" dedicados al cultivo de plantas medicinales en el territorio; y secadas a la sombra durante 15 días con el empleo de tejas traslúcidas.

En el Centro de Producción Local de Santa Clara (CPL), la droga vegetal fue molinada y tamizada. Posteriormente se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos por el método de reperlación acorde a las Buenas Prácticas de Producción y sometidos a un proceso de control de la calidad. Se almacenaron a temperatura ambiente y en frascos ámbar. Finalmente fueron sometidos a un proceso de concentración a vacío utilizando un evaporador rotatorio (IKA-Labortechnik) con la finalidad de obtener un extracto blando como producto final. Sobre la base de los sólidos totales se prepararon las soluciones de estudio garantizando las dosis de ensayo de 200 mg/kg y 400 mg/kg de peso corporal.

Los extractos hidroalcohólicos de la especie *M piperita* L fueron evaluados a través de la realización de tamizaje fitoquímico para la identificación de los diferentes grupos químicos de metabolitos secundarios presentes en estos.

El agente hepatotóxico en este caso fue el paracetamol (blister de 10 tabletas de 500 mg, lote 09087, de producción QUIMEFA), se trituraron y disolvieron las tabletas en solución salina (NaCl) al 0,9% (Garba *et al.*, 2009; Pradeep *et al.*, 2009; Takate *et al.*, 2010), garantizando una dosis de 600 mg/kg de peso corporal. La dosis a emplear fue seleccionada a partir de estudios previos diseñados para obtener la dosis efectiva del modelo experimental de hepatotoxicidad aguda (Méndez *et al.*, 2009)

Se registraron promedios diarios de humedad relativa y temperatura, además de controlar el horario de administración, concentración y dosis a administrar el producto.

Se evaluaron los signos clínicos de toxicidad y los niveles plasmáticos pretratamiento y a las 24 horas post-administración del agente tóxico como variables de respuesta (Kasper *et al.*, 2006; Puiguriguer *et al.*, 2010) de los siguientes parámetros bioquímicos: fosfatasa alcalina (FAL), aminotransferasas de aspartato (AST) y alanina (ALT), y concentración de bilirrubina total (Bbt), considerándose como valores normales según rango de referencia definidos en la literatura para la línea en estudio (Olfert *et al.*, 1998).

Se realizó la identificación y caracterización de las lesiones macroscópicas y microscópicas. La observación macroscópica fue dirigida sobre la evaluación de las características morfológicas del hígado tales como la coloración, consistencia, dilatación de vasos sanguíneos y presencia de trombos. En el análisis microscópico se evaluaron como indicadores de daño celular la aparición de focos de necrosis, esteatosis hepática microvacuolar, degeneración balonizante, y hepatocitos binucleados, (Olfert *et al.*, 1998; Tejeda, 2010). Para la clasificación del daño histológico se estableció la siguiente escala gradual: grado 1 (leve), grado 2 (moderado), grado 3 (severo); definiéndose como grado 0 la ausencia de daño celular o daño mínimo del tejido encontrándose dentro de los límites histológicos normales.

La administración del producto se realizó sobre la base del peso corporal a razón de 10ml/kg por ser el volumen recomendado para el modelo biológico utilizado, por vía oral empleando una cánula intragástrica e iniciándose la administración a las 9:00 am. Se conformaron 4 grupos experimentales de 10 animales cada uno a los cuales se les asignó el siguiente tratamiento:

Grupos I, II:

Los animales pertenecientes a estos grupos fueron tratados con el extracto de la planta, garantizando las dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg sobre la base de los sólidos totales 3 días consecutivos previos al daño provocado con el paracetamol. Al tercer día, pasados 30 minutos de la ingestión del extracto vegetal, se les administró paracetamol/NaCl 0.9% a una dosis de 600 mg/kg como agente hepatotóxico (para provocar el daño).

Grupo I:

Tratados con dosis de 200 mg/kg de *M piperita* L.

Grupo II:

Tratados con dosis de 400 mg/kg de *M piperita* L.

Grupo III:

Este grupo se empleó como control de daño hepático. Se utilizó una sobredosis de 600 mg/kg de paracetamol tabletas como agente hepatotóxico para generar experimentalmente un modelo de hepatotoxicidad aguda. Los animales pertenecientes al mismo recibieron NaCl al 0.9% 3 días consecutivos previos a la inducción del daño hepático y en el día tercero pasados 30 minutos de la ingestión del NaCl se les administró paracetamol/ NaCl 0.9%.

Grupo IV:

Se utilizó como grupo control sin recibir tratamiento alguno.

Se realizaron inspecciones clínicas cada 2 horas con el fin de detectar signos clínicos de toxicidad. Todos los animales fueron sometidos a toma de muestra de sangre de 1 ml en viales químicamente limpios que contenían heparina sódica 72 horas antes y 24 horas después de la administración del agente tóxico, lo cual se realizó bajo los efectos de la anestesia con éter (Olfert *et al.*, 1998). Transcurridas 24 horas de la administración del agente tóxico se llevó a cabo la eutanasia de los animales por el método de narcosis por éter y posteriormente sus hígados fueron removidos para estudios histopatológicos macro y microscópicos.

La sangre anticoagulada fue centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos y se obtuvo el plasma para la determinación de la actividad de AST, ALT, FAL y la concentración de bilirrubina total. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital Universitario "Celestino

Hernández Robau", mediante kit diagnóstico HELFA® en un Hitachi-Roche 902, según procedimiento descrito por el fabricante.

El estudio macroscópico se realizó mediante observación de los órganos abdominales, prestando especial atención al hígado. Para el análisis microscópico se tomó un fragmento del hígado de cada animal, los cuales se fijaron en formol neutro al 10% y se procesaron en el Laboratorio de Histología de la UCM-VC.

Los datos obtenidos fueron tabulados y almacenados en bases de datos confeccionadas en SPSS versión 15.0 para Windows. A los datos se le aplicaron los estadígrafos descriptivos media aritmética y desviación estándar para cada una de las variables estudiadas. La comparación entre los grupos se realizó mediante la aplicación de pruebas no paramétricas, empleando los tests de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. La significación estadística en un mismo grupo en momentos diferentes (antes y después de inducir toxicidad hepática) para cada variable se determinó a través de la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon. Se consideró un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS***Evaluación del efecto hepatoprotector de la M piperita L.***

El resultado del tamizaje fitoquímico realizado al extracto hidroalcohólico al 43% de *M piperita* L, (Tabla 1) mostró mayor concentraciones de Monoterpenos, fenoles y/o taninos y triterpenos y/o esteroides (Miranda & Cuéllar, 2001; Jiménez *et al.*, 2012).

Tabla 1
Resultados del tamizaje fitoquímico.

Metabolito	Extracto hidroalcohólico
	<i>M piperita</i> L
Compuestos reductores	-
Saponinas	-
Flavonoides	+
Alcaloides	-
Compuestos fenólicos y/o taninos	+++
Aminoácidos	-
Triterpenos y/o esteroides	++
Monoterpenos	+++

De manera general, no se presentaron signos clínicos de toxicidad en ninguno de los grupos experimentales al evaluar las plantas de ensayo (Kasper *et al.*, 2006). La ausencia de alteraciones clínicas mostrada por los animales es consistente con resultados publicados por otros autores, que utilizaron igual dosis de paracetamol como agente inductor de daño hepático (Kon *et al.*, 2007; Girish *et al.*, 2009; Roy & Kumar, 2010).

Sin embargo, durante la evaluación experimental se produjo la muerte de 3 animales correspondientes al grupo III, tratado con paracetamol, de las cuales 2 ocurrieron entre las 9-16 horas posteriores a la administración del fármaco, resultado que se corresponde con otros publicados donde se reporta que en ratas tratadas con igual dosis de paracetamol se produjo una letalidad de 25% (Kumar *et al.*, 2006; Kon *et al.*, 2007; Roy & Kumar, 2010) y un tercer animal murió durante la administración de este agente hepatotóxico debido a una inadecuada técnica de canulización, lo cual fue corroborado mediante el estudio anatomopatológico macroscópico. Por otro lado, en los grupos experimentales tratados con la planta de estudio se produjo una muerte durante la administración del extracto vegetal previo a la inducción del daño con paracetamol en el grupo II, lo cual fue corroborado macroscópicamente.

Se determinaron los valores de la actividad plasmática de las enzimas ALT, AST, FAL y concentración de bilirrubina total en cada grupo experimental, obtenidos en pre-tratamiento y postratamiento; (Tabla 2) donde el comportamiento de los niveles plasmáticos de los parámetros bioquímicos evaluados en cada uno de los grupos experimentales, previo a la inducción del daño hepático con paracetamol, muestra valores dentro del rango de referencia establecidos para la línea y especie (Miranda & Cuéllar, 2001). Al analizar cada parámetro evaluado, entre los 4 grupos experimentales mediante la prueba de Kruskal-Wallis (K-W) se aprecia que no existen diferencias estadísticas *significativas*. Además se muestran los valores plasmáticos de los parámetros bioquímicos evaluados para cada grupo experimental, transcurridas 24 horas de la inducción del daño con el agente hepatotóxico. Al analizar mediante la prueba de K-W los parámetros bioquímicos evaluados post-tratamiento entre los diferentes grupos experimentales, se obtuvieron diferencias *altamente significativas* para cada una de las variables analizadas (todas, $p = 0,000$).

Los niveles plasmáticos de los parámetros bioquímicos en el grupo (IV) se ubican dentro del intervalo de valores de referencia y al aplicar la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon no se aprecian diferencias estadísticas significativas en los valores plasmáticos de los marcadores bioquímicos antes y después del tratamiento. En cambio, se obtuvo un incremento de la actividad plasmática de ALT, AST, FAL y de la concentración de Bbt en los animales tratados con una dosis de 600 mg/kg de paracetamol (grupo III). A pesar ello los valores se ubican dentro del rango de referencia para la línea y especie (Miranda & Cuéllar, 2001). El análisis de los parámetros bioquímicos antes y después de la inducción mediante la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon, evidenció diferencias *significativas* en cada caso, siendo para la FAL $p = 0,016$ mientras que la ALT, AST y Bbt presentaron una significación de 0,018.

Al analizar en cada uno de los grupos tratados con la planta y expuestos a la acción tóxica del paracetamol, el comportamiento de los parámetros bioquímicos antes y después de inducir toxicidad, mediante la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon, se apreció que en ambos grupos tratados con la dosis y *M piperita* L (I y II) se obtuvieron diferencias estadísticas *altamente significativas* ($p < 0,01$) para cada parámetro evaluado.

La comparación por parejas de grupos experimentales mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (M-W), transcurridas 24 horas de inducido el daño con paracetamol, evidenció que al analizar el grupo (I y II, tratado con la dosis de 200 y 400 mg/kg de *M piperita* L.) respecto a los grupos (III, control de daño hepático) y (IV, control no tratado) en relación a los niveles plasmáticos medios de ALT, AST, FAL y Bbt, se obtuvieron diferencias *altamente significativas* para cada variable ($p = 0,000$).

El análisis bioquímico evidenció que el extracto de *M piperita* L a ambas dosis presentaron poca actividad protectora y capacidad para estabilizar la disfunción biliar, frente a la hepatotoxicidad provocada por una sobredosis de paracetamol (Tabla 2).

En el análisis morfológico del hígado de los animales tratados con el extracto de la planta en estudio (Tabla 3) no se evidenció cambios importantes en las características morfológicas macroscópicas del hígado, caracterizadas por

coloración y consistencia normal, con ausencia de dilatación de vasos sanguíneos y de trombos.

El grupo expuesto solamente al paracetamol (III) se corresponde con el mayor grado de hepatotoxicidad mostrando un daño del tejido de

moderado (28,57%) a severo (71,43%) con predominio de necrosis severa de la vena centrolobulillar. En cambio, podemos observar como en el grupo control no tratado (IV) el 90% de los animales no presentaron alteración histopatológica.

Tabla 2A
Actividad plasmática de las enzimas ALT, AST, FAL y concentración de bilirrubina total en cada grupo experimental, obtenidos pre-tratamiento y Post-tratamiento

GRUPOS	Media aritmética y desviación estándar, n = 36			
	FAL (U/L)		ALT (U/L)	
	0 días	3 días	0 días	3 días
I	194,7 ± 1,7	220,10 ± 3,2	58,20 ± 1,2	79,69 ± 0,9
II	194,5 ± 1,7	272,11 ± 5,2	58,32 ± 1,4	97,91 ± 1,1
III	195,8 ± 1,4	288,86 ± 4,1	58,24 ± 1,0	120,0 ± 0,7
IV	195,5 ± 1,4	194,60 ± 2,7	58,46 ± 1,1	58,43 ± 1,0
Valores de Referencia	67-303 (167)		28-184 (95)	
Significancia Estadística	0,166	0,000**	0,873	0,000**

Tabla 2B

GRUPOS	Media aritmética y desviación estándar, n = 36			
	AST (U/L)		Bbt (µmol/L)	
	0 días	3 días	0 días	3 días
I	88,78 ± 1	92,95 ± 0,7	4,66 ± 0,3	5,0 ± 0,1
II	88,44 ± 1	112,70 ± 1,0	4,76 ± 0,3	6,0 ± 0,1
III	88,00 ± 1	133,26 ± 1,0	4,92 ± 0,2	7,3 ± 0,2
IV	88,30 ± 1	87,76 ± 0,3	4,80 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Valores de Referencia	30-251 (139)		0-8 (4)	
Significancia Estadística	0,904	0,000**	0,221	0,000**

I: *M. piperita* L 200 mg/Kg, II: *M. piperita* L 400 mg/Kg, III: Paracetamol, IV: No tratado.
Significación estadística:

*p < 0.05, **p < 0.01 prueba de K-W *(significativo), **(altamente significativo)

Tabla 3
Análisis histológico obtenido 24 horas posterior a la inducción del daño hepático (n = 36).

Hallazgo histopatológico					
Grupos experimentales		Ausencia alteraciones	Daño leve	Daño moderado	Daño severo
I	<i>M piperita</i> L+ paracetamol	0	8	2	0
II	<i>M piperita</i> L + paracetamol	0	3	6	0
III	Paracetamol	0	0	2	5
IV	No tratado	9	1	0	0
<i>Significación Estadística.</i>		0,000**	0,001**	0,000**	0,000**

Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ prueba de K-W *(significativo), ** (altamente significativo)

Al aplicar la prueba no paramétrica de K-W se obtuvieron diferencias estadísticas *altamente significativas* entre todos los grupos experimentales en relación a la ausencia de alteraciones histopatológicas, la presencia de daño leve, moderado y severo del tejido (todos $p < 0,01$).

La comparación por parejas de grupos experimentales mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (M-W) en relación a los hallazgos histopatológicos obtenidos, evidenció diferencias *significativas* (todos $p < 0,05$) al analizar los diferentes grupos tratados con la planta de estudio (I-II) respecto al grupo (III) en relación a la presencia de daño severo, lo que indica la presencia de alteraciones histológicas de menor grado en los grupos tratados con los extractos de las plantas de estudio.

Al comparar los dos grupos tratados con las plantas de estudio (I y II) respecto al grupo tratado con paracetamol (III) en relación a la presencia de daño severo, se evidenciaron diferencias *significativas* ($p < 0,05$) para cada caso, indicando la presencia de alteraciones histológicas de menor grado en los grupos tratados con los extractos de la planta de estudio.

En los grupos tratados con el extracto de *M piperita* L. (grupos I y II) se observó la presencia de daño leve y moderado del tejido hepático. En el caso de los animales tratados con la dosis de 200 mg/kg predominó la presencia de daño leve (80%) hallazgo histopatológico que difiere de manera *altamente significativa* respecto al grupo tratado con el agente

hepatotóxico (III) y al grupo control no tratado (IV) para valores de $p = 0,005$ y $p = 0,002$ respectivamente. Mientras que, el 20% de los animales presentaron daño moderado del tejido, alteración que no difiere significativamente respecto al grupo III. En cambio, en los animales tratados con la dosis de 400 mg/kg (grupo II), se observó un predominio de daño moderado del tejido (66,67%) y en el resto de los animales (33,33%) la presencia de daño leve, ambos hallazgos no difieren significativamente respecto al grupo expuesto solamente al paracetamol ($p = 0,210$ y $p = 0,299$ respectivamente). Por otro lado, al comparar ambos hallazgos respecto al grupo control no tratado (IV) la presencia de daño leve no arrojó diferencias significativas ($p = 0,243$), mientras que la presencia de daño moderado arrojó diferencias *significativas* ($p = 0,013$). Teniendo en cuenta los hallazgos morfológicos presentes en el parénquima hepático de los animales tratados con el extracto de esta planta y el análisis bioquímico obtenido en estos grupos experimentales (III y IV), es de señalar que a pesar de ambos grupos no diferir significativamente respecto al grupo tratado con el agente hepatotóxico (III) en relación a la presencia de daño moderado, sí difieren de manera *significativa* (I, $p = 0,014$ y II, $p = 0,016$) en cuanto a la presencia de daño severo como hallazgo predominante en el grupo III.

La Figura 1 muestra representativamente las características morfológicas del tejido hepático con predominio en cada grupo experimental.

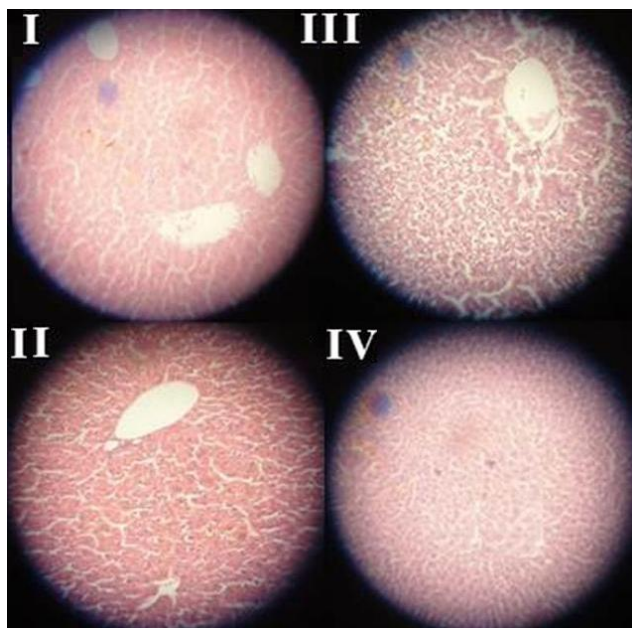


Figura 1

Características morfológicas del tejido hepático en ratones, los que se expusieron al paracetamol y recibieron preventivamente el extracto de *M piperita* L a dosis de 200 mg/kg (I) y 400 mg/kg (II), los tratados con paracetamol (III) y los no tratados (IV).

El tratamiento con el extracto de *M piperita* L. a una dosis de 200 mg/kg unido a la exposición de la sobredosis del agente hepatotóxico Figura 1(I) provocó como principales características morfológicas focos de necrosis aislada y esteatosis hepática microvacuolar ligera focal centrolobulillar. No siendo así para la dosis de 400 mg/kg donde se evidencian hepatocitos binucleados, necrosis moderada confluyente centrolobulillar moderada, necrosis parcelar moderada y esteatosis hepática microvacuolar ligera Figura 1(II).

La administración de una dosis única de 600 mg/kg de paracetamol provocó alteraciones en la morfología hepática como necrosis confluyente severa centrolobulillar, necrosis parcelar moderada y esteatosis hepática macrovacuolar moderada. Además de aumento del tamaño de los espacios sinusoidales y hepatocitos binucleados Figura 1(III).

En la Figura 1(IV), perteneciente a un animal no tratado, se observa una morfología hepática normal, caracterizada por una distribución radial de las cadenas de hepatocitos con respecto a la vena central y espacios sinusoidales de tamaño regular.

DISCUSIÓN

La actividad hepatoprotectora exhibida por los extractos de estudio pudiera deberse a la presencia de determinados metabolitos con actividad hepatoprotectora comprobada, que al menos en parte, contribuyen al efecto farmacológico evaluado.

La presencia de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, pudiera explicar el efecto hepatoprotector mostrado por la planta de estudio, presumiblemente por su actividad antioxidante demostrada, como resultado de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. (Troncoso & Guija, 2007; Ochoa et al., 2008; Zeashan et al., 2008)

Además de los compuestos fenólicos presentes en las plantas de ensayo, otros antioxidantes naturales con efectos inmunomoduladores, anti-inflamatorios, antifibróticos, secuestradores de radicales libres y estabilizadores de membrana; pudieran contribuir a proteger al hígado de cambios degenerativos con prevención de reacciones químicas de toxicidad, estrés oxidativo, peroxidación lipídica, cambios moleculares en el tejido hepático y necrosis, todo ello como resultado de la acción tóxica del n-acetil-parabenz-

quinoneimina (NAPQI) y a la depleción del GSH (Mallet *et al.*, 2008; Veggi *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2009; Polyak *et al.*, 2010); lo cual pudiera explicar el efecto hepatoprotector levemente mostrado por la planta de estudio (Zeashan *et al.*, 2008; Jagruti & Urvi, 2009). Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción tóxica del paracetamol involucra la formación de NAPQI, metabolito responsable de generar estados de estrés oxidativo mediante la acción de especies reactivas del oxígeno y por otro lado, la actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres que se le atribuye a los flavonoides que contribuye a inhibir la cadena de reacciones de peroxidación lipídica, podemos sugerir que la presencia de estos metabolitos secundarios en los extractos de ensayo pudiera contribuir mayoritariamente al efecto hepatoprotector (Kumar & Misra, 2006; Veggi *et al.*, 2008).

No obstante, el estudio realizado no nos permite asegurar que los flavonoides sean los responsables del efecto farmacológico estudiado, ni descartar que otros compuestos presentes en los extractos guarden relación con los resultados obtenidos. En este sentido, la clínica y la experimentación farmacológica demuestran que la acción de una planta a veces no puede explicarse por uno de sus principios activos. La acción de la planta se debe a fitocomplejos que son entidades bioquímicas, dinámicas y unitarias con interacciones entre sus componentes, donde las funciones biológicas de las diferentes moléculas son complementarias.

El paracetamol es comúnmente empleado para generar modelos experimentales de hepatotoxicidad debido a que provoca necrosis aguda centrolobulillar. En este estudio, la dosis empleada (600 mg/kg) para inducir el daño hepático produjo el incremento de los niveles plasmáticos de los parámetros bioquímicos evaluados (ALT, AST, FAL y Bbt), lo que demuestra el efecto tóxico de este fármaco sobre el parénquima hepático. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores al emplear una dosis similar de este agente hepatotóxico (Garba *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2009; Girish *et al.*, 2009; Roy & Kumar, 2010). Mientras (Kumar & Misra, 2006), refieren haber obtenido niveles elevados de aminotransferasas, FAL y Bbt con el empleo de una dosis de 200 mg/kg de paracetamol por vía oral en ratas albinas.

La lesión hepática tóxica provoca daños en la membrana plasmática hepatocelular con la consiguiente liberación al fluido sanguíneo de las

enzimas localizadas en el citosol y en las estructuras intracelulares, siendo estas indicadores sensibles para el diagnóstico de enfermedad hepática (Troncoso & Guija, 2007). En este sentido, un incremento de la actividad plasmática de las aminotransferasas de aspartato y alanina refleja directamente mayor permeabilidad o ruptura celular, debido a un daño en la célula hepática que pudo haber sido el resultado de la unión covalente del NAPQI a los grupos tioles de macromoléculas del hepatocito o a las principales reacciones de lesión celular, inducidas por los radicales libres generados durante la biotransformación del paracetamol en NAPQI.

Teniendo en cuenta que la ALT es una enzima altamente específica para detectar lesiones celulares en el parénquima hepático y que una sobredosis de paracetamol produce necrosis centrolobulillar en la zona 3 del acino hepático de Rappaport donde se encuentra una elevada concentración de AST, podemos inferir que los resultados mostrados por los extractos de *M. piperita* L. (a ambas dosis) no son característicos de agentes hepatoprotectores, pues a pesar de su exposición al paracetamol, no presentaron similar actividad plasmática de ALT y AST respecto al grupo control no tratado (IV), lo que demuestra que los extractos a las dosis citadas anteriormente previenen muy poco la elevación de los niveles plasmáticos de estas enzimas como consecuencia del daño hepatocelular provocado por el fármaco.

La FAL es excretada normalmente vía biliar por el hígado y aunque el aumento de sus niveles plasmáticos no es específico de enfermedad hepática, resulta indicativo de la ocurrencia de cualquier forma de obstrucción del tracto biliar, debido a su presencia en la membrana del hepatocito y en la superficie exterior de la membrana canalicular biliar. De manera similar, los niveles de bilirrubina se elevan cuando el hígado pierde al menos el 50% de su capacidad de excreción (Kumar *et al.*, 2006) De ahí a que, un incremento de los niveles plasmáticos medios de FAL inducida por la acción tóxica del paracetamol se correlaciona con niveles elevados de bilirrubina. Considerando lo anterior, los grupos tratados con el extracto de *M. piperita* L. no mostraron de manera significativa niveles medios de FAL y Bbt similares al grupo control no tratado (III). Ello sugiere, la posibilidad de que ambos extractos blandos a las dosis citadas presentan poca capacidad para estabilizar la disfunción biliar provocada por la acción tóxica del paracetamol.

Otro de los indicadores estudiados para evaluar la actividad hepatoprotectora de las plantas de ensayo fue la evaluación de la morfología del parénquima hepático, donde los resultados obtenidos del estudio histológico se correlacionan con los hallazgos histopatológicos obtenidos por (Troncoso & Guija, 2007) al estudiar el efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas con intoxicación hepática inducida con este fármaco. Otros estudios que describen similares características morfológicas son los realizados por (Garba *et al.*, 2009) en un biomodelo de hepatotoxicidad con paracetamol empleando similar dosis de estudio. En cambio, (Méndez *et al.*, 2009) con el empleo de igual dosis de paracetamol refieren haber obtenido morfológicamente necrosis hepatocelular moderada al evaluar el efecto hepatoprotector de *Bidens pilosa* L. en ratones NMRI.

Por otro lado, en las secciones de hígado de los animales tratados con el extracto de *M. piperita* L. en los grupos (I y II), no mostraron prácticamente protección del tejido hepático al producir mayoritariamente daño moderado lo cual se correlaciona con el comportamiento de los parámetros bioquímicos analizados, donde se observó un incremento de los niveles plasmáticos de ALT, AST, FAL y Bbt respecto al resto de los grupos tratados con extractos vegetales, resultados que se correlacionan con los arrojados por (Garba *et al.*, 2009; Girish *et al.*, 2009; Roy & Kumar, 2009).

De manera general, cuando analizamos los tres indicadores que nos permiten evaluar el efecto hepatoprotector de una sustancia, podemos observar como en el caso de los grupos tratados con el extracto de *M. piperita* L. a las dosis ensayadas (I y II) y a la vez expuestos al paracetamol, no existe una correspondencia entre la ausencia de signos clínicos de toxicidad, actividad enzimática y concentración plasmática de bilirrubina total y el análisis morfológico del hígado, demostrando poca capacidad hepatoprotectora de este extracto vegetal al prevenir levemente el daño hepatocelular provocado por la acción tóxica del paracetamol, lo que pudiera ser el resultado de poca estabilización de la membrana celular con la consiguiente preservación leve de la integridad estructural del tejido hepático.

Algo más a añadir, es que en este estudio los extractos blandos de la especie *M. Piperita* L. (grupos I y II) mostraron comportamientos dosis-dependiente en diferentes estudios farmacológicos preclínicos. De modo que, el estudio de la actividad antiparasitaria de

una decocción de esta planta a concentraciones de 0,475 g/dl; 0,950 g/dl y 1,900 g/dl arrojó efecto vermífugo en dependencia de la dosis, correspondiéndose la mayor actividad obtenida a la mayor concentración (Paz *et al.*, 2006). También la validación farmacológica de la actividad sedante e hipnótica según (Castillo, 2007; Sierra-Pérez *et al.*, 2013) de una infusión elaborada a partir de las hojas de la planta evidenció efecto dosis-dependiente para ambas actividades (Castillo, 2007).

En la literatura médica se reportan diversos comportamientos al evaluar la relación dosis-efecto hepatoprotector de plantas medicinales que poseen un efecto dosis independiente, como los arrojados por (Méndez *et al.*, 2009), mientras que (Ochoa *et al.*, 2008; Zeashan *et al.*, 2008) obtuvieron un comportamiento dosis-dependiente, obteniendo la mayor actividad con la dosis mayor.

A partir de los tres indicadores que se tomaron como criterios para evaluar la actividad hepatoprotectora de las plantas de estudio, se arribó a la siguientes conclusiones: no se presentaron signos clínicos de toxicidad asociados a la administración de las sustancias de ensayo. Por otra parte los extractos blandos de *M. piperita* L. a ambas dosis estudiadas no previeron en mayor medida la elevación de la actividad enzimática de las aminotransferasas de alanina y aspartato, fosfatasa alcalina y la concentración de bilirrubina total, frente a la acción tóxica del paracetamol donde prácticamente no hubo protección hepática en ningún sentido. Las características macroscópicas del hígado estuvieron dentro de los parámetros normales, no presentándose cambios en las mismas. Sin embargo, microscópicamente la administración de paracetamol provocó daño severo de los hepatocitos, presentándose en los grupos tratados con *M. piperita* L. daños de leves a moderados. Se puede afirmar que según la evaluación del potencial hepatoprotector del extracto de *M. piperita* L. a las dosis estudiadas no se comportó como agente hepatoprotector.

REFERENCIAS

- Arundel C, Lewis JH. 2007. Drug-induced liver disease in 2006. *Gastroenterol* 23: 244 - 254.
- Castillo BA. 2007. **Validación farmacológica de la actividad sedante e hipnótica de las infusiones acuosas de las hojas de *Mentha piperita* L. (menta), hojas de *Ternstroemia tepezapote* S (trompillo) y bulbo de *Allium cepa* L (cebolla) en ratones machos**

- albinos.** Tesis Doctoral, Universidad de San Carlos, Guatemala. Disponible en: <http://www.infomed.cu/revistas/pdf/903/90350207.pdf>
- Castro I. 2006. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. **Rev Cub Plant Med** 11: Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol11_2_06/pla01206.htm.
- FDA. 2000. **International Conference on Harmonisation; guidance on Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances.** Notice. Fed Regist. Dic 29 ; 65 (251): 83041-63.
- Garba SH, Sambo N, Bala U. 2009. The effect of the aqueous extract of *Kohautia grandiflora* on paracetamol induced liver damage in albino rats. **Nig J Physiol Sci** 24: 17 - 23.
- Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Rao KR, Rajesh B, Pradhan SC. 2009. Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice. **Ind J Med Res** 129: 569 - 578.
- Godínez DC, Volpato G. 2008. Plantas medicinales que se venden en el mercado el Río, Camaguey, Cuba. **Rev Mex Biodiv** 79: 243 - 259.
- Guyton AC, Hall JE. 2011. **El hígado como órgano.** En: Tratado de Fisiología Médica. Ed. Interamericana- McGraw-Hill 11a ed, Philadelphia, USA.
- ICH. 2005. **Harmonised Tripartite Guideline.** "International Conference on Harmonization of Technical requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, ICH- Q6 A, Geneva, Switzerland.
- Jagruti AP, Urvi SS. 2009. Actividad hepatoprotectora del extracto tradicional lácteo de *Piper longum* en ratas Wistar. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 121 - 129.
- Jiménez Alonso AE, Rodríguez Mendiola MA, López De Alba PL, López Martínez L, Gutiérrez Miceli FA, Arias Castro C. 2012. Efecto de macronutrientes en la acumulación de (-) Mentol en el aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) cultivado *in vitro* e invernadero. **Gayana Bot** 69: 101 - 108.
- Kamal M, Nermien Z. 2011. Comparison of the effects of some essential oils as anti-inflammatory agents on the activities of lysosomal acid-hydrolases in rat liver *in-vitro*. **Nature and Science** 9: 90 - 98.
- Kasper LD, Braunwald E, Fauci SA, Hauser LS, Longo LD, Jameson JL. 2006. **Hepatotóxicosis por paracetamol.** En: Harrison. Principios de Medicina Interna. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México. .
- Kaushik P, Mathur M, Rawat N, Saxena T, Mobar S, Meena PD. 2013. Study of *Mentha piperita* against gamma radiation in mice. **Oxid Antioxid Med Sci** 2: 285 - 295.
- Kon K, Ikejima K, Okumura K, Aoyama T, Arai K, Takei Y, Lemasters JJ, Sato N. 2007. Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. **J Gastroenterol Hepatol** 22: 49 - 52.
- Kumar GA, Chitme H, Dass SK, Misra N. 2006. Hepatoprotective activity of *Rauwolfia serpentina* rhizome in paracetamol intoxicated rats. **J Pharmacol Toxicol** 1: 82 - 88.
- Kumar GA, Misra N. 2006. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of *Chamomile capitula* in paracetamol intoxicated albino rats. **Am J Pharmacol Toxicol** 1: 17 - 20.
- Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, Libert F, Eschalier A. 2008. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. **Pain** 139: 190 - 200.
- Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E. 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. **J Med Plant Res** 2: disponible en: [http://www.academicjournals.org/article/article1380527961_Matkowski et al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380527961_Matkowski%20et%20al.pdf).
- Méndez RT, Boffill MC, Monteagudo JE, Pérez MM, López BO. 2009. Protective effect of *Bidens pilosa* L extract in hepatotoxicity induced by Paracetamol. **Rev Cub Farmacia** 43: 87.
- Miranda M, Cuéllar A. 2001. **Farmacognosia y productos naturales.** Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba.
- Mota KSL, Dias GEN, Pinto MEF, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM. 2009. Flavonoids with

- gastroprotective activity. **Molecules** 14: 979 - 1012.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW. 2010. **Metabolismo de los xenobióticos**, En: Murray RK. Bioquímica Ilustrada de Harper. Ed. Mc Graw-Hill, 28 ed, USA.
- Ochoa C, Granda C, Chapoñán M, Borja R, Borjas P, Ortiz J, Ugaz G, Puerta E, Pucutay M. 2008. Efecto protector de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol. **Ciencia e Investigación Médica Estudiantil** 13: 20 - 25.
- Olfert ED, Cross BM, Mcwilliam A. 1998. Parámetros fisiológicos y nutricionales. **Charles River Techn Bull** 3: Disponible en: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/V1_93/APPEN/APP111.HTM
- Paz NJ, Maceira CM, Corral SA, Gonzáles CC. 2006. Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* L. **Rev Cub Med Milit** 35: Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6_2_01/pla02201.pdf
- Polyak S, Morishima CH, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, Graf TN. 2010. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. **Proc Natl Acad Sci USA** 107: 5995 - 5999.
- Pradeep H, Khan S, Ravikumar K, Ahmed M, Rao M, Kiranmai M, Reddy DS, Ahamed SR, Ibrahim M. 2009. Hepatoprotective evaluation of *Anogeissus latifolia*: In vitro and in vivo studies. **World J Gastroenterol** 15: 4816 - 4822.
- Puiguriguer J, Barceló B, Castanyer T, Nogué S. 2010. Valoración del riesgo de hepatotoxicidad en la intoxicación aguda por paracetamol cuando no es posible aplicar el nomograma de Rumack-Matthew. **Emergencias** 22: Disponible en: http://www.semes.org/revista/vol22_5/9_in_g.pdf
- Ramírez SM, Pascuzzo LC, Bastidas O. 2009. Tratamiento de intoxicaciones por compuestos hepatotóxicos: uso de la N-acetilcisteína y las carboximetilcisteína. **Arch Venez Puericultura Pedriatría** 72: 68 - 72.
- Roy CK, Kumar DA. 2010. Comparative evaluation of different extracts of leaves of *Psidium guajava* linn for hepatoprotective activity. **Pak J Pharm Sci** 23: 15 - 20.
- Sharma A, Sharma MK, Kumar M. 2007. Protective effect of *Mentha piperita* against arsenic-induced toxicity in liver of Swiss albino mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 100: 249 - 257.
- Sierra Pérez R, González Canavaciolo VL, Marrero-Delange D, Rodríguez Leyes EA. 2013. Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. **Revista CENIC Ciencias Biológicas** 44: Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB13-12.pdf>
- Takate SB, Pokharkar RD, Chopade VV, Gite VN. 2010. Hepatoprotective activity of the ethyl acetate extract of *Launaea intybacea* (jacq) Beauv in paracetamol induced hepato-toxicity in albino rats. **Int J Pharm Sci** 1: 72 - 74.
- Tejeda FC. 2010. Hepatotoxicidad por fármacos. **Rev Clín Med Fam** 3: 177 - 191.
- Troncoso L, Guija E. 2007. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol. **Anales de la Facultad de Medicina** 68: 333 - 343.
- Veggi L, Pretto L, Ochoa E, Marcelo L, Taborda D, Sánchez-Pozzi EJ, Ikushiro S, Coleman MD, Roma MG, Mottino AD. 2008. Dapsone induces oxidative stress and impairs antioxidant defenses in rat liver. **Life Sciences** 83: 155 - 163.
- Zeashan H, Amresh G, Satyawani S, Chandana V. 2008. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. **Food Chem Toxicol** 46: 3417 - 3421.