

Efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. "cadillo" sobre la cirrosis hepática inducida en ratas

Protective effect of ethanol extract of *Cenchrus echinatus* L. "cadillo" on induced liver cirrhosis in rats

César B. Cisneros Hilario¹, Jorge L. Arroyo Acevedo², Bertha M. Fernández Araujo¹,
Pierina M. Silva Bazalar¹

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto protector de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre la cirrosis hepática inducidas con en ratas. El diseño es un estudio pre-clínico, el cual se desarrolló en la Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina Humana. Universidad San Pedro, Chimbote, Perú. Para lo cual se utilizaron 36 ratas machos de 190 ± 10 g y extracto etanólico de cadillo. La muestra vegetal se recolecto en San José, distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope, Departamento de la Libertad. La determinación del efecto sobre la cirrosis se evaluó utilizando el método de Regimbeau 2008, que consistió en la distribución de 6 grupos de 6 ratas c/u, donde el primer grupo recibió (SSF), el segundo: fenobarbital (F) + tetracloruro de carbono (CCl₄), el tercero: (F + CCl₄) + Silimarina, el cuarto, quinto y sexto grupo: (F + CCl₄) + extracto en tres niveles de dosificación. El fenobarbital 0,5 mg/mL, diluida en el agua de beber por 15 días, y luego, tetracloruro de carbono 0,2mL/kg en aceite de oliva 1:1, oralmente por 7 días. Se colectó una muestra de sangre para determinar perfil hepático; los animales fueron sacrificados extrayéndose el hígado para estudio histopatológico. Los datos obtenidos mostraron daño hepático con tetracloruro y fenobarbital, evidenciándose un aumento del colágeno, la fibrosis y los nódulos de regeneración; mientras que la silimarina y el extracto de cadillo demostró protección disminuyendo los parámetros mencionados, por lo tanto se concluyó que el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) ejerce efecto protector de la cirrosis inducida en ratas por tetracloruro de carbono y fenobarbital.

Palabras clave: Extracto etanólico, *Cenchrus echinatus* L., cirrosis hepática.

Abstract

This study aimed to determine the protective effect of *Cenchrus L. echinatus* (cocklebur) on-induced liver cirrhosis in rats. The design is a pre-clinical study, which was developed at the School of Pharmacy and Biochemistry, College of Human Medicine. Universidad San Pedro, Chimbote, Peru. To which used 36 male rats and 190 ± 10 g ethanol extract of cocklebur. The plant sample was collected in San José district of Santiago de Cao, Ascope Province, Department of La Liberty. Determining the effect on cirrhosis was evaluated using the method Regimbeau 2008, which involved the distribution of 6 groups of 6 rats c/u, where the first group received (SSF), the second: phenobarbital (F) + tetrachloride carbon (CCl₄), third (F + CCl₄) + Silymarin, the fourth, fifth and sixth group: (F + CCl₄) + extract three dose levels. Phenobarbital 0.5 mg / mL, diluted in the drinking water for 15 days, and then, carbon tetrachloride 0.2 mL / kg of olive oil 1:1, orally for 7 days. We collected a blood sample to determine liver profile, the animals were sacrificed for extracting liver histopathology. Data were obtained showed tetrachloride and liver damage with phenobarbital, showed an increase of collagen, fibrosis and regeneration nodules whereas silymarin extract and protection showed decreasing cocklebur above parameters are therefore concluded that the extract echinatus *Cenchrus L. ethanolic* (cadillo) exerts protective effects of cirrhosis induced by carbon tetrachloride rats and phenobarbital.

Keywords: Ethanolic extract, *Cenchrus echinatus* L., liver cirrhosis

Introducción

Las lesiones hepáticas ente ellas la cirrosis hepática constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a su alta tasa de morbilidad. Las tasas de

1. Facultad de Medicina Humana, USP. cbraulio_cisnerosh@hotmail.com

2. Facultad de Medicina, UNMSM

Recibido, 22 de febrero del 2013

Aceptado, 16 de julio del 2013

defunción más elevadas se registran en países como Moldavia (91 por 100.000 habitantes) y Hungría (85 por 100.000 habitantes), en algunos países de América Latina, como Chile y México, la cirrosis hepática ocupa, entre el 5° y 6° lugar como causa de muerte general (Varvasovszky, 2000). En el Perú, la cirrosis hepática tiene una tasa de mortalidad de 9,48 por 100,000 habitantes, ocupando el 5° lugar, en orden de magnitud entre las defunciones generales, el 2° lugar entre las enfermedades digestivas y hepatobiliares y es la 2° causa de muerte entre las defunciones registradas para el grupo etáreo de 20 a 64 años (MINSA, 2006).

A nivel mundial las causas principales de cirrosis hepática son el consumo crónico de alcohol y la enfermedad viral crónica. Causas menos frecuentes, son las enfermedades hepáticas autoinmunes (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria), las enfermedades metabólicas (deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, Fibrosis Quística) así como la esteatosis hepática no Alcohólica (NASH) (Medina, 2002). Estos posibles daños son provocados por mecanismos complejos que involucran la citotoxicidad directa del etanol y la capacidad para formar aductos entre las proteínas de los hepatocitos (Bouneva et al., 2003), el aumento de la reducción de forma de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) que causa la acumulación de grasa (Zimmerman, 1999), los radicales libres que estimulan la oxidación, el estrés oxidativo que conduce a la respuesta inflamatoria y la peroxidación (Jarvelainen, 2000), y el etanol que induce la elevación de las endotoxinas que pasan al hígado. Las endotoxinas estimulan a las células de Kupffer para producir los radicales libres y citoquinas proinflamatorias como el TNF y IL-1, que son los dos importantes mediadores de la inflamación y de la muerte celular (Boelsterli, 2003).

En ausencia de información fiable de medicamentos hepatoprotectores modernos, hay una serie de medicinas tradicionales que se recomiendan para el tratamiento de enfermedades hepáticas como son: *Silybum marianum* (Flora et al. 1998), *Procumbens Tridax* (Ravikumar et al., 2006), *Strychnos potatorum* (Sanmugapriya y Venkataraman, 2006), *Andrographis paniculata* (Pramyothin et al., 1994), *Picrorhiza kurroa* (Saraswat et al., 1999) y *Aquilegia vulgaris* (Liebert et al., 2005), los que contiene muchos tipos de compuestos fenólicos y flavonoides (Khatoon et al, 2006), éstos compuestos fenólicos están relacionados con la actividad antioxidante (Kumaran y Karunnakaran, 2007), potente efecto hepatoprotector contra el paracetamol (Udomuksorn et al, 2000) y el tetracloruro de carbono (Harish y Shivanandappa, 2006).

Los extractos vegetales han demostrado poseer efectos terapéuticos gracias a los múltiples metabolitos que contienen, sobre todo a los compuestos fenólicos (flavonoides), los que los convierten en candidatos para la prevención de diversas enfermedades inflamatorias, microbianas, alérgicas, cardiovasculares, cancerígenas, neurológicas entre otras. (Manthey, 1998).

Cenchrus echinatus L. vulgarmente conocido como cadillo, pega-pega o rata-rata (Soukup, 1970). Pertenece a la familia Gramineae, presenta culmos cilíndricos, ascendentes desde una base geniculada, de 15 a 85 cm de largo con pubescencia variable; láminas de glabras a pubescentes, de 4 a 26 cm de largo y de 3.5 a 11 mm de ancho, es utilizado para tratar problemas digestivos, genitourinarios, durante el embarazo, parto y puerperio debido a su actividad antiinflamatoria, cicatrizante, antiulcerosa y antiberrucosa (Carrizo, 2009).

Por todas estas razones nos planteamos el problema si: ¿El extracto etanólico de cadillo administrado por vía oral tendría efecto protector al administrarlo en diferentes

concentraciones en ratas con cirrosis hepática inducida por fenobarbital y CCl_4 ?; siendo el objetivo general determinar el efecto protector del extracto de cadillo sobre la cirrosis hepática inducida en ratas, y los objetivos específicos coleccionar y realizar la identificación taxonómica de la muestra vegetal, obtención del extracto y estudio fitoquímico, inducir la cirrosis hepática, realizar las pruebas de bioquímica sanguíneas y el estudio histopatológico de los hígados de las ratas; planteándonos la hipótesis que el extracto de *Cenchrus echinatus* L. al ser administrado a diferentes concentraciones por vía oral es protector frente a la cirrosis hepática inducida con fenobarbital y tetracloruro de carbono en ratas.

Material y métodos

Las muestra vegetales (planta completa) fueron recolectadas en el caserío de San José, distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope, Departamento de la Libertad. La identificación taxonómica fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Siendo estudiada y clasificada según el sistema de Cronquist (1988).

Para la preparación del extracto alcohólico, las plantas de cadillo fueron lavadas y sometidas a deshidratación a $40\text{ }^\circ\text{C}$, luego el material seco se trituró en un molino de mano, hasta obtener un polvo fino, el que se maceró con etanol de 96° a temperatura ambiente durante 7 días, posteriormente se filtró, dicho filtrado se desecó a 40°C en estufa hasta peso constante. El residuo obtenido será llamado extracto etanólico de cadillo (CYTED, 1995).

El estudio fitoquímico del extracto se realizó en los laboratorios la Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, al cual se le practicó, las reacciones de Gelatina, tricloruro férrico, Dragendorff, Molisch, NaOH 10%, Vainillin sulfúrico, Liebermann, Shinoda y Ninhidrina, Para determinar la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto (Lock de Ugaz, 1994).

Para la determinación del efecto hepatoprotector del extracto de cadillo frente a la cirrosis hepática se siguió el modelo de Regimbeau, 2008, se utilizaron 36 ratas machos cepa Holtzmann de 190 ± 10 g de peso corporal. Las ratas se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima-Chorrillos), las que fueron aclimatadas 7 días antes de la experimentación, siendo alojadas en jaulas metálicas con alimento balanceado y agua *ad libitum*, el ambiente de experimentación se mantuvo a temperaturas $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, con un ciclo de luz/oscuridad 12:12 y humedad relativa (40 ± 2)%, las cuales se dividieron en seis grupos de 6 ratas cada una, donde: El primer grupo fue el control y recibió solución salina fisiológica 4 ml/kg, el segundo fenobarbital(F) + tetracloruro de carbono(CCl_4), el tercero (F + CCl_4) + Silimarina (15 mg/kg), mientras que los grupos 4,5 y 6 recibieron (F + CCl_4) además de extracto a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente. El fenobarbital fue administrado las dos primeras semanas, el cual se disolvió en el agua de beber (500 mg/L de agua), la tercera semanas recibió diariamente y por vía oral 0.2 ml de CCl_4 (0.1 mL CCl_4 + 0.1 mL de aceite de oliva), el extracto de cadillo fue administrado desde el primer día por vía oral, haciendo uso de una cánula metálica.

Después de la última dosis oral de cada experimento, las ratas fueron anestesiadas con éter para extraerles sangre por punción cardiaca, la cual se utilizó para obtener el perfil hepático consistente en pruebas de: Colesterol, HDL, Triglicéridos, Glucosa, urea, Glutámico pirúvico transaminasa (TGP), fosfatasa alcalina, Proteína C reactiva, Superóxido dismutasa (SOD).

Al finalizar la inducción se eutanizó a las ratas con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg), se aperturó el abdomen y retiró el hígado para su estudio histopatológico según Humason, 1979, los factores evaluados fueron: fibrosis, formación de colágeno y nódulos de regeneración, siendo clasificados como: Abundante cantidad=(+++); Regular cantidad=(++); Poca cantidad=(+); Ausencia=(-).

Los resultados fueron expresados mediante la estadística descriptiva expresados en valores medios \pm error estándar(EA), porcentaje de variación a un intervalo de confianza del 95%, e inferencialmente por el análisis de varianza y de múltiples comparaciones de Duncan, los valores fueron significativos con una $p < 0,05$

Resultados

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo).

Reacción	Metabolito Secundario	Cantidad
Gelatina	Taninos	+++
Tricloruro férrico	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	+++
Hidróxido de sodio	Quinonas	++
Alfa naftol	Glicósidos	++
Liebermann	Esteroides y triterpenos	-
Shinoda	Flavonoides	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	+++

Leyenda: (+++) = Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad o positivo, (+)= Poca cantidad o trazas;(-)=Ausencia.

Tabla 2. Valores medios y porcentajes de variación del perfil hepático en ratas.

Tratamiento	Colesterol (mg/dL)			Lipoproteínas de alta densidad-HDL (mg/dL)			Triglicéridos (mg/dL)		
	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var
Normal	99.0	1.2	0.0	41.4	1.8	0.0	122.7	3.0	0.0
FT	155.2	2.1	56.7	46.2	1.9	11.4	188.3	2.9	53.5
FT + Silimarina 15 mg/kg	135.8	2.4	37.2	53.3	4.4	28.7	148.2	3.1	20.7
FT + Cadillo 50 mg/kg	118.5	2.2	19.7	55.0	1.4	32.8	159.3	1.9	29.8
FT + Cadillo 100 mg/kg	145.7	5.9	47.1	58.0	2.1	40.0	129.7	2.3	5.7
FT + Cadillo 200 mg/kg	182.0	3.5	83.8	58.5	4.1	41.2	149.2	5.1	21.6

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)			Urea (mg/dL)			Transaminasa glutámico pirúvica-TGP (UI/L)		
	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var
Normal	81.3	2.4	0.0	16.6	1.8	0.0	25.4	3.3	0.0
FT	91.3	1.9	12.4	36.7	2.3	121.3	53.2	3.5	109.1
FT + Silimarina 15 mg/kg	77.2	3.2	-5.1	21.0	1.3	26.7	46.3	3.5	82.2
FT + Cadillo 50 mg/kg	74.2	2.2	-8.8	16.3	1.2	-1.4	45.2	5.3	77.6
FT + Cadillo 100 mg/kg	88.8	2.9	9.3	15.0	2.0	-9.5	27.0	1.6	6.2
FT + Cadillo 200 mg/kg	98.2	3.0	20.8	14.2	1.9	-14.5	24.5	2.1	-3.7

Tratamiento	Fosfatasa alcalina (UI/dL)			Proteína C reactiva (mg/L)			Superóxido dismutasa (UI/L)		
	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var	Media	EE	% Var
Normal	89.4	1.8	0.0	1.5	0.0	0.0	1883.7	152.6	0.0
FT	125.2	2.7	40.0	4.3	0.1	183.6	3526.8	28.2	87.2
FT + Silimarina 15 mg/kg	97.3	2.2	8.8	1.9	0.0	26.0	2435.0	135.7	29.3
FT + Cadillo 50 mg/kg	107.8	2.3	20.6	2.6	0.3	75.8	2865.5	120.1	52.1
FT + Cadillo 100 mg/kg	103.8	2.5	16.1	2.3	0.2	50.0	2234.2	67.9	18.6
FT + Cadillo 200 mg/kg	101.3	3.8	13.3	1.8	0.1	20.0	2170.0	89.5	15.2

Porcentaje de variación (% var) = [(Valor medio del tratamiento X 100) / Valor medio del normal) – 100].
 EE = error estándar; FT = fenobarbital + tetracloruro de carbono.

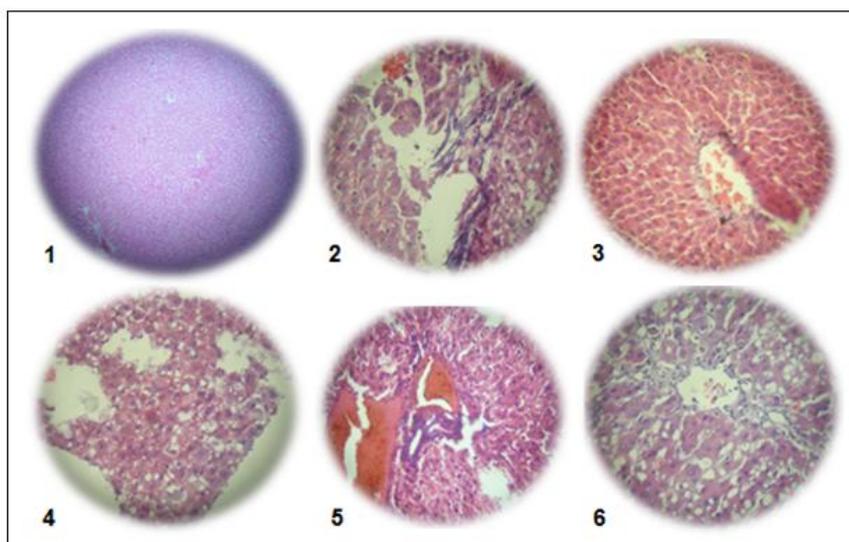


Figura 1. Vista fotográfica de los cortes histopatológicos de los hígados de ratas, donde: 1. Normal (100X); 2. Fenobarbital + tetracloruro de carbono (FT)(400X), 3. FTC + silimarina 15 mg/kg (400X); 4. FT + extracto 50 mg/kg (400X); 5. FT + extracto 100 mg/kg (400X); 6. FT + extracto 200 mg/kg (400X).

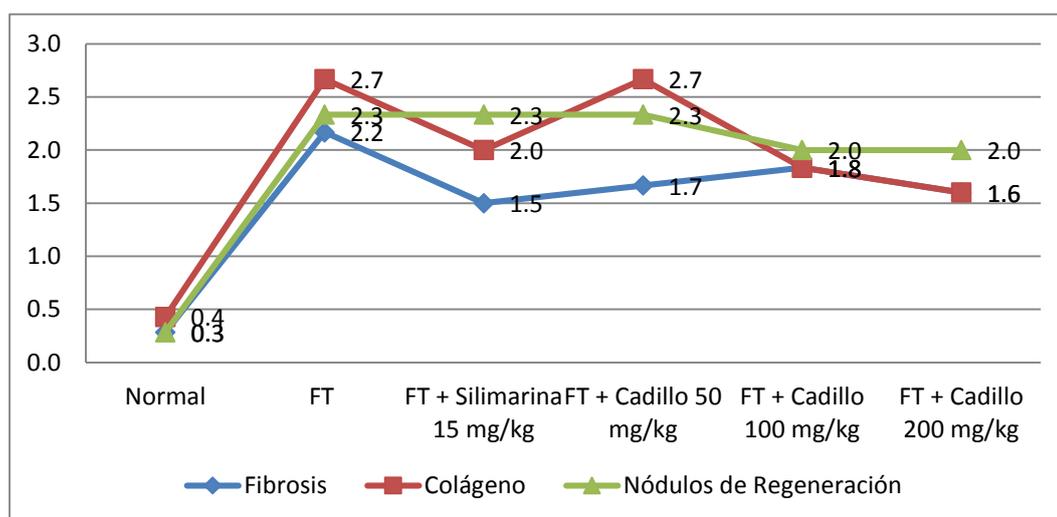


Figura 2. Valores medios de la fibrosis, formación de colágeno y aparición de nódulos de regeneración en los hígados de las ratas con inducción de cirrosis hepática por CCl₄ y fenobarbital.

Discusión

Dentro de los componentes fitoquímicos del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) se ha reportado la presencia de taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y aminoácidos libres en mayor proporción (tabla 1), los cuales tendrían implicancias sobre la protección hepática en ratas, que fueron inducidas a cirrosis por tetracloruro de carbono (CCl₄) y fenobarbital.

En la la tabla 1. se muestran los cambios sobre el perfil hepático, donde se aprecia que el fenobarbital- CCl₄ indujo incremento de colesterol, HDL, glucosa, urea, glutámico pirúvico transaminasa (TGP), fosfatasa alcalina, proteína C-reactiva y Superóxido dismutasa (SOD); y los tratamientos con extracto etanólico a dosis de 200 mg/kg mejoró estos desniveles al

apreciarse una disminución marcada de glutámico pirúvico transaminasa, urea, (TGP), fosfatasa alcalina, Proteína C reactiva, superóxido dismutasa (SOD) y en menor proporción al colesterol, HDL(lipoproteínas de alta densidad), triglicéridos y glucosa.

En la figura 2, la formación de colágeno, fibrosis y nódulos de regeneración fueron elevados indicando daño hepático en los grupos que recibieron fenobarbital- CCl₄; estos se redujeron con los extractos a diferentes dosis, incluso con silimarina.

La cirrosis observada se explicaría porque el fenobarbital es un potente estimulante hepático que in vivo produce hipertrofia e hiperplasia a este nivel. Asimismo, se ha comunicado que el tratamiento a largo plazo en ratas resulta en atrofia, disminución y pérdida de regeneración hepática. En cambio, el CCl₄ se metaboliza activamente por el citocromo P450 al radical CHCl₃, el cual inicia la lipoperoxidación celular, produciendo daño hepático al comprometer la integridad de las membranas y por la unión covalente de intermedios reactivos a moléculas biológicamente importantes, como el glutatión, induciendo necrosis y daño hepático en general. Por ello, se considera al estrés oxidativo como el principal mecanismo molecular involucrado en la toxicidad por CCl₄, el cual tiene rol importante para la inactivación de células Kupffer en la fibrosis hepática inicial inducida por este agente. La producción de radicales libres durante el desarrollo del daño hepático conduce a la disminución de la actividad de la superóxido dismutasa (Aldaba, 2011).

Entre los principales hallazgos histológicos de este estudio estuvo la disminución del daño a la estructura hepática influenciada, por el extracto etanólico cadillo en ratas con cirrosis inducida por fenobarbital y CCl₄ (figura 2). En esta figura se aprecia reducción del daño hepático similar a lo obtenido con la administración de la silimarina; si bien existe daño moderado, la presencia de fibrosis es marcadamente en el control con los inductores y menor en los tratamientos, lo que estaría directamente relacionado con los metabolitos que componen el extracto de cadillo.

Los flavonoides son inhibidores de la formación de leucotrieno B₄, potenciadores de la formación de prostaglandina E₂ e inhibidores de la liberación de óxido nítrico. Así como, actividad hepatoprotectora relacionada con la capacidad de estos de disminuir el estrés oxidativo y atrapar radicales libres, tanto in vivo como in vitro; un ejemplo es el caso de la quercetina, el cual ha demostrado ser efectivo contra el daño hepático en ratas con inducción de cirrosis con tetracloruro de carbono, asociado con un incremento de la capacidad antioxidante del hígado para atrapar radicales peroxilo; y en ratas con obstrucción biliar crónica, el tratamiento con quercetina resultó en una preservación significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes, fibrosis menos pronunciada y marcada inhibición de la proliferación ductular biliar (Pérez, 2011).

En este estudio, el extracto de cadillo se comparó con la silimarina, que es un flavonoide antioxidante aislado del cardo mariano (*Silybum marianum* L.) y se utiliza clínicamente como un desintoxicante del hígado, hepatoprotector y anticancerígeno (Polyak, 2010).

Al evaluar diferentes marcadores bioquímicos y hematológicos no hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento que recibieron tanto el tóxico como la silimarina y las diferentes dosis del extracto de cadillo.

En la figura 2, se evidencia incremento en la fibrosis, colágeno y por tanto el daño hepático; la fibrosis hepática es la consecuencia común a lesiones hepáticas crónicas de muchas etiologías. El abuso crónico de alcohol es el principal motivo de que aparezca

fibrosis hepática, lo que conduce a la cirrosis, una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La fibrosis se caracteriza por una acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), tal como el colágeno de tipo I (encontrado en humanos), que se encuentran normalmente en la zona pericentral y perisinusoidal del hígado (Vera, 2006).

La silimarina ha ratificado su efecto protector sobre el daño inducido en el hígado, como se evidenció en esta investigación (Tabla 2, figura 1-2), mientras que el tetracloruro de carbono induce incrementos de transaminasas y colágeno entre 4 a 5 veces más que el normal, mientras que la administración de CCL₄ más silimarina disminuyó esas elevaciones significativamente, posiblemente al proteger la membrana celular del hepatocito, y así evitaría el desequilibrio colesterol: fosfolípidos y esfingomiélin: fosfatidilcolina, y también redujo los niveles de colágeno (Pradhan, 2006).

Conclusión

El extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) ejerce efecto protector de la cirrosis hepática inducida en ratas por fenobarbital y tetracloruro de carbono

Referencias bibliográficas

- Aldaba LR, Moreno MG, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. (2011). Protective effects of allopurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: Modulation of NF- κ B, cytokine production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2011. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651100239X>.
- Boelsterli, U.A. (2003). *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemical Disrupts Biological Targets*. Taylor & Francis, London.
- Bouneva, I., Abou-Assi, S., Heuman, D.M., Mihás, A.A. (2003). Alcohol liver disease. *Hospital Physician*, 31–38.
- Carrizo, E., Palacio, M., Roic, L. (2009). *Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero (Argentina)*. Citado 16 setiembre del 2009, disponible en: <http://www.dominguezia.org.ar/volumen/articulos/18-3.pdf>.
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden, 555.
- CYTED. *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. (1995). Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación*; 220.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., Benner, K. (1998). Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 93, 139–143.
- Harish, R., Shivanandappa. (2006). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*, 95, 180–185.
- Khatoon, S., Rai, V., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S. (2006). Comparative Pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 79–86.
- Kumaran, A., Karunnakaran, R.J. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Swiss Society of Food Science and Technology*, 40, 344–352.
- Lieber, C.S. (2006). Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 7, 84–94.

- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2° Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Manthey, J., Grohmann, K., Guthrie, N. (2001). *Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation*. *Curr Med Chem*, 8:135-53.
- Medina, E., y Kaempffer, A. (2002). Cirrosis hepática en Chile. *Revista Chilena de Salud Pública*, Vol 6 (1): 3.
- MINSA- Oficina de Estadística e Informática. Informe estadístico de Mortalidad en Perú a nivel nacional. (2000). Tomado el 01 de octubre de 2006. http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/SalaSituacional/04_Mortalidad.pdf
- Pramyothin, P., Chirdchupunsare, H., Rungsipipat, A., Chaichantipyuth, C. (2005). Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn. extract in rats treated with ethanol: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 408–411.
- Perez Gutierrez RM, Anaya Sosa I, Hoyo Vadillo C, Victoria TC. (2011). Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol*. 49(11):1121-7.
- Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, Graf TN, Oberlies NH. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(13):5995-9.
- Pradhan SC, Girish C. (2006). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res*. 124(5):491- 504.
- Ravikumar, V., Shivashangari, K.S., Devaki, T., (2006). Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens* against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006: 101, 55–60.
- Regimbeau, J.M., Fuks, D., Kohneh-Shahri, N., Terris, B. (2008). Soubrane O.Restrictive model of compensated carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol*, 14(45):6943-6947.
- Sanmugapriya, E., Venkataraman, S. (2006). Studies on hepatoprotective and oxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seed on CCl₄induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105,154–160.
- Saraswat, B., Visen, P.K.S., Patnaik, G.K., Dhawan, B.N. (1999). Ex vivo and in vivo investigations of *Picrorhiza kurroa* in an alcohol intoxication model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 263–269.
- Soukup, S.(1970). *Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana*. Lima, 70-72.
- Udomuksorn, W., Phurthi-Punlai, S., Wongnawa, M., Nitiruangjaruj, A., Wanapong, N., Yunyium, N. (2004). Effects of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Journal of the Department of Medical Sciences*, 2, 119–132.
- Varvasovszky, Z., Mckee, M. (2000) Problem drinking among hospitalized patients in Hungary. *Alcohol & Alcohol*,35(6):574-579.
- Vera M, Nieto N. (2006). Células estrelladas hepáticas y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig*. 98(9): 674-684.
- Zimmerman, H.J. (1999). Hepatotoxicity: the adverse effects of drug and other chemicals on the liver. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 147–175.