**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA**
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA**

# "EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO *Medicago Sativa* EN *Rattus norvegicus* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY INDUCIDAS A DAÑO HEPÁTICO CON TETRACLORURO DE CARBONO"

Tesis presentada por el Bachiller:
WALDIR ALEJANDRO CORNEJO GONZALES
Para optar el Título Profesional de:
Biólogo

ASESOR:
Prof. Dr. Henry Juan Díaz Murillo

AREQUIPA - PERÚ

2018

---

Prof. Dr. Henry Juan Díaz Murillo
ASESOR

MIEMBROS DEL JURADO

---

Dr.  Benjamín Dávila

PRESIDENTE

---

Dr. Walter Colque Rondon

SECRETARIO

---

Dr. Henry Juan Díaz Murillo

INTEGRANTE

## DEDICATORIA

Esta tesis se  la dedico a mi Dios que supo guiarme por buen camino, darme fuerzas para seguir adelante ante los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades, sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy. A mi madre por su apoyo, consejos, comprensión, amor en los momentos difíciles. A mis hijos por los cuales se renuevan mis ganas de seguir creciendo día con día. A mi compañera por estar a mi lado todo este tiempo y darme su amor.

**AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco a la universidad San Agustín por haber aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir día a día.

Agradezco también a mi asesor Dr. Henry Juan Díaz Murillo por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico para aplicarlo en el desarrollo de esta tesis.

A mi madre por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue y que en esta vida nadie regala nada.

A mis hijos y pareja por su compañía y por que con solo verlos mi vida toma sentido.

**ÍNDICE DEL CONTENIDO**

**RESUMEN** ..... I
**INTRODUCCIÓN** ..... II
**OBJETIVOS** ..... IV
OBJETIVO GENERAL ..... IV
OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... IV
**HIPÓTESIS** ..... V
**CAPÍTULO I** ..... 1
**MARCO TEÓRICO** ..... 1
1.1.ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL HIGADO HUMANO ..... 1
1.2.FUNCIONES DEL HIGADO ..... 4
1.3.ENZIMAS HEPATICAS. ..... 5
1.4.HEPATOTOXICIDAD RELACIONADA CON FARMACOS: ..... 5
1.4.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA HEPATOPATÍA INDUCIDA POR TÓXICOS O FÁRMACOS. ..... 6
1.5 INFLAMACIONES Y COLESTASIA ..... 6
1.6 FARMACOS PROTECTORES DEL HIGADO ..... 17
1.7 GERMINADO DE ALFALFA (Duke 2016) ..... 21
1.8.COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CON ACCIÓN HEPATOPROTECTORA ..... 23
1.9 HEPAPROTECTORES HEPABIONTA ..... 25
**CAPÍTULO II** ..... 27
**MATERIAL Y MÉTODOS** ..... 27
2.1. LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN ..... 27
2.2. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN ..... 27
2.3. MUESTRA DE ESTUDIO ..... 27
2.4. VARIABLES ..... 27
2.5. TÉCNICA ..... 28
2.5.1 OBTENCIÓN DEL GERMINADO DE *Medicago sativa.* ..... 28
2.5.2 INTOXICACIÓN CON TETRACLORURO DE CARBONO, DOSIS DEL EXTRACTOY HEPABIONTA ..... 29
2.6 MATERIAL ..... 30
2.7. MÉTODOS ..... 30
2.7.1. MÉTODO PARA EL DOSAJE DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS ..... 30
2.7.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA: MÉTODO DE HARRIS ..... 33
2.7.3. MÉTODO ESTADÍSTICO ..... 36
**CAPÍTULO III** ..... 37
**RESULTADOS** ..... 37
3.1. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA ..... 41
**DISCUSIÓN** ..... 45
**CONCLUSIÓNES** ..... 48
**RECOMENDACIONES** ..... 49
**BIBLIOGRAFÍA** ..... 50
**ANEXOS** ..... 53
ANEXO 1 ..... 54
ANEXO 2 MATRIZ DE TABULACION ..... 56

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de extracto acuoso de ***Medicago sativa "alfalfa"***en ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley intoxicadas con tetracloruro de carbono. Se llevó a cabo en el Bioterio y Laboratorio Seccion Academica de Ciencias Fisiologicas del Departamento Academico de Biología de la UNSA, Arequipa, durante los meses de noviembre del 2017 a marzo del 2018.

Se utilizaron 24 ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley distribuidas en cuatro grupos de 6 ratas cada uno: A los cuatro grupos tetracloruro de carbono a dosis de 0,5 ml/kg de peso por vía intraperitoneal (ip), administrado 2 veces / semana durante 4 semanas con el objetivo de producir daño hepático; Al grupo experimental Nº 1 no se le administró extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** (Grupo blanco), al grupo experimental Nº 2 se le administró vía orogástrica extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***a dosis de 100 mg/Kg./día, (Tratamiento 1); al grupo experimental Nº 3 se le administró vía orogástrica extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***de 200 mg/Kg./día (Tratamiento 2) y finalmente al grupo experimental Nº 4 se le administró vía orogástrica hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día (control). El tiempo de tratamiento fue de treinta días, las evaluaciones del peso corporal y la actividad hepática durante el estudio se realizaron cada diez días.
Se utilizó el método de Valtek en la determinación de TGO, TGP. La insuficiencia hepática se obtuvo con la administración de tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/Kg/2 veces por semana.

Los resultados mostraron que las ratas que estuvieron sometidas al Tratamiento 1 y 2 de extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** a dosis de 100 y 200 mg/Kg./día tuvieron una disminución de moderado a una forma leve en la degeneración grasa y congestión vascular hepática mejor que las que estuvieron sometidas al Tratamiento 3 con hepabionta 5 mg/Kg./día.


**Palabras claves :** tetracloruro , germinado , TGO ,TGP , hepabiota , esteatosis.

# INTRODUCCIÓN

El hígado, es uno de las glándulas más importantes del organismo ya que ejecuta un gran número de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias (endógenas y exógenas, hormonas, esteroides, fármacos y toxinas), que recibe desde el torrente circulatorio y el sistema portal( ). Por lo tanto el hígado está muy propenso a sufrir daños funcionales o anatómicos por la exposición a tóxicos (químicos u orgánicos) debido a que los dos sistemas circulatorios pueden llevar hasta él, sustancias tóxicas o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en este órgano (bioactivación).

Algunas de las reacciones que sufren los tóxicos en el hígado es que se convierten en sustancias menos tóxicas o no tóxicas y más fáciles de excretar, lo que se denomina detoxificación.

Entonces la hepatotoxicidad, producida por un largo periodo de exposición a dosis altas de un producto químico u orgánico, es responsable del 5% de todos los ingresos hospitalarios y de un 50% de todas las causas de insuficiencia hepática aguda( , ); las manifestaciones hepatotóxicas se muestran con un amplio espectro de signos clínicos que van desde la elevación leve y asintomática de las transaminasas (sobre todo la TGP) hasta la insuficiencia hepática fulminante.

A nivel nacional la Cirrosis Hepática es la segunda causa de muerte en personas cuyas edades oscilan entre los 30 y 59 años y está entre las 10 principales causas de mortalidad por cada 100 mil personas, por causas específicas, según la Dirección General de Epidemiologia (DGE) del MINSA (2010).

Por otro lado según la revista de Gastroenterología del Perú (2005) la incidencia de hepatotoxicidad por fármacos es de 10 a 20% y generalmente se recupera si el tratamiento es continuo pero, también puede progresar a hepatitis sintomática del 1-3% mientras que, el 10% de los que hacen hepatitis ictérica progresan a insuficiencia hepática fulminante.

Actualmente existen muchos tratamientos médicos para los diferentes daños hepáticos producidos por medicamentos, alcohol u otros; pero tanto médicos como pacientes demandan medicamentos efectivos que no produzcan efectos secundarios y las hierbas medicinales constituyen una alternativa natural y viable.

Las plantas medicinales han sido utilizadas tradicionalmente desde hace miles de años por el hombre para la prevención y tratamiento de enfermedades.

El consumo de germinados en especial de la alfalfa (Medicago Sativa) se están incrementando actualmente en nuestras dietas como una alternativa orgánica por sus múltiples funciones ya que cada semilla de grano entero que germina concentra grandes propiedades y multiplica en

gran medida los nutrientes y beneficios, son ricas en proteínas, carbohidratos, minerales, vitamina C, E, A y vitaminas del complejo B, así como ácidos esenciales no saturados (vitamina E) y una gran cantidad de enzimas potentes que participan en una innumerable lista de funciones en el cuerpo. Estos nutrientes son de gran calidad que sería una excelente alternativa en el tratamiento hepatoprotector.

La alfalfa por ser un producto común y abundante en la agricultura regional es que resulta ser una alternativa económica para incluir a la dieta habitual, de fácil manejo para obtener el germinado de alfalfa en casa y que pueda ser utilizada por toda la familia y de esta forma mantener la salud máxima del hígado que es un importante órgano por su variada participación en muchos procesos fisiológicos esenciales del organismo.

Por lo anteriormente expuesto, los resultados del presente estudio generarán información para posteriores investigaciones como también para retomar la importancia del uso de germinados de alfalfa en el tratamiento alternativo Hepatoprotector frente a los productos sintéticos. Las plantas medicinales han sido utilizadas tradicionalmente desde hace miles de años por el hombre para la prevención y tratamiento de enfermedades Robbins (2013).

Entre muchas cualidades medicinales que se les atribuye al extracto acuoso de germinado de alfalfa se incluyen las coleréticos, colagogas, además de ser considerado como estimulante protector hepático frente a diversos agentes nocivos. Dichas propiedades radican en los componentes fitoquímicos Aesculetina, Beta amirina, Beta sitosterol, Acido cafeico, Colina, Esculetina, Acido ferúlico, Acido glucorónico, Caempferol, Metionina, Zeaxantin, Niacina, Acido coumarico, Quercetin, Escopoletina, Taninos, Vitamina E Duke (2016).

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto Hepatoprotector del extracto acuoso de Germinado de Alfalfa (*Medicago Sativa*) en Ratas con daño Hepático inducido experimentalmente con Tetracloruro de carbono.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del extracto acuoso de germinado de alfalfa en el peso corporal de ratas inducidas experimentalmente con tetracloruro de carbono.
2. Comparar los niveles de transaminasas (TGO transaminasa glutámico oxalacetica y TGP transaminasa glutámico -pirúvica) antes y después de haber administrado elextracto acuoso de germinado de alfalfa.
3. Analizar la acción hepatoprotectora del extracto acuoso de germinado de alfalfa sobre el peso corporal, actividad de TGO, TGP y microscópica de hígado en ratas inducidas experimentalmente con tetracloruro de carbono.

# HIPÓTESIS

Dado que ***Medicago sativa*** dentro de sus componentes fitoquímicos presentan, Aesculetina, Beta amirina, Beta sitosterol, Acido cafeico, Colina, Esculetina, Acido ferúlico, Acido glucorónico, Caempferol, Metionina, Zeaxantin, Niacina, Acido coumarico, Quercetin, Escopoletina, Taninos, Vitamina E, , los cuales presentan principios activos con actividad hepatoprotectora, es probable que el extracto acuoso de ***Medicago sativa*** administrado oralmente a ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley intoxicadas con tetracloruro de carbono tenga acción hepatoprotectora.

# CAPÍTULO I

# MARCO TEÓRICO

## 1.1. ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL HIGADO HUMANO

ANATOMÍA MACROSCÓPICA.
El hígado ocupa casi la totalidad del hipocondrio derecho y parte del epigastrio e hipocondrio izquierdo, su peso aproximado en el adulto es de 1500 g.(11).

El hígado es el órgano más grande y metabólicamente más complejo del cuerpo humano. En él se reconocen dos caras: Una antero-superior y otra postero-inferior.

La superficie hepática está cubierta por una doble membrana fibrosa, el peritoneo visceral y la cápsula de Glisson. Consiste en miles de unidades funcionales individuales conocidos como acinos hepáticos.

Tiene gran capacidad de regeneración en respuestas a lesiones (11).

MICROSCOPÍA ÓPTICA.
Con fines clínicos pueden considerarse en el hígado su riego sanguíneo, las células hepáticas o del parénquima, las células de Kuptfer, los conductos biliares y las vías linfáticas (11).

**Células hepáticas:**
Forman el mayor volumen del órgano. Estas células o hepatocitos aparecen de forma poliédrica cuando se les observa dentro del lobulillo hepático.

El diámetro oscila en general alrededor de 3Ou. el núcleo es grande de acuerdo con su gran capacidad regenerativa. Presenta uno o más nucleolos.

La cromatina nuclear está formada principalmente por ADN

El citoplasma tiene aspecto diferente según la coloración que se utiliza para su visualización. Con la hematoxilina eosina aparece de aspecto grumoso.

Las células del parénquima llevan a cabo procesos metabólicos muy complejos y de ellos depende el papel central que juega el hígado en el metabolismo (11).

**Células de Kupffer.**

Son células mesenquimáticas que bordean los sinusoides hepáticos. Su presencia hace del hígado un órgano perteneciente al retículo endotelial. Presenta un gran núcleo alargado y un citoplasma escaso que se prolonga en finas bandas. Estas células fusiformes filtran partículas extrañas diminutas y bacterias e intervienen en los procesos inmunológicos del hígado (11).

Por sus células de Kupffer y su abundante riego sanguíneo el hígado suele afectarse secundariamente en infecciones y otras enfermedades sistémicas aumentando de tamaño y número en las más variadas situaciones de daño hepático.

**Arquitectura hepática.**

En una sección histológica de hígado se aprecian dos zonas de estructura bien definida.

• El espacio portal
• El lobulillo.

**El espacio portal**.- Es de naturaleza conjuntiva y está en continuidad con la cápsula de Glisson que envuelve toda la glándula. En él transcurren todas las ramas de la vena porta, de las arterias hepáticas, las vías biliares intrahepáticas, así como también los elementos linfáticos nerviosos (11).
La trama conjuntiva del hígado comprende tres tipos de fibras:

• Las fibras colágenas. Están confinadas al espacio portal y solo rebasan sus límites en condiciones patológicas.

• Las fibras de reticulína. Forman un esqueleto de sostén de los hepatocitos a los cuales bordean tangencialmente transcurriendo por el espacio de Disse. En

los colapsos post-necróticos dichas fibras se superponen una contra otras dando el aspecto de bandas de fibrosis.

• Las fibras elásticas. Además de encontrarse en las paredes vasculares forman parte del esqueleto conjuntivo, están también aumentados en procesos de fibrosis sobre todo a nivel del espacio portal.

**Lobulillo.-** La masa hepática total está formada por un conjunto de unidades anatómicas funcionales, los lobulillos.

El lobulillo o acino de Rappaport está constituido por la zona comprendida entre dos venas centrales vecinas y un espacio portal.

**Vascularización intrahepática.**

Entre el 65 y el 85% de la sangre que llega al hígado en condiciones normales, lo hace por vía porta.

La oxigenación del hepatocito depende del sistema portal en aproximadamente un 50%.

Una vez dentro del hígado, las ramas portales se subdividen en otras cada vez más pequeñas hasta dar una vena terminal y distribuidora que al dividirse en múltiples ramúsculos originará el lecho sinusoidal.

Los sinusoides convergen hacia la vena central del lobulillo. A su vez la reunión de varias venas centrales constituye la vena supralobulillar, está originará por convergencia con sus similares las cuatro venas suprahepáticas que drenan al hígado (7).

La arteria hepática proporciona entre el 20 y el 35% de la sangre que llega al hígado y es responsable de un 50% de su oxigenación. Irriga las estructuras del espacio portal.

**Vías biliares intrahepáticas.**

Los conductos biliares se inician como canalículos muy pequeños formados por células parenquimatosas vecinas. Estas estructuras recubiertas por microvellosidades, se une progresivamente para formar conductillos, conductos biliares, interlobulillares y los conductos hepáticos mayores (7, 11)

Fuera del hilio hepático, el conducto hepático principal se une con el cístico proveniente de la vesícula biliar para formar el colédoco que drena hacia el duodeno.

Cualquier interferencia del flujo de bilis produce el cuadro clínico de la colestasís.

**Vías linfáticas.**

A pesar de la importancia que tienen las vías linfáticas en la fisiología hepática poco es lo que se ha podido demostrar desde el punto de vista anatómica.

Más conocidos son los vasos linfáticos portales que drenan el hígado.
Ellos acompañan a los vasos sanguíneos y conductos biliares pasando luego por los ganglios biliares para seguir a la circulación linfática general (7, 11).

## 1.2.- FUNCIONES DEL HIGADO

El hígado es el órgano con una gran variedad de funciones metabólicas, sintéticas y de degradación (25).

Para conocer la respuesta metabólica del hígado a la lesión se deben reconocer las funciones más importantes del hígado, entre estas tenemos:

- El hígado sintetiza en forma activa muchas proteínas.
- El hígado es el sitio principal del metabolismo de los aminoácidos en el organismo.
- El hígado es activo en la síntesis de lípidos en especial de triglicéridos.

- Almacena glucosa en la forma de glucógeno y este último forma el 6% del peso normal del hígado.
- Cumple un rol destacado en el metabolismo de purinas y pirimidinas.
- Interviene en la síntesis de lipoproteínas así como en la síntesis de urea.
- Formación y excreción de bilis.
- Regulación de la homeostasis de los carbohidratos.
- Secreción de lipoproteínas del colesterol.
- Formación de albúminas séricas y enzimas.
- Formación de factores de coagulación (25).

### 1.3. ENZIMAS HEPATICAS.

Los hepatocitos intactos contienen en su protoplasma cierto número de sustancias o enzimas en concentraciones mucho más elevadas que en la sangre circulante. Estas sustancias pueden ser liberadas y pasar a la sangre después de lesionarse la pared de la célula. La persistencia de cada sustancia anormal depende de un balance entre la intensidad de liberación y su conservación sin descomponerse en el torrente vascular (25).

La transaminasa glutámico pirúvica en el suero es la medida más específica y útil para descubrir la necrosis hepatocelular. La transaminasa glutámico oxalacética del suero actúa de manera similar, pero es menos específica, pues todos los músculos estriados contienen este material (24).

### 1.4. HEPATOTOXICIDAD RELACIONADA CON FARMACOS:

Siempre se debe considerar la hepátotoxicidad relacionada con fármacos en el diagnóstico diferencial de la disfunción hepática. El cuadro clínico puede ser de lesión hepátocelular (similar a una hepatitis), colestasis o ambos. Las lesiones vasculares o los tumores del hígado pueden ser causados por fármacos o toxinas (por ejemplo, esteroides anabólicos, cloruro de vinilo, píldoras para el control de la natalidad). Las enzimas hepáticas tornan a su normalidad algunas semanas después de suspendido el agente desencadenante. No se recomienda un nuevo desafío con el fármaco a menos que éste sea esencial, dado que puede producir una insuficiencia hepática fulminante (24).

### 1.4.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA HEPATOPATÍA INDUCIDA POR TÓXICOS O FÁRMACOS.

Un medicamento dado puede causar más de una forma de lesión hepática. Por ejemplo, es posible que la isoniacida produzca hepatitis viral aguda o hepatitis crónica activa (24, 25).

**Necrosis zonal.** - Se origina más a menudo por hepátotoxinas que provocan daño predecible y relacionado con la dosis que también puede producirse en animales de laboratorio. Los ejemplos incluyen necrosis centro lobulillar relacionada con toxicidad por tetracloruro de carbono y acetaminofen.

**Hígado graso.** Suele representar la acumu1ació de triglicéridos dentro del hepatocito, la grasa se acumula en grandes gotas que desplazan al núcleo del hepatocito y le confiere aspecto parecido al adipocito.

**Colestasis.** Manifestaciones muy frecuente de lesión hepática inducida por fármacos.

### 1.5 INFLAMACIONES Y COLESTASIA

En la práctica, el término hepatitis se utiliza para designar inflamaciones con compromiso difuso del hígado. No se suele emplear para las lesiones focales, ni para abscesos hepáticos o inflamaciones purulentas que afectan principalmente componentes de los espacios porta (25).

**Hepatitis aguda viral**

Habitualmente por hepatitis aguda viral se entiende una hepatitis por virus hepatotrópicos (virus de la hepatitis ); sin embargo, existe un grupo de otros virus, que en el curso de infecciones sistémicas, también afectan al hígado. Por ejemplo, citomegalovirus, herpes viridae, mononucleosis infecciosa.

La evolución de los pacientes infectados por virus de la hepatitis puede asumir las siguientes formas: a) Infección subclínica, sin manifestaciones de enfermedad; b) Enfermedad clínica autolimitada, que a su vez puede presentarse de tres formas principales: Ictericia clásica o hepatitis ictérica, hepatitis anictérica y hepatitis

colestásica; en ésta última predominan las manifestaciones clínicas y morfológicas de colestasia (obstrucción del flujo biliar intrahepático); c) Formas evolutivas especiales: hepatitis fulminante, paso a hepatitis crónica, paso al estado de portador asintomático (30).

Microscopia : Hígado tumefacto e hiperémico.

1. Lesiones alterativas predominantemente centrolobulillares: Cuerpos acidófilos (necrosis celular aislada de coagulación), balonización (degeneración vesicular hidrópica), necrosis lítica (necrolisis precoz); la trama reticular del hígado está conservada. Los mecanismos por los que se produce la lesión de los hepatocitos no han sido aclarados, probablemente son de tipo inmunológico.

2. Infiltrado inflamatorio: hay infiltración linfo-histiocitaria en todos los espacios porta, e infiltración en el lobulillo, que puede ser difusa o focal.

3. Signos regenerativos: mitosis, aumento del número de hepatocitos binucleados.

Caracteres histológicos sugerentes de paso a formas evolutivas especiales
1. Necrosis masiva: Cuando compromete más del 85% la evolución es la de una hepatititis fulminante, con grave insuficiencia hepática. El aspecto del hígado varía según el tiempo que sobreviva el paciente: si son pocos días, el hígado está disminuido de tamaño y consistencia, es friable; al corte domina una coloración amarillenta anaranjada; el parénquima, turbio. Si son algunas pocas semanas, el hígado, empequeñecido, es flácido; al corte domina un color rojizo en zonas esplenizadas : homogéneas, brillantes, con pérdida de la estructura lobulillar. Microscópicamente ellas corresponden a zonas de colapso de la trama fibrilar, con gran ingurgitación sanguínea de los sinusoides, entre los cuales se encuentran detritus celulares. Si son algunos meses, el hígado, pequeño, muestra extensas cicatrices que alternan con nódulos regenerativos. Estos tres cuadros morfológicos se denominan en la patología clásica, atrofia amarilla aguda , atrofia roja subaguda e hiperplasia nodular múltiple (de Marchand ).
2. Necrosis en puente: Necrosis de hepatocitos en áreas que unen espacios porta entre sí (porto-portal) o espacios porta con venas centrolobulillares (porto-central).

Generalmente se observa como área de desaparición de células hepáticas, acompañada de colapso del retículo: no se aprecia la etapa de necrofanerosis.

3. Necrosis en sacabocado o necrosis erosiva: Destrucción de hepatocitos aislados de la placa limitante periportal, con interrupción de ésta. En lugar de los hepatocitos hay infiltración linfocitaria, que tiende a rodear hepatocitos, generalmente balonizados, en vías de desaparición. No se aprecia la etapa de necrofanerosis. La presencia de necrosis en sacabocado puede significar el paso a la llamada hepatitis crónica activa .

**Etiología**

Los principales virus de la hepatitis son los siguientes:

Virus hepatitis A. Es un virus cuyo material genético es ARN, de 27 nm de diámetro. Produce la hepatitis llamada epidémica, por transmisión fecal-oral. Tiene un período de incubación de unas 4 semanas. No se presenta en la forma fulminante; no pasa a la cronicidad ni al estado de portador.

Virus hepatitis B. Es un virus ADN. El virión completo (partícula DANE) está constituido por: a) Una envoltura externa de lípidos, proteína y carbohidratos como antígeno de superficie (HBsAg); b) Una porción central, que se expresa en parte como antígeno central (core ) HBcAg. La hepatitis por virus B se transmite por vía parenteral: transfusión (representa el 10% de las hepatitis transmitidas por transfusión), por agujas de inyección y a través de soluciones de continuidad en piel y mucosas por contacto sexual (homosexual o heterosexual). Tiene un período de incubación de 2 ó3 meses. Causa una hepatitis aguda que dura semanas o meses. En alrededor del 25% de los casos puede presentarse como hepatitis fulminante. Puede evolucionar a la cronicidad o pasar al estado de portador. Los pacientes infectados con virus B tienen mayor riesgo de carcinoma hepatocelular (30).

Virus hepatitis C. Recientemente caracterizado, su material genético es ARN. Las vías de transmisión son similares a las del virus B. Alrededor del 90% de las hepatitis post-transfusionales son por virus C. Produce una hepatitis aguda que puede presentar una evolución fulminante. Puede evolucionar a hepatitis crónica o al estado de portador. La infección por virus confiere mayor riesgo de carcinoma hepatocelular (30).

**Hepatitis crónica**

Se define la hepatitis crónica como la presencia de inflamación en el hígado por más de seis meses. Según la etiología y patogenia se reconocen los siguientes tipos

Histología: Aparte la acumulación de pigmento biliar en canalículos y hepatocitos, el aumento de presión produce dilatación de los conductos que unen el conductillo biliar portal con el canalículo (colangiolos); se dilatan a continuación los conductillos, rodeados por polinucleares, que luego migran desde fuera de la membrana basal a través del epitelio al lumen (colangitis aguda) (31).

La obstrucción extrahepática, particularmente la causada por cálculos, puede favorecer una infección bacteriana ascendente, con exudado purulento (colangitis supurada), enfermedad grave que lleva a la formación de microabscesos y abscesos hepáticos (abscesos colangíticos)

Si persiste la obstrucción sin colangitis, hay una reacción fibrosa en el espacio porta alrededor de los conductillos biliares, proliferación de conductillos en los espacios porta y, con menor frecuencia, desarrollo de tabiques fibrosos entre espacios porta.

**Abcesos hepáticos**

En el hígado pueden producirse abscesos por la llegada de bacterias piógenas por distintas vías; las principales son:

1. Vía biliar (abscesos colangíticos), secundarios a obstrucción de la vía biliar
2. Vía vena porta, a partir de una inflamación intraabdominal, como la apendicitis aguda (abscesos pileflebíticos).
3. Vía arteria hepática, en el curso de una séptico-piohemia.
4. Por contigüidad (por ejemplo, desde un absceso subfrénico o una colecistitis aguda).
5. Vía directa (trauma).
6. Infección de un quiste.

Los abscesos hepáticos pueden ser únicos o múltiples; miden desde milímetros a varios centímetros; pueden confluir formando grandes cavidades. Los abscesos pequeños pueden curar con cicatriz. Otros abscesos pueden fistulizarse a la cavidad peritoneal o a un órgano vecino previamente adherido al hígado, o a pleura y pulmón, a través del diafragma (31).

## CIRROSIS HEPATICA

Cirrosis es una fibrosis hepática difusa, sistematizada, de carácter inflamatorio o desencadenada por necrosis de hepatocitos. La fibrosis delimita nódulos de parénquima remanente o con regeneración atípica de manera similar, en forma de septos, en todos los sectores del órgano (24).

El concepto de cirrosis es morfológico, derivado de un hecho anatómico y no una entidad nosológica; la cirrosis representa un estado terminal de diversas enfermedades hepáticas.

**Principales formas patogenéticas**

- Alcohólica.
- Poshepatitis.
- Biliar secundaria (a obstrucción de la vía biliar extrahepática).
- Biliar primaria.

Hemocromatosis. principales de hepatitis crónica: por virus B, por virus C, autoinmune, por drogas e idiomática (31).

En alrededor de la mitad de los casos de hepatitis crónica no hay antecedente de una fase aguda precursora. De los casos con hepatitis aguda B, un 5 a 10% evolucionan a la cronicidad; de los casos de hepatitis aguda C, un 30 a 40%.

Se reconocen dos variedades importantes:

Hepatitis crónica persistente

Es una enfermedad autolimitada que no se asocia con daño hepático progresivo. A veces corresponde a la recuperación retardada de un episodio agudo, pero puede demorar años en curar. En más de la mitad de los casos se encuentra antígeno de superficie de virus B en el suero. Histología: Hay infiltración predominantemente linfocitaria limitada a los espacios porta. No se observan lesiones destructivas ni infiltrado inflamatorio lobulillar

**Hepatitis crónica activa (agresiva)**

Enfermedad progresiva, que sin tratamiento termina en cirrosis o insuficiencia hepática y muerte . Su historia natural tiene un curso aproximado de 10 a 20 años. Aparte los

tipos viral, autoinmune, por drogas e idiopático, puede ser secundaria a drogas, alcohol, enfermedad de Wilson o déficit de alfa-1-anti-tripsina

Histología: se caracteriza por infiltración linfocitaria o linfoplasmocitaria portal y periportal con necrosis en sacabocado , que puede avanzar a necrosis en puente, fibrosis periportal progresiva, fibrosis en puente porto-portal y porto-central y finalmente cirrosis. Cuando la necrosis en puente se hace confluente, la enfermedad tiene una mortalidad de 50% a los 5 años.

Como puede verse, los términos persistente y activa convencionalmente designan en este contexto, cuadros histopatológicos diferentes, en propiedad son inadecuados puesto que toda inflamación crónica tiene una actividad que persiste.

**Daño hepático por etanol**

En la enfermedad hepática alcohólica se reconocen tres entidades anatomopatológicas: hígado graso alcohólico, hepatitis alcohólica y cirrosis. El tipo y grado de las lesiones están relacionados con la cantidad y duración del consumo exagerado de alcohol.

En el hígado graso los lípidos derivan en primer lugar de la dieta y, en segundo lugar de los depósitos. El alcohol produce los siguientes efectos: Estimula la lipólisis en los depósitos, aumenta la síntesis de ácidos grasos en el hígado, disminuye la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, aumenta la producción de triglicéridos e interfiere la liberación de lipoproteínas.

Histología: La lesión empieza por esteatosis centrolobulillar que luego se hace panlobulillar. El microscopio electrónico demuestra mitocondrias gigantes y aumento del retículo endoplásmico liso. El hígado graso es reversible si se suspende la ingestión de alcohol.

**Hepatitis alcohólica**

Es un conjunto de lesiones inducidas por consumo exagerado de licor equivalente a 100 gramos diarios de alcohol puro durante 3 a 5 años; sin embargo, se requiere una susceptibilidad del huésped, cuyos factores no han sido aclarados.

Se reconocen tres componentes principales: a) Componente alterativo: Representado por degeneración hialina de Mallory, necrosis de hepatocitos y degeneración vesicular hidrópica; b) Componente exudativo: Está dado por infiltración multifocal intralobulillar de polinucleares; c) Fibrosis: Se produce alrededor de la vena centrolobulillar, con prolongaciones aracniformes hacia adentro del lobulillo; alrededor de los hepatocitos y en los sinusoides, forman una malla portal y periportal, quedan espacios porta de forma estrellada. Esta fibrosis luego tiende a la formación de bandas fibrosas porto-centrolobulillares y porto-portales (31).
Evolución

Si las lesiones alterativas son extensas se puede producir insuficiencia hepática grave. Si no son tan importantes y el individuo continúa bebiendo, sigue la evolución de la hepatitis alcohólica crónica con eventual progresión a la cirrosis. Si deja de beber, hay regeneración adecuada en la cuarta parte de los casos, persistencia de las lesiones en la mitad, y progresión a la cirrosis en la otra cuarta parte.

**Colestasia**

Es la interrupción del flujo biliar, que impide que la bilis formada en los hepatocitos se vierta al duodeno. Clínicamente se manifiesta principalmente por ictericia y retención en la sangre de sustancias contenidas normalmente en la bilis, como bilirrubina, colesterol y ácidos biliares. Las colestasias pueden producirse por:
a) Obstrucción de la vía biliar extrahepática;
b) Obstrucción biliar intrahepática (por ejemplo: en la cirrosis biliar primaria);
c) Colestasia funcional, por alteración en el transporte de la bilis a través de la membrana canalicular de los hepatocitos (por ejemplo, en la hepatitis viral colestásica o en la colestasia del embarazo).

Histología: la colestasia se caracteriza por la presencia de pigmento biliar en los canalículos biliares (trombos o cilindros biliares) y en el citoplasma de los hepatocitos, principalmente en la zona centrolobulillar.

**Obstrucción de la vía biliar extrahepática**

La vía biliar extrahepática puede obstruirse en cualquier segmento de los conductos biliares extrahepáticos, desde la ampolla de Vater hasta el hilio hepático. Las causas más frecuentes son: litiasis, carcinoma, estenosis por inflamación o cicatriz postoperatoria.

- Enfermedad de Wilson.
- Deficiencia de a-1-antitripsina

No siempre se puede deducir la causa a partir de la morfología de la cirrosis, debido a que una misma noxa puede producir tipos diferentes de cirrosis y causas diversas terminan en una misma alteración morfológica (25).

**Formas anatómicas**

**Cirrosis micronodular**

Se denomina también portal , septal o monolobulillar .

Macroscopía: hígado de tamaño normal o pequeño, aumentado de consistencia. Se observa difusa y homogéneamente micronodular (1 a 3 mm) con tabiques conjuntivos rosado- blanquecinos, deprimidos, firmes o elásticos, que rodean completamente los nódulos.

Histología: en los tabiques fibrosos se observa infiltración linfo-histiocitaria de grado variable. Los tabiques rodean o disecan los nódulos de hepatocitos; éstos son de disposición trabecular o desordenada con signos regenerativos. Rara vez pueden reconocerse venas centrolobulillares. En los tabiques suele encontrarse una proliferación de conductillos biliares, y, especialmente en la periferia de los nódulos regenerativos, pseudoconductos constituidos por hepatocitos.

La cirrosis micronodular es frecuente consecuencia del daño hepático por alcohol. También puede ser consecutiva a una hepatitis crónica activa, daño de la vía biliar, primario o secundario, o déficit de alfa-1-antitripsina (31).

**Cirrosis macronodular**

Llamada también posnecrótica , multilobulillar o poscolapso .

Macroscopía: El hígado se observa de tamaño conservado , menos frecuentemente pequeño. Los nódulos miden de 3 mm a 3 cm de diámetro; entre ellos, bandas o tabiques fibrosos, gris-blanquecinos o gris-rojizos

Histología: Los tabiques se forman por colapso del retículo de zonas necróticas (tabiques pasivos) a los que se agrega fibrosis activa. Se reconocen espacios portales y venas centrales. Algunas de estas últimas están comunicadas con espacios portales por tabiques o están claramente incluidas en las cicatrices.

La cirrosis macronodular se observa como secuela de hepatitis necrotizante viral, enfermedad de Wilson, hepatitis crónica activa con reagudizaciones, déficit de alfa-1-antitripsina y en las fases tardías de daño por alcohol con cirrosis micronodular establecida (30).

**Cirrosis biliar secundaria**

Llamada también colangítica, es producida por una obstrucción de la vía biliar extrahepática. La colangitis, que afecta a los conductos también en los espacios portales, daña progresivamente a los hepatocitos perilobulillares. La inflamación portal lleva a una fibrosis perilobulillar, que tiende a disecar los lobulillos y a alterar la arquitectura hepática.

Macroscopía: el hígado es micronodular, verde-negruzco, duro. La vía biliar se observa dilatada y puede haber extensas cicatrices perihiliares. Es característico el aspecto en guirnaldas del parénquima remanente (30):

**Cirrosis biliar primaria**

Enfermedad de causa desconocida, de patogenia autoinmunitaria, con anticuerpos antimitocondriales circulantes (ver patología general: inmunopatología). Afecta principalmente a mujeres de edad mediana. Histología: La lesión comienza por degeneración del epitelio de conductillos biliares, seguida de una reacción inflamatoria crónica portal y periportal con necrosis en sacabocado , granulomas epiteloideos vecinos a los conductillos biliares, desaparición de conductillos biliares y signos de colestasia. En una fase ulterior hay fibrosis portal con formación de puentes y ulterior evolución a cirrosis (30).

**Principales efectos de la cirrosis**

1. Hipertensión portal secundaria a: Compresión de ramas de venas hepáticas por los nódulos y aumento de la resistencia de la circulación sinusoidal portal por fibrosis. Se manifiesta por esplenomegalia y desarrollo de circulación colateral (ver patología general: hiperemia pasiva).

2. Lesión hepatocelular secundaria a: Daño por alcohol, mecanismo inmunológico reactivo a la infección viral en la hepatitis B, isquemia por desvío de sangre, distorsión y fibrosis de sinusoides y regeneración con formación de trabéculas hepatocelulares gruesas. Se puede manifestar por insuficiencia hepática e ictericia.

3. Ascitis secundaria a: Hipertensión portal, menor presión oncótica del plasma (30).

El tumor más frecuente del hígado es la metástasis, especialmente de carcinomas de origen gastrointestinal, mamario y pulmonar. En lo que sigue se tratarán los tumores primarios del hígado (30).

**Adenoma**

Muy infrecuente, se observa predominantemente en mujeres que consumen anovulatorios orales. Bien delimitado, de arquitectura trabecular, formado por células similares a los hepatocitos normales (31).

**Carcinoma hepatocelular (hepatocarcinoma, hepatoma)**

Su frecuencia varía en los diversos países del mundo. Entre los factores relacionados con su etiología y patogenia destaca la cirrosis: entre 50 y 75% de los carcinomas hepatocelulares se presentan en hígados cirróticos.

La cirrosis por hepatitis B es el factor de mayor riesgo. Las personas con serología positiva para antígeno de superficie B tienen un riesgo de carcinoma hepatocelular 230 veces mayor que las personas sin antígeno. La cirrosis alcohólica tiene un riesgo mucho menor que la poshepatitis B de desarrollar un carcinoma hepatocelular. Sin embargo, como en algunas regiones la cirrosis alcohólica es mucho más prevalente que las post-hepatitis, la mayoría de los carcinomas hepatocelulares en cirrosis se pueden originar en una de tipo alcohólico (30).

**Macroscopía**

Masas nodulares blandas, hemorrágicas, ocasionalmente verdosas (por bilis), localizadas más frecuentemente en el lóbulo derecho. Se distinguen cuatro formas macroscópicas: a) uninodular, b) multinodular, c) masiva (la masa tumoral ocupa la mayor parte de un lóbulo) y d) difusa (muy numerosas masas y nódulos pequeños que se mimetizan con los nódulos de la cirrosis). El tumor tiene marcada tendencia a la extensión intravascular, frecuentemente hay permeación, acompañada de trombosis, de la vena porta o de las venas hepáticas.

**Microscopía**

Tumor epitelial sólido, con células neoplásicas de disposición trabecular. Tiene escaso estroma tumoral. Las células presentan abundante citoplasma eosinófilo y núcleo vesiculoso con uno o más nucléolos prominentes, una pequeña proporción de los canalículos biliares delimitados por células neoplásicas muestran cilindros de pigmento biliar. Las células tumorales producen a-feto-proteína, cuyo nivel sérico se utiliza como elemento de ayuda diagnóstica de este tumor.

**Diseminación**

El tumor se disemina por invasión local (muy frecuente la invasión y permeación de ramas de la porta y de la hepática), metástasis a ganglios linfáticos regionales, y metástasis hematógenas, más frecuentes en: Pulmón, hueso, corazón y glándula suprarrenal.

**Pronóstico**

Es muy desfavorable, con sobrevida de pocos meses. La radioterapia y la quimioterapia no son efectivas. La resección quirúrgica del tumor y el transplante de hígado han dado resultado en algunos casos.

**Colangiocarcinoma**

Es menos frecuente que el carcinoma hepatocelular. Algunos se originan de conductos biliares pequeños y son macroscópicamente indistinguibles del hepatocarcinoma. Otros se originan cerca del hilio y se manifiestan por ictericia, prurito y baja de peso.

Microscopía: Está constituido por estructuras glanduliformes en un estroma colágeno denso (desmoplástico); habitualmente la arquitectura es tubular, pero puede ser papilar.

Da frecuentemente metástasis intrahepáticas y se disemina preferentemente por vía linfática. La sobrevida es algo mayor que en el hepatocarcinoma, pero igualmente el pronóstico es malo.

Los pacientes con colitis ulcerativa idiopática tienen mayor riesgo de colangiocarcinoma que el resto de la población (30):

**Hepatoblastoma**

Se observa en niños. Representa el 5% de todos los tumores en la infancia. Más frecuente en niños varones y durante los primeros dos años de vida (65-70%) Síntoma de presentación frecuente es la hepatomegalia. La ictericia es rara. Se observa alfa fetoproteína elevada en 90 a 95% de los casos.

Macroscopía: Tumor circunscrito, que varía de 5 a 25 cm de diámetro, necrótico-hemorrágico.

Microscopía: Constituído por células tumorales embrionarias de tipo epitelial, similares a los hepatocitos del embrión, a veces con un componente mesenquimático prominente. La permeación vascular linfática es frecuente y muy marcada, pero de valor pronóstico no precisado. En cambio, el pronóstico es muy desfavorable si se trata de un tumor anaplástico o embrionario, si los bordes quirúrgicos tienen compromiso tumoral y si ya hay metástasis (30).

Es un tumor rápidamente progresivo y puede llevar a la muerte por rotura hepática, insuficiencia hepática y metástasis. La sobrevida a 5 años varía de 25 a 40%. Las metástasis más frecuentes son: pulmón, ganglios linfáticos regionales, diafragma, glándula suprarrenal y médula ósea. La resección quirúrgica en fases precoces puede ser curativa.

## 1.6 FARMACOS PROTECTORES DEL HIGADO

En el industria farmacéutica existen los siguientes tipos de protectores hepáticos:

- Dadores de grupos SH: Glutatión reducido; Timonacid, etc.
- Derivados de nucleótidos.
- Combinaciones vitamínicas.
- Silimarina y extractos de Cardo Mariano conteniendo dicho principio activo.
- Otros (Derivados de aminoácidos).

Los fármacos más comercializados en nuestro medio son las combinaciones vitaminicas como el hepabionta, higanapur, etc. (html./hepatoprotectores.html).

**Hepabionta**

Composición.

Cada gragea contiene: Tiamina mononitrato (vit.$B_1$) 5mg, riboflavina (vit. $B_2$) 4mg, piridoxina clorhidrato (vit. $B_6$) 4mg, biotina 0,1mg, ácido alfa-lipoico 5mg, cianocobalamina (vit. $B_{12}$) 8mcg, nicotinamida 15mg, ácido orótico 25mg, alfa tocoferol acetato (vit.E) 5mg, mioinosita 20mg, rutina 10mg, excipientes c.s.p. Cada ampolla contiene: piridoxina clorhidrato (vitamina B 6) 4mg, cianocobalamina (vitamina $B_{12}$) 2500mcg, dexpantenol 6mg, ácido fólico 1mg, ácido orótico 10mg, nicotinamida 20mg, agua inyectable, c.s.p. 2ml (10).

**Farmacología.**

Hepabionta es una combinación biológica de factores metabólicamente activos que se asocian de manera sinérgica para el tratamiento de diversas afecciones nutricionales y condiciones carenciales que influyen negativamente sobre el funcionamiento de órganos vitales tales como el hígado, sistema nervioso, riñones, corazón y pulmones. Sus componentes se hallan en proporciones adecuadamente balanceadas, cumpliendo así con los requerimientos necesarios para cubrir las diversas necesidades metabólicas. Las vitaminas B1 y B12 se constituyen en elementos fundamentales dentro del metabolismo intermediario participando en numerosas rutas metabólicas de anabolismo y catabolismo en la gran mayoría de órganos de la economía. La asociación de vitaminas con compuestos como el ácido orótico

contribuye al tratamiento de trastornos deficitarios o aumento en las necesidades de tales nutrientes esenciales que participan en diversos enzimáticos orgánicos (10).

**Mecanismo de acción**

El principio activo contenido de hepabionta ayuda en forma óptima el metabolismo alterado de los hepatocitos; además proporciona las condiciones favorables para la regeneración del parénquima dañado del hígado. los mecanismos principales de acción de los componentes de hepabionta son: apoya las funciones hepáticas, protege el hígado, promueve la restauración del parénquima hepático, y mejora la desintoxicación.

**Indicaciones.**

Como suplemento vitamínico.

**Dosificación.**

Grageas: 1 gragea 3 veces al día, administradas por vía oral. Ampollas: 1 ampolla diaria durante 10 días, luego 2-3 ampollas semanales, administradas por vía intramuscular (I.M.).

**Contraindicaciones.**

No han sido documentadas. Hipersensibilidad a algunos de los componentes del producto.

**Reacciones adversas**

En casos bastante raros puede presentarse anorexia, náuseas, rash dérmico, cefalea y bochornos, particularmente con el preparado de administración parenteral.

**Precauciones.**

Hepabionta inyectable deberá administrarse en situaciones clínicas estrictamente necesarias. Asimismo, la duración de la terapia se prolongará por el tiempo mínimo indispensable.

**Advertencias.**

Al igual que todo medicamento, no se recomienda el uso del producto durante el embarazo y la lactancia hasta demostrar su completa inocuidad sobre tales estados. Interacciones.

La isoniazida, penicilamina, cicloserina e hidralazina pueden causar deficiencia de la vitamina $B_6$. Incompatibilidades.

La nicotinamida presenta el riesgo de producir hipotensión postural cuando se administra concomitantemente con drogas antihipertensivas que pertenecen al grupo de los betabloqueadores. Asimismo la piridoxina puede causar la activación metabólica de la enzima descarboxilasa periférica y de esta manera anular los efectos de la levodopa en pacientes portadores de la enfermedad de Parkinson. Sobredosificación.

En casos de ingesta excesiva del preparado, puede ocurrir neuropatía periférica sensorial que revierte espontáneamente al suspender la administración del fármaco. Es posible que aparezca nefrotoxicidad luego de consumo prolongado de 200mg de piridoxina al día y se ha evidenciado el desarrollo de manifestaciones de dependencia que desarrollan adultos que ingieren dosis diarias superiores a 200mg de vitamina $B_6$. (10).

## 1.7 GERMINADO DE ALFALFA (Duke 2016)

Figura Nº 1. Fotografía de germinado deMedicago sativa

## SISTEMATIZACION DE Medicago sativa

| | |
|---|---|
| Reyno: | Plantae |
| División. | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Fabales |
| Familia: | Fabaceae |
| Género: | Medicago |
| Especie: | sativa |

## DESCRIPCION BOTANICA

Son hierbas perennifolias, sobre todo erectas a suberectas que alcanzan un tamaño de 30-60 cm de altura, pubescentes a subglabras. Los foliolos de 5-20 mm de largo, 3-10 mm de ancho, obovadas a sublineal, dentados en el ápice, adpreso pubescentes; entera o dentada en la base. Inflorescencia en racimo pedunculado, el pedúnculo mucho más largo que el pecíolo. Corola de 6-12 mm de largo, violeta pálido lavanda. Las fruta o en una espiral floja de 11-4 giros, glabras a pilosas Duke (2016).

## PROPIEDADES

***Medicago sativa*** Posee en su composición química numerosas sustancias, muchas de las cuales han sido estudiadas con el fin de conocer sus efectos.

***Medicago sativa.*** esta formado por sustancias con propiedades hepatoprotectoras, antidepresivas, antiparkinsonianas, espasmolítica, vasoconstrictoras, entre otras.

Algunas sustancias de: ***Medicago sativa***han demostrado tener efecto hepatoprotector como el alfa y beta pineno, cineol, eucaliptol, linalol, boldina, ceneole, eugenol, linomemo, espartiecina, taninos y cemfenos.Apaza (2002), Alcazar (2006).

**USOS**

**Uso interno**

**Digestiva:**Favorece la digestión y evita los espasmos gástricos, siendo muy útil en los casos de gastritis o de hernia de hiato (infusión de unas puñado de hojas frescas- unos 15 g. - por litro de agua. Tomar 3 tazas al día después de las comidas).

**Estimulante digestivo y láctico:** La esencia de la planta abre el apetito (2 ó 3 gotas al día disueltas en azúcar) Estimula la producción de leche en las mujeres lactantes (Decocción de 30g. de hojas secas por litro de agua. Dos tazas diarias) .

**Antivomitiva:** En caso de tener sensación de vómitos o malestar intestinal. (15g. de infusión de hojas secas por litro de agua.)

**Problemas nerviosos:** Refuerza el sistema nervioso y tranquiliza sus manifestaciones adversas en el estómago. Infusión de una cucharadita de hojas secas por vaso de agua. Tomar un par de tazas al día después de las comidas principales. Si se aumenta la dosis tiene propiedades narcóticas.

**Uso externo**

**Bucal:**Cuando aparecen problemas en la boca, como inflamaciones, llagas o mal aliento (Gargarismos con la decocción de 100g. de hojas secas por litro de agua)

**Quistes de ovario:**Realizar un masaje abdominal utilizando el aceite esencial.

**Problemas nerviosos:** Diluir una infusión de flores secas en el agua del baño.

**Otros usos**

**Repelente de mosquitos:**Durante mucho tiempo se ha utilizado para repeler los mosquitos, a los que parece ser que les disgusta el olor penetrante que desprende la presencia en la planta del estranol y eugenol. Parece ser que su uso masivo en su país de origen - la India - favorece la disminución de estos insectos dentro de las casas, aunque la planta realmente sea utilizada allí por considerarla sagrada

**Condimento alimentario:** Su uso para sazonar comidas en forma de hojas secas trituradas y mezcladas con otras hiervas esta bastante extendido. Se puede tomar fresca en las ensaladas Duke (2016).

**Tónico capilar:**Para fortalecer el cabello y contribuir a preservarlo de la caída (Realizar fricciones con el líquido resultante de la infusión de hojas secas)

## 1.8. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA CON ACCIÓN HEPATOPROTECTORA

**La Quercetina**

La quercetina es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se trata de un compuesto polifenólico presente naturalmente en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales.

**Efecto Hepatoprotector:** En lesiones de la mucosa gástrica y del parénquima hepático provocadas por etanol, la quercetina ha evidenciado una actividad gastroprotectora y hepatoprotectora significativa. Junto a polioles ha resultado

efectiva en el abordaje de ratas intoxicadas con vapores de fluoruro de amonio. Se ha postulado el papel benéfico de la quercetina en pacientes con gota debido a la actividad inhibitoria sobre la enzima xantina-oxidasa (de manera similar al allopurinol)

También evidenció actividad hipoglucemiante en ratas alimentadas con un 1% de colesterol en su dieta diaria. Por poseer una actividad morfinosimil e inhibir la síntesis de acetilcolina se recomienda en el abordaje de diarreas agudas. También presenta propiedades antiimflamatorias, antivirales y antitumoral entre otras **La Rutina.**

**La Rutina** es un flavonoide que normalmente la encontramos en plantas como las moras, los albaricoques, el saúco, el té, las espinacas o el limón.
Propiedades de la rutina: Muchas son las propiedades de la rutina. Entra todas cabe mencionar su capacidad para combatir las alergias, las infecciones bacterianas y el herpes. Posee, entre otras, propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas, previene el cáncer y protege al hígado, mejora la circulación por sus propiedades vasodilatadoras, previene la fragilidad capilar, disminuye la hipertensión y evita el riesgo de derrames cerebrales. Se han realizado estudios que parecen confirmar la acción protectora de la rutina contra la agresión celular que produce el amianto

Parece ser que la rutina ayuda a la absorción de la vitamina C, impidiendo la oxidación de la misma.

**La Niacina**
Los diferentes nombres que recibe esta vitamina son Niacina, Niacinina, ácido nicotínico, nicotinamida y Factor PP, del inglés Pelagrum Preventig. Aunque el más utilizado de entre todos ellos es el de Niacina o vitamina B3 Vitamina que forma parte del grupo de vitamina B. Trabaja en conjunción con la riboflavina y la piridoxina para mantener el organismo en perfectas condiciones

Beneficios de la vitamina B3: Interviene en el proceso de metabolización de determinados oligoelementos como el litio, selenio, fósforo, calcio, hierro, cobalto y cobre

Se ha demostrado que acelera, junto con la vitamina B1, la eliminación del alcohol y otros tóxicos como la marihuana, los colorantes, conservantes, pesticidas y derivados opiáceos. Esta cualidad antitóxica y antidegenerativa hepática resulta muy útil en el tratamiento del alcoholismo crónico y la drogadicción

**El Borneol**

Analgésico, antiinflamatorio, reduce la fiebre, protege el hígado (H).

**El Kenferol**

Flavonoide protector hepáticos cuando existe lesión o insuficiencia hepática, está indicado su uso, que protejan al hígado de la acción destructora de los elementos tóxicos

**El Eugenol**

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo, que es utilizado desde hace varios siglos en la práctica odontológica. Por sus propiedades farmacológicas tiene diferentes usos. Sus efectos farmacológicos son complejos y dependen de la concentración del Eugenol libre a la cual el tejido se expone

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo, que también puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites Duke (2016).

## 1.9 HEPAPROTECTORES HEPABIONTA

**Composición**

**La Gragea contiene:**

Cada gragea contiene: Tiamina mononitrato (vit.B1) 5mg, riboflavina (vit. B2) 4mg, piridoxina clorhidrato (vit. B6) 4mg, biotina 0,1mg, ácido alfa-lipoico 5mg, cianocobalamina (vit. B12) 8mcg, nicotinamida 15mg, ácido orótico 25mg, alfa tocoferol acetato (vit.E) 5mg, mioinosita 20mg, rutina 10mg, excipientes c.s.p.Goodman (2012).

**Indicaciones:**

Alcoholismo social, crónico y agudo. Hepatitis viral tipos A, B, C, D, E, F y G, Hepatitis tóxica, Hepatitis Crónica, Hepatitis Medicamentosa .

**Farmacología**

Hepabionta es una combinación biológica de factores metabólicamente activos que se asocian de manera sinérgica para el tratamiento de diversas afecciones nutricionales y condiciones carenciales que influyen negativamente sobre el funcionamiento de órganos vitales tales como el hígado, sistema nervioso, riñones, corazón y pulmones. Sus componentes se hallan en proporciones adecuadamente balanceadas, cumpliendo así con los requerimientos necesarios para cubrir las diversas necesidades metabólicas. Las vitaminas B1 y B12 se constituyen en elementos fundamentales dentro del metabolismo intermediario participando en numerosas rutas metabólicas de anabolismo y catabolismo en la gran mayoría de órganos de la economía. La asociación de vitaminas con compuestos como el ácido

orótico contribuye al tratamiento de trastornos deficitarios o aumento en las necesidades de tales nutrientes esenciales que participan en diversos enzimáticos orgánicosGoodman (2012).

El principio activo contenido de hepabionta ayuda en forma óptima el metabolismo alterado de los hepatocitos; además proporciona las condiciones favorables para la regeneración del parénquima dañado del hígado. los mecanismos principales de acción de los componentes de hepabionta son: apoya las funciones hepáticas, protege el hígado, promueve la restauración del parénquima hepático, y mejora la desintoxicaciónGoodman (2012).

Posología

Inyectable: Al principio 1 inyección diaria intramuscular profunda o intravenosa lenta. Posteriormente, 2 a 3 inyecciones semanales.

Gragea: 1 a 2 grageas 3 veces al día o con las principales comidas, por el tiempo que el médico juzgue convenienteGoodman (2012).

Presentaciones

Inyectable: Caja x 1ampolla de 2 ml + Jeringa.

Gragea: Caja por 50 grageas (16, N).

# CAPÍTULO II

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.1. LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Bioterio y Laboratorio Seccion Academica de Ciencias Fisiologicas del Departamento Académico de Biología – U.N.S.A. durante el periodo de Noviembre 2017 a Marzo del 2018.

## 2.2. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

El problema  es de tipo experimental univariado.

## 2.3. MUESTRA DE ESTUDIO

Para efectuar el presente proyecto de investigación se utilizaron 24 ratas machosRattus norvegicus variedad Sprague Dawley (Anexo 2), aparentemente normales; y con pesos corporales entre 250 y 300 g. aproximadamentey edades entre 5 a 6 meses.

Inicialmente a los animales de experimentación se les indujo daño hepático con tetracloruro de carbonopor vía oral y luego se le administró extracto de Medicago sativapor vía orogástrica.

.

## 2.4. VARIABLES

### VARIABLE DEPENDIENTE

Peso corporal
Actividad de TGO, TGP

### VARIABLE INDEPENDIENTE

Extracto acuoso degerminado deMedicago sativa “alfalfa”. (100 y 200 mg/Kg./día).

Hepabionta a dosis de 1.5 mg/Kg./día.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

| **TIPO DE TRATAMIENTO RECIBIDO** | **Nº DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (RATAS)** |
|---|---|
| **Blanco**Placebo (agua) | 6 |
| **Tratamiento 1. *Medicago sativa***100 mg/kg/dia | 6 |
| **Tratamiento 2. *Medicago sativa***200 mg/kg/dia | 6 |
| **Tratamiento 3.** Hepabionta 1.5mg/Kg./dia | 6 |
| **TOTAL** | 24 |

Las dosis se administraron por treinta días de acuerdo a los tratamientos descritos.

## 2.5. TÉCNICA

### 2.5.1 OBTENCIÓN DEL GERMINADO DE *Medicago sativa.*

La compra de semillas de alfalfa se realizó en la Empresa Semiagro S.A.

El germinado de alfalfa se realizó de la siguiente manera:

1. Lo primero y lo más importante es conseguir semilla orgánica o sin tratar.
2. La Cantidad de semilla seca inicial que ponemos a remojar en agua pura es de unas 3 cucharadas. El tiempo de remojo puede oscilar entre 4 y 6 horas que se deja la semilla dentro del agua. Disolvemos desde el principio los grumos que ellas normalmente forman cuando entran en contacto con el agua y nos aseguramos de que todas las semillas queden bien humedecidas y separadas.

3. Luego del tiempo de remojo se retira el agua y se lava de nuevo con abundante agua para retirarle la exudación propia del proceso y se coloca el frasco en un lugar fresco, que no reciba mucha luz, inclinado unos 45º para que destile bien el agua. Tratamos de que las semillas estén por todo el frasco para que entre suficiente aire.
4. Luego se enjuaga, todos los días del proceso, dos o tres veces al día, con agua pura y colocando el frasco inmediatamente en posición de 45°.
5. Si al tercer día de germinación, observa indicios de verde o clorofila, debe llevar el frasco a un lugar oscuro o tapar con bolsa negra.
6. Más o menos en el cuarto día de germinación las cascaritas de la semilla se han separado de ésta y se ven sueltas en el frasco, por lo tanto, deben ser retiradas
7. Llevar todos los brotes a un recipiente con agua pura y mover muy suavemente para que terminen de soltar las cáscaras. El brote es muy delicado y se parte fácilmente si no lo hace con cuidado. Retire y deseche las cáscaras de la superficie y del fondo y vaya regresando de nuevo el germinado al mismo frasco, que debió ser lavado con anterioridad.
8. A partir de este momento ya está listo para consumir, pero debemos dejarlo de nuevo a 45º sin que se le vuelva a echar agua durante un día (24 horas) para que seque el agua del brote, coja clorofila y tenga mayor duración en la nevera. Así el tiempo total del proceso de germinación es entre 5 y 7 días. [7]

### 2.5.2 INTOXICACIÓN CON TETRACLORURO DE CARBONO, DOSIS DEL EXTRACTOY HEPABIONTA

Para poder realizar el presente trabajo de investigación se utilizó 24 Rattus norvegicus variedad Sprague Dawley se les dividió en cuatro grupos y se les administró a todos las unidades experimentales tetracloruro de carbono en dosis de 0,5 ml/kg de peso por vía intraperitoneal (ip), administrado 2 veces / semana durante 4 semanas con el objetivo de producir daño hepático.

**CONTROL**. Se les administro tetracloruro de carbono vía oral durante 4 semanas.

**TRATAMIENTO 1.** Se les administro tetracloruro de carbono vía oral durante 4 semanas y se les administró diariamente vía orogástrica 100 mg/Kg. de extracto acuoso de germinadoMedicago sativa.

**TRATAMIENTO 2.** Se les administro tetracloruro de carbono vía oral durante 4 semanas y se les administró diariamente vía orogástrica 200 mg//Kg. de extracto acuoso de germinado de Medicago sativa

**TRATAMIENTO 3.** Se les administro tetracloruro de carbono vía oral durante 4 semanas y se les administró diariamente vía orogástrica 5 mg/Kg. de hepabionta.

A todos los animales de experimentación se les extrajo cada cinco días una muestra de sangrepara así poder realizar el dosaje de las transaminasas.

## 2.6 MATERIAL

### a) Material Biológico

- ***Germinado de Medicago sativa "alfalfa"***.
- ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley.

### b) Reactivos

- Tetracloruro de carbono.
- Kit para TGP (Valtek)
- Kit para TGO (Valtek)

## 2.7. MÉTODOS

### 2.7.1. MÉTODO PARA EL DOSAJE DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La muestra de sangre se obtuvopor el método de Dorman extraído de la punta de la cola del animal de experimentación con la ayuda de un tubo capilar.
Evaluación de Transaminasas: Valtek

**Fundamento**

- La TGP cataliza la siguiente reacción:

L- alanina + a-cetoglutarato **TGP**Glutamato + Piruvato.

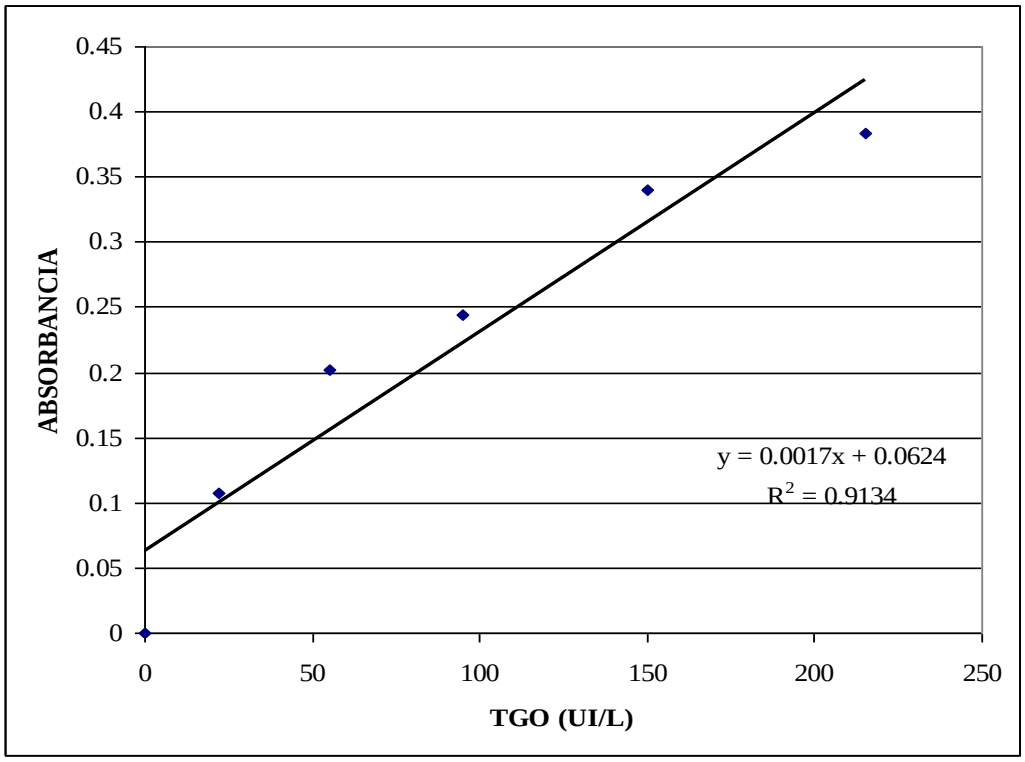
- La TGO cataliza la siguiente reacción:

L-aspartato + a-cetoglutarato **TGO** Glutamato + Oxalacetato

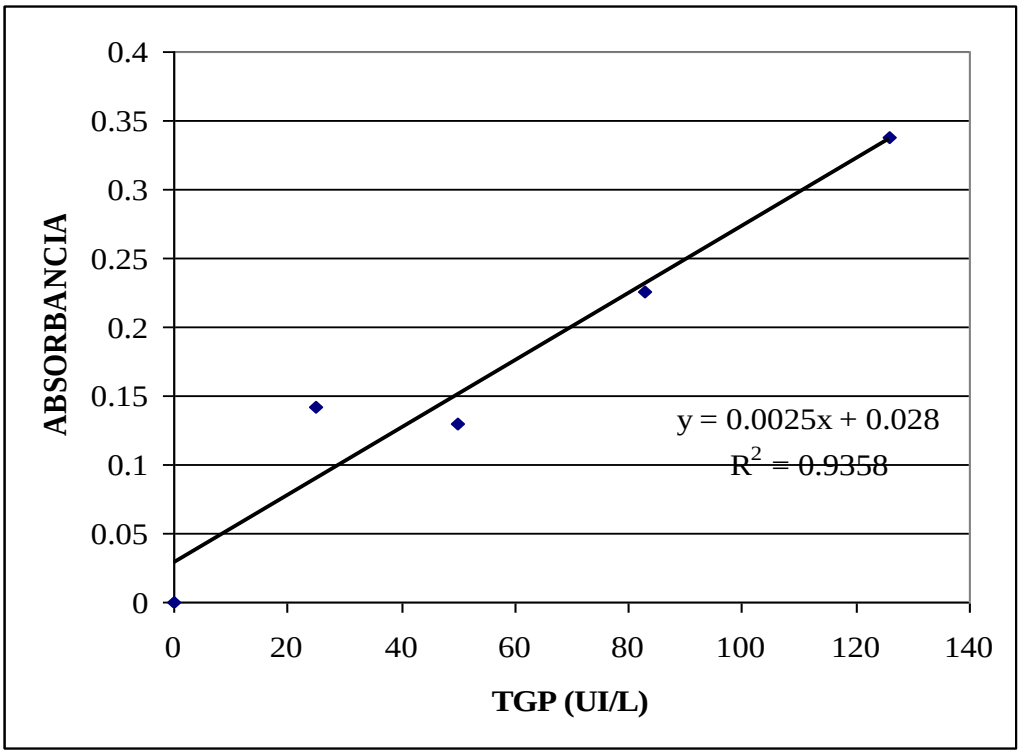
El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato) reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina produciendo en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505nm.

Se utilizará el método colorimétrico. (Reitman y Frankel) para la determinación de la actividad transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxalacética (TGO) en suero .

**CURVA DE CALIBRACIÓN DE TGO (UI/L)**




**CURVA DE CALIBRACIÓN DE TGP(UI/L)**



## 2.7.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA: MÉTODO DE HARRIS

### 1. Obtención de la Muestra

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

### 2. Fijación

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

Las muestras se fijaron en formol al 10% por 24 horas, seguidamente se hacen los cortes necesarios, los cuales deberán tener un grosor de 3 a 5 mm., los mismos que se colocarán nuevamente en Formol al 10 % por 1 hora, debidamente etiquetados o rotulados para ser colocados en el Autotecnichon.

### 3. Deshidratación y Aclaración

**Deshidratación**

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

| | |
|---|---|
| Agua corriente, | 1 hora |
| Alcohol 70%, | 1 hora |
| Alcohol 100%, | 1 hora |
| Alcohol 90%, | 1 hora |
| Alcohol 95%, | 1 hora |
| Alcohol 100%, | 1 hora |
| Alcohol 100%, | 1 hora |

**Aclaración**

| | |
|---|---|
| En Xilol puro I | por 1 hora |
| En Xilol puro II | por 1 hora |

**4. Inclusión**

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

**5. Corte**

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

Los bloques formados se llevan a refrigeración por espacio de 1 hora, para endurecer la parafina lo cual favorece en el corte de las muestras, se procede al corte mediante el micrótomo deslizante (Rotatorio Americana Óptica).

El corte de las muestras permite obtener "las cintas" de las mismas. Estas cintas mediante pinzas se colocan en un flotador de tejidos (que contiene agua caliente: Baño María 50 $^{o}$C). El Baño María extiende los cortes histológicos (evitar la presencia de arrugas y aire atrapado); una vez bien extendidos los cortes, estos se colocan en las láminas portaobjetos recubiertas con albúmina de Mayer (que favorece la adhesión de los cortes).

**6. Coloración con Hematoxilina - Eosina**

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

Se empieza colocando las láminas portaobjetos en el Xilol (Xilol I) por 15 minutos para eliminar la parafina de los cortes; luego se pasa al otro recipiente con Xilol (Xilol II) para completar la eliminación de la parafina. Después las láminas se trasladan a los alcoholes de una batería de hidratación:

| | |
|---|---|
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Alcohol 95%, | 1 minuto |
| Alcohol 90%, | 1 minuto |
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Alcohol 70%, | 1 minuto |
| Agua corriente, | 1 minuto |

Luego se procede a la coloración siguiendo los siguientes pasos:

| | |
|---|---|
| Hematoxilina de Mayer, | 5 minutos |
| Agua corriente, | 10 minutos |
| Agua destilada, | 1 minuto |
| Eosina, | 20 segundos |
| Alcohol 70%, | 1 minuto |
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Alcohol 90%, | 1 minuto |
| Alcohol 95%, | 1 minuto |
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Alcohol 100%, | 1 minuto |
| Xilol I, | 1 minuto |
| Xilol II, | 1 minuto |

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

**B) Diagnóstico Histopatológico**

El Diagnóstico Histopatológico de las muestras obtenidas se realizó en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital CASE ESSALUDpor el Dr. Henry Mercado.

### 2.7.3. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como promedios. Se aplicó Análisis de Varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas ($p<0.05$) en los promedios de TGO, TGP en los diferentes tratamientos evaluados y se aplicó la prueba de especificidad de Tukey para establecer el mejor tratamiento para el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de germinado*de Medicago sativa "alfalfa"*en *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley intoxicadas con tetracloruro de carbono. Se utilizó el paquete estadístico computarizado SPSS versión 23para Windows 10.

## CAPÍTULO III

## RESULTADOS

Los resultados mostraron disminución significativa en la actividad de la TGO (Tabla Nº 1) en el Tratamiento 1 y 2 que se les administró vía orogástrica extracto acuoso de germinado de Medicago sativa “alfalfa”a dosis de 100 mg/Kg./día y 200 mg/Kg./día respectivamente y en el Tratamiento 3 al cual se le administro vía oral hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día; con respecto al blanco ($p<0.01$).

Los resultados obtenidos mostraron disminución significativa en la actividad de la TGP (Tabla Nº 2) en el Tratamiento 1 y 2 que se les administro vía orogástrica extracto acuoso de germinado de Medicago sativa “alfalfa”a dosis de 100 mg/Kg./día y 200 mg/Kg./día respectivamente y en el Tratamiento 3 al cual se les administro hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día; con respecto al Control ($p<0.01$).

Además se encontró disminución significativa en el peso corporal (Tabla Nº 3) de las ratas del Control a las cuales se les administró vía orogástrica extracto acuoso degerminado de Medicago sativa “alfalfa”a dosis de 100 mg/Kg./día y 200 mg/Kg./día respectivamente y el Tratamiento 3 se le administró hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día sus pesos corporales se incrementaron significativamente ($p<0.01$).

En la evaluación histológica se observó que las ratas del blanco presentaron degeneración grasa a gota mediana y grande acompañada de congestión vascular y dilatación de las sinusoides hepáticos en forma moderada (Figura 1). En el Tratamiento 1; Se les administro vía orogástrica 100 mg/Kg./día de extracto acuoso de germinado de Medicago sativa “alfalfa” en la cual no se observa mayor variación en cuanto al daño hepático en relación al blanco (Figura 2). En el Tratamiento 2; se les administró vía orogástrica 200 mg/Kg./día de extracto acuoso de germinado de Medicago sativa “alfalfa”en la cual se observódegeneración grasa a gota mediana y congestión vascular disminuida de moderada a leve en relación al Control (Figura 3). En el Tratamiento 3; Se les administro hepabionta vía orogástrica 5 mg/Kg./día,en la cual se observa una disminución ligera de la degeneración grasa y congestión vascularen relación al Control (Figura 4).

**TABLA Nº 1**

**VALORES PROMEDIO DE TGO (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO DE *MEDICAGO SATIVA "ALFALFA"*.**

| **TRATAMIENTO** | **TGO (UI/L)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **BASAL** | **DIAS** | | | |
| | | **7** | **14** | **21** | **28** |
| **Blanco** | 28.59 | 109.65 | 174.83 | 176.17 | 185.83 |
| **T 1 :*Alfalfa*** 100 mg/kg | 24.96 | 106.33 | 158.96 | 146.36 | 130.06 |
| **T 2 : *Alfalfa*** 200 mg/kg | 26.66 | 111.51 | 147.15 | 173.02 | 130.40 |
| **T 3 :** Hepabionta 5 mg/Kg | 27.86 | 112.50 | 138.95 | 129.08 | 86.48 |
| **F (ANOVA)** | 2.91 | 29.04 | 198.51 | 25.81 | 128.33 |
| **P** | >0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| **SIGNIFICANCIA** | NS | AS | AS | AS | AS |

$^{abc}$TUKEY (P<0.05)

En la Tabla Nº 1 se observa que existe diferencia significativa p< 0.01 en los niveles de TGO (UI/L) en ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley tratados con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** el tratamiento blanco 185.83 UI/L, extracto acuoso de alfalfa 100 mg/kg/día 130.6 UI/L; extracto acuoso de alfalfa 200 mg/kg/día 130.40 UI/L y Hepabionta 86.48 UI/L. Al aplicar la prueba de Post comparación de Tukey se observó disminución significativa en los niveles de TGO en el tratamiento con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** (P<0.05).

**TABLA Nº 2**

VALORES PROMEDIO DE TGP (UI/L) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO DE *MEDICAGO SATIVA "ALFALFA"*.

| **TRATAMIENTO** | **TGP (UI/L)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **BASAL** | **DIAS** | | | |
| | | **7** | **14** | **21** | **28** |
| **Blanco** | 40.40 | 104.17 | 109.54 | 108.55 | 141.58 |
| **T 1 :*Alfalfa*** 100 mg/kg | 44.84 | 108.22 | 112.67 | 114.65 | 103.82 |
| **T 2 : *Alfalfa*** 200 mg/kg | 52.43 | 106.04 | 94.25 | 109.45 | 90.53 |
| **T 3 :** Hepabionta 5 mg/Kg | 43.34 | 108.85 | 90.42 | 58.93 | 53.01 |
| **F (ANOVA)** | 0.72 | 1.35 | 13.14 | 41.59 | 128.23 |
| **P** | >0.05 | >0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| **SIGNIFICANCIA** | NS | NS | AS | AS | AS |

[abcd]TUKEY (P<0.05)

En la Tabla Nº 2 se observa que existe diferencia significativa p< 0.01 en los niveles de TGP (UI/L) en ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley tratados con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***el tratamiento blanco 141.58 UI/L, extracto acuoso de alfalfa 100 mg/kg/día 103.82 UI/L; extracto acuoso de alfalfa 200 mg/kg/día 90.53 UI/L y Hepabionta 53.01 UI/L. Al aplicar la prueba de Post comparación de Tukey se observó disminución significativa en los niveles de TGP en el tratamiento con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** tratadas con tetracloruro de carbono 200 mg/Kg/5 veces por semana (P<0.05).

**TABLA Nº 3**

VALORES PROMEDIO DE PESO (G) EN *RATTUS NORVEGICUS* VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY SEGÚN TRATAMIENTO CON EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO DE*MEDICAGO SATIVA "ALFALFA"*.

| **TRATAMIENTO** | **PESO (gr)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **BASAL** | **DIAS** | | | |
| | | **7** | **14** | **21** | **28** |
| **Blanco** | 231.36 | 216.96 | 216.96 | 214.78 | 212.15 |
| **T 1 :*Alfalfa*** 100 mg/kg | 233.94 | 218.09 | 218.09 | 222.23 | 223.25 |
| **T 2 : *Alfalfa*** 200 mg/kg | 229.20 | 236.17 | 236.17 | 229.86 | 232.100 |
| **T 3 :** Hepabionta 5 mg/Kg | 229.77 | 241.35 | 241.35 | 291.50 | 303.79 |
| **F (ANOVA)** | 1.99 | 4.64 | 39.49 | 42.55 | 34.44 |
| **P** | >05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| **SIGNIFICANCIA** | NS | AS | AS | AS | AS |

$^{abc}$TUKEY (P<0.05)

En la Tabla Nº 3 se observa que existe diferencia significativa p< 0.01 en los pesos (UI/L) en ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley tratados con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***el tratamiento blanco 212.15 g, extracto acuoso de alfalfa 100 mg/kg/día 223.25 g; extracto acuoso de alfalfa 200 mg/kg/día 232.100 g y Hepabionta 303.79 g. Al aplicar la prueba de Post comparación de Tukey no se observó aumento significativo en los pesos en el tratamiento con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** (P>0.05).

### 3.1. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

A continuación mostramos fotografías de corte histológico de hígado de ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley, con aumentos de 400 Xrespectivamente.

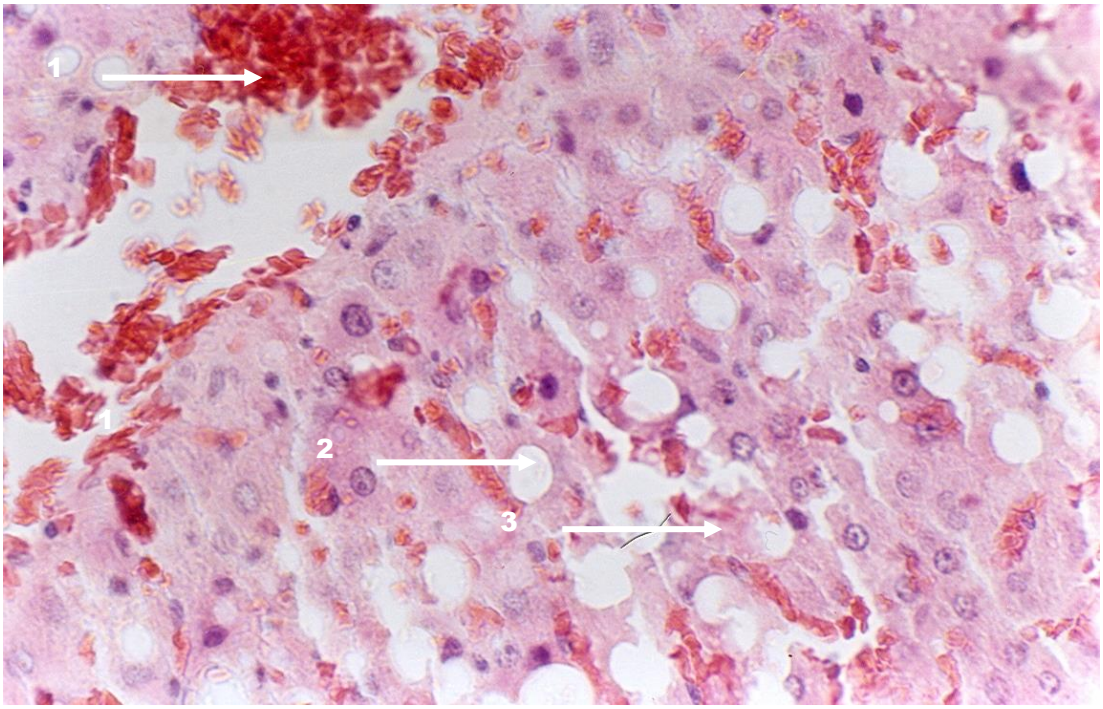



**FIGURA 1.**ESTRUCTURA DE HÍGADO DEL GRUPO BLANCO QUE RECIBIÓ 0,5 ml/kg DE TETRACLORURO DE CARBONO EN ***Rattus norvegicus*** VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY, HEMATOXILINA EOSINA 400 X.

Observamos Congestión vascular moderada y dilatación de los sinusoides hepáticos en forma moderada. Esteatosis (degeneración grasa) gota mediana a grande. En ratas tratadas con dosis de 0,5 ml/kg de tetracloruro de carbono 2 veces por semana.

1. Congestión vascular
2. Degeneración grasa
3. Necrosis zonal

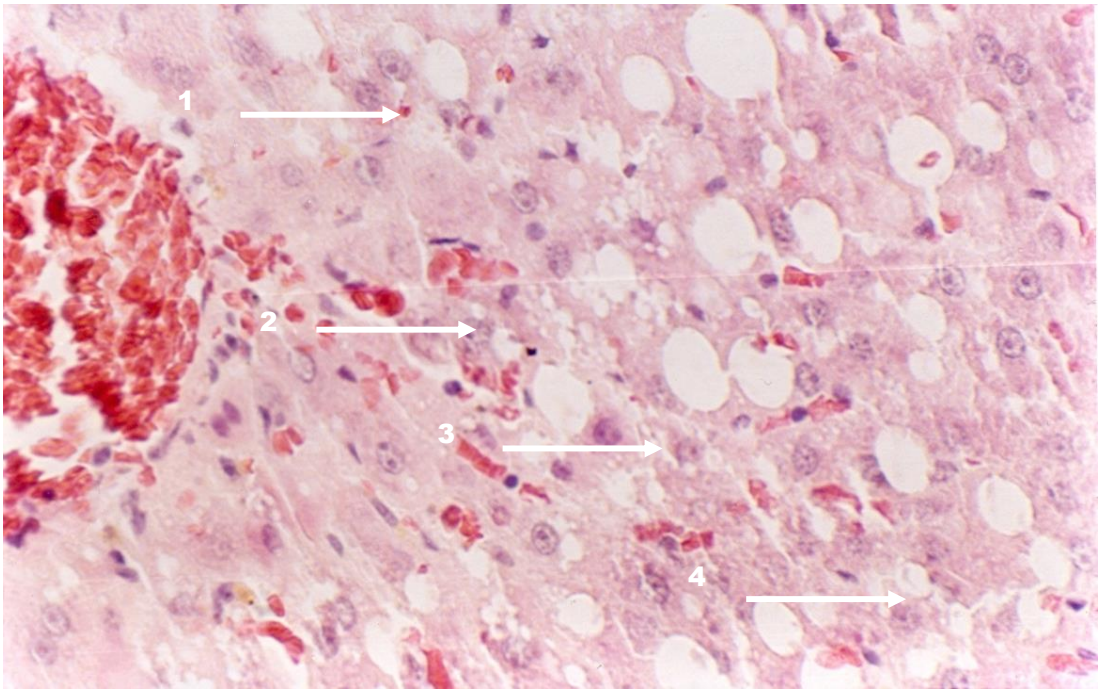



**FIGURA 2**. ESTRUCTURA DE HÍGADO DE TRATAMIENTO 1 QUE RECIBIÓ 0,5 ml/kg DE TETRACLORURO DE CARBONO/2VECES/SEMANA Y EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO DE***Medicago sativa "alfalfa"***100 mg/Kg./díaEN ***Rattus norvegicus***VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY HEMATOXILINA EOSINA 400 X

No se observa mayor variación en cuanto al daño hepático en relación al control Observamos congestión vascular moderada y dilatación de los sinusoides hepáticos en forma moderada. Esteatosis (degeneración grasa) gota mediana a grande. En ratas tratadas con dosis de 0,5 ml/kg tetracloruro de carbono 2 veces por semana.

1. Necrosis zonal
2. Edema
3. Vacuolización
4. Esteatosis

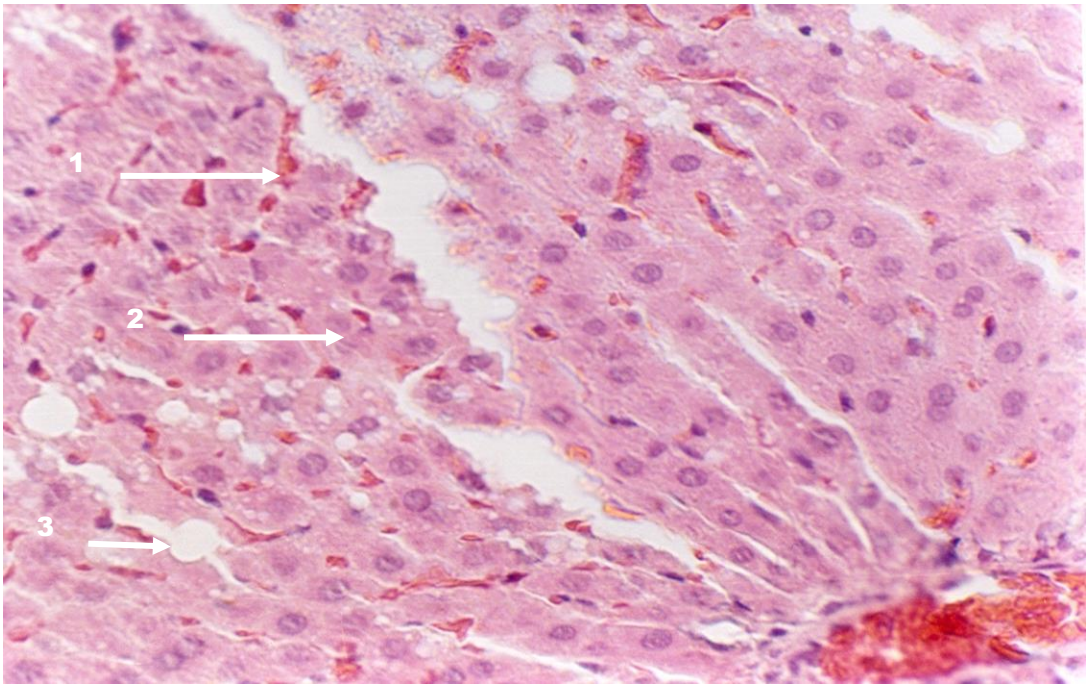
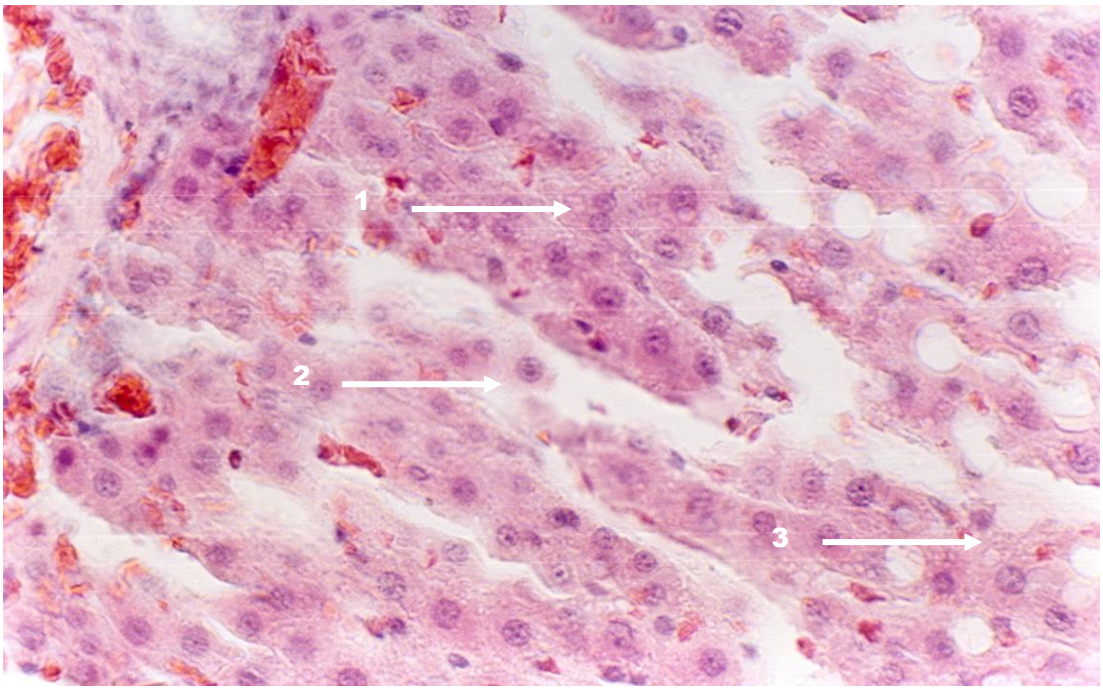



**FIGURA 3.** ESTRUCTURA DE HÍGADO DE TRATAMIENTO 2 QUE RECIBIÓ 0.5 ml/Kg. DE TETRACLORURO DE CARBONO/2VECES/SEMANA Y EXTRACTO ACUOSO DE GERMINADO DE ***Medicago sativa "alfalfa"***200 mg/Kg./día EN ***Rattus norvegicus*** variedad Sprague Dawley HEMATOXILINA EOSINA 400 X

Se observa degeneración grasa a gota mediana y congestión vascular disminuida en relación al control de moderada a leve. En ratas tratadas con dosis de 0,5 ml/kg tetracloruro de carbono 2 veces por semana.

1. Necrosis zonal
2. Edema
3. Esteatosis




**FIGUIRA 4.** ESTRUCTURA DE HÍGADO DE TRATAMIENTO III QUE RECIBIÓ 0.5ml/Kg. DE TETRACLORURO DE CARBONO/2VECES/SEMANA Y HEPABIONTA 5 mg/Kg./día EN ***Rattus norvegicus*** VARIEDAD SPRAGUE DAWLEY HEMATOXILINA EOSINA 400X

Se observa una disminución ligera en relación al control de la degeneración grasa y congestión vascular. En ratas tratadas con dosis de 0,5 ml/kg tetracloruro de carbono 2 veces por semana.

1. Necrosis zonal
2. Edema
3. Esteatosis

## DISCUSIÓN

Se observó que existe diferencia significativa ($p<0.01$) en la actividad de la TGO de las ratas en los diferentes grupos de evaluación. Al aplicar la prueba postcomparación de Tukey se encontró que en los tratamientos conextracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** a dosis de 100 y 200 mg/kg/día y el tratamiento con hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día, la actividad de la TGO de las ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/kg/2 veces/semana disminuyeron significativamente ($p<0.01$) respecto al grupo Control como se aprecia en la Tabla 1. Estos resultados se corroboran con los reportes de Al dosari (2012)Al said y col (2012) Chaoy col (2009). Esta disminución significativa de la actividad de la TGO se debería a los principios activos de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** tales como Alfa tocoferol, Antocianinas, Arginina, Beta caroteno, Beta sitosterol, Campesterol, Acido ferúlico, Acido laurico, Luteina, los cuales son antioxidantes inhibidores de la peroxidación de lípidos, disminuyendo así la lesión de la membrana plasmática, causada por aldehídos grasos debido a la presencia de radicales libres que se forman por la administración de Tetracloruro de carbono a dosis de 0.5ml/kg/día.

Se observó que existe diferencia significativa ($p<0.01$) en la actividad de la TGP de las ratas en los diferentes grupos de evaluación. Al aplicar la prueba postcomparación de Tukey se encontró que en los tratamientos con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** a dosis de 100 y 200 mg/Kg./día y el tratamiento con hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día, la actividad de la TGP de las ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/kg/2veces/semana disminuyeron significativamente ($p<0.01$) respecto al grupo Control como se aprecia en la Tabla 2. Estos resultados se corroboran con los reportes de Al Dosari (2012) Akindele y col (2010) Dong col (2011) Sadeghi y col (2016). Esta disminución significativa de la actividad de la TGP se debería a los principios activos degerminado de ***Medicago sativa "alfalfa"***como el tales como Alfa tocoferol, Antocianinas, Arginina, Beta caroteno, Beta sitosterol, Campesterol, Acido ferúlico, Acido laurico, Luteina que tienen

acción hepatoprotectora y hepatotrópica los cuales inactivan la formación de radicales superóxidos, finalizando de esta manera las reacciones autocatalíticas que se dan con la formación de radicales libres, disminuyendo de esta forma la lesión mitocondrial y posterior hinchazón de la célula debido al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática por la administración de tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/kg/2 veces/semana, disminuyendo la necrosis del hígado comprobándose que el extracto de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***tiene acción hepatoprotectora.

Se observó diferencia significativa ($p<0.01$) en el peso corporal de las ratas en los diferentes grupos de evaluación. Al aplicar la prueba postcomparación de Tukey se encontró que en los tratamientos con extracto acuoso de germinado **de *Medicago sativa "alfalfa"*** a dosis de 100 y 200 mg/Kg/día y el tratamiento con hepabionta a dosis de 5 mg/Kg./día los pesos corporales de las ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/kg/día aumentaron significativamente ($p<0.01$) respecto al grupo blanco como se aprecia en la Tabla 4. Estos resultados coinciden con lo reportado por Seida y col (2015) que realizaron estudios con extracto acuoso de ***Medicago sativa L.***para inhibir la formación de tumores en hígado de ratones suizos albinos; Robbins y col. (38)afirman que eltetracloruro de carbono induce la formación de carcinomas gástricos, y síndrome de mala absorción lo que explicaría la disminución del peso corporal de las ratas del Control que recibieron solo tetracloruro de carbono a dosis de 0.5 ml/kg/día.

En el examen histopatológico se observo degeneración grasa en el hígado de las ratas intoxicadas por tetracloruro de carbono. El tetracloruro de carbono son metabolizados a compuestos inactivos por combinación con sulfato y ácido glucurónico, siendo una pequeña parte metabolizada por el sistema del citocromo P-450. Éste oxida al tetracloruro de carbonopara producir un intermedio muy reactivo, la imina N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). En condiciones normales, la NAPQI se neutraliza por acción del glutatión.En dosis crónicas la toxicidad por tetracloruro de carbono, las vías metabólicas del sulfato y la glucuronida se saturan y mayor cantidad tetracloruro de carbono se desvía al sistema del citocromo P-450 donde se produce NAPQI. Consecuentemente, los suministros hepatocelulares de glutatión se agotan y en NAPQI

puede reaccionar libremente con las membranas celulares, causando amplios daños y muerte de muchos hepatocitos, dando como resultado necrosis hepática aguda Goodman (2012), Robbins y col (2013).

En las Figura 1 se observa la evaluación histológica del grupo control que recibió 0.5 ml/kg/2v/semana de tetracloruro de carbono. Se encontró alteración de la arquitectura y estructura hepática, dilatación del sinusoide hepático y esteatosis (degeneración grasa) gota mediana a grande. En las Figuras 2 tratadas con 100 mg/kg/día se observa daño leve a moderado en la arquitectura y estructura hepática, congestión vascular de leve a moderada y esteatosis (degeneración grasa) gota pequeña a mediana. Por otro lado en la Figura 3 y 4 tratadas con extracto acuoso de germinado de Medicago sativa a dosis de 200 mg/kg/día y 5 mg de heapabionta respectivamente se muestra una mejoría en la cito arquitectura del tejido hepático con respecto al grupo blanco.

La disminución significativa de TGO, TGPy el incremento de peso respecto al blanco y recuperación de la citoarquitectura de hígado por acción del extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** se debería a la presencia de componentes fitoquímicos aesculetina, beta amirina, beta sitosterol, acido cafeico, colina, esculetina, acido ferúlico, acido glucorónico, caempferol, metionina, zeaxantin, niacina, acido coumarico, quercetin, escopoletina, taninos, vitamina E; antiinflamatorios como Alfa espinasterol, Apigenina, Acido ascórbico, Beta amirina, Beta sitosterol, Acido cinámico, Ginesteina, Hederagenina, Caempferol, Limoneno, Salicilato, Estigmasterol, Acido oleico, Acido linoleico, Mirecetina, Acido coumarico, Quercetina y antioxidantes Alfa tocoferol, Antocianinas, Arginina, Beta caroteno, Beta sitosterol, Campesterol, Acido ferúlico, Acido laurico, Luteina. Los cuales inhiben o finalizan la formación de radicales superóxidos y disminuirían la necrosis de los hepatocitos. Ademas estos componentes fitoquimicos participarían en el metabolismo intermediario participando en numerosas rutas metabólicas de anabolismo y catabolismo en los hepatocitos.

## CONCLUSIÓNES

1. Se encontró disminución significativa ($p<0.01$) en los niveles de TGO, en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono con tratamiento de 100 mg/Kg. y 200 mg/Kg. de extracto acuoso de germinado de***Medicago sativa "alfalfa"*** y hepabionta 5 mg/Kg. respecto al blanco.
2. Se encontró disminución significativa ($p<0.01$) en los niveles de TGPen ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono con tratamiento de 100 mg/Kg. y 200 mg/Kg. de extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** y hepabionta 5 mg/Kg. respecto al blanco.
3. No se encontró aumento significativo ($p>0.05$) de los pesos corporales en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono con tratamiento de 100 mg/Kg. y 200 mg/Kg. de extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"*** y hepabionta 5 mg/Kg. respecto al blanco.
4. En la evaluación histológica se observó que las ratas que estuvieron sometidas al tratamiento 2 con extracto acuoso de germinado de ***Medicago sativa "alfalfa"***200 mg/Kg. tuvieron una disminución de moderado a una forma leve en la degeneración grasa y congestión vascular.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda introducir el consumo de extracto acuoso de germinado de *Medicago sativa* como terapia alternativa al tratamiento de enfermedades hepáticas ya que presenta interés nutricional debido al gran contenido de compuestos antioxidantes que contribuyen al mantenimiento de la salud humana.
2. Evaluar la acción del extracto acuoso de germinado de *Medicago sativa*en el metabolismo lipídico “in vitro” determinando la actividad de la lipasa e hidroximetilglutaril coenzima A reductasa.

## BIBLIOGRAFÍA


**1.** AKINDELE AJ, EZENWANEBE KO, ANUNOBI CC, ADEYEMI OO. 2010. Hepatoprotective and in vivo antioxidant effects of Byrsocarpus coccineus Schum. and Thonn. (Connaraceae). J Ethnopharmacol. 2010 May 4;129(1):46-52.

**2.** ALCÁZAR R ,PONCE M 2006. Comparación de la capacidad antioxidante el extracto acuoso de hojas de Alfalfa (Medicago Sativa) con la capacidad antioxidante de la Vitamina E observado en la concentración de malondialdehido en plasma y tejido aórtico en ratas sometidas a estrés oxidativo inducido por Hiperlipidemia.[Tesis Licenciatura].Arequipa: biblioteca biomédicas, Universidad Nacional San Agustin.

**3.** AL-DOSARI MS. 2012. In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (Medicago sativa L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats. Am J Chin Med. 2012;40(4):779-93.

**4.** ALQASOUMI S. 2010 Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: Protective effect of 'Rocket' Eruca sativa L. in rats. Am J Chin Med. 2010;38(1):75-88.

**5.** AL-SAID MS, MOTHANA RA, AL-YAHYA MA, AL-BLOWI AS, AL-SOHAIBANI M, AHMED AF, RAFATULLAH S. 2012. Edible oils for liver protection: hepatoprotective potentiality of Moringa oleifera seed oil against chemical-induced hepatitis in rats. J Food Sci. 2012 Jul;77(7):T124-30.

**6.** APAZA M, CUNO S. Estudio preliminar del efecto de (Medicago Sativa l. Var. Americana) “Alfalfa” sobre la hiperglicemia experimental inducida en ratas. [Tesis Licenciatura].Universidad Católica Santa María; 2002.

**7.** BOTERO B. 2016Los germinados como alimento excepcional y medicina natural [en línea]. Colombia. Germinados Cosecha Sagrada; URL

**8.** CHAO J, LEE MS, AMAGAYA S, LIAO JW, WU JB, HO LK, PENG WH. 2009. Hepatoprotective effect of shidagonglao on acute liver injury induced by carbon tetrachloride. Am J Chin Med. 2009;37(6):1085-97.

**9.** CULEBRAS J, GARCÍA DE LORENZO A, GIL A, LABORDA PÉREZ DE LA CRUZ A, SANCHEZ-ALVAREZ 2007 Las referencias bibliográficas en la nutrición.SanzValero J, Wanden-Berghe C, coordinadores. Madrid: Grupo de Comunicación y Documentación Científica en Nutrición (CDC Nut-SENPE).

**10.** DENG W, DONG XF, TONG JM, XIE TH, ZHANG Q. 2012. Effects of an aqueous alfalfa extract on production performance, egg quality and lipid metabolism of laying hens. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2012 Feb;96(1):85-94.

**11.** DONG XF, GAO WW, SU JL, TONG JM, ZHANG Q. 2011. Effects of dietary polysavone (Alfalfa extract) and chlortetracycline supplementation on antioxidation and meat quality in broiler chickens. Br Poult Sci. 2011 Jun 1;52(3):302-9.

**12.** DUKE, J. A, JAMES A. 2016 Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, FL. CRC Press.

**13.** DUKE, J.2016. “Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Chemical and their biological Activities in: Medicago sativa

**14.** GANONG W 2015 Fisiología Médica. 23 ava Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. México D.F.

**15.** GOODMAN G, GOODMAN L., RALL T. MURAD F. 2012. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Editorial Panamericana Buenos Aires

**16.** GUYTON, 2015 Fisiología y Fisiopatología. Quinta Edición. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V. México.

**17.** HUILCA L. 2002. Efecto el homogenizado de hojas de medicago sativa “alfalfa” en el tratamiento de las lesiones gástricas inducidas por estrés en ratas. [Tesis Licenciatura].Universidad Católica Santa María.

**18.** LATARJET RUIZ L. 2012 Anatomía del Aparato Digestivo. Anatomía humana de Latarjet y Ruiz L. 2ª Edición, Vol 2. Editorial Panamericana.

**19.** OCHOA C, GRANDA C, CHAPOÑAN M, BORJA R, BORJAS P, ORTIZ J, 2008. Efecto Protector de Peumus Boldus en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol.CIMEL Vol.13 N 1.

**20.** ROBBINS,STEPHEN Y COULTER,MARY. 2013. PatologíaEstructural y funcional.Adaptacionescelulares,lesióncelularymuertecelular. Ed.Interamericana

**21.** SADEGHI L, TANWIR F, YOUSEFI BABADI V. 2016. Antioxidant effects of alfalfa can improve iron oxide nanoparticle damage: Invivo and invitro studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2016 Nov;81:39-46.

**22.** SEIDA A, EL-HEFNAWY H, ABOU-HUSSEIN D, MOKHTAR FA, ABDEL-NAIM A. 2015. Evaluation of Medicago sativa L. sprouts as antihyperlipidemic and antihyperglycemic agent. Pak J Pharm Sci. 2015 Nov;28(6):2061-74.

**23.** SHI Y, GUO R, WANG X, YUAN D, ZHANG S, WANG J, YAN X, WANG C. 2014 The regulation of alfalfa saponin extract on key genes involved in hepatic cholesterol metabolism in hyperlipidemic rats.

**24.** SOBERÓN, M al.Impacto de una intervención alimentaria con un extracto acuosoproteico de Medicago sativa L (alfalfa), en niños pre escolares con desnutrición crónica. An. Fac. med., Set 2009, vol.70, no.3, p.168-174.

**25.** STANLEY L. ROBBINS. 2008 Patología Estructural y Funcional. Tercera Edición. Editorial Nueva Editorial Interamericana S. A de C. V. México D.F.

**26.** TRONCOSO LV. 2007. Efecto antioxidante y Hepatoprotector del Petroselinum sativum (perejil) y de una mezcla de vitaminasantioxidantes (A, E, C) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol[Tesis Licenciatura] Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

## COMPOSICION FITOQUIMICA Medicago sativa

HEPATOPROTECTORES HEPATOTROPICOS

Aesculetina
Beta amirina
Beta sitosterol
Acido cafeico
Colina
Esculetina
Acido ferúlico
Acido glucorónico
Caempferol
Metionina
Zeaxantin
Niacina
Acido coumarico
Quercetin
Escopoletina
Taninos
Vitamina E

ANTIINFLAMATORIOS

Alfa espinasterol
Apigenina
Acido ascórbico
Beta amirina
Beta sitosterol
Acido cinámico
Ginesteina

Hederagenina
Caempferol
Limoneno
Salicilato
Estigmasterol
Acido oleico
Acido linoleico
Mirecetina
Acido coumarico
Quercetina

ANTIOXIDANTES

Alfa tocoferol
Antocianinas
Arginina
Beta caroteno
Beta sitosterol
Campesterol
Acido ferúlico
Acido laurico
Luteina

## ANEXO 2 MATRIZ DE TABULACION

| | | TGO B | TGO 7 | TGO 14 | TGO 21 | TGO 28 | TGP B | TGP7 | TGP 14 | TGP 21 | TGP 28 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | control | 24.8 | 110.9 | 185.0 | 186.0 | 198.0 | 40.8 | 103.2 | 101.0 | 102.0 | 102.6 |
| 2 | control | 31.9 | 106.6 | 176.0 | 175.0 | 186.0 | 52.8 | 103.0 | 110.3 | 105.3 | 114.0 |
| 3 | control | 29.1 | 111.4 | 186.0 | 176.0 | 179.0 | 27.6 | 105.8 | 112.4 | 104.7 | 167.3 |
| 4 | control | 24.8 | 110.9 | 159.0 | 169.0 | 176.0 | 40.8 | 103.2 | 111.0 | 114.4 | 152.7 |
| 5 | control | 31.9 | 106.6 | 168.0 | 175.0 | 189.0 | 52.8 | 104.0 | 110.3 | 116.4 | 145.7 |
| 6 | control | 29.1 | 111.4 | 175.0 | 176.0 | 187.0 | 27.6 | 105.8 | 112.4 | 108.6 | 167.3 |
| 7 | alfalfa 1 | 24.7 | 112.0 | 148.3 | 134.7 | 134.6 | 50.9 | 102.0 | 111.4 | 106.4 | 124.6 |
| 8 | alfalfa 1 | 26.3 | 103.0 | 165.2 | 118.0 | 120.4 | 40.8 | 105.8 | 114.3 | 125.2 | 113.6 |
| 9 | alfalfa 1 | 22.1 | 105.0 | 163.4 | 186.4 | 135.2 | 42.8 | 114.8 | 112.4 | 112.4 | 98.3 |
| 10 | alfalfa 1 | 28.2 | 106.0 | 148.3 | 134.7 | 134.6 | 50.9 | 106.0 | 111.4 | 106.4 | 98.6 |
| 11 | alfalfa 1 | 26.3 | 108.0 | 165.2 | 118.0 | 120.4 | 40.8 | 105.8 | 114.3 | 125.2 | 89.6 |
| 12 | alfalfa 1 | 22.1 | 104.0 | 163.4 | 186.4 | 135.2 | 42.8 | 114.8 | 112.4 | 112.4 | 98.3 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | alfalfa 2 | 27.3 | 104.0 | 157.5 | 186.2 | 129.7 | 39.0 | 105.8 | 94.6 | 125.6 | 98.4 |
| 14 | alfalfa 2 | 24.4 | 120.1 | 148.7 | 184.3 | 136.3 | 86.6 | 103.2 | 89.4 | 102.4 | 93.6 |
| 15 | alfalfa 2 | 28.2 | 114.0 | 135.3 | 148.6 | 125.3 | 31.6 | 109.0 | 98.8 | 100.4 | 79.6 |
| 16 | alfalfa 2 | 27.3 | 106.0 | 157.5 | 186.2 | 129.7 | 39.0 | 105.8 | 94.6 | 125.6 | 98.4 |
| 17 | alfalfa 2 | 24.8 | 111.0 | 148.7 | 184.3 | 136.3 | 86.6 | 103.2 | 89.4 | 102.4 | 93.6 |
| 18 | alfalfa 2 | 28.2 | 114.0 | 135.3 | 148.6 | 125.3 | 31.6 | 109.0 | 98.8 | 100.4 | 79.6 |
| 19 | hepabionta | 28.2 | 115.0 | 136.3 | 124.6 | 98.6 | 43.3 | 111.1 | 75.3 | 34.4 | 56.4 |
| 20 | hepabionta | 29.1 | 112.0 | 134.3 | 136.3 | 81.3 | 46.7 | 110.2 | 98.7 | 78.4 | 56.4 |
| 21 | hepabionta | 26.3 | 109.0 | 146.3 | 126.4 | 79.6 | 40.0 | 105.3 | 97.3 | 64.0 | 46.3 |
| 22 | hepabionta | 28.2 | 113.0 | 136.3 | 124.6 | 98.6 | 43.3 | 111.1 | 75.3 | 34.4 | 56.4 |
| 23 | hepabionta | 29.1 | 114.0 | 134.3 | 136.3 | 81.3 | 46.7 | 110.2 | 98.7 | 78.4 | 56.4 |
| 24 | hepabionta | 26.3 | 112.0 | 146.3 | 126.4 | 79.6 | 40.0 | 105.3 | 97.3 | 64.0 | 46.3 |