



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

"Estudio del efecto protector y/o regenerador del aceite de Emú (*Dromiceius oil*) sobre el daño celular agudo inducido por tetracloruro de carbono en células hepáticas de ratas".

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

GERMÁN ALONSO OLIVERA FUENTEALBA

VALDIVIA-CHILE

2008

I. AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer y dedicar este trabajo, a mis padres Guillermo y Alba. A mi mamá quien con su carácter, esfuerzo, fuerza, entrega, dedicación, amor y cariño de día a día, han permitido mi formación personal y académica. Te amo mamá.

A mi hermana Valina, por su bondad, amor incondicional, por su fuerza y compañía en muchos aspectos de mi vida.

Agradezco a mi profesora patrocinante, Annemarie Nielsen, por la confianza depositada en mí al aceptarme como alumno tesista y por su tiempo y gran disposición a ayudarme y atender mis dudas y consultas cada vez que fue necesario.

Agradezco al profesor Alejandro Jerez y al Dr. Humberto Dölz, por la excelente disposición personal dedicada al desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que integran el Instituto de Farmacia y que de alguna manera u otra contribuyeron a la realización de este trabajo

A la T.M MCs. Sra. Inés Siegmund, agradezco su paciencia y la valiosa ayuda brindada el momento que la necesitaba.

A la Q.F Sra Dinorita Ramirez y a cada una de las “chicas” de la Farmacia Prat, a quienes no solo les agradezco parte de mi formación profesional, sino también su cariño sincero, apoyo y comprensión de cada día.

A mis amigos Fabiola, Natalia, Karen, Carola, Verónica, Evelyn y Juan Pablo, Coca y Marxi, quienes sin querer se han convertido en personas muy importantes para mí, entregándome cariño y acompañándome en los buenos y malos momentos de la vida. Lo único que les pido es que jamás nos distancieemos. Los quiero mucho.

A Andrés, quien su compañía, admirable fuerza y cariño entregado, me ha permitido, soñar, creer y, tener un objetivo y esperanza en la vida. Lo logramos Andrés.

Finalmente, quiero agradecer a Dios, por su ayuda, compañía y por permitirme llegar hasta importante etapa de mi vida junto a mis seres queridos.

Germán Alonso Olivera Fuentealba.

II. INDICE.

I. AGRADECIMIENTOS.....	1
II. INDICE.....	3
III. RESUMEN.....	5
IV. SUMMARY.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Hígado.....	7
1.2 Sustancias tóxicas que inducen daño hepático.....	8
1.3 Regeneración hepática.....	11
1.4 Estudio del arte.....	12
2. HIPÓTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo General.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Materiales.....	17
4.2 Método.....	17
4.2.1 Diseño experimental.....	17
4.2.2 Método de procedimiento histológico.....	19
4.2.3 Evaluación histológica.....	21
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Observación macroscópica de los hígados.....	23

5.2 Observación microscópica de los hígados.....	24
5.2.1 Tejido hepático de ratas control.....	24
5.2.2 Tejido hepático de ratas de grupo I.....	26
5.2.3 Tejido hepático de ratas de grupo II.....	27
5.2.4 Tejido hepático de ratas de grupo III.....	32
5.2.5 Tejido hepático de ratas de grupo IV.....	33
5.2.6 Tejido hepático de ratas de grupo V.....	38
6. DISCUSIÓN.....	43
6.1 Macroscópica de los hígados.....	43
6.2 Microscópica de los hígados.....	44
7. CONCLUSIONES.....	49
8. REFERENCIAS.....	50
9. ANEXOS.....	56

III. RESUMEN.

El aceite de emú, es un aceite de origen animal, extraído de la grasa hipodérmica del ave no voladora *Dromiceus novaehollandiae*, el cual ha sido utilizado por los aborígenes australianos, desde hace miles de años, por sus efectos tópicos de aliviar el dolor, humectar y regenerar la piel. De acuerdo a sus propiedades relipidizantes, por su capacidad de actuar como un efectivo vehículo incrementador de la penetración de sustancias y por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, cualitativamente similares a los de la piel humana, despierta el interés de su investigación y estudio. Actualmente, el aceite de emú está siendo utilizado como ingrediente activo en variadas formulaciones farmacéuticas y/o cosméticas.

En este trabajo se estudió, en un modelo de daño celular hepático, el efecto protector y/o regenerador del aceite de emú, cuando es administrado previo y posterior a la inducción del daño lipoperoxidativo con tetracloruro de carbono (CCl_4) al 20% en aceite de oliva. Para ello, se procedió a observar y evaluar los cambios histológicos producidos en el tiempo, en los tejidos hepáticos tratados con y sin aceite de emú.

Los resultados de la observación histológica, mostraron que cuando el aceite de emú se administró previo al daño producido por el hepatotóxico (CCl_4), existe una disminución del desarrollo de necrosis del tipo balonizante mediozonal y centrolobulillar y, una aparición más temprana de los signos de regeneración en el área periportal, que cuando el aceite de emú es administrado posterior a la acción dañina del CCl_4 en el tejido hepático.

SUMMARY

Emu oil is an animal origin oil extracted from the of hypodermic fat of the non-flying bird *Dromiceus novaehollandiae*, which has been used by Australian native population since immemorial times due to their moisturizing, analgesic, and skin regenerating properties. According to its re-lipidizing properties emu oil is an effective penetration enhancing vehicle for a great variety of substances and because of its high polyunsaturated fatty acid content which are quantitatively similar to human skin has attracted a great deal of interest. Currently, emu oil has been used as an active ingredient in several cosmetic and pharmaceutical preparations.

In this work we evaluated, in an hepatic damage model the emu oil protective and regenerating effect when administered before and after 20 % CCl₄ induced lipoperoxidative damage, with olive oil acting as vehicle for CCl₄. The emu oil protective effect was assessed observing the histopathological changes through time in hepatic tissues treated with or without emu oil.

The results obtained from histopathological observations showed that when emu oil was administered before CCl₄ induced damage, a decrease in ballooned centrolobular and mediozonal necrosis was observed and early signs of regeneration at the periportal region were assessed when emu oil was added after CCl₄ induced hepatic damage.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Hígado.

El hígado es el órgano más representativo del organismo, debido a las complejas funciones que realiza, tales como, biotransformación de sustancias endógenas y exógenas, síntesis de proteínas, metabolismo energético y desintoxicación. Su unidad funcional es el hepatocito, que son células poligonales, de unos 20 a 30 μm de diámetro, que se agrupan entre si para formar placas anastomosantes de una a dos células de grosor. Estas células muestran variaciones en sus propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas, según su localización dentro de los lobulillos hepáticos, por lo tanto, cualquier sustancia tóxica que afecte al hígado estará destruyendo o dañando hepatocitos, cuyo daño estructural o funcional se denomina hepatotoxicidad.

El hígado es a menudo el órgano blanco para lesiones químicamente inducidas. Primero, la mayoría de los xenobióticos se incorporan al cuerpo a través del aparato gastrointestinal y, después de la absorción, son transportados por la vena porta hepática al hígado, así el hígado es el primer órgano inundado por los productos químicos que se absorben en el tracto gastrointestinal. Un segundo factor es la alta concentración de enzimas metabolizantes de xenobióticos en el hígado, principalmente del sistema de monooxigenasa dependiente de citocromo P-450 (CYP). Así, muchas de las reacciones oxidativas que produce este sistema pueden inducir metabolitos activos que ocasionen lesiones en el hígado.

Las áreas del daño se manifiestan a menudo en la región centrolobulillar, y esta localización se ha atribuido, principalmente por la presencia la alta concentración del citocromo P-450 en esa área del hígado.

1.2. Sustancias tóxicas que inducen daño hepático.

Existe una gran de variedad sustancias químicas que producen daño celular hepático, tales como CCl_4 , furosemida, paracetamol, entre otros. Algunos, actúan directamente sobre determinadas moléculas celulares, así por ejemplo, el mercurio afecta grupo sulfihídrido y el cianuro interfiere con la cadena respiratoria mitocondrial. Otros lo hacen a través de la generación de radicales libres, como es el caso de algunas toxinas de hongos y bacterias. Otros como el alcohol, interfieren con el metabolismo hepático de múltiples maneras.

1.2.1 Tetracloruro de carbono (CCl_4)

a) Características generales:

De todos los compuestos mencionados, el tetracloruro de carbono es utilizado frecuentemente para realizar un modelo de hepatotoxicidad, ya que, el mecanismo de la necrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4) ha sido objeto de investigación extensa y, es quizás el hepatotóxico mejor estudiado y conocido entre aquellos xenobióticos que se sabe causan daño hepático (Kiso y Tohkin, 1983). El CCl_4 pertenece al grupo de hidrocarburos halogenados, es poco soluble en agua y, se usa como disolvente (aceites, grasas, ceras y limpieza en seco), difunde fácilmente a través

de las membranas plasmáticas. Su absorción lenta en el tracto gastrointestinal se ve favorecida por la presencia de aceites y grasas de origen animal o vegetal (Daykin, 1965), esto se debe a que las sustancias no polares que se disuelven en lípidos difunden con mayor rapidez, ya que, la membrana celular que es permeable, se encuentra constituida principalmente por fosfolípidos, y cuya permeabilidad está determinada por las características fisicoquímicas de las sustancias.

b). Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción del CCl_4 es complejo y para el inicio de su toxicidad se requiere su metabolización en el hígado. Además, se indica que por si mismo no sería tóxico, pero que en el retículo endoplásmico liso entraría a la cadena enzimática microsomal (Taira *et al*, 1980). El CCl_4 ejerce su efecto tóxico al generar el radical libre altamente tóxico (CCl_3^\bullet) (Payer *et al*, 1980) por acción de oxidasas ligadas al sistema P-450 en el retículo endoplásmico, paralelamente por una reacción de reducción (vía de eliminación cloro), se formaría el CCl_2 . (Wolf *et al*, 1977).

El CCl_3^\bullet inicia la rápida peroxidación de lípidos de membrana, lo que provoca una reducción de la fluidez de la membrana (Campo *et al*, 2001), la cual es esencial para preservar la función celular (transducción de señal, secreción y endocitosis). Se rompen las membranas del RE, se liberan los ribosomas. Se acumulan triglicéridos al no existir síntesis de las apoproteínas necesarias para su salida del hígado. Esto se traduce en esteatosis. Por otro lado, la peroxidación de lípidos que afecta a la membrana plasmática se traduce en trastornos en el transporte de iones, ingreso masivo de agua, sodio y calcio. (Ver figura N° 1).

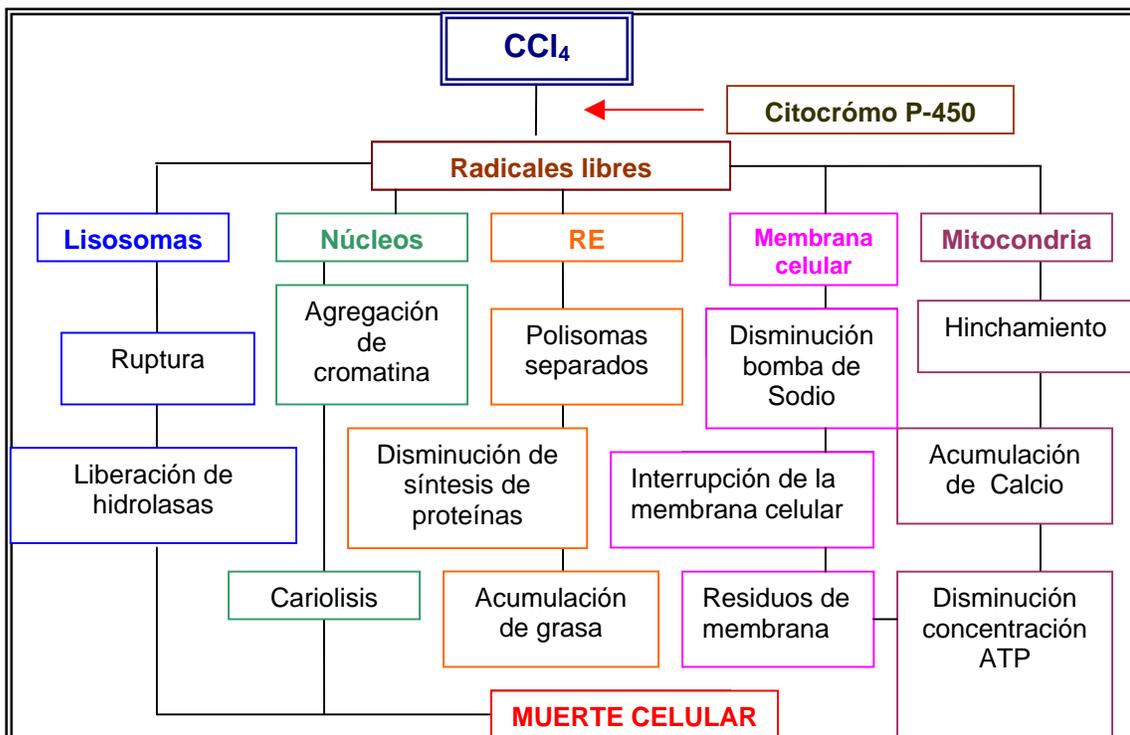


Fig. N° 1. Esquema del mecanismo de acción del daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl_4).

De manera que dependiendo de la magnitud y tiempo de la acción del tóxico las consecuencias fisiopatológicas difieren, pudiendo encontrarse esteatosis o necrosis masiva (Lowrey, 1981).

Dado lo anterior, la necrosis inducida por CCl_4 es más severa en las células centrolobulillares del hígado quienes contienen la más alta concentración de la isoenzima P-450 (Hodgson, 1996; Niesink, 1996), la cual es la responsable de la activación del CCl_4 . Además, se ha observado que el daño hepático, se expresa a través de dos tipos celulares morfológicamente diferentes, necrosis balonizante y necrosis hialina, los cuales alcanzan su máximo a las 24 horas luego de administrado el tóxico. (Ortiz, 1988).

1.3 Regeneración hepática.

Por otra parte, el inicio de la regeneración hepática estaría íntimamente relacionado con la ubicación zonal, ventajosa o desventajosa de los hepatocitos en el lobulillo hepático. Por lo tanto, los hepatocitos ubicados en la zona periportal (cerca al espacio porta) inician un temprano proceso de recuperación y de regeneración, puesto que reciben cantidades excelentes de nutrientes y oxígeno, y sólo están expuestos en forma mínima a productos metabólicos, a diferencia, de aquellos hepatocitos posicionados en la región mediozonal y centrolobulillar, ya que estos reciben sangre de "segunda calidad" en términos de nutrientes y oxígeno y fuertemente cargada de metabolitos. (Ham, Cormarck, 1988; Gartner, Hiatt, 2002; Robbins, Kumar, 2005)

1.4 Estudio del arte.

El continuo avance de la investigación farmacológica ha hecho posible la obtención de nuevos productos que presentan una actividad hepatoprotectora y / o regeneradora, de origen natural. Es así como por ejemplo compuesto derivados del *Haplopappus bailahuen* (Martin *et al*, 1986; Nuñez *et al*, 1986), *Silybum marianum* (Benda y Zens, 1974; Pérez – Carnero *et al*, 1976) , *Cynara scolymus* (Adzet *et al*, 1987), *Aspalathus linaeris* (Ulicna *et al*, 2003) han demostrado poseer tal efecto.

Así esta interminable búsqueda hoy se centra en una sustancia de origen animal, que es el **aceite de Emú** (*Dromiceius oil*). Un producto obtenido a partir de la grasa hipodérmica del ave *Dromiceus novaehollandiae*, ave de origen australiano de unos 45 Kg. de peso y hasta 1,9 mts de altura, no voladora y que se alimenta principalmente de semillas y bayas. Actualmente, se está criando para el aprovechamiento de su aceite y su carne de color rojizo, baja en colesterol. (Ventura, 2006)

El aceite de emú, es una grasa semi-sólida a temperatura ambiente, pero se le clasifica como aceite y ha sido utilizado por los aborígenes australianos, desde hace miles de años, por sus efectos tópicos de aliviar el dolor, regenerar y humectar la piel. Sus fantásticas cualidades se difundieron tanto por sus propiedades de reducir el colesterol, triglicéridos y lipoproteína de alta densidad, como por su capacidad única de penetrar en forma rápida y profunda la epidermis, por estimular células nuevas de la piel y por atenuar cicatrices y quemaduras. Además, el aceite de emú a diferencia de otras materias primas que se utilizan en la industria cosmética, ha demostrado poseer ventajas y beneficios, debido a que no tiene la tendencia de obstruir los poros; no

comedogénico (Departament of dermatology. University of Texas Medical School, Houston, 1993), ser hipoalergénico, también ha dado buenos resultados en estudios sobre su actividad antiinflamatoria (Qiu XW., *et al*, 2005), anestésicas (Code, 1997) en el tratamiento y/o cicatrización de heridas, en otras alteraciones dérmicas como psoriasis y eccemas (Fein E., *et al*, 1997; Zemtsov A., *et al*, 1997) y como un vehículo extraordinariamente efectivo. (Craig- Schmidt *et al*, 1994; Whitehouse , Turner , 1997)

El estudio lipídico del aceite de emú, indicó una composición similar a los ácidos grasos que constituyen la barrera hidrolipídica cutánea, lo que la hace ideal para el tratamiento de todo tipo de pieles. (Craig- Schmidt *et al*, 1994) (Ver grafico n° 1)

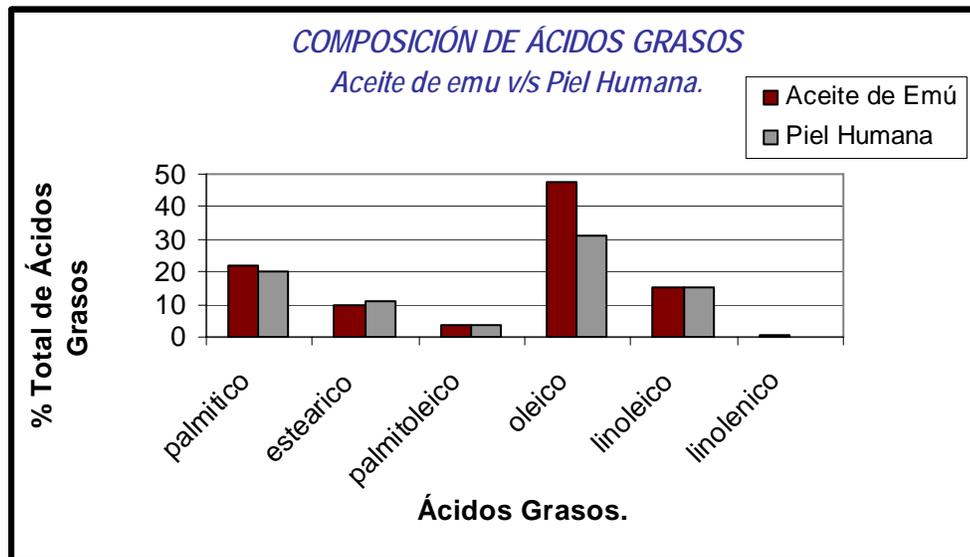


Grafico N° 1. La figura muestra una comparación entre la composición de ácidos grasos de la piel humana y el aceite de emú

El aceite de emú posee ácidos grasos saturados (30 %) e insaturados (monoinsaturados 40% y poliinsaturados 22% a 25%). (Ver grafico n°2)

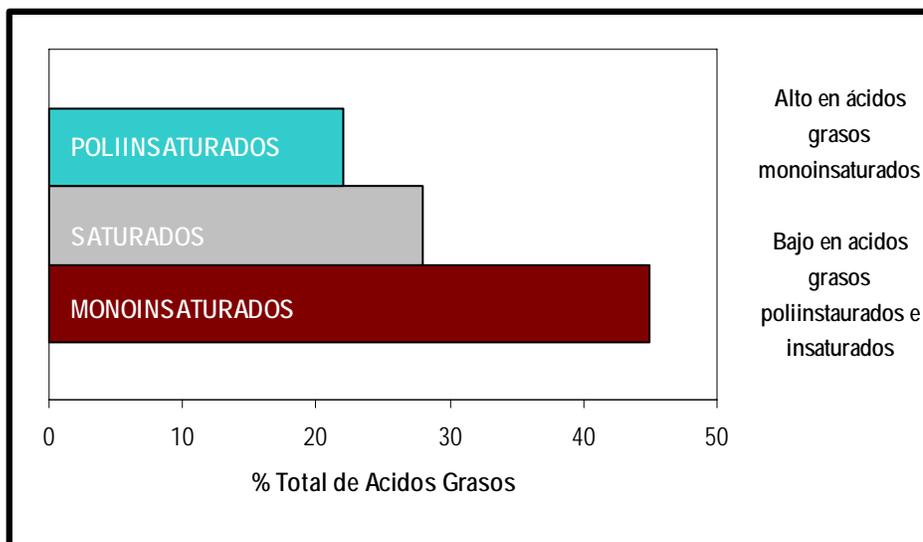


Grafico N° 2: La figura muestra el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos presentes en el aceite de Emú.

La mayor cantidad de ácidos grasos saturados encontrados en el aceite de emú fueron ácido palmítico (16:0), el cual comprende aproximadamente el 20% del total de ácidos grasos y ácido esteárico (18:0) el 8%.

Ácido oleico (18:1), es el mayor ácido graso monoinsaturado encontrado y, comprende el 40% del total de ácidos grasos. En cantidad mucho más pequeña, cerca del 5%, se encuentra el ácido palmitoleico (16:1).

Ácido linoléico (18:2), fue el ácido graso poliinsaturado encontrado en mayor cantidad (20%), seguido por cantidades pequeñas (1-2%) del ácido linolénico (18:3). Solamente cantidades trazas de ácido araquidónico fueron encontrados. (Craig - Schmidt *et al.*, 1994)

En conclusión, aproximadamente el 70% de ácidos grasos presentes en el aceite de emú son insaturados. El ácido oleico, es el mayor ácido graso presente en el aceite. También contiene los ácidos grasos esenciales, ácido linoléico y linolénico, que son necesarios para determinadas funciones del organismo y que los seres humanos los deben adquirir a través de la dieta (Craig – Schmidt *et al*, 1994), posiblemente estos últimos podrían ser los responsables de la elevada penetrabilidad de este aceite en la piel y que le permite estimular células nuevas en la piel. Debido a que la membrana celular es permeable cuando permite el paso, más o menos fácil, de una sustancia y cuya permeabilidad depende de varios factores relacionados con las propiedades físico-químicas de las sustancias. Así sustancias que se disuelven en los lípidos (moléculas hidrófobas, no polares) penetran con facilidad en la membrana dado que está compuesta en su mayor parte por fosfolípidos. Y, por otro lado, el transporte de ácidos grasos a través de membrana ocurre en forma pasiva, como también por proteínas que unen ácidos grasos (J. J. F. P. Luiken *et al*, 2002 ; Tova Meshulam *et al*, 2006).

2. HIPÓTESIS.

Se plantea que de acuerdo a la composición de los ácidos grasos que posee el aceite de emú, cuando se administra previo y/o posterior a la inducción de un daño hepático lipoperoxidativo agudo con tetracloruro de carbono (CCl_4) al 20% en aceite de oliva, éste presenta un efecto protector y/o regenerador de las células hepáticas de ratas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Estudiar en un modelo de daño celular en ratas, el efecto protector y/o regenerador del aceite de emú, cuando es administrado previo y/o posterior a la inducción de un daño lipoperoxidativo en membranas celulares (específicamente hepáticas), con tetracloruro de carbono (CCl_4).

3.2 Objetivos Específicos.

3.2.1 Observar y evaluar los cambios histológicos que se producen en el tiempo, cuando se administra aceite de emú previo a la administración en dosis única de CCl_4 al 20% en aceite de oliva.

3.2.2 Observar y evaluar los cambios histológicos que se producen en el tiempo, cuando se administra aceite de emú posterior a la administración en dosis única de CCl_4 al 20% en aceite de oliv

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Materiales.

4.1.1 Animales

Se utilizaron un total de 62 ratas machos cepa Sprague Downley, de dos meses de edad, cuyos pesos fluctuaban entre los 160 y 250 gramos. Se alimentaron en forma libre con pellets y se le administró agua por goteo.

4.1.2 Reactivos.

- Aceite de Oliva.
- Aceite de emú. (Emuêlle Chile ®)
- Tetracloruro de Carbono (CCl₄). (Merck ®)
- Éter Etílico. (Merck ®)

4.1.3 Instrumental.

- Jeringas de 3 ml.
- Sonda de alimentación buco gástrica.
- Placas petri.
- Tijeras, pinzas, tabla de disección.

4.2 Método.

4.2.1 Diseño Experimental *.

***Según diseño experimental (Rutherford, 1988 y Nielsen, 1990).**

El diseño experimental para el estudio del efecto protector y/o regenerador del aceite de emú, consideró 5 grupos de 12 animales cada uno, más un grupo control, constituido por dos ratas.

La administración de cada una de las sustancias fue por vía oral, usando una sonda buco gástrica. Las ratas permanecieron 24 horas en ayuno con agua *ad - libitum*, previo al inicio del estudio.

La descripción de los grupos es la que se detalla a continuación:

GRUPO I: Ratas a las que se administró aceite de oliva en dosis única de 0,5 mL / 200 grs de peso

GRUPO II: Ratas a las que se administró una dosis de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

GRUPO III: Ratas a las que se administró una dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú.

GRUPO IV: Ratas a las que se administró en dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú 24 y 1 hora previo a la inducción del daño celular con dosis única de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

GRUPO V: Ratas a las que se administró en dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú 1, 24, 36 y 48 horas posterior a la inducción del daño celular con dosis única de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

- Luego de administrado el CCl_4 se sacrificaron las ratas de los grupos I, II, III, IV (2 ratas por grupo) a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas.
- Las ratas del grupo V fueron sacrificadas 2 a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas, luego de administrado el CCl_4 .
- En el sacrificio de las ratas se utilizó una sobredosis de éter por vía inhalatoria.
- Una vez sacrificado el animal se procedió a extraer el hígado, y realizarle 2 a 3 cortes, luego cada corte fue fijado en formalina al 10%, posteriormente fueron incluidos en histosec, seguidos de cortes histológicos de $4\ \mu\text{m}$ y finalmente se les efectuó tinción con Hematoxilina – Eosina (H-E).

PROCEDIMIENTO HISTOLÓGICO

La administración de cada una de las sustancias fue por vía oral, usando una sonda buco gástrica. Las ratas permanecieron 24 horas en ayuno con agua *ad - libitum*, previo al inicio del estudio.

La descripción de los grupos es la que se detalla a continuación:

GRUPO I: Ratas a las que se administró aceite de oliva en dosis única de 0,5 mL / 200 grs de peso

GRUPO II: Ratas a las que se administró una dosis de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

GRUPO III: Ratas a las que se administró una dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú.

GRUPO IV: Ratas a las que se administró en dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú 24 y 1 hora previo a la inducción del daño celular con dosis única de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

GRUPO V: Ratas a las que se administró en dosis de 1 mL / 200 grs de peso de aceite de emú 1, 24, 36 y 48 horas posterior a la inducción del daño celular con dosis única de 0.5 mL / 200 grs de peso de una solución de CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

4.2.2 Método de procedimiento histológico.

A. Evaluación del daño:

Realizada por observación en microscopía óptica, enfocada en describir cambios en las características morfológicas del tejido, de acuerdo a criterios de: Tipo y Localización.

A.1) Tipo:

Los tipos de cambios morfológicos considerados, incluyeron los siguientes:

- ☞ **Esteatosis:** presencia de pequeñas vacuolas de grasa en el citoplasma del hepatocito.
- ☞ **Degeneración balonizante:** hepatocitos aumentados en volumen con tumefacción citoplasmática, palidez tintorial y aspecto homogéneo.
- ☞ **Necrosis balonizante:** producto de la degeneración balonizante, al cual se le agrega picnosis nuclear.
- ☞ **Necrosis hialina:** necrosis de coagulación, donde la célula se reduce en volumen, citoplasma hialinizado, eosinófilo y núcleo picnótico.
- ☞ **Infiltrado inflamatorio.**

A.2) Localización:

Se efectuó una fragmentación del lobulillo hepático en tres zonas:

- ☞ **Periportal,** hepatocitos cercanos a la triada portal.
- ☞ **Centrolobulillar,** hepatocitos que limitan con la vena hepática central y,
- ☞ **Mediozonal,** hepatocitos que se sitúan entre ambas zona centrolobulillar y periportal.

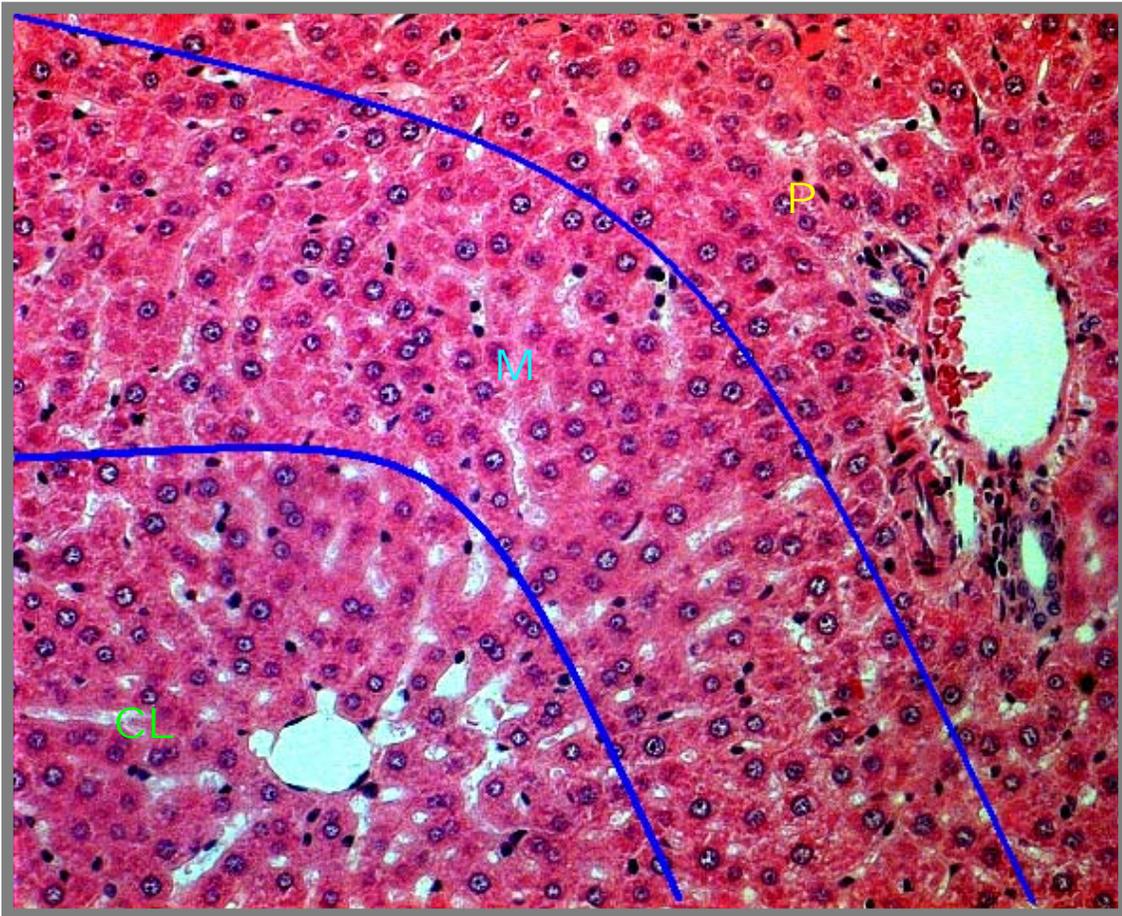


Fig. N° 2. Microfotografía de tejido hepático. Se observan la tres zonas en que fue dividido el lobulillo hepático: zona periportal (P), mediozonal (M) y centrolobulillar (CL).

B. Evaluación de la regeneración:

La regeneración hepática se evaluó, mediante la observación de los tejidos por microscopia óptica, determinando la presencia de los siguientes signos histológicos:

- ☞ Basofilia citoplasmática.
- ☞ Anisocariocitosis.
- ☞ Nucleolos prominentes.
- ☞ Mitosis.

5. RESULTADOS.

5.1 Observación macroscópica de los hígados.

La arquitectura externa de los hígados de las ratas control, exhibían una superficie lisa, brillante y de color rojo oscuro. Sin embargo, la apariencia de aquellos hígados pertenecientes al grupo I y III, tratados con aceite de Oliva y aceite de emú respectivamente, presentaban una ligera tonalidad amarillenta.

Respecto a los hígados provenientes de las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4) o grupo II mostraban en general una coloración pálida-amarillenta y superficie moteada.

Finalmente, los hígados de ratas que fueron tratados con aceite de emú previo y posterior a la inducción del daño con CCl_4 , manifestaban una tonalidad rojiza menos acentuada con respecto al grupo control.

5.2 Observación microscópica de los tejidos hepáticos.

La evaluación de las muestras se realizó a través del estudio histológico con la tinción de Hematoxilina Eosina, observando los cambios morfológicos en las distintas horas de exposición a los compuestos.

5.2.1 Tejido hepático de ratas control.

Características del grupo:

- o Grupo constituido por dos ratas.

Observación:

Se observa en general una estructura común del tejido, sin evidencias de daño, con una conformación lobulillar normal: vena central y triada portal, constituida por vena porta, conducto biliar y arteria hepática, de fácil identificación, cordones de hepatocitos separados unos de otros por sinusoides de calibre normal, hepatocitos con núcleos regulares en tamaño y citoplasmas granulados, homogéneos y tenuemente basófilos.

(Ver foto 1)

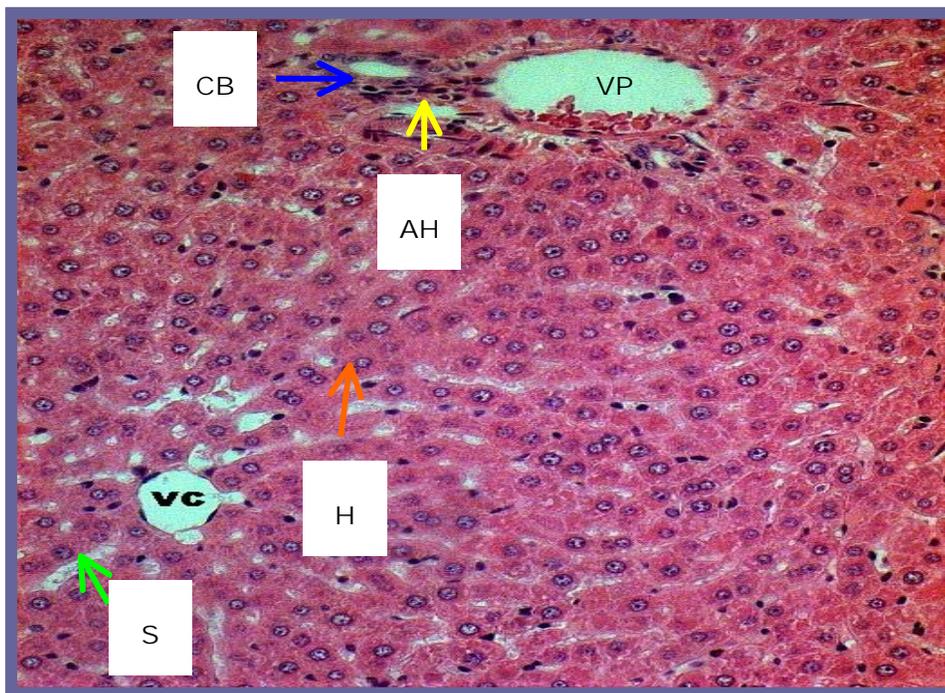


Foto 1. Microfotografía de tejido hepático normal de rata control, se destaca vena porta (VP), conducto biliar (CB), arteria hepática (AH), cordones de hepatocitos (H), sinusoides de calibre normal (S) y regularidad nuclear. H-E 20x

5.2.2 Tejido hepático de ratas de grupo I

Característica del grupo:

- o Ratas a las que se administró aceite de oliva.

Observación:

A las **6 horas**, se observa un tejido de arquitectura histológica igual que el del tejido control, con una leve esteatosis microvacuolar difusa (Ver foto 2-A), la cual desapareció rápidamente, haciéndose ausente a las **12 horas** donde se observa un tejido sin daño (Ver foto 2-B), permaneciendo de esta manera a las **24, 48 y 72 horas** de exposición al aceite de oliva.

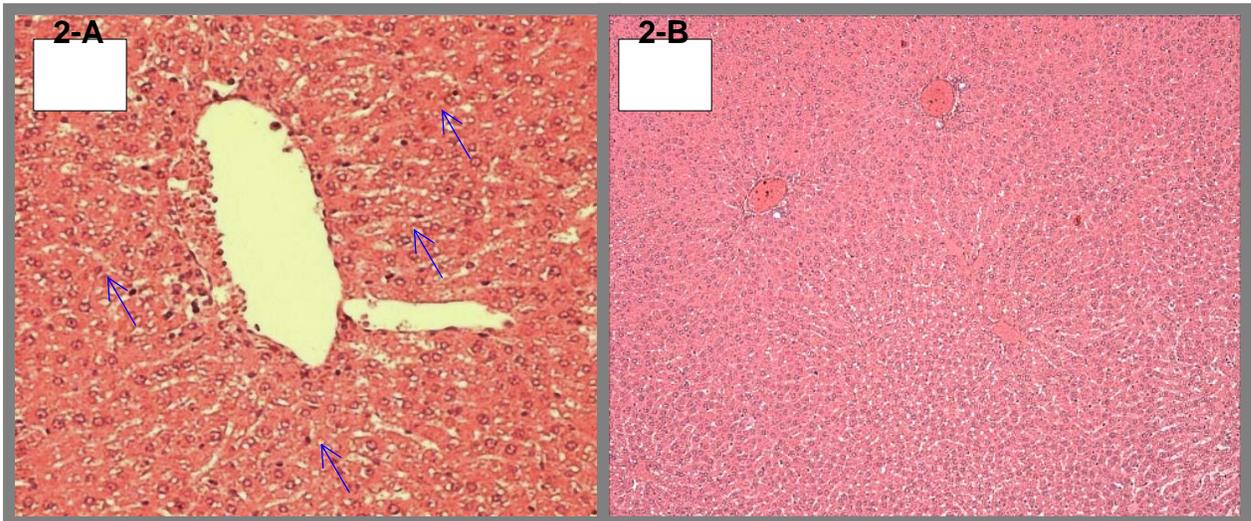


Foto 2-A. Se observa esteatosis microvacuolar difusa (↗), sin desplazamiento del núcleo a las 6 hrs, H-E 20x

Foto 2-B. Se observa un tejido y lobulillos hepáticos de conformación regular, sin daño y, de características similares al tejido control. H-E 10x

5.2.3 Tejido hepático de ratas de grupo II

Características del grupo:

- Ratas a las que se administró tetracloruro de carbono (CCl_4) al 20 % en aceite de oliva.

Observación:

Se observa durante las primeras **6 horas** un evidente grado de esteatosis citoplasmática, cuya intensidad es preferentemente centrolobulillar. Además, se manifiesta tumefacción de hepatocitos, infiltrado inflamatorio y dilatación sinusoidal (Ver foto 3).

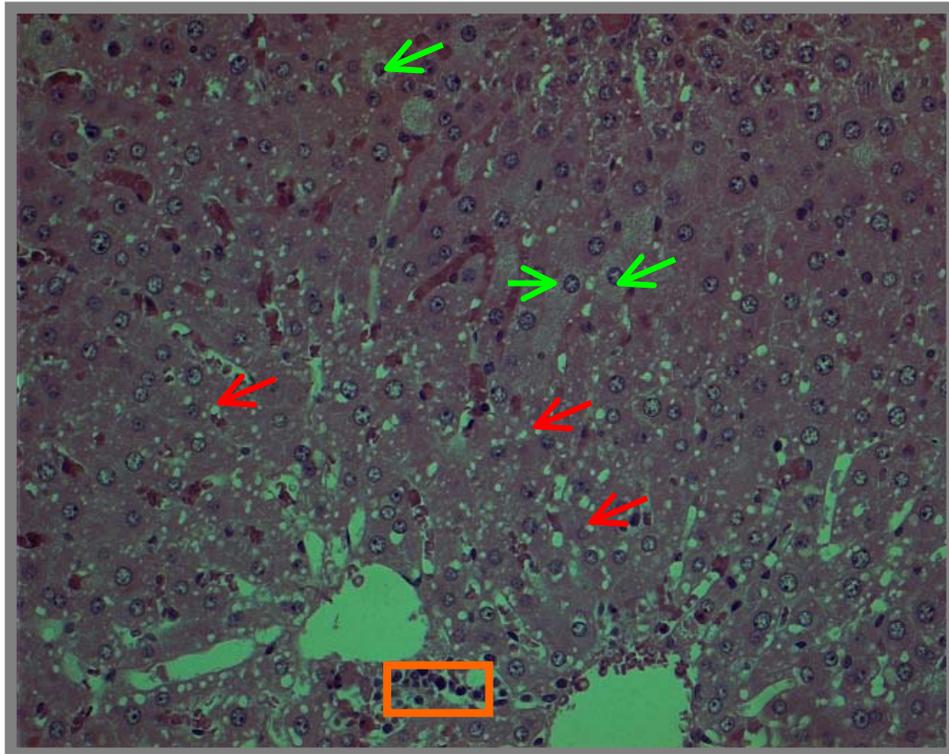


Foto 3. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo II a las 6 horas, se observa esteatosis microvacuolar mediozonal y centrolobulillar (↑), infiltrado inflamatorio (□) y tumefacción de hepatocitos mediozonales (↑). H-E 20x.

A las **12 horas**, aparece mayor grado de tumefacción de hepatocitos mediozonal e infiltrado inflamatorio, núcleos picnóticos y hepatocitos periportales y mediozonales con necrosis balonizante (Ver foto 4). Cada una de estas alteraciones se mantiene y aumenta su intensidad de manifestación hasta las **24 horas**, donde se suma la aparición de necrosis hialina centrolobulillar (Ver foto 5).

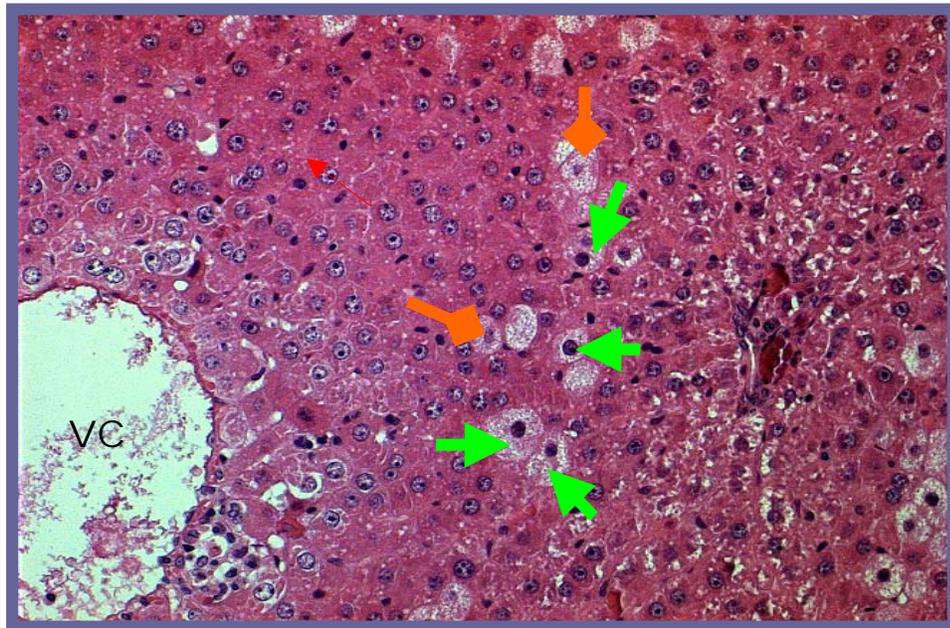


Foto 4. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo II a las 12 horas después de la administración de CCl_4 . Se destaca tumefacción de hepatocitos (↑) necrosis balonizante mediozonal (↑), infiltrado inflamatorio y esteatosis microvacuolar (↑). H-E 20x.

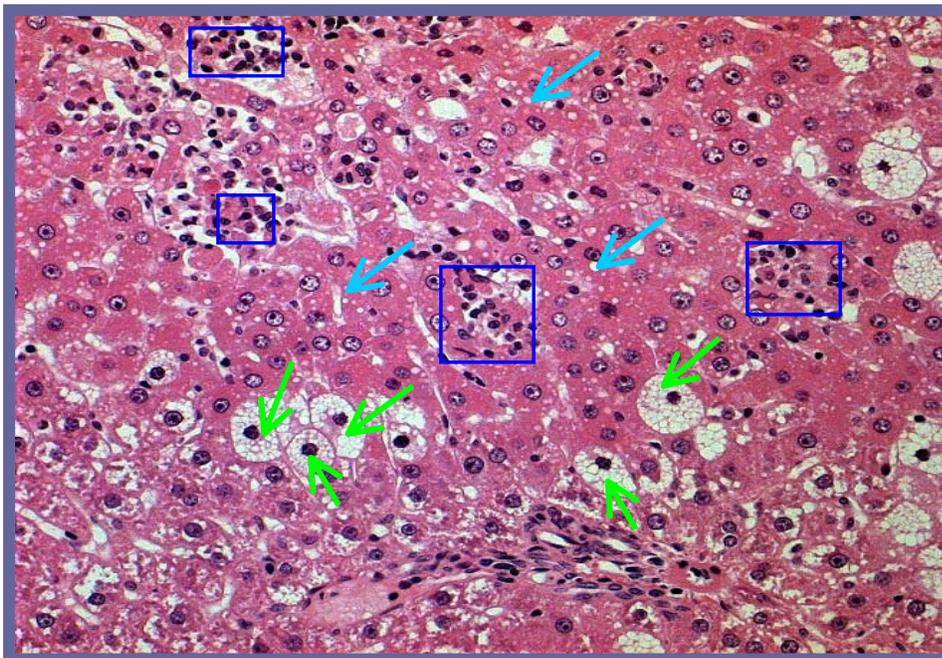


Foto 5. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo II a las 24 horas después de la administración de CCl_4 ; se destaca mayor grado de necrosis balonzante (↗) desde espacio porta hacia el centro del lobulillo, infiltrado inflamatorio (□), esteatosis (↗) y necrosis hialina (↗) a nivel centrolobulillar. H-E 20x.

A las **48 horas** es posible distinguir ausencia de necrosis balonzante y signos de regeneración en zona periportal; observándose basofilia citoplasmática, anisocariocitosis, nucléolos prominentes y alta actividad mitótica. Sin embargo, la necrosis hialina centrolobulillar aun permanece, siendo simultánea y posterior a la necrosis balonzante, acompañada de abundante infiltrado inflamatorio, disgregación del parénquima y cordones de hepatocitos difíciles de distinguir (ver foto 6).

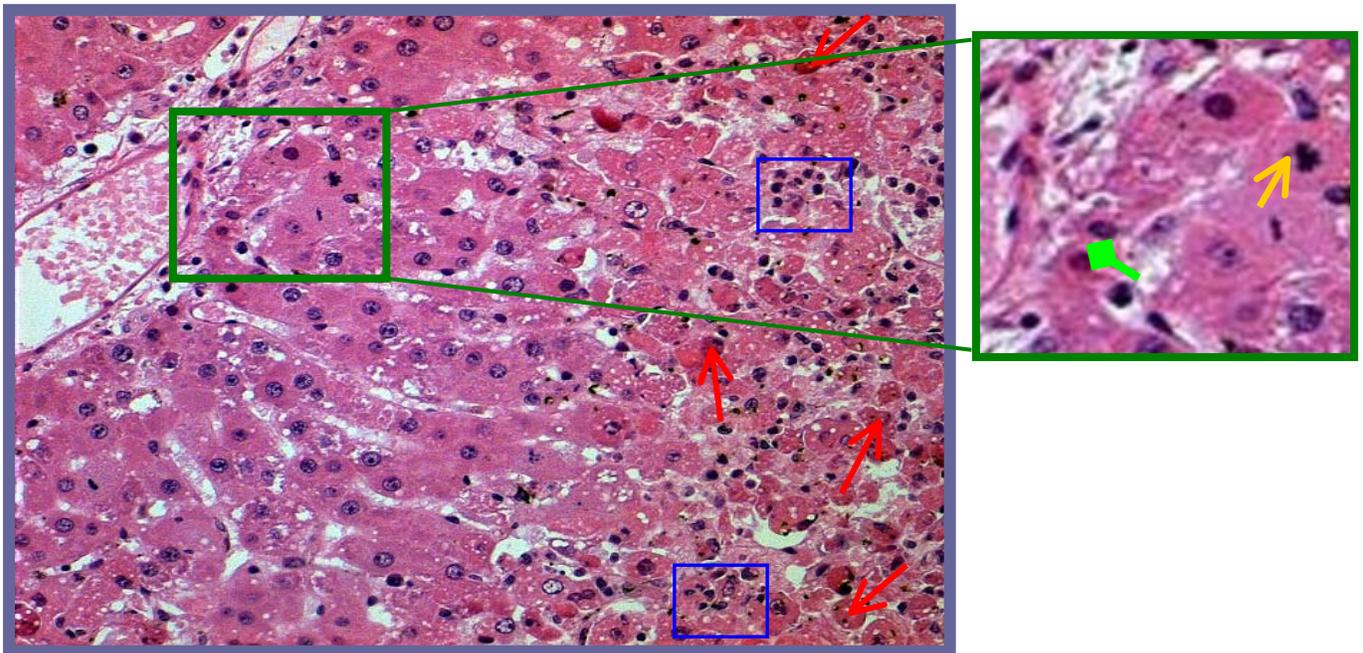


Foto 6. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo II a las 48 hrs. post-inyección de CCl_4 ; se observa necrosis hialina (↑) centrolobulillar e infiltrado inflamatorio (□) y, hacia espacio porta se destaca binucleación (↑) y numerosas mitosis (↑), signos que indican regeneración hepática. H-E 20x

Finalmente a las **72 horas**, se observa colapso en el centro del lobulillo, menor presencia de hepatocitos necróticos e infiltrado inflamatorio. Aún persisten signos de regeneración (principalmente mitosis y anisocariocitosis) en el espacio porta, los cuales se extienden hacia el centro del lobulillo. (Ver foto 7)

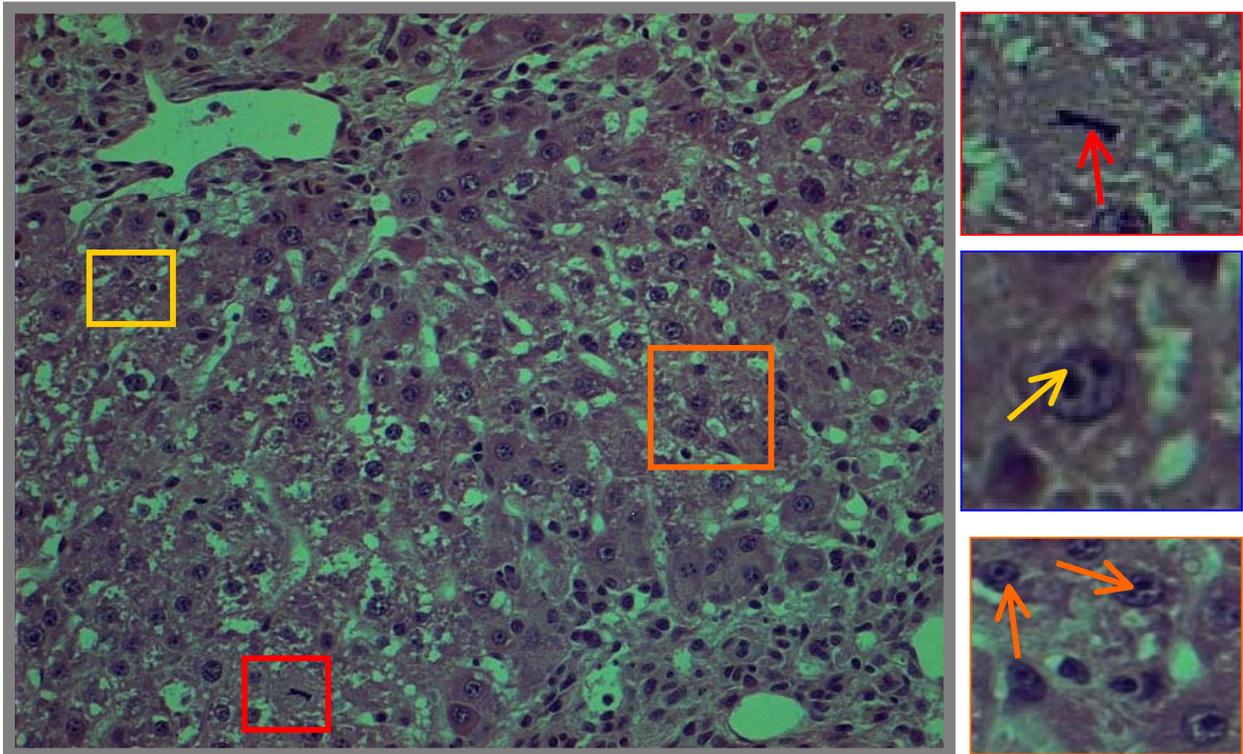


Foto 7. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo II a las 72 hrs. post-inyección de CCl_4 ; se observa despoblamiento de hepatocitos y colapso del centro del lobulillo, infiltrado inflamatorio, y evidentes signos de regeneración hacia espacio porta y al centro del lobulillo, se destaca mitosis (↕), binucleación (↕) y anisocariocitosis (↕). H-E 20x.

5.2.4 Tejido hepático de ratas de grupo III

Características del grupo:

- Ratas a las que se administro aceite de emú.

Observación:

A las **6 horas** de la administración es posible distinguir una leve esteatosis microvacuolar (Ver foto 8-A), que persiste hasta **12 horas** (Ver foto 8-B), y cuya manifestación es insignificantes o nula a las **24 hrs** (Ver foto 8-C), permaneciendo de esta manera a las **48 y 72 horas** de administrado el aceite.

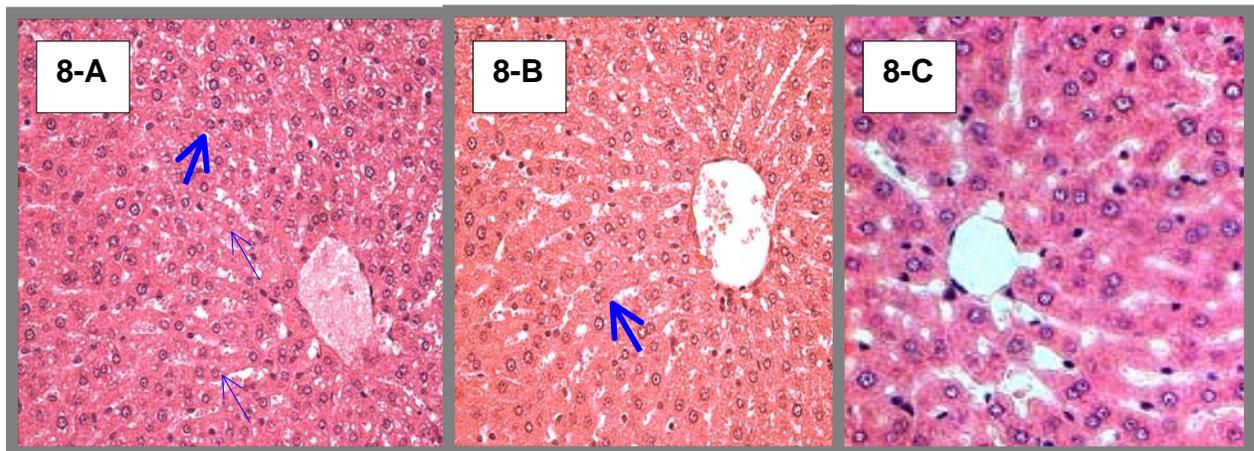


Foto 8-A. Microfotografía de tejido hepático a las 6 horas, se observa esteatosis microvacuolar mediozonal difusa (↑). H-E 20x

Foto 8-B. Microfotografía de tejido hepático a las 12 horas, se menor grado de esteatosis microvacuolar (↑). H-E 20x

Foto 8-C. Microfotografía de tejido hepático a las 24 horas, se observa un tejido hepático normal, ausente de algún grado de esteatosis. H-E 20x

5.2.5 Tejido hepático de ratas de grupo IV

Características del grupo:

- Ratas a las que se administró aceite de emú 24 y 1 hora previo al daño con CCl_4 al 20% en aceite de oliva.

Observación:

Es posible identificar a las **6 horas** de la administración, esteatosis microvacuolar, escaso infiltrado inflamatorio, balonamiento celular mediozonal y algunas células con necrosis hialina (Ver Foto 9).

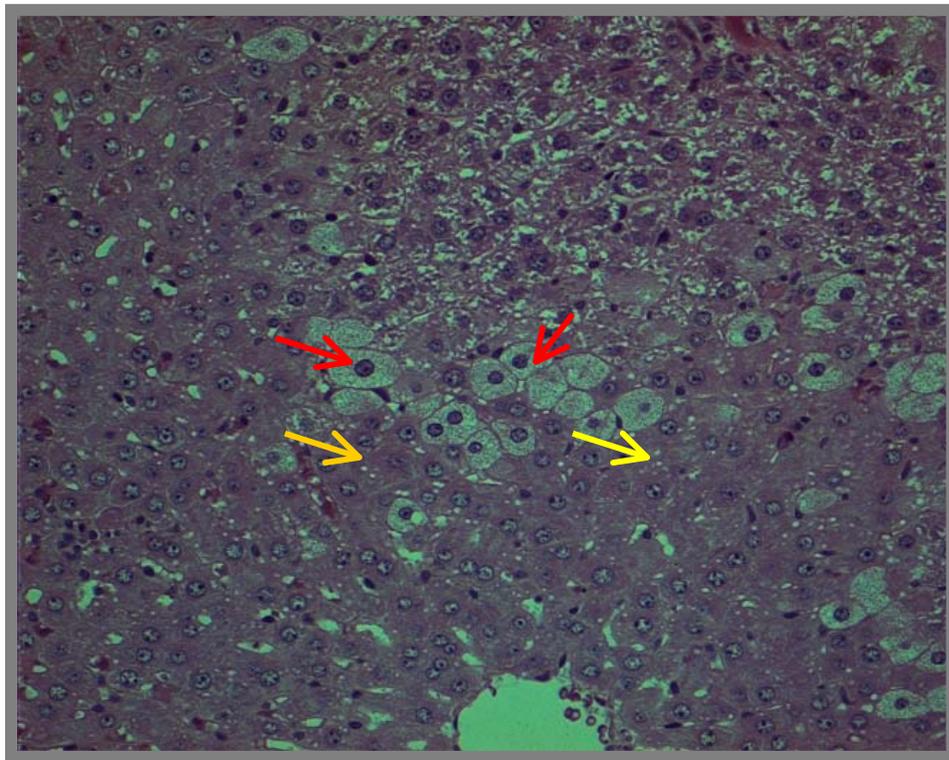


Foto 9. Microfotografía de tejido hepático de grupo IV a las 6 horas, se destaca esteatosis microvacuolar (↕), y balonamiento mediozonal (↗) . H-E 20x

Sin embargo, a las **12 horas**, se observa un notorio aumento de necrosis y degeneración hialina centrolobulillar y esteatosis microvacuolar. El grado de degeneración y necrosis balonzante mediozonal es menor que en el grupo II a tiempos iguales (Ver foto 10).

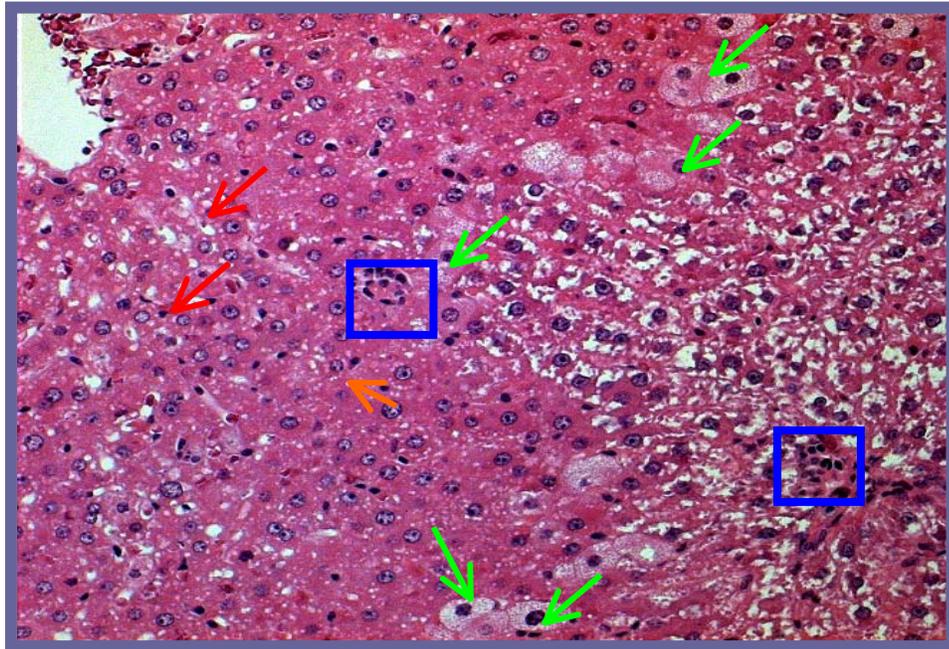


Foto 10. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo IV a las 12 horas, se destaca degeneración balonzante mediozonal (↑), necrosis hialina (↑) centrolobulillar esteatosis (↑) e infiltrado inflamatorio (□). H-E 20x

A las **24 horas**, predomina mayor cantidad de necrosis hialina, esteatosis microvacuolar moderada en hepatocitos conservados e infiltrado inflamatorio centrolobulillar, no obstante, el grado que se observa de necrosis balonizante es menor respecto al grupo II a la misma hora. (Ver foto 11).

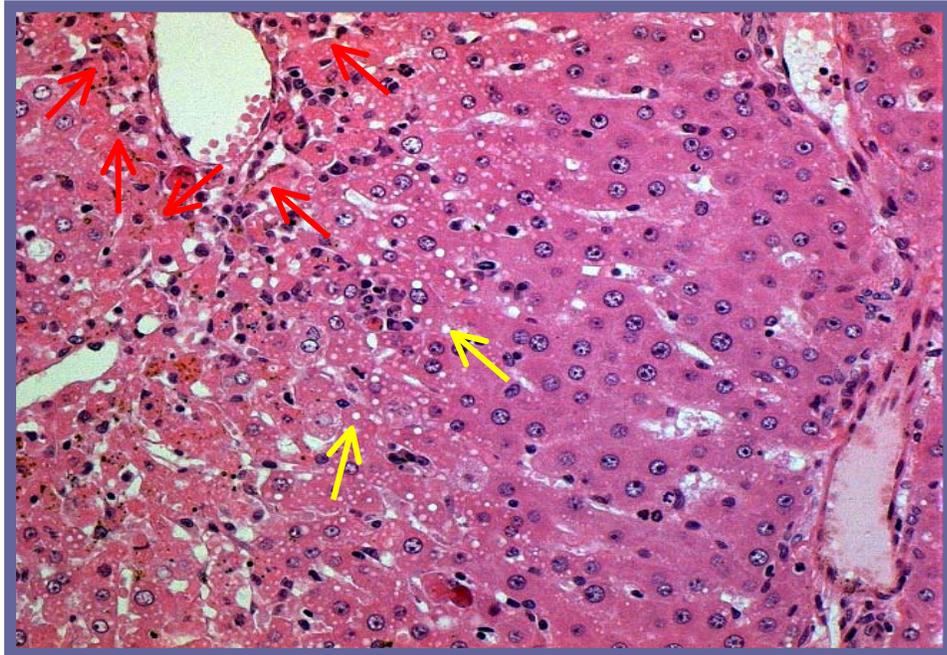


Foto 11. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo IV a las 24 horas, se destaca esteatosis (↑), necrosis hialina (↑) centrolobulillar y no se observa necrosis balonizante en comparación al grupo II a las 24 hrs. H-E 20x

A las **48 horas**, el tejido muestra evidentes y excelentes signos de regeneración en la zona periportal (mitosis, nucleolos prominentes y anisocariocitosis), no se observa la presencia de necrosis balonizante, pero el grado de necrosis hialina centrolobulillar persiste (Ver foto 12)

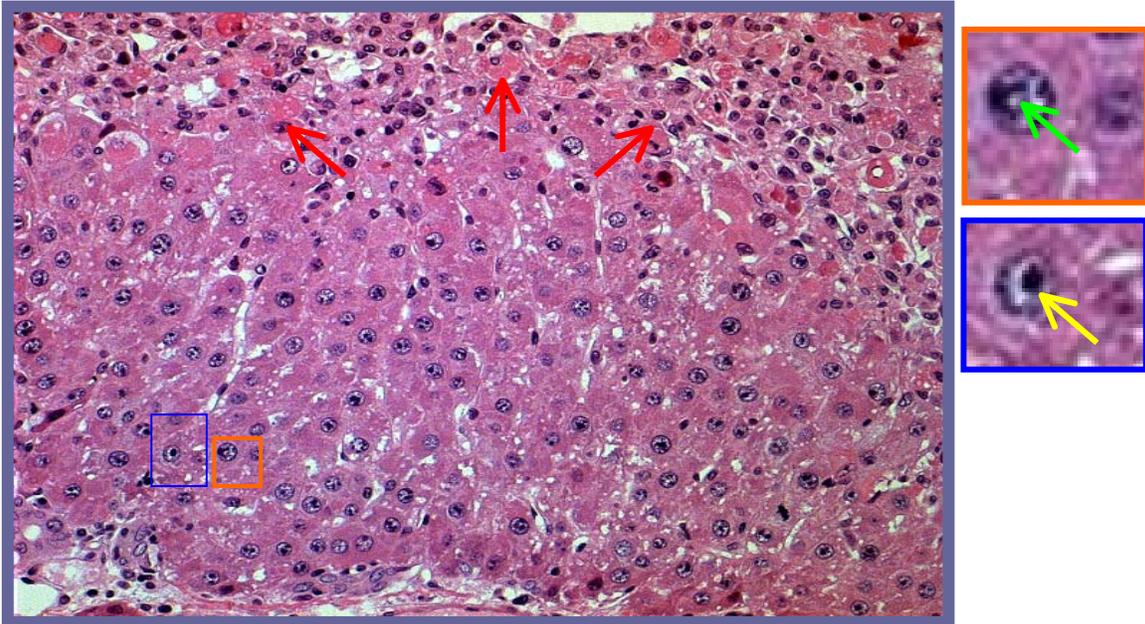


Foto 12. Microfotografía de tejido hepático de ratas de grupo a las IV 48 horas, se destaca necrosis hialina centrolobulillar (↑) y signos de regeneración, tales como, mitosis (↑), y nucléolos prominentes (↑). H-E 20x

A las **72 horas**, no se observan gran cantidad de células necróticas, hay presencia de macrófagos a nivel centrolobulillar, se ve un tejido muy vital, con signos de regeneración aumentados, pero no hay recuperación completa del hígado, debido a que aún hay colapso del lobulillo. (Ver foto 13)

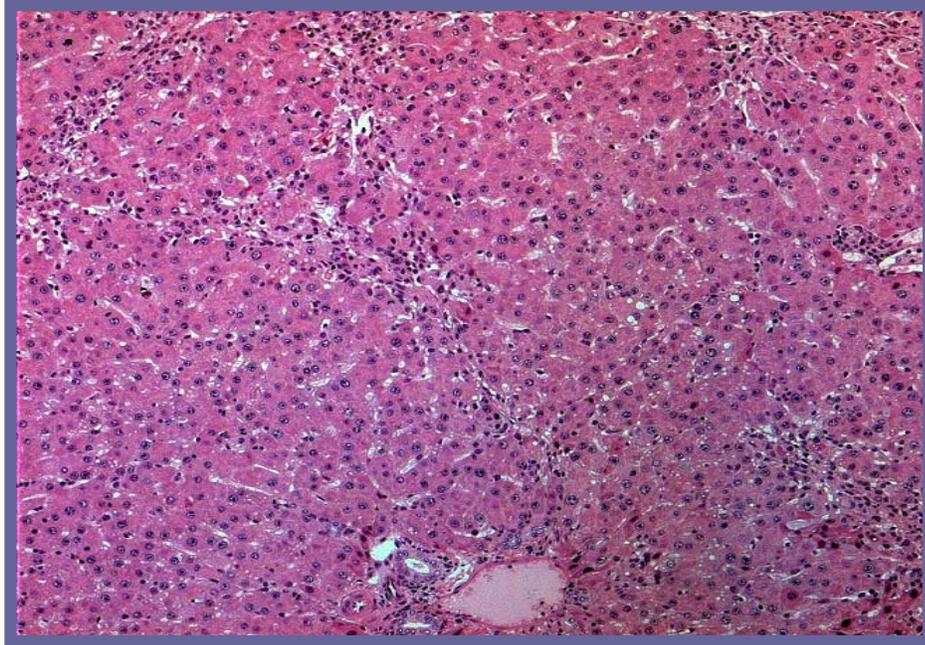


Foto 13. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo IV 72 horas, se observa disminución del daño y recuperación casi completa del hígado. H-E 10x

5.2.6 Tejido hepático de ratas de grupo V.

Características del grupo:

- Ratas a las que se administró aceite de Emú 1, 24, 36,48 horas posterior al daño con CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

Observación:

Se observa a las **6 horas** de la administración una abundante esteatosis microvacuolar y balonamiento de hepatocitos en la región mediozonal (Ver foto 14).

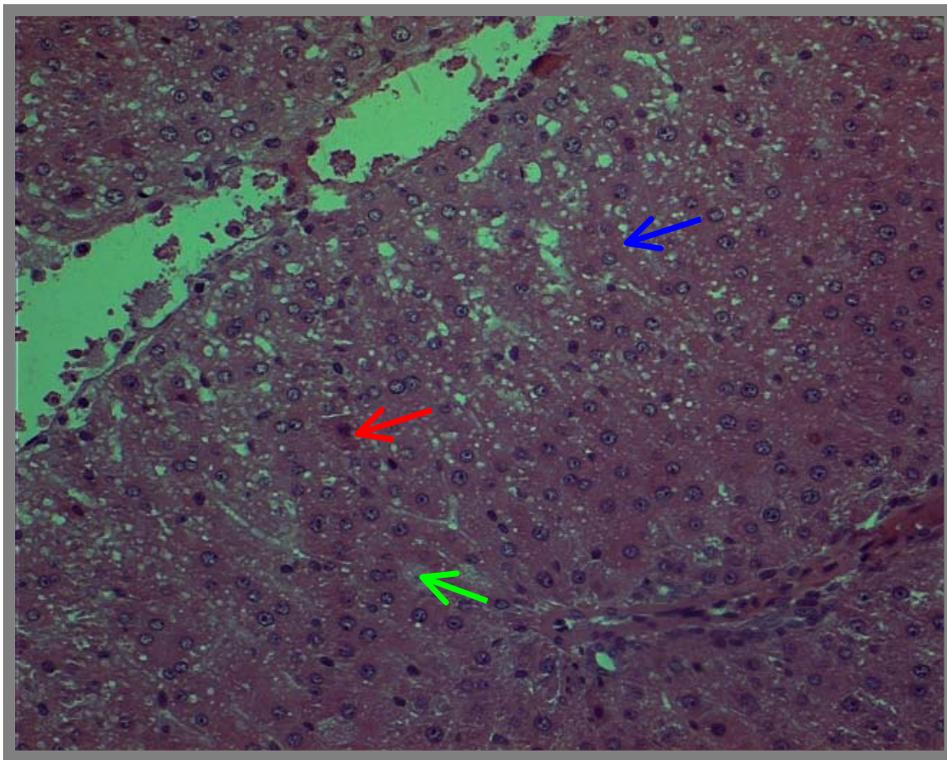


Foto 14. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo V a las 6 horas, se observa balonamiento mediozonal (↑), esteatosis microvacuolar (↑) y algunas células con necrosis hialina (↑). H-E 20x.

La degeneración balonizante se mantiene a las **12 horas** y se añade necrosis balonizante desde espacio porta hacia región mediozonal. También es posible distinguir una ligera necrosis hialina centrolobulillar, acompañada de infiltrado inflamatorio, (Ver foto15) manifestación que aumenta a las **24 horas** donde, además, se observa una disminución de la necrosis del tipo balonizante y se evidencian signos de regeneración en regiones mediozonal y periportal (Ver foto 16).

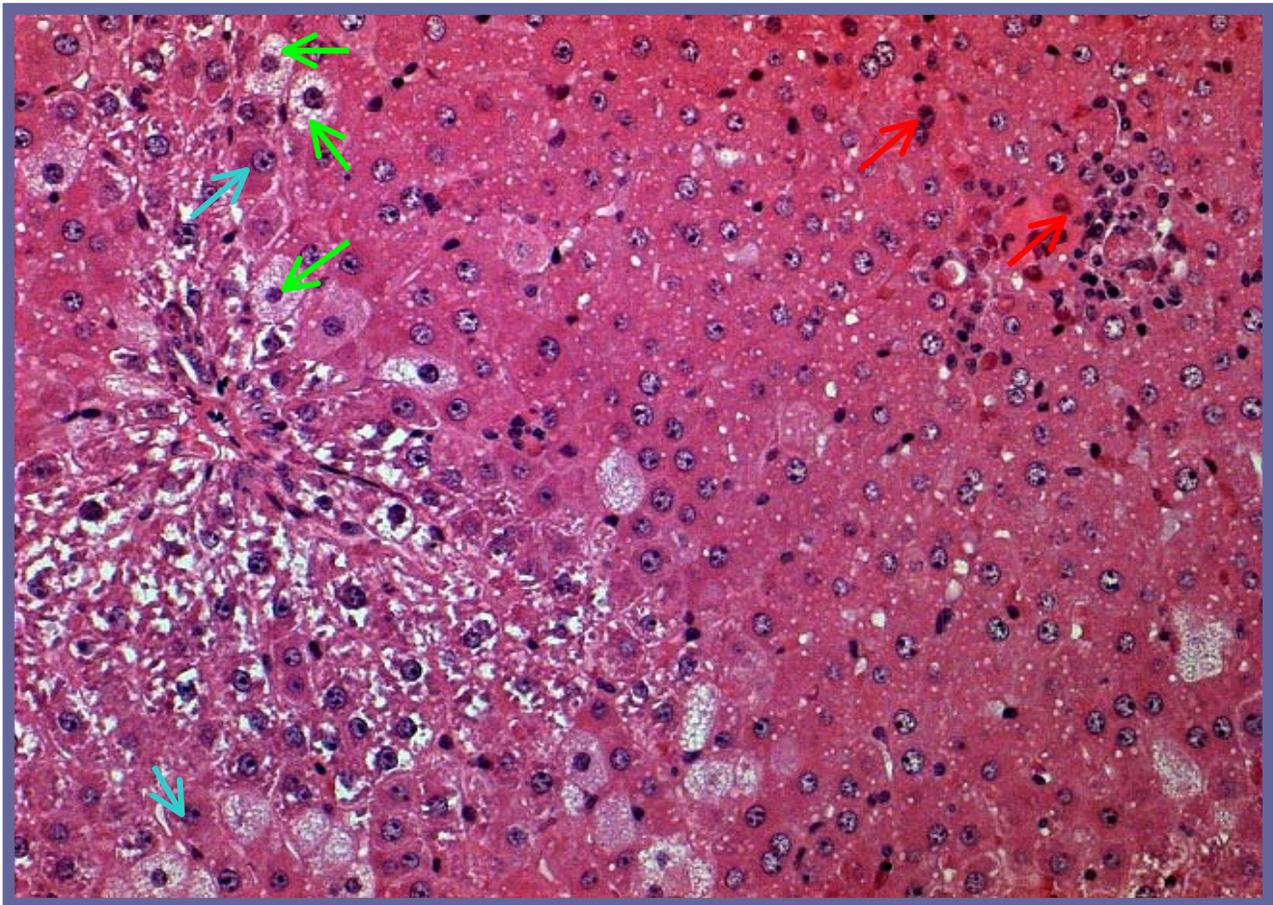


Foto 15. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo V 12 horas, se observa degeneración balonizante (↑), necrosis balonizante (↑) y necrosis hialina centrolobulillar (↑).

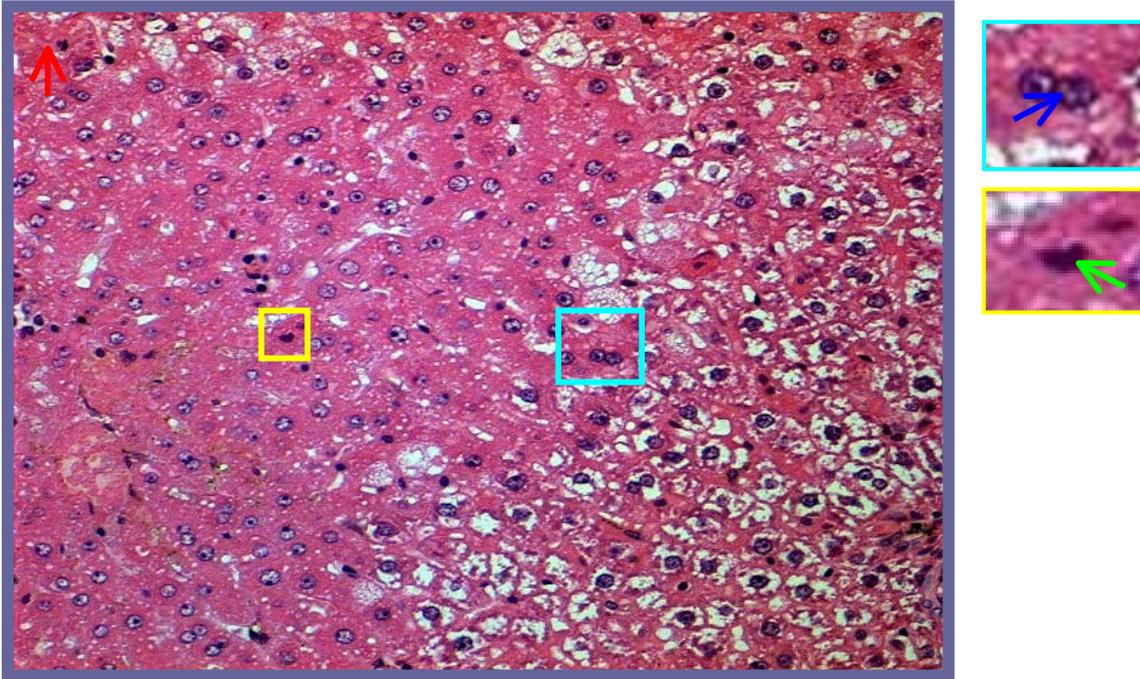


Foto 16. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo a las V 24 horas, se observa necrosis hialina (↑) centrolobulillar y signos de regeneración, tales como, mitosis (↑) y binucleación (↑) desde de espacio porta hacia región mediozonal. H-E 20x

A las **48 horas** se observa un alto grado de necrosis hialina e infiltrado inflamatorio, principalmente a nivel centrolobulillar. Los signos de regeneración persisten y aumentan su manifestación desde espacio porta hacia mediozonal. (Ver foto 17).

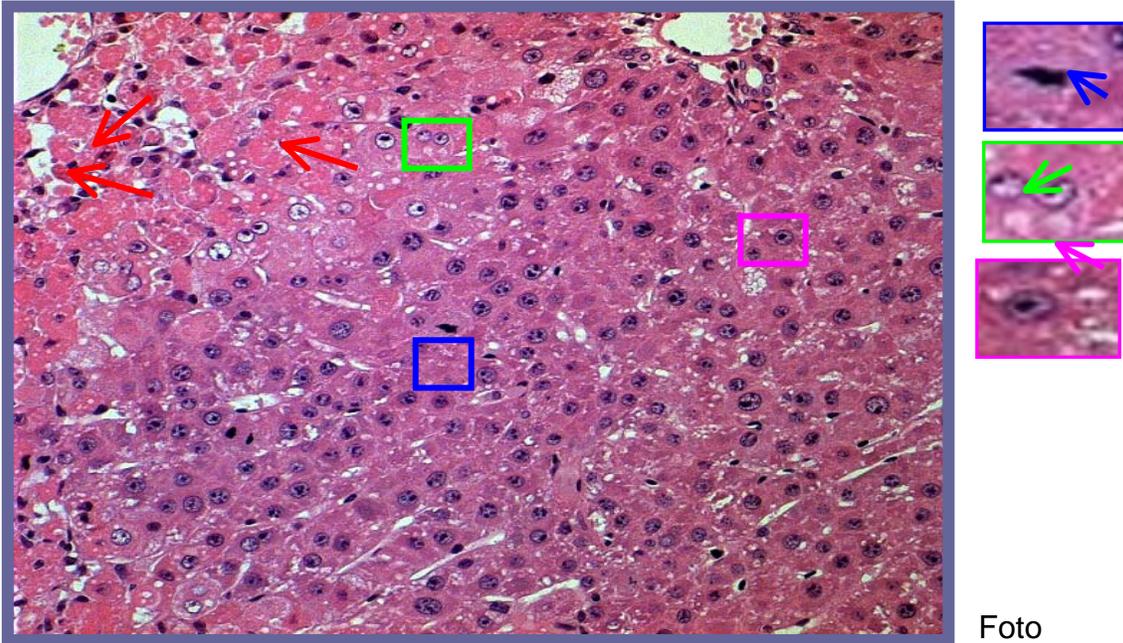


Foto 17.

Microfotografía de tejido hepático de ratas de grupo V a las 48 horas, se destaca necrosis hialina (↗) centrolobulillar, mitosis (↕), binucleación (↗), y nucléolos prominentes (↗). H-E 20x

5.2.6 Tejido hepático de ratas de grupo V

Características del grupo:

- Ratas a las que se administró aceite de Emú 1, 24, 36,48 horas posterior al daño con CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

Observación:

Se observa a las **6 horas** de la administración una abundante esteatosis microvacuolar y balonamiento de hepatocitos en la región mediozonal (Ver foto 14).

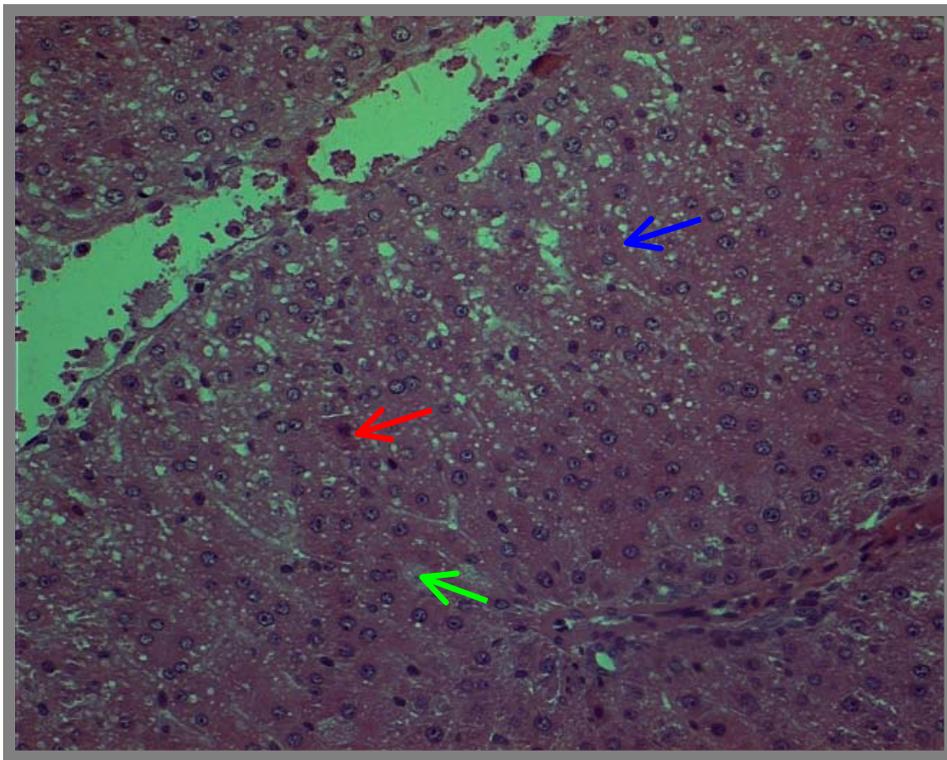


Foto 14. Microfotografía de tejido hepático de rata de grupo V a las 6 horas, se observa balonamiento mediozonal (↑), esteatosis microvacuolar (↑) y algunas células con necrosis hialina (↑). H-E 20x.

6. DISCUSIÓN.

6.1 Macroscopía de los hígados.

La ligera tonalidad amarillenta, que exhibían las ratas tratadas con aceite de oliva, como aquellas que se les administró aceite de emú, fue provocada por la esteatosis que estaría relacionada estrechamente con la ingesta enteral de lípidos a la que fueron sujetos ambos grupos. (Nielsen, A., 1990).

La superficie pálida y amarillenta que presentaban los hígados de las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), es consecuencia de la acumulación de lípidos al interior de los hepatocitos, producto de la peroxidación lipídica de la membrana celular provocado por metabolitos del CCl_4 . (Lowrey *et.al.*, 1981)

Finalmente, aquellos hígados de ratas que se les administró aceite de emú previo y posterior a la inducción del daño con CCl_4 presentaban en general, la misma apariencia externa que el grupo tratado sólo con CCl_4 , pero en un grado menos acentuado, esto debido al probable efecto protector y/o regenerador de células hepáticas que se postula para el aceite de emú

6.2 Microscopía de los tejidos hepáticos (H-E).

6.2.1 Tejidos hepáticos tratados con aceite de oliva y aceite de emú.

Basado en los resultados y de acuerdo a las observaciones, se determina que tanto el tejido hepático tratado con dosis única de 0,5 mL / 200 grs. de peso de aceite de oliva, como con dosis única de 1 mL / 200 grs. de peso de aceite de emú, en ambos se manifiesta la presencia de esteatosis microvacuolar difusa en el citoplasma de los hepatocitos, la cual es evidencia de un daño celular agudo y en el que las células presentan al microscopio óptico numerosas vacuolas pequeñas intracitoplasmáticas, sin desplazamiento del núcleo.

La esteatosis se considera en términos generales, una situación patológica, a excepción cuando se da en forma transitoria en el epitelio hepático y enteral después de una alimentación rica en grasas. La existencia de vacuolas de grasa en la célula, puede inferirse como un desequilibrio entre la oferta y la utilización de los lípidos. Este signo se evidenció claramente a las 6 horas de su administración, atenuando su intensidad a las 12 horas y desapareciendo a las 24 horas, donde se observa un tejido de apariencia normal y sin daño.

6.2.2 Tejidos hepáticos tratados con CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

En el grupo II, se usó una dosis única de 0,5 mL / 200 grs. de peso de una solución de tetracloruro de carbono (CCl₄) al 20 % en aceite de oliva, dosis efectiva para producir la hepatotoxicidad esperada. Los cambios morfológicos más importante resultantes como producto del daño provocado por la acción de esta noxa en el tejido hepático, fueron necrosis del tipo balonzante mediozonal y hialina a nivel centrolobulillar, la que se manifestó en forma paralela y posterior a la balonzante.

La necrosis balonzante es de aparición temprana y se caracteriza por la manifestación de un núcleo picnótico, tumefacción de hepatocitos, con gran número de vacuolas lípidicas intracitoplasmáticas. La presencia de esta alteración se relaciona con la metabolización hepática del CCl₄ al radical libre triclorometil (CCl₃•) (Taira *et.al*,1980), el cual provoca la peroxidación de los lípidos de las membranas del retículo endoplásmico liso (REL), rica en ácidos grasos poliinsaturados, produciendo desintegración de las membranas de las diferentes estructuras, lo que desencadena la ruptura y posterior muerte celular (Masuda y Nakamaya, 1982) y liberación del material citoplasmático al lumen sinusoidal, que junto al aumento de volumen de la célula hepática, disminuyen el flujo de la circulación sanguínea, impidiendo el transito de oxígeno y nutrientes hacia el centro del lobulillo, lo que desencadenaría el desarrollo y aparición de necrosis hialina (Ortiz, 1988) . Además, se le agregaría a esta lesión, la acción provocada por el mecanismo del metabolito CCl₃•, en el REL de los hepatocitos centrolobulillares.

Por lo tanto, en este grupo se puede observar a las 24 horas en forma simultánea, la manifestación de necrosis balonizante y hialina centrololubulillar. Situación dada, porque los hepatocitos de la zona centrololubulillar estarían expuestos a concentraciones menores de oxígeno y nutrientes y concentraciones mayores de metabolito reactivo, puesto que esta zona tiene una provisión mucho más abundante de REL y el doble de enzimas microsomales que los hepatocitos del área periportal. (Gooding *et.al*,1967).

Los signos de regeneración comienzan a ser evidentes a las 48 horas, iniciándose en la zona periportal, dado que esta zona del lobulillo hepático posee una mejor irrigación sanguínea, de manera tal que los hepatocitos recibirían mayor cantidad de oxígeno y nutrientes (Wittwer, 1997). La regeneración se extiende en forma paulatina hacia el centrololubulillo. De esta forma, a las 72 horas, se observa un parénquima hepático recuperado casi en su totalidad completa.

6.2.3 Tejidos hepáticos tratados con aceite de emú *previo* al daño con CCl₄.

En el grupo tratado con dosis de 1 mL / 200 grs. de peso aceite de emú, 24 y 1 hora **previo** a la inducción del daño con tetracloruro de carbono (CCl₄) al 20% en aceite de oliva, presentó en general un adelanto en la aparición e intensidad de necrosis del tipo hialina en relación al grupo II (tejidos tratados solo con CCl₄). Asimismo, el grado de degeneración balonizante se mantiene en comparación al grupo II, pero existe una disminución clara y evidente de necrosis de hepatocitos del tipo balonizante mediozonal y centrolobulillar. Por otro lado, la identificación de los signos de regeneración, que incluyen anisocariocitosis, basofilia citoplasmática, mitosis, nucléolos prominentes, es evidente, pero no presenta la misma intensidad que en el grupo tratado sólo con CCl₄, esto se debe principalmente a que se produjo un menor grado de injuria o muerte celular en el tejido hepático de este grupo.

6.2.4 Tejidos hepáticos tratados con aceite de emú *posterior* al daño con CCl₄.

En el grupo que fue tratado con dosis de 1 mL / 200 grs. de peso aceite de emú, 1, 24, 36 y 48 horas **posterior** a la inducción del daño con CCl₄, se pudo visualizar a las distintas horas, un transcurso de la manifestación del daño similar al observado en el grupo II. Sin embargo, el hecho más importante de destacar, es el inicio temprano de la recuperación de la histología hepática normal, manifestado por la aparición de signos de regeneración en zona periportal y mediozonal, haciéndose ya evidentes a las 24 horas, en comparación con el grupo II los cuales se manifestaron a las 48 horas.

Estos signos se acentuaron a las 48 horas de administrado el aceite de emú, para finalmente observar a las 72 horas un tejido vital, casi recuperado en su totalidad. La leve, temprana y progresiva recuperación del tejido hepático esta dada por la reducción de la necrosis del tipo balonizante después de las 24 horas y es indicativo de un aceleramiento del proceso de regeneración del tejido hepático respecto del grupo no tratado con aceite de emú.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados y al igual que un estudio previo (Oviedo, 2008), se confirma que el aceite de emú, independiente de cuando se administra (previo, conjuntamente o posterior al CCl₄) produce una disminución en la aparición de necrosis balonizante centrolobulillar y mediozonal, al comparar con el tejido que recibe sólo CCl₄ al 20% en aceite de oliva.

7. CONCLUSIONES.

- I. Dosis única de 0.5 ml de CCl₄ por 200 grs de peso vía sonda buco gástrica, provocan necrosis de células hepáticas del tipo balonzante y hialina.
- II. La necrosis desarrollada fue preferentemente centrolobulillar y mediozonal, de característica hialina y balonzante respectivamente.
- III. La regeneración hepática se inició en la región del hígado menos perjudicada por la acción del tóxico (CCl₄), correspondiente a la zona periportal, extendiéndose en forma progresiva hacia el centro del lobulillo.
- IV. De acuerdo al estudio histológico, el aceite de emú en su administración **previa** a la del hepatotóxico, produjo una disminución del daño, destacando el menor grado de desarrollo de necrosis balonzante en el tejido.
- V. Cuando el aceite de emú se administró **posterior** al daño provocado por el hepatotóxico, se observó un aceleramiento en el tiempo de aparición de los signos de regeneración en los tejidos hepáticos sometidos a la acción de la noxa.

8. REFERENCIAS.

Adzet T, Camarasa J, Laguna JC. (1987) Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. J Nat Prod; 50(4): 612-7.

Benda, L. und W. Zenz. (1974) Ambulate Langzeitbehandlung der Leberzirrhose mit Silymarin. J. Therapiewoche. 24 (35): 3598-3614.

Campo GM, Squadrito F, Ceccarelli S, Calo M, Arenoso A, Campo S, Squadrito G, Altavilla D (2001) , Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. Free Radic. Res; 34, pag. 379-393

Code W. (1997) Emu cream Assists lidocaine: local anesthetic absorption through human skin. Presented at the 88th American Oil Society Annual meeting.

Coon MJ, Ding X, Penecky ST, Vaz ADN (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. FASEB J; 6, pag 669-673.

Craig Schimdt M., Brown A., Smith P (1994). Fatty Acid of Emu oil. American Emu Association.

Emu Oil: Comodogenicity Testing (Study done for E.R.I). Department of dermatology. University of Texas Medical School, Houston (1993)

Fein E., Caputo J., Nagal A.K., Nagal K-L (1997). THERAPEUTICS USES OF EMU OIL. Patent Number 5, 662, 921. Sep.2

Flores J. Farmacología Humana (1997). 4ta edición. Ed. Masson. Pág. 50

Gartner L.P., Hiatt J.L. (2002). Texto atlas de histología. 2da Edición. Mc. Graw Hill Interamericana. Pág. 406-408

Ghosh P., Whiteouse M (1993). Experimental study to determine the anti-arthritic of new emu oil (EMMP). Royal North Shore Hospital of Sidney, Australia & University of Adelaide, Australia.

Gooding, K., Kraus, D., Liends, K. (1967) Destruction of liver microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride and bromotrichloromethan. Biochem. Pharmacol. Vol 12.

Ham Artur W., Cormarck D. H. (1988) Histologia de Ham. Novena Edición. Editorial Oxford. Pág 645-647

Hodgson Ernest, Levi Patricia (1996). A Textbook of Modern Toxicology. 2da edicion. Ed. Appleton & Lange. Pag. 199-204

J. J. F. P. Luiken, A. Bonen and J. F. C. Glatz (2002). Cellular fatty acid uptake is acutely regulated by membrane-associated fatty acid-binding proteins. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, Volume 67, Issues 2-3, pages 73-78

Kiso, Y. Tohkin, M. (1983). Assay method for antihepatoxid activity using CCl₄ induced hepatotoxicity in primary cultured hepatocytes. Planta med. Vol 49. Pág. 222-225.

Klaasen Curtis D., Watkins John B. (2001). Manual de Toxicología. 5ta edición. Ed. Graw- Hill. Pág. 736-737.

Lowrey, K. (1981) Destruction of liver microsomal calcium pump activity by Carbon Tetrachloride and Bromotricloromethane. Biochem. Pharmacol. Vol. 30. Pág. 135-140.

Monasterio, A. (1999). Evaluación del infuso *Haplopappus bailahuen* en región hepática mediante cuantificación de regiones del organizador nucleolar. Seminario de titulación. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

Nielsen, A. (1990). Efecto de la Silimarina, del extracto de *Schizandra chinensis* y del infuso de *Haplopappus baylahuèn* sobre cambios bioquímicos e histológicos inducidos por CCl₄ en ratas. Tesis de titulación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

Niesink, R.J.M., de Vries J. y Hollinger, M.A (1996). Principles and applications. CRC Press. Pag 708-710.

Núñez-Alarcon, J., M. Quinoñez and M.T Carmona. Flavonoid Aglycones in the leaf resin of *Haploppapus bailahuen*, (Compositae). XI Mona Symposium, Natural Products and Medical Chemistry, Mona, Jamaica. 42-43. 1986

Martin, R., Wittwer, F. Y J. Nuñez. (1986). Efecto de la infusión de *Haploppapus baylahuen* en hígado alterado por tetracloruro de carbono en perro. VI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Santiago, Chile, SP-154

Ortiz E., (1988). Evaluación en el tiempo de las lesiones hepática en intoxicación por tetracloruro de carbono. Tesis de Licenciatura, Facultad de Filosofía y Humanidades, Universidad Austral de Chile.

Oviedo E., (2008). Estudio del efecto del aceite de Emú (*Dromiceius Oil*) sobre el daño celular agudo inducido por tetracloruro de carbono en células hepáticas de ratas. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Payer, J.L. Lai, E. Davis, E.(1980) Confirmation of assignment of the Trichlomethyl radical spin adduct detected by spin trapping during C-13. Carbon Tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. Biochem. Biophys Res. Commun. Vol. 94. Pág. 1154

Qiu XW, Wang JH, Fang, XW, Gong ZY, Li ZQ, Yi ZH (2005). Anti- Inflammatory activity and healing-promoting effects of topical application of Emu oil on wound in scalded rats: journal of southern medical university, Volume 25, Sigue 4, pages 407-410.

Robbins S.L, Kumar V. (2005). Patología estructural y funcional. 7ma Edición. Editorial Elsevier España S.A. Pág. 882-908.

Rutherford, J. (1988). Efecto de flavonoides, infuso *Haplopappus bailahuèn* y Silimarina, sobre la hepatotoxicidad inducida por dosis única de CCl4 en ratas. Tesis Universidad Austral de Chile.

Taira, Y. Redick, J. Baron, (1980). An inmunohistochemical study on the localization and distribution of NADPH – Cytochrome C (P – 450) reductase in rat liver. Molec. Pharmacol. Vol. 17. Pág. 374-381.

Tova Meshulam, Jeffrey R. Simard, Jonathan Wharton, James A. Hamilton, and Paul F. Pilch (2006). Role of Caveolin-1 and Cholesterol in Transmembrane Fatty Acid Movement: Biochemistry, Volume 45 Issue 9, pages 2882 -2893.

Ventura C. (2006) El aceite de Emú en el tratamiento de la psoriasis y el eccema xerótico. Estudio observacional abierto

Wittwer, P. (1997). Estudio de la regeneración hepática secundaria a daño por tetracloruro de carbono mediante cuantificación de las regiones del organizador nucleolar. Seminario de titulación. Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.

Whitehouse M., Turner A. Emu oil: A source of non- toxic transdermal anti-inflammatory agents in aboriginal Medicine.

Wolf C. R., Mansura D., Nastainczyk W., Deutschmann G., Ullrich V. (1977). The reduction of polyhalogenated methanes by liver microsomal Cytochrome P-450. *Molec. Pharmacol* 13: 698.

Zemtsov A., Gaddis M., Montalvo-Lugo V. (1997). Moisturizing and Cosmetic Properties of emu oil: A Double Blind Study. *The Australian Journal of Dermatology* 37 (3): 159-161

9. ANEXOS.

Técnica Utilizada

Hematoxilina – Eosina. (H-E)

Principio:

La tinción se basa en una coloración combinada: coloración sucesiva. Con un colorante nuclear básico, la hematoxilina y un colorante ácido eosina.

Completado el procedimiento de tinción de tejidos, los núcleos de los hepatocitos y regiones ácidas del citoplasma se verán de color azul o morado oscuro (por acción de la hematoxilina) y las regiones básicas del citoplasma se observaran de color rosa. (por acción de la eosina).

Técnica:

- ❖ Desparafinar los cortes mediante pasos sucesivos en xilol y en alcohol de concentraciones decrecientes, llevar al agua.
- ❖ Colorear con Hematoxilina durante 3 minutos.
- ❖ Lavar con agua corriente.
- ❖ Colorear con Eosina durante 3 minutos.
- ❖ Lavar en agua destilada rápidamente.
- ❖ Deshidratar en alcohol de concentraciones crecientes.
- ❖ Pasar por alcohol absoluto y xilol para la aclaración, montar en bálsamo de Canadá.