

Efecto hepatoprotector de hojas de *Morus nigra* L. sobre daño hepático en ratas inducido por acetaminofeno

Hepatoprotective effect of *Morus nigra* L. leaves on acetaminophen induced liver damage in rats

Elvis Gilmar Gonzales Condori^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-6804-5895>

Fiorela Anyeli Arce Raymi¹ <https://orcid.org/0000-0003-4640-3836>

María Noelia Magaña Charca¹ <https://orcid.org/0000-0001-6640-2326>

Stamber Alvaro Ramírez Revilla² <https://orcid.org/0000-0003-3133-3353>

Azael Paz-Aliaga³ <https://orcid.org/0000-0002-6606-8054>

¹Universidad Privada Autónoma del Sur (UPADS). Arequipa, Perú.

²Universidad Tecnológica del Perú (UTP). Arequipa, Perú.

³Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Centro de Investigación y Desarrollo Científico. Arequipa, Perú.

*Autor para la correspondencia: elvgonzalesc@gmail.com

RESUMEN

Introducción: El acetaminofeno es uno de los fármacos analgésicos y antipiréticos más utilizados. Se caracteriza por los efectos hepatotóxicos que produce luego de una administración prolongada por la formación excesiva de N-acetil-p-benzoquinoneimina intermedia, producto del metabolismo en fase I. Las hojas de *Morus nigra* L. presentan actividad terapéutica debido a su composición química y capacidad antioxidante.

Objetivo: Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de *Morus nigra* L. en ratas con daño hepático inducido por acetaminofeno.

Métodos: Veinte ratas (*Rattus norvegicus albinus*) se dividieron en cuatro grupos: control, acetaminofeno (250 mg/kg) como grupo control de hepatotoxicidad, acetaminofeno + silimarina (100 mg/kg) y acetaminofeno + *Morus nigra* L. (250 mg/kg). Las enzimas de función hepática ALT y AST fueron medidas los días 1, 6, 12 y 21. Además, se realizó un estudio histopatológico en secciones de hígado.

Resultados: El acetaminofeno aumentó los niveles de ALT y AST, lo cuales se mantuvieron elevados luego de la administración de agua destilada como placebo hasta el día 21. La silimarina y el extracto de hojas *Morus nigra* L. disminuyeron los niveles de ALT y AST hasta niveles similares del control (basal).

Conclusiones: Los resultados del presente estudio demostraron que la administración de *Morus nigra* L. mejora la lesión hepática producida por el acetaminofeno con efecto significativamente similar al de la silimarina.

Palabras clave: alanina aminotransferasa; aspartato aminotransferasa; hepatoprotector; histopatología.

ABSTRACT

Introduction: Acetaminophen, one of the most commonly used analgesic and antipyretic drugs, is characterized by its hepatotoxic effects after prolonged administration, due to the excessive formation of intermediate N-acetyl-p-benzoquinone imine, a product of phase I metabolism. Because of their chemical composition and antioxidant activity, *Morus nigra* L. leaves display therapeutic activity.

Objective: Evaluate the hepatoprotective effect of *Morus nigra* L. hydroalcoholic extract on acetaminophen-induced liver damage in rats.

Methods: Twenty rats (*Rattus norvegicus albinus*) were distributed into four groups: control, acetaminophen (250 mg/kg) as hepatotoxicity control group, acetaminophen + silymarin (100 mg/kg) and acetaminophen + *Morus nigra* L. (250 mg/kg). Liver function enzymes ALT and AST were measured on days 1, 6, 12 and 21. Additionally, a histopathological study was conducted of liver sections.

Results: Acetaminophen raised ALT and AST levels, which remained high after administration of distilled water as placebo until day 21. Silymarin and *Morus nigra* L. leaf extract lowered ALT and AST levels to values similar to the control (baseline).

Conclusions: Results show that administration of *Morus nigra* L. improves the hepatic lesion caused by acetaminophen with an effect significantly similar to that of silymarin.

Keywords: alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; hepatoprotective; histopathology.

Recibido: 15/04/2020

Aprobado: 22/12/2021

Introducción

Las enfermedades hepáticas representan aproximadamente el 3,5 % de todas las muertes por año en todo el mundo. Las causas principales son las complicaciones de la cirrosis, la hepatitis viral y el carcinoma hepatocelular.⁽¹⁾ El daño hepático surge de la disminución de las funciones metabólicas del hígado causadas por xenobióticos,⁽²⁾ antibióticos,⁽³⁾ sustancias químicas o toxinas,⁽⁴⁾ virus,⁽⁵⁾ alcohol,⁽⁶⁾ entre otros. Los estudios sobre el efecto hepatoprotector generalmente usan la inducción de daño hepático usando acetaminofeno (N-acetil-p-amino-fenol, APAP) como modelo experimental.⁽⁷⁾ El APAP es un analgésico altamente efectivo, sin embargo a dosis altas o prolongadas puede tener efectos negativos, desde toxicidad hepática aguda hasta insuficiencia hepática.⁽⁸⁾ Esto se debe a que a dosis terapéuticas el APAP se metaboliza por reacciones de fase II y se excreta conjugado con ácido glucurónico y sulfato. No obstante, cuando la dosis es alta una parte se metaboliza por reacciones de fase I que producen N-acetil-p-benzoquinoneimina intermedia (NAPQI), que normalmente se desintoxica a través de la interacción con el glutatión celular (GSH).

Cuando el GSH se agota por la sobreproducción de NAPQI provocada por la saturación de las vías de conjugación en dosis altas, el NAPQI se une a las macromoléculas celulares provocando estrés oxidativo, necrosis y muerte celular.^(9,10,11)

Un patrón de comparación en los estudios del efecto hepatoprotector es la silimarina (SN), que es un flavonolignano, obtenido de las semillas de *Silybum marianum* L., que tiene efectos antioxidantes, hepatoprotectores, antidiabéticos, antiinflamatorios, antifibróticos y citoprotectores. El mecanismo hepatoprotector de la especie mencionada se explica por un aumento en la regeneración de los hepatocitos, aumentando el nivel reducido de glutatión en el hígado, lo que lleva a una disminución en la unión de las hepatotoxinas a los sitios receptores en el hepatocito.^(12,13)

Al género *Morus*, de la familia Moraceae, pertenecen algunas plantas que son utilizadas en la medicina tradicional debido a la presencia de metabolitos secundarios que han mostrado efectos bioactivos como antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, entre otros.⁽¹⁴⁾

Morus nigra L. (MN) también es conocida como mora negra y sus hojas se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones durante la menopausia, por ejemplo. Asimismo, diversos estudios han demostrado sus beneficios terapéuticos ante la obesidad y como antihiperlipidémico, antidepresivo, neuroprotector,^(15,16) antimicrobiano,⁽¹⁷⁾

cicatrizante,⁽¹⁸⁾ antidiabético,^(19,20) antinociceptivo⁽²¹⁾ y antiinflamatorio.⁽²²⁾ También son conocidos sus efectos como antiespasmódico, analgésico, hipotensor,⁽²³⁾ hipocolesterolémico,⁽²⁴⁾ antiparkinsoniano,⁽²⁵⁾ y anticancerígeno.^(26,27) Es de mencionar además su capacidad como blanqueador de origen natural para reducir la hiperpigmentación de la piel⁽²⁸⁾ y su uso en el tratamiento complementario de las mordeduras de serpientes.⁽²⁹⁾

Las propiedades biológicas de *Morus nigra* L. están potencialmente relacionadas con su capacidad antioxidante, sin embargo, se ha demostrado que las variaciones climáticas estacionales afectan el desempeño de los fitocompuestos después del proceso de extracción.⁽³⁰⁾ Varios parámetros como la variedad, la región geográfica, el clima y el estrés afectan este desempeño. Los parámetros operacionales como el tipo de solvente, la temperatura, la presión, entre otros, también modifican sus rendimiento.⁽³¹⁾ Estos parámetros determinan en la mayoría de los casos la composición del extracto y por ende la actividad terapéutica.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de *Morus nigra* L. en ratas con daño hepático inducido con acetaminofeno.

Métodos

Animales experimentales

En el estudio se utilizaron ratas macho (*Rattus norvegicus albinus*) de veintitrés meses de edad que pesaban 280 ± 20 g. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes: la temperatura se mantuvo a 22 ± 1 °C, la humedad al 55 %, y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.⁽³²⁾ Las ratas se alimentaron con una dieta estándar para roedores con agua del grifo *ad libitum*.

La investigación se llevó a cabo de acuerdo con los principios internacionalmente aceptados para el uso y cuidado de animales de laboratorio (Directiva CEE de 1986; 86/609/CEE). Los procedimientos aquí desarrollados han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Privada Autónoma del Sur.

Reactivos

El acetaminofeno y la silimarina para los experimentos se obtuvieron de Sigma Aldrich y el etanol para el extracto de JT Baker. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Extracto

Las hojas de *Morus nigra* L. (MN) fueron recolectadas y luego identificadas taxonómicamente en la Universidad Nacional Mayor de San Agustín de Arequipa con el código 062-2019-CIDEC-UNSA. Las plantas se limpiaron de polvo y otros desechos se eliminaron con agua desionizada⁽³³⁾ y luego se secaron a temperatura ambiente durante 72 h. Para preparar el extracto hidroalcohólico de MN se utilizó etanol al 70 % y 20 g de hojas pulverizadas. El método de extracción fue Soxhlet. El solvente se evaporó completamente a presión reducida usando un evaporador rotatorio a 60 °C. Finalmente, el extracto concentrado seco se almacenó a -20 °C hasta la realización de los experimentos.

Diseño experimental

Las ratas se dividieron en cuatro grupos que contenían 5 ratas por grupo.

-Grupo 1. (grupo control). Recibió 5 ml/kg de agua destilada⁽³⁴⁾ por vía orogástrica durante los 21 días del estudio.

-Grupo 2. Daño hepático inducido por la administración de 250 mg/kg de acetaminofeno^(35,36) durante 5 días. Del día 6 al 21 las ratas recibieron un placebo en lugar del tratamiento con acetaminofeno consistente en agua destilada por vía orogástrica.

-Grupo 3. Daño hepático inducido por la administración de 250 mg/kg de acetaminofeno durante 5 días. Del día 6 al 21 se administraron 100 mg/kg de silimarina^(37,38 39) por vía orogástrica.

-Grupo 4. Daño hepático inducido por la administración de 250 mg/kg de acetaminofeno durante 5 días. Del día 6 al 21 se administraron 250 mg/kg de *Morus nigra* L.⁽⁴⁰⁾ por vía orogástrica.

Las muestras de hígado se recogieron 21 días después de los tratamientos. El CO₂ se utilizó como agente de eutanasia para las ratas de laboratorio.

Análisis de laboratorio

Antes de la administración de los tratamientos se determinaron los niveles basales del perfil hepático (día 1). Para ello, después de un ayuno de 12 h, se tomó una muestra de sangre de la cola de las unidades experimentales utilizando el método de Archer. (La cola de la rata se limpió con alcohol puro y algodón, y luego se calentó con una lámpara de radiación infrarroja para provocar la vasodilatación de la vena caudal. Luego se extrajo la sangre realizando movimientos peristálticos y se almacenó en capilares para determinar el perfil hepático). Se tomaron muestras de sangre con el mismo procedimiento los días 6, 12 y 21.

Análisis bioquímico de la actividad enzimática

Para evaluar los marcadores bioquímicos en las lesiones hepáticas, se analizaron la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) mediante el método colorimétrico de Reitman y Frankel.^(38,41)

Examen histológico

Se realizó la necropsia y la extracción del hígado para observar sus características microscópicas. El diagnóstico histológico de las muestras obtenidas de los hígados se realizó en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Nacional Mayor de San Agustín en Arequipa mediante la tinción con Hematoxilina Eosina (H&E) en un microscopio óptico binocular CAR-ZEIZ.

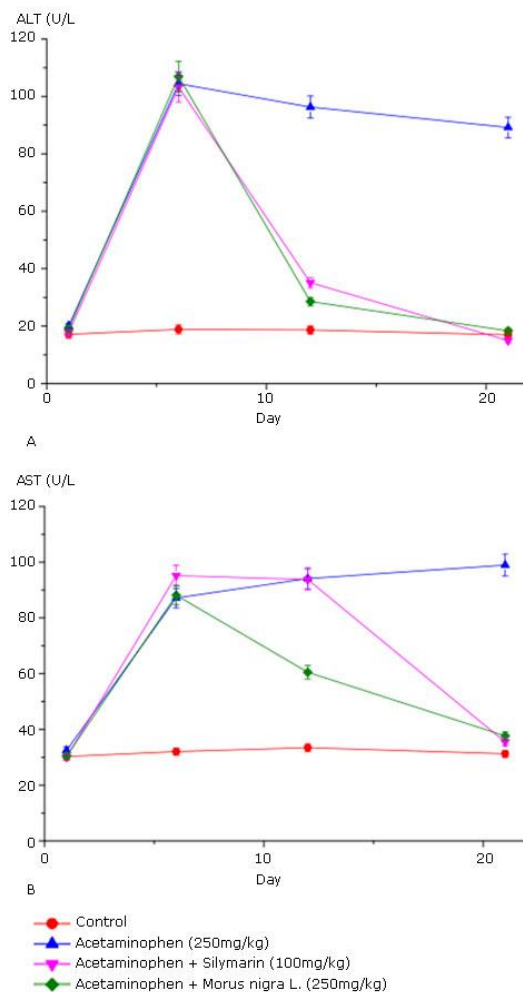
Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando OriginPro 9.0. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Posteriormente, se analizaron las comparaciones múltiples utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al final del tratamiento (día 21). Se utilizó la prueba de Tukey como prueba *post hoc*.⁽³⁸⁾ Con un valor de ($p < 0,05$) se consideró la existencia de diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

Efecto de *Morus nigra* L. sobre los niveles séricos de ALT y AST

Los resultados de los niveles de ALT y AST evaluados se muestran en la tabla 1. Los niveles de ALT y AST en ratas aumentaron después de la inducción de daño hepático con 250 mg/kg de acetaminofeno. Después de su administración a las ratas del grupo 3 (tratadas con una dosis de 100 mg/kg de silimarina), se mostró una disminución significativa en los niveles de ALT (Fig. 1A). Sin embargo, los niveles de AST disminuyeron por debajo del grupo control el día 21 (Fig. 1B.). Por otro lado, las ratas tratadas con 250 mg/kg de *Morus nigra* L., tras la inducción de daño hepático con acetaminofeno, también mostraron un descenso significativo de los niveles de AST y ALT similar al obtenido con silimarina (Fig. 1A y B).



Los datos presentados son medias \pm DE durante los días 1, 6, 12 y 21. Denotan diferencia significativa ($p < 0,05$) en al menos un grupo al final del tratamiento (día 21).

Fig. 1 - Efecto de *Morus nigra* L. sobre los niveles de ALT y AST después del daño hepático inducido con acetaminofeno.

Tabla 1 - Efecto de los niveles séricos de AST y ALT de *Morus nigra* L. después de las lesiones hepáticas inducidas con acetaminofeno en ratas

Grupos	ALT (U/L)				AST (U/L)			
	Día 1	Día 6	Día 12	Día 21	Día 1	Día 6	Día 12	Día 21
Control	17,13±1,23	18,84±1,26	18,64±1,33	16,94±1,49	30,25±1,32	32,05±1,49	33,45±2,27	31,25±1,30
Acetaminofeno (250 mg/kg)	20,04±4,59	104,43±10,18	96,30±6,36	89,19±6,69	32,45±1,25	87,14±2,15	94,11±2,30	98,98±3,24
Acetaminofeno + silimarina (100 mg/kg)	19,04±2,49	106,94±12,10	28,55±1,90	18,34±1,73	30,46±2,19	88,16±2,52	60,51±2,56	37,68±3,16
Acetaminofeno + <i>Morus nigra</i> L. (250 mg/kg)	17,74±1,23	103,22±8,09	35,09±6,07	14,93±0,82	30,06±1,62	95,17±3,76	93,77±2,01	35,47±1,36

Los datos presentados son medias ± DE durante los días 1, 6, 12 y 21.

El análisis de varianza de una vía (ANOVA) muestra diferencias significativas en al menos un grupo al final del tratamiento (día 21) en cuanto a los niveles de ALT y AST ($p < 0,05$). Con respecto a los niveles de ALT en el día 21, los datos muestran que no hay una diferencia significativa entre el efecto de *Morus nigra* L. y la silimarina ($p < 0,05$); y entre la *Morus nigra* L. y el grupo control ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

El ANOVA de los niveles de ALT y AST en el día 21 resultó en valores de $p < 0,05$ para ambos casos, lo que significa que hubo una diferencia significativa dentro de los grupos. El análisis *post hoc* (test de Tukey) al 95 % de confianza que se muestra en las Fig. 2 y 3 indica que en cuanto a los niveles finales de ALT y AST (día 21) no existe diferencia significativa entre el efecto hepatoprotector (HE) de las hojas de *Morus nigra* L. (250 mg/kg) y el efecto de la silimarina (100 mg/kg). El HE de las hojas de *Morus nigra* L. (250 mg/kg) permite reducir los niveles de ALT a niveles basales, ya que no existe diferencia significativa con los niveles de ALT del grupo control al final del tratamiento ($p > 0,05$), lo que no se observa para los niveles de AST. Sin embargo, la disminución del marcador enzimático AST también es significativa.

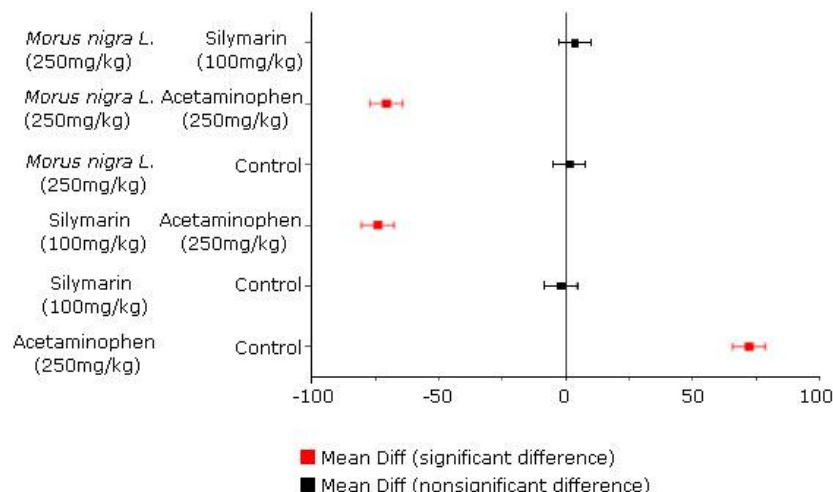


Fig. 2 - Comparación de medias de los niveles de ALT de los grupos estudiados al final del tratamiento (día 21) mediante la prueba de Tukey.

Si la diferencia se aproxima a cero, entonces no hay diferencia significativa. Los datos presentados son medias \pm DE y muestran que no hay diferencia significativa entre el efecto hepatoprotector de *Morus nigra* L. y la silimarina ($p < 0,05$), y entre *Morus nigra* L. y el grupo control ($p < 0,05$). Por otro lado, los datos muestran diferencia significativa entre *Morus nigra* L. y el grupo con acetaminofeno ($p > 0,05$), entre la silimarina y el grupo con acetaminofeno ($p > 0,05$), y entre el acetaminofeno y el grupo control ($p > 0,05$).

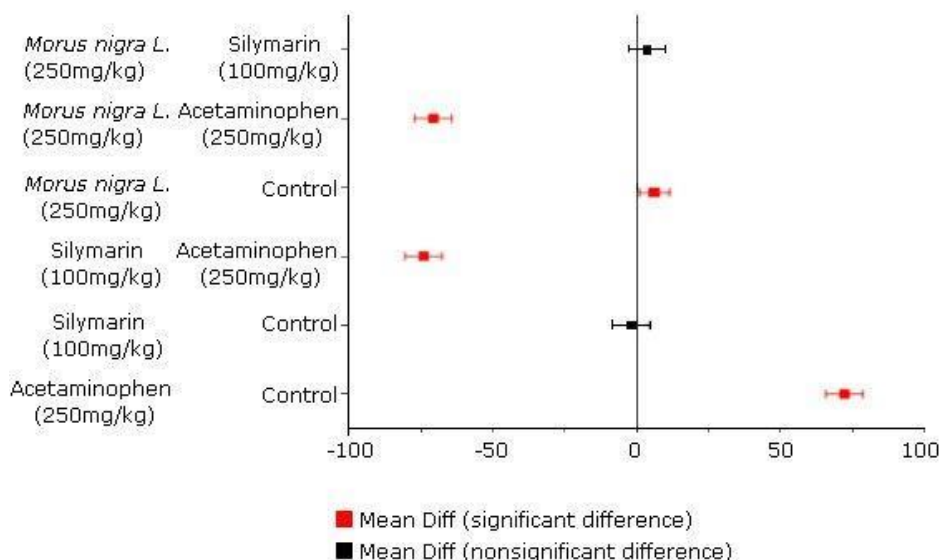


Fig. 3 - Comparación de medias de los niveles de AST de los grupos estudiados al final del tratamiento (día 21) mediante la prueba de Tukey.

Si la diferencia se aproxima a cero, entonces no hay diferencia significativa. Los datos presentados son medias \pm DE y muestran que no hay diferencia significativa entre el efecto hepatoprotector de *Morus nigra* L. y silimarina ($p < 0,05$) y entre *Morus nigra* L. y el grupo control ($p < 0,05$). Por otro lado, los datos muestran una diferencia significativa entre *Morus nigra* L. y el grupo con acetaminofén ($p > 0,05$), *Morus nigra* L. y el grupo control ($p < 0,05$), silimarina y el grupo con acetaminofén ($p > 0,05$); y acetaminofén y el grupo control ($p > 0,05$).

Efecto de *Morus nigra* L. sobre los cambios histopatológicos

En la Fig. 4 se muestra el análisis histopatológico realizado por tinción H&E a los grupos estudiados. En los cortes histológicos de los hígados de las ratas del grupo control no se encontraron alteraciones histológicas dado que no hay signos de necrosis y la disposición de los hepatocitos es normal (Fig. 4A.). La hepatotoxicidad del acetaminofeno se observa en la Fig. 4B. Este grupo solo recibió agua destilada hasta el día 21. La fotomicrografía hepática muestra signos de necrosis hepatocelular severa, así como restos nucleares y aumento de células de Kupffer. Los cortes histológicos de los hígados del grupo de ratas que recibieron tratamiento con 100 mg/kg de silimarina después de la inducción del daño hepático con acetaminofén muestran signos de una leve necrosis, espacio porta normal, células de Kuffer normales, así como una probable regeneración de hepatocitos binucleados. (Fig. 4C.). El tratamiento de 250 mg/kg con *Morus nigra* L. mostró claramente una mejoría histopatológica, ya que se observan signos de necrosis moderada con recuperación de la disposición de los hepatocitos y células de Kupffer aparentemente normales (Fig. 4D).

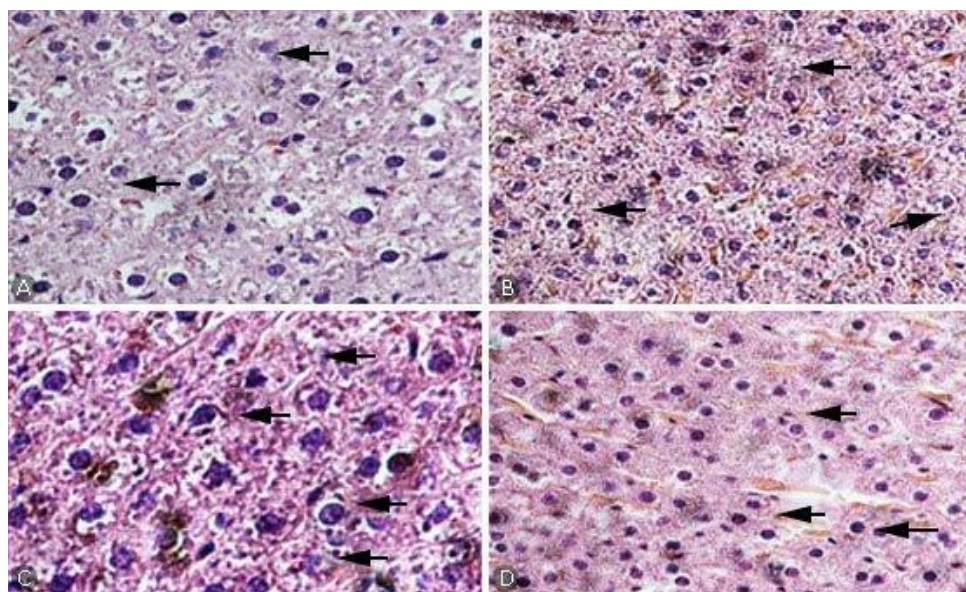


Fig. 4. Microfotografías de secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). **A.** Hígado de rata del grupo control: no hay signos de necrosis. **B.** Hígado de rata lesionado con acetaminofeno (250 mg/kg) y agua destilada como placebo: signos de necrosis hepatocelular grave, restos nucleares y aumento de células de Kupffer. **C.** Hígado de rata del grupo acetaminofeno + silimarina (100 mg/kg): signos de necrosis leve, espacio porta normal, células de Kuffer normales. **D.** Hígado de rata del grupo acetaminofeno + *Morus nigra* L. (250 mg/kg): signos de necrosis moderada con recuperación de la disposición de los hepatocitos y células de Kupffer aparentemente normales.

Discusión

Actualmente, el acetaminofeno o N-acetil-p-aminofenol (APAP) se utiliza para aliviar dolores, inflamaciones y como analgésico, sin embargo, su uso prolongado desencadena la producción de N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) que provoca la muerte de células hepáticas, por lo que se utilizó para provocar hepatotoxicidad en la presente investigación. La toxicidad de APAP permite observar aspectos específicos de la insuficiencia hepática aguda en humanos para proponer nuevas terapias, ya que los modelos de hepatotoxicidad de APAP mimetizan de cerca todo el proceso observado en los pacientes, a diferencia de otros modelos que solo simulan algunos aspectos de la enfermedad humana.⁽⁴²⁾ La silimarina es un agente hepatoprotector ampliamente utilizado para el tratamiento de lesiones hepáticas de diferente origen,⁽⁴³⁾ por lo que se utilizó como estándar de comparación en una dosis de 100 mg/kg.

Un estudio evaluó el perfil fitoquímico estacional y el efecto antioxidante de las hojas de *Morus nigra* L. y halló que la mayor concentración de fenoles totales se observó en verano, flavonoides y carotenoides en primavera, mientras que el ácido ascórbico fue más abundante durante el otoño.⁽³⁰⁾ Otro estudio reporta variabilidad entre características morfológicas y químicas de MN, lo que influye directamente en la variabilidad de fenoles totales.⁽⁴⁴⁾ Estos estudios motivan un estudio constante de la actividad farmacológica de las hojas de MN, pues debido a diversos factores ya expuestos, las propiedades de MN podría estar relacionado con la procedencia de la especie.

El consumo de sustancias con efecto hepatoprotector es fundamental. El presente estudio evaluó los beneficios de las hojas de *Morus nigra* L. como hepatoprotector tras la administración de acetaminofeno, ya que un estudio previo había demostrado que el extracto etanólico de MN no presentaba efectos tóxicos significativos cuando se administraba por vía oral en ratas en tratamiento agudo. El extracto fue clasificado como seguro, mostrando incluso una disminución de AST en machos a dosis de 750 y 1000 mg/kg y en hembras a dosis de 1000 mg/kg. También produjo una reducción del colesterol total en ratas hembra a dosis de 750 y 1000 mg/kg.

Asimismo, el estudio encontró quercetina y ácido cafeico en la composición química del MN,⁽²⁴⁾ lo que podría estar relacionado con la disminución de AST. Los extractos etanólicos (EE) de MN provocaron una disminución significativa del nivel de glucosa en sangre en ratas en ayunas a dos dosis diferentes (250 y 500 mg/kg) para el modelo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina.⁽¹⁹⁾ Un tratamiento con 500 mg/kg del extracto etanólico de MN mostró una mejora moderada en la protección de las células hepáticas con daño por metotrexato (MTX), por lo que el estudio indicó que la administración conjunta de MN y MTX puede prevenir la hepatocitotoxicidad causada por este último.⁽⁴⁵⁾ Debido a esto estudio, en la presente investigación se utilizó una dosis de MN de 250 mg/kg.

Se ha demostrado que las hojas de mora tienen varios metabolitos secundarios. En ácido clorogénico, rutina, isoquercitrina,⁽²⁸⁾ antocianinas (7,3 mg/100 g de materia seca),⁽⁴⁶⁾ β -sitosterol, quercetina-3-O-glucopiranosido y kaempferol-3-O-glucopiranosido, rutina y quercetina fueron encontrados. Este último, relacionado con la prevención del edema provocado por la serotonina y la bradicinina.⁽²⁹⁾

En cuanto al efecto hepatoprotector, se han realizado estudios administrando dosis de 250 y 500 mg/kg de extracto metanólico (ME) de hojas de MN antes de la administración de acetaminofeno. Sus resultados indican que el extracto de MN reduce los niveles de ALT

y AST a niveles comparables a los alcanzados por la silimarina, lo que se confirma con el examen histopatológico. Este efecto se relacionó con la presencia de luteolina, quercetina e isorhamnetina.⁽⁴⁰⁾ En la presente investigación con MN, también se encontró una disminución en los niveles de ALT y AST después del daño hepático con acetaminofeno. Estos efectos fueron estadísticamente similares al efecto de la silimarina. Además, las mejoras también se observaron en los cortes histológicos analizados. Los resultados del presente estudio podrían sugerir una similitud en los efectos hepatoprotectores de los extractos de MN obtenidos por maceración con metanol y por Soxhlet con etanol.

Otro estudio informa que los beneficios de las hojas de MN se deben principalmente a su composición química. Se han encontrado compuestos fenólicos totales (TPC) entre 16,21-24,37 mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g, flavonoides totales (FT) 26,41-31,28 mg de equivalente de rutina (RE)/g, 0,97-1,49 mg de ácido ascórbico (AA)/g y una capacidad antioxidante de 6,12-9,89 mM de Trolox equivalente/g de hojas secas, en la EM acuosa.⁽⁴⁷⁾

Otros estudios sobre EM encontraron que los efectos farmacológicos estaban relacionados con componentes de MN como el ácido betulínico, β -sitosterol, germanicol,⁽²²⁾ ácido gálico, ácido protocatequico, p-hidroxibenzoico, vanilo, clorogénico, siringico, ácido p-cumárico, ferúlico y m-cumárico,⁽⁴⁸⁾ morusina, U kuwanon, E kuwanon, P moracina, O moracina, A albanol, B albanol,⁽²³⁾ cianidina 3-glucósido y cianidina 3-rutinósido, quercetina 3-glucósido, rutina, cafeico y otros derivados del ácido hidroxicinámico y elágico,⁽⁴⁹⁾ flavonol, principalmente formas glicosiladas de quercetina, kaempferol, ácidos cafeilquínicos, ácidos fenólicos simples y algunos ácidos orgánicos.⁽⁵⁰⁾

Los estudios realizados hasta la fecha muestran que el estudio de las propiedades composicionales del MN debe continuarse, ya que aún se están descubriendo nuevos compuestos presentes en el MN.^(51,52)

Del presente estudio se puede concluir que, según el modelo experimental hepatotóxico de acetaminofeno en ratas, el extracto hidroalcohólico de hojas de *Morus nigra* L. tiene un efecto hepatoprotector a la dosis estudiada de 250 mg/kg, comparable a la silimarina. La actividad hepatoprotectora se evidenció a través de los niveles de ALT y AST, y el examen histológico.

Referencias bibliográficas

1. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2014;70(1):151-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
2. Sun J, Zhou B, Tang C, Gou Y, Chen H, Wang Y, *et al.* Characterization, antioxidant activity and hepatoprotective effect of purple sweetpotato polysaccharides. *Internat J Biolog Macromolec.* 2018;115:69-76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.033>
3. Stine JG, Lewis JH. Hepatotoxicity of antibiotics: A Review and update for the Clinician. *Clinic Liver Dis.* 2013;17(4):609-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.008>
4. Parvez MK, Al-Dosari MS, Arbab AH, Niyazi S. The in vitro and in vivo antihepatotoxic, antihepatitis B virus and hepatic CYP450 modulating potential of *Cyperus rotundus*. *Saud Pharma J.* 2019;27(4):558-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.02.003>
5. Zhang X, Zhang R, Yang H, Xiang Q, Jiang Q, He Q, *et al.* Hepatitis B virus enhances cisplatin-induced hepatotoxicity via a mechanism involving suppression of glucose-regulated protein of 78 Kda. *Chem Biolog Interact.* 2016;254:45-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.030>
6. Luyendyk JP, Ganey PE, Fullerton A, Roth RA. 2.13 Inflammation and Hepatotoxicity. In: CA McQueen (Ed.). 3rd. Ed. *Comprehensive toxicology.* 2020:324-45. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95664-2>
7. Rathee D, Kamboj A, Sachdev RK, Sidhu S. Hepatoprotective effect of *Aegle marmelos* augmented with piperine co-administration in paracetamol model. *Rev Brasil de Farmacog.* 2018;28(1):65-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.003>
8. Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen hepatotoxicity: A mitochondrial perspective. *Advan Pharmacol.* 2019;85:195-219. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.01.007>
9. Coen M. Metabolic phenotyping applied to preclinical and clinical studies of acetaminophen metabolism and hepatotoxicity. *Drug Metabol Rev.* 2015;47(1):29-44. DOI: <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.982865>
10. Mohammed NEM, Messiha BAS, Abo-Saif AA. Effect of amlodipine, lisinopril and allopurinol on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Saud Pharma J.* 2016;24(6):635-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.04.004>

11. Ogilvie JD, Rieder MJ, Lim R. Acetaminophen overdose in children. CMAJ. 2012;184(13):1492-6. DOI: <https://doi.org/10.1503/cmaj.111338>
12. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Research. 2006;124(5):491-504. PMID: 17213517
13. Vivekanandan L, Sheik H, Singaravel S, Thangavel S. Ameliorative effect of silymarin against linezolid-induced hepatotoxicity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infected *Wistar* rats. Biomed Pharmacol. 2018;108:1303-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.133>
14. Wei H, Zhu JJ, Liu XQ, Feng WH, Wang ZM, Yan LH. Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (*Sang-Bai-Pi*) and their pharmacological effects. Cogent Chem. 2016;2(1):1212320. DOI: <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1212320>
15. Dalmagro AP, Camargo A, Zeni ALB. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. Metab Brain Dis. 2017;32(6):1963-73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0089-y>
16. Lim SH, Choi CI. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (black mulberry) as a promising nutraceutical resource. Nutrients. 2019;11(2):437. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020437>
17. Mascarello A, Orbem Menegatti AC, Calcaterra A, Martins PGA, Chiaradia-Delatorre LD, D'Acquarica I, et al. Naturally occurring diels-alder-type adducts from *Morus nigra* as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B. Europ J Med Chem. 2018;144:277-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.087>
18. Zhou R, Li D, Kou Q, Jiao Z, Ning Z. Evaluation of antiinflammatory, antimicrobial and wound healing activity of *Morus nigra*. South Afric J Bot. 2019;124:540-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.021>
19. Hago S, Mahrous EA, Moawad M, Abdel-Wahab S, Abdel-Sattar E. Evaluation of antidiabetic activity of *Morus nigra* L. and *Bauhinia variegata* L. leaves as Egyptian remedies used for the treatment of diabetes. Nat Prod Research. 2019;1-7. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601094>
20. Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal fetal outcome,

- oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharma*. 2011;138(3):691-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.044>
21. de Mesquita Padilha M, Vilela FC, da Silva MJD, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *J Med Food*. 2009;12(6):1381-5. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0012>
22. Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Santos MH, *et al*. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phyther Research*. 2010;24(10):1496-500. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.3134>
23. Zoofishan Z, Kúsz N, Csorba A, Tóth G, Hajagos-Tóth J, Kothencz A, *et al*. Antispasmodic activity of prenylated phenolic compounds from the root bark of *Morus nigra*. *Molecules*. 2019;8:24(13). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24132497>
24. Figueredo KC, Guex CG, Reginato FZ, Haas da Silva AR, Cassanego GB, Lhamas CL, *et al*. Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in *Wistar* rats. *J Ethnopharma*. 2018;224:290-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.013>
25. Fahimi Z, Jahromy MH. Effects of blackberry (*Morus nigra*) fruit juice on levodopa-induced dyskinesia in a mice model of Parkinson's disease. *J of Experim Pharma*. 2018;10:29-35. DOI: <https://doi.org/10.2147/JEP.S161782>
26. Qadir MI, Ali M, Ibrahim Z. Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. *Bangla J Pharma*. 2014;9(4):496-7. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjp.v9i4.19783>
27. Turan I, Demir S, Kilinc K, Burnaz NA, Yaman SO, Akbulut K, *et al*. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharma J*. 2017;25(2):241-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>
28. Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra ENS, Nóbrega YK, *et al*. Extracts of *Morus nigra* L. Leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PLOS ONE*. 2016;11(9):e0163130. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163130>
29. Ribeiro AEAS, Soares JMD, Silva HAL, Wanderley CW, Moura CA, de Oliveira-Junior RG, *et al*. Inhibitory effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by *Bothrops jararacussu* snake venom in mice. *Biomed Pharma*. 2019;111:1046-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.011>
30. Dalmagro AP, Camargo A, da Silva Filho HH, Valcanaia MM, de Jesus PC, Zeni ALB. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus*

- nigra* leaves. Ind Crops Prod. 2018;123:323-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.085>
31. Nastić N, Borrás Linares I, Lozano Sánchez J, Švarc Gajić J, Segura Carretero A. Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (*Morus nigra* L.) leaves. J Ind Engin Chem. 2018;68:282-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.055>
32. Geyikoglu F, Yilmaz EG, Erol HS, Koc K, Cerig S, Ozek NS, *et al.* Hepatoprotective role of thymol in drug-induced gastric ulcer Model. Annals Hepat. 2018;17(6):980-91. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7198>
33. Azarmehr N, Afshar P, Moradi M, Sadeghi H, Sadeghi H, Alipoor B, *et al.* Hepatoprotective and antioxidant activity of watercress extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Heliyon. 2019;5(7):e02072. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02072>
34. Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. Food Sci Human Wellness. 2015;4(1):35-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.02.002>
35. Mohammadi S, Nezami A, Esmaili Z, Rouini MR, Ardakani YH, Lavasani H, *et al.* Pharmacokinetic changes of tramadol in rats with hepatotoxicity induced by ethanol and acetaminophen in perfused rat liver model. Alcohol. 2019;77:49-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.09.006>
36. Ozcelik E, Uslu S, Erkasap N, Karimi H. Protective effect of chitosan treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Kaoh J Med Sci. 2014;30(6):286-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.02.003>
37. Binitha RRV, Shajahan MA, Muhamed J, Anilkumar TV, Premlal S, Indulekha VC. Hepatoprotective effect of *Lobelia alsinoides* Lam. in *Wistar* rats. J Ayurv Integ Med. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2019.04.004>
38. Fahmy AA, Fouad MM, Arafat OM, Abd El-Fathaah E. Aminoguanidine potentiates the hepatoprotective effect of silymarin in CCL4 treated rats. Ann Hepat. 2011;10(2):207-15. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31570-4](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31570-4)
39. Ren X, Xin LT, Zhang MQ, Zhao Q, Yue SY, Chen KX, *et al.* Hepatoprotective effects of a traditional Chinese medicine formula against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity *in vivo* and *in vitro*. Biomed Pharma. 2019;117:109190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109190>

40. Mallhi TH, Qadir MI, Khan YH, Ali M. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Bangla J Pharma* 2014;9(1):60-6. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjp.v9i1.17337>
41. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. *Amer J Clin Pathol*. 2017;28(1):56-63. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
42. Maes M, Vinken M, Jaeschke H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol Appl Pharma*. 2016;290:86-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.016>
43. Uchida NS, Silva-Filho SE, Cardia GFE, Cremer E, Silva Comar FM, Silva EL, *et al*. Hepatoprotective effect of citral on acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *Evid Bas Compl Altern Med*. 2017:1796209. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1796209>
44. Hosseini AS, Akramian M, Khadivi A, Salehi Arjmand H. Phenotypic and chemical variation of black mulberry (*Morus nigra*) genotypes. *Ind Crops Prod*. 2018;117:260-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.007>
45. Tag HM. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Compl Altern Med*. 2015;15(1):252. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0744-y>
46. Thabti I, Marzougui N, Elfalleh W, Ferchichi A. Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Act Bot Gallica*. 2011;158(2):205-14. DOI: <https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516267>
47. Iqbal S, Younas U, Sirajuddin Chan KW, Sarfraz RA, Uddin MK. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus sp.*): A comparative study. *Inter J Molec Sci*. 2012;13(6):6651-64. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms13066651>
48. Ayaz MA, Najma M, Devanand LD, Muhammad BM, Amanat PA. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Pol J Food Nut Sci*. 2010 [acceso: 10/12/2021];60(1). Disponible en: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-70198bea-e960-47bd-9de9-d821124cb52b>
49. Pérez Gregorio MR, Rigueiro J, Alonso González E, Pastrana Castro LM, Simal Gándara J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and

phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). LWT Food Sci Technol. 2011;44(8):1793-1801. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.007>

50. Sánchez Salcedo EM, Tassotti M, Del Rio D, Hernández F, Martínez JJ, Mena P. (Poly) phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach. Food Chem. 2016;212:250-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.121>

51. Wang L, Gong T, Chen RY. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. Chin Chem Letters. 2009;20(12):1469-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2009.06.035>

52. Xu LJ, Yu MH, Huang CY, Niu LX, Wang YF, Wu CZ, *et al.* Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR γ agonistic activities. Fitoterapia. 2018;127:109-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.004>

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses entre los autores con respecto a este documento.

Contribución de los autores

Conceptualización: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Curación de datos: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca, Stamber Alvaro Ramírez-Revilla.

Análisis formal: Azael Paz Aliaga, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Adquisición de fondos: Azael Paz Aliaga, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca.

Investigación: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca.

Metodología: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca.

Administración del proyecto: Azael Paz Aliaga, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Recursos: Azael Paz Aliaga, Fiorela Anyeli Arce Raymi, María Noelia Magaña Charca.

Software: Azael Paz Aliaga, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Supervisión: Azael Paz Aliaga, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Validación: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Stamber Alvaro Ramírez Revilla.

Redacción del borrador original: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Azael Paz Aliaga.

Redacción, revisión y edición: Elvis Gilmar Gonzales Condori, Azael Paz Aliaga.