



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"

EFFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR ACETAMINOFEN EN LA RATA.

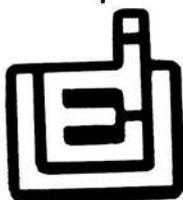
T E S I S

Que para obtener el Grado de:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

Presenta:

TANIA GARCIAPIÑA RIOS



MEXICO

1991.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Marisabel Mourelle Mancini en el Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

A mis padres con todo mi amor
por el apoyo que siempre me han brindado.
Infinitamente, gracias.

A mi hermano
con mucho cariño.

Agradezco muy especialmente a mi asesor, M. en C. Pablo Muriel de la Torre por haberme apoyado y brindado sus conocimientos, tiempo y experiencia durante el desarrollo de este trabajo, así como su valiosa amistad.

Mi agradecimiento a la Dra. Marisabel Mourelle Mancini quien siempre se preocupó por el buen desarrollo de este trabajo aportando sus valiosos conocimientos y su experiencia.

Agradezco al M. en C. Victor Manuel Pérez Alvarez su importante colaboración en el desarrollo de este estudio, tanto en el ámbito experimental como en el académico.

Quiero hacer patente mi agradecimiento a mis sinodales, M. en C. Martha Ofelia Salcedo Alvarez, M. en C. Bertha Segura Alegría, M. en C. Ignacio Peñalosa Castro y M. en C. Beatriz Vazquez Cruz, por sus sugerencias y comentarios del presente trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por la valiosa ayuda y cooperación que me ofrecieron y por el excelente ambiente de trabajo y compañerismo que me brindaron.

Agradezco también al Sr. Alfredo Padilla Delgado, por la magnífica realización de las figuras que forman parte de esta tesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APAP: acetaminofén
- Cit. P₄₅₀: Citocromo P₄₅₀
- CMC: carboximetil celulosa
- FA: fosfatasa alcalina
- GGTP: gamma glutamil transpeptidasa
- GSH: glutati3n reducido
- I.P.: vía intraperitoneal
- I.V.: vía intravenosa
- 3-MC: 3-metil colantreno
- MDA: malondialdehído
- MFO: sistema de oxidaci3n de funci3n mixta
- NAC: N-acetil-L-cisteína
- NAPQI: N-acetil-p-benzoquinoneimina
- O.P.: vía oral
- PB: piperonil but3xido
- PTU: propiltiuracilo
- RPM: revoluciones por minuto
- SH: grupos sulfhidrilos 3 grupos tioles
- TBA: ácido tiobarbitúrico
- TCA: ácido tricloroacético
- TGP: transaminasa glutámico pirúvica

INDICE

	PAGINA
0.0.0.0 RESUMEN	1
1.0.0.0 INTRODUCCION	4
1.1.0.0 El Hígado	4
1.1.1.0 Generalidades	4
1.1.2.0 Metabolismo de xenobióticos por el hígado	7
1.1.3.0 Importancia del daño al hígado	9
1.2.0.0 El Acetaminofén (APAP)	10
1.2.1.0 Biotransformación	13
1.2.2.0 Mecanismos de hepatotoxicidad	13
1.2.3.0 Fármacos utilizados para prevenir ó revertir el daño producido por la intoxicación con APAP	17
1.3.0.0 La silimarina	19
1.3.1.0 Generalidades	19
1.3.2.0 Biotransformación	19
1.3.3.0 Propiedades hepatoprotectoras	19
1.4.0.0 Evaluación de los marcadores de daño hepático.	23
1.5.0.0 Objetivos	26
2.0.0.0 MATERIALES Y METODOS	27
2.1.0.0 Tratamiento de los animales	27
2.2.0.0 Obtención de las muestras y determinación de los marcadores de daño hepático	27
2.2.1.0 Suero	27
2.2.1.1 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA)	28

2.2.1.2	Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (GGTP)	28
2.2.1.3	Determinación de la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP)	28
2.2.2.0	Muestras de hígado	29
2.2.2.1	Determinación de proteínas	29
2.2.2.2	Determinación del grado de lipoperoxidación ..	29
2.2.2.3	Determinación de glutatión reducido (GSH)	30
2.2.2.4	Determinación del contenido de glucógeno hepático	30
2.2.2.5	Estudio histopatológico del hígado	30
2.3.0.0	Análisis estadístico	31
3.0.0.0	RESULTADOS	32
4.0.0.0	DISCUSION	45
5.0.0.0	BIBLIOGRAFIA	51

0.0.0.0. RESUMEN

El acetaminofén (APAP) es un analgésico antipirético útil y libre de efectos secundarios a dosis terapéuticas, sin embargo, una sobredosis provoca daño hepático marcado que puede conducir a la muerte del individuo. Actualmente está aceptado que el consumo de glutatión reducido (GSH) por un metabolito activo del APAP es un requisito para que ocurra el daño. La participación de la lipoperoxidación se encuentra más discutida en la literatura. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la secuencia de eventos (consumo de GSH, lipoperoxidación) que conducen al daño celular, y evaluar la capacidad hepatoprotectora de la silimarina (un flavonoide con efectos benéficos en varias enfermedades hepáticas) en la intoxicación con APAP. Se utilizaron ratas Wistar macho de 120-150 g de peso y se hicieron 5 grupos experimentales: 1. Tratamiento con APAP 500 mg/Kg p.o. suspendido en carboximetil celulosa (CMC) al 1%. 2. Pretratamiento con 3-metil colantreno (3-MC) 20 mg/kg i.p. 72 h antes de la administración de APAP 500 mg/kg p.o. suspendido en CMC al 1%. 3. Administración de 3-MC y APAP igual que en el grupo 2, más silimarina 200 mg/Kg suspendidos en CMC al 1%. La silimarina se administró 24h antes del APAP. 4. Grupo control de CMC y 3-MC administrados igual que en el grupo 2. 5. Control de 3-MC y silimarina administrados igual que en el grupo 3. Cinco ratas de cada tratamiento se sacrificaron a 1, 3, 4, 6, 18 y 24 h después de la administración de APAP. Se midió el GSH y el grado de

lipoperoxidación en homogenados de hígado, así como el contenido de glucógeno hepático. La actividad de las enzimas transaminasa glutámico pirúvica (TGP), gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP) y fosfatasa alcalina (FA) fue determinada en suero. El grupo que recibió APAP pero sin pretratamiento con 3-MC para inducir el metabolismo no mostró evidencias de daño hepático. En cambio el grupo pretratado con 3-MC e intoxicado con APAP mostró daño hepático generalizado, indicando que la toxicidad del APAP depende de su metabolismo a través del Cit. P₄₅₀. A partir de este experimento, todas las ratas recibieron un pretratamiento con 3-MC antes de la intoxicación de APAP. Desde la primera hora de la administración del APAP el GSH disminuyó significativamente 70% y se mantuvo bajo durante 6 h, el glucógeno también bajó desde la primera hora y permaneció por debajo del valor del control las siguientes 24 horas. Cuatro horas después de la administración del APAP, el grado de lipoperoxidación aumentó 3 veces. A las 18 h el grado de lipoperoxidación regresó a valores normales y el GSH se recuperó y sobrepasó el valor control. Las enzimas séricas mostraron un incremento máximo a las 18 h. La silimarina previno totalmente el aumento en la actividad de la FA, de la GGTP y de la TGP en suero y la disminución en el contenido de glucógeno a las 18 y 24 h. Además, el grupo protegido con silimarina no mostró incremento en el grado de lipoperoxidación, pero la disminución en el contenido de GSH fue similar a la del grupo que recibió 3-MC + APAP. Concluimos que el consumo de GSH y el aumento en el grado de lipoperoxidación preceden al incremento en las enzimas séricas marcadoras de daño hepático sugiriendo que la

lipoperoxidación juega un papel importante en el establecimiento del daño. La silimarina protegió de manera importante de la intoxicación con APAP, probablemente, actuando como captador de radicales libres y evitando los procesos lipoperoxidativos.

1.0.0.0 INTRODUCCION

1.1.0.0 El Hígado

1.1.1.0 Generalidades

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados, en el hombre comprende del 2 al 3% del peso corporal (27). Se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma y presenta cuatro lóbulos separados de manera incompleta. Su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson).

El hígado tiene doble sistema de irrigación sanguínea. La vena porta, que transporta sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas, suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo (23); ésta es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno. Por otra parte la arteria hepática transporta sangre bien oxigenada. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos. La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central [Fig. 1].

La unidad estructural del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido, que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro y la vena

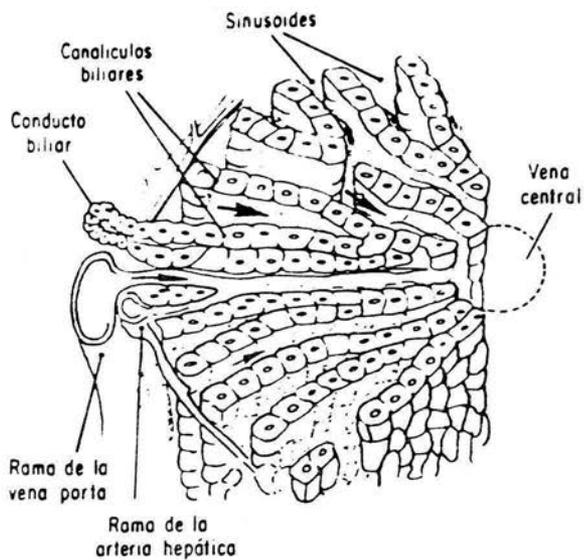


Fig. 1. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. El dibujo está basado en una ilustración de Ham A.W. Textbook of Histology. I. B. Lippincott Company, Filadelfia, 1965.

central pasa por el centro de éste (13) [Fig. 1].

El hígado es esencial para la vida, y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen extraordinaria capacidad de regeneración. El animal de laboratorio más frecuentemente usado para estudios de regeneración experimental es la rata, cuyo hígado lobulado permite una remoción fácil y reproducible de una parte del hígado. El desarrollo de la regeneración más intensa se observa después de la remoción del 65-70% del hígado. La estimulación en la síntesis de DNA hepático puede ser vista aproximadamente a las 14 horas después de la operación, con un máximo alrededor de las 24 horas. Un incremento en la actividad mitótica de los hepatocitos se puede observar después de una fase lag de alrededor de 6 horas, con un máximo cercano a las 30 horas posteriores a la operación (9).

El hígado también tiene la facultad de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas.

Este órgano funciona como una glándula exócrina y como una glándula endócrina. Secreta bilis que fluye hacia el duodeno y que tiene, entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina, que es el fosfolípido más importante, y el colesterol son insolubles en agua, pero son capaces de formar micelas mixtas con las sales biliares, por lo cual permiten que se lleve a cabo la emulsificación de las grasas antes de su digestión (35). Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatocito

pueden ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa, o bien, ligadas a un transportador como los triglicéridos que salen formando parte de una lipoproteína.

Las células hepáticas también sintetizan muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa (gluconeogénesis), ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Biotransforma compuestos exógenos como drogas e insecticidas y compuestos endógenos como esteroides.

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Finalmente, la abundancia de macrófagos representados por las células de Kupfer del sistema retículo endotelial, hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (35).

1.1.2.0 Metabolismo de xenobióticos por el hígado

El hígado tiene a su cargo, como una de sus funciones primordiales, un papel protector contra agentes nocivos; por lo que está capacitado para biotransformar una gran mayoría de los xenobióticos que llegan a él. Para realizar tal función, el hepatocito contiene una serie de complejos enzimáticos que se encuentran inmersos en las membranas del retículo endoplásmico liso y en el citosol. El proceso de biotransformación consta de dos fases, y es mediante ellas que los compuestos liposolubles

son convertidos en productos metabólicos más polares, que permiten una más rápida excreción y prevenir así los efectos tóxicos por la retención de agentes nocivos (31).

Las reacciones de la fase I consisten de oxidaciones, reducciones e hidrólisis, que tienen la finalidad de introducir grupos químicos adecuados para que se lleven a cabo las reacciones de la fase II. Entre las de mayor importancia son las oxidaciones, que son realizadas por un complejo enzimático llamado "sistema de oxidasas de función mixta". Este sistema está constituido por el Citocromo P₄₅₀ (Cit. P₄₅₀), NADPH citocromo c reductasa, y el lípido fosfatidilcolina. El Cit. P₄₅₀ es una familia de proteínas que contiene el grupo hemo. Este grupo de hemoproteínas está involucrado en el metabolismo de una gran variedad de sustancias endógenas y exógenas; actúa como un aceptor terminal de electrones para varias reacciones oxidativas. El NADPH actúa como una fuente primaria de electrones para este sistema. Con estos elementos y en presencia de algún compuesto extraño, se inicia una serie de eventos moleculares. El compuesto se une a la forma oxidada del Cit. P₄₅₀ y forma un complejo, éste es entonces reducido por un electrón donado por el NADPH citocromo c reductasa. El complejo Cit. P₄₅₀-droga reducida reacciona con oxígeno, y ya oxidado acepta un segundo electrón del NADPH o NADH, formándose un complejo "oxígeno activado". Este compuesto se descompone dando la forma oxidada de la droga, el Cit. P₄₅₀ y agua. Los productos de las reacciones de la fase I pueden incluir la formación de epóxidos, radicales libres, azoalcanos y N-óxidos. Estos metabolitos pueden estar implicados

en el desarrollo del daño hepático (32).

Las reacciones de la fase II son esencialmente detoxificantes y se realizan en el citosol destruyendo las propiedades biológicas del compuesto original y sus productos, permitiendo su excreción como glucurónidos, derivados del ácido mercaptúrico y otros conjugados. Las reacciones de esta fase consisten en la conjugación de moléculas que contienen grupos polares con algún grupo endógeno (GSH, UDP del ácido glucurónico, glicina, etc.). Las principales reacciones de conjugación incluyen glucuronidación, metilación, acetilación, síntesis de ácido mercaptúrico, síntesis de tiocianato y conjugación con glicina, sulfato, y glutamina. La naturaleza detoxificante de las reacciones de la fase II es importante, pues como ha sido mencionado, los productos de la fase I son frecuentemente compuestos tóxicos activos o carcinogénicos que cuando no son capturados por alguna de las reacciones de la fase II manifiestan su efecto tóxico (37).

1.1.3.0 Importancia del daño al hígado

El hígado es un órgano que muy frecuentemente se ve afectado por una gran variedad de patologías, directas o indirectas, entre las que pueden citarse los trastornos vasculares, metabólicos, tóxicos, obstructivos y neoplásicos; y en algunos países como el nuestro también se ve afectado por parasitosis y micosis (28). El hígado juega un papel central en el control de la homeostasis metabólica, consecuentemente cualquier lesión hepática alterará los procesos celulares normales y conducirá a varios grados de

disfunción hepatocelular. Puede decirse que todas las enfermedades hepáticas disminuyen la capacidad funcional del hígado, por lo tanto van a conducir a una incapacidad funcional del hombre y en el peor de los casos conducen a la muerte (49). De ahí, que las enfermedades hepáticas constituyan un problema de salud muy importante a nivel mundial y nacional que incapacita o lleva a la muerte a un gran número de personas en edad productiva.

El hígado, debido a su papel primario en el metabolismo y disposición de compuestos está sujeto a daño por una gran cantidad de agentes. Los agentes inorgánicos, los compuestos orgánicos sintéticos y las hepatotoxinas naturales pueden producir daño hepático. De ahí que cualquier agente que produzca daño químico al hígado debe ser estudiado considerando diversos aspectos, es decir, tomando en cuenta la naturaleza del agente hepatotóxico, circunstancias de la exposición, mecanismos para iniciar tales efectos, el carácter del daño, y sobre todo, tomar en cuenta las repercusiones médicas y sociales (75).

1.2.0.0 El Acetaminofén (APAP)

El acetaminofén (paracetamol, N-acetil-p-amino-fenol, 4'-hidroxiacetanilida) es considerado uno de los analgésicos-antipiréticos no narcóticos más seguros cuando es tomado en dosis terapéuticas. Es muy utilizado en casos de migraña, neuralgias, mialgias y dismenorrea, y también en afecciones artríticas y reumáticas. Una de sus ventajas sobre la aspirina, es que no causa irritación o hemorragia gástrica, además en

dosis terapéuticas no baja la actividad de la protrombina (52). Sin embargo, sus efectos antiinflamatorios son débiles, aunque se ha demostrado este tipo de efectos pero con dosis mucho mayores que las requeridas para producir analgesia. El APAP es un inhibidor débil de la biosíntesis de las prostaglandinas, aunque algunas pruebas sugieren que puede ser un inhibidor más efectivo de la ciclooxigenasa del SNC que de otros tejidos. Esto puede explicar en parte su capacidad para reducir la fiebre (una acción central) y para inducir analgesia.

El APAP se absorbe rápidamente y casi totalmente en el tracto gastrointestinal. La concentración plasmática llega al máximo en 30 a 60 minutos, y la vida media plasmática de dosis terapéuticas es de aproximadamente 2 horas. El APAP tiene una distribución relativamente uniforme en casi todos los líquidos corporales. Su unión a las proteínas plasmáticas es variable; del 20 al 50% puede estar ligado en las concentraciones que se encuentran durante la intoxicación aguda. Con dosis terapéuticas puede recuperarse del 90 al 100% de la droga en la orina el primer día. Prácticamente todo el APAP se excreta como sus metabolitos, y la mayor parte se excreta después de la conjugación hepática con ácido glucurónico (60%), ácido sulfúrico (35%) o cisteína (3%); también se han detectado pequeñas cantidades de los metabolitos hidroxilados y desacetilados (26).

El APAP tiene poco efecto sobre la función renal en sujetos normales, sin embargo, reduce el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o cirrosis hepática con ascitis o en aquellos que

sufren una hipovolemia. Efectos similares se producen en pacientes con enfermedad crónica renal. En estas circunstancias, puede precipitarse una insuficiencia renal aguda. Estos efectos parecen reflejar la función de las prostaglandinas renales de mitigar las influencias vasoconstrictoras de la noradrenalina y angiotensina II que resultan de la activación de mecanismos presores (26).

Además de sus efectos hemodinámicos en el riñón, el APAP puede promover la retención de sal y agua por reducción de la inhibición inducida por prostaglandinas de la reabsorción de cloro y la acción de la hormona antidiurética. Esto puede causar edema en algunos pacientes con artritis tratados con APAP. El APAP también promueve una hiperpotasemia aparentemente al suprimir la secreción de renina inducida por prostaglandinas (26).

Sin embargo, como la acción del APAP sobre las prostaglandinas periféricas es pequeña en comparación con otros analgésicos del tipo de la aspirina, su efecto sobre el riñón también es menor.

Debido a su grado de seguridad, este fármaco es muy utilizado incluso más que la aspirina en Europa. Sin embargo, su popularidad ha conducido a un aumento en el número de sobredosis, e incluso se tienen registrados suicidios ocasionados por altas dosis de acetaminofén (52). Una exposición a grandes cantidades de este fármaco en adultos, puede causar varios grados de necrosis hepática, que en los casos más severamente afectados causa daño hepático fulminante que conducen a la muerte (15).

1.2.1.0 Biotransformación

El APAP es biotransformado principalmente en el hígado, mediante reacciones de conjugación con glucurónidos y sulfatos. Una pequeña proporción del fármaco se biotransforma por el Cit. P₄₅₀. Estos metabolitos polares no son tóxicos y se eliminan por el riñón, acompañados de trazas de fármaco no metabolizado. Ambas vías son saturables. El producto de la vía catalizada por el Cit. P₄₅₀ es un metabolito reactivo, la N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), el cual se conjuga con glutatión reducido (GSH), este conjugado posteriormente se transforma en el mercapturato del APAP y es excretado por el riñón (55) [Fig. 2].

Se han propuesto varios mecanismos para la formación del metabolito NAPQI [Fig. 3] (29). El primero involucra la formación de N-hidroxiacetaminofén, durante el metabolismo dependiente del Cit. P₄₅₀ (i). Otro mecanismo sugiere que un epóxido de APAP es formado como resultado del metabolismo del Cit. P₄₅₀ (ii). Una tercera sugerencia de la acción del Cit. P₄₅₀ sobre el APAP, es que por medio de un transportador de electrones se produce un radical libre semiquinona, el cual en presencia de O₂, forma O₂⁻ y H₂O₂ (iii).

1.2.2.0 Mecanismos de hepatotoxicidad

Se ha demostrado que la hepatotoxicidad del APAP depende al menos en parte, de la unión covalente del metabolito reactivo NAPQI a macromoléculas hepáticas, ocasionando necrosis centrilobulillar (33). El GSH juega un papel fundamental en la

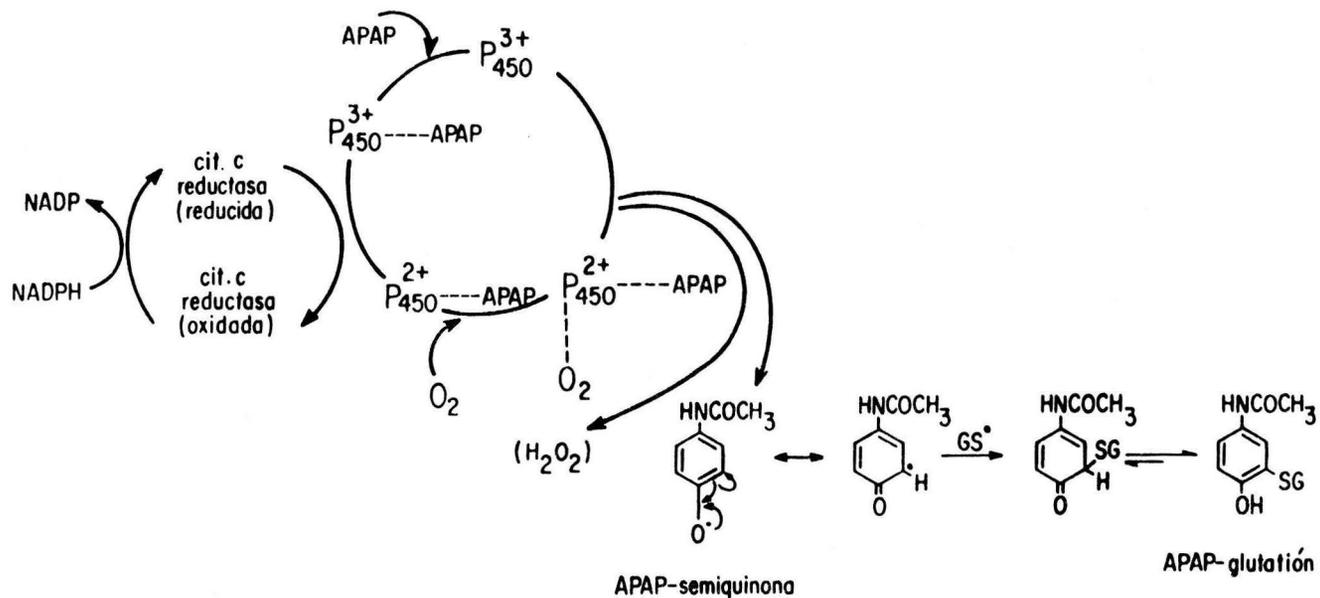


Fig. 2. Modelo propuesto para la biotransformación del acetaminofén. El esquema está basado en una ilustración de Savides C.M. and Oehme W.F. Acetaminofén and its Toxicity. J. of Applied Toxicology 3(2):96, 1983.

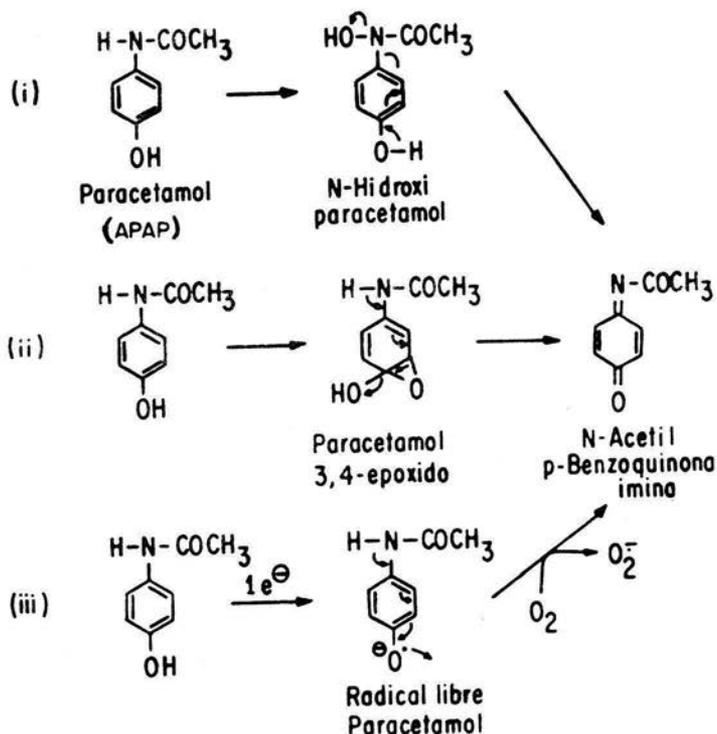


Fig. 3. Mecanismos propuestos para la oxidación del paracetamol (APAP) a N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI).

protección contra el ataque electrofílico del NAPQI a los hepatocitos, ya que para que el daño se presente es necesario que el contenido de GSH hepático disminuya un 70-80% (45). La toxicidad del fármaco es dependiente de la dosis ingerida cuando la cantidad metabolizada a través del Cit. P450 de APAP es grande, la cantidad de NAPQI formado es suficiente para agotar el GSH hepático, por lo que el metabolito que queda libre se une covalentemente a macromoléculas hepáticas ocasionando el daño.

Los centros nucleofílicos más susceptibles que pueden ser atacados por agentes arilados son los grupos sulfhidrilo (SH). Se ha visto que cuando el NAPQI interactúa covalentemente con albúmina de suero, el único sitio que es modificado son los grupos SH de los residuos de cisteína de la proteína (5). Los grupos SH libres juegan un papel crítico en el mecanismo catalítico de una gran variedad de enzimas y la modificación de estos grupos causa la inactivación de las enzimas.

El NAPQI no es sólo un fuerte electrófilo, sino también un potente agente oxidante capaz de oxidar los grupos tioles a puentes disulfuro inactivando a las enzimas dando como resultado la muerte celular (58).

Una de las enzimas que pueden ser inhibidas por la modificación de sus grupos tioles es la ATPasa de Ca^{++} . Se ha demostrado que en células aisladas expuestas a altas concentraciones de APAP se eleva el contenido de Ca^{++} citosólico rápidamente (12). Esta perturbación en los niveles celulares de Ca^{++} juega un papel importante como causa de muerte celular

producida por APAP.

Después de la administración de altas dosis de APAP, el nivel de GSH en el hígado declina ya que es conjugado con la NAPQI. Una vez que el nivel de GSH ha bajado a un 20-30% de su valor normal, el NAPQI aparece unido indiscriminadamente a grupos SH de proteínas inhibiendo las enzimas que causan la muerte celular.

1.2.3.0 Fármacos utilizados para prevenir o revertir el daño producido por la intoxicación con APAP

Los tratamientos orientados a prevenir o revertir los daños causados por la intoxicación con APAP están enfocados principalmente a 1) incrementar el contenido de GSH e 2) inhibir la biotransformación oxidativa en la cual se forma el metabolito reactivo NAPQI.

Como se mencionó anteriormente el GSH es el principal detoxificador en la intoxicación por APAP, así que teóricamente es un excelente antídoto para dicha intoxicación. Desafortunadamente el GSH no puede ser utilizado debido a que tiene una muy mala difusión en los hepatocitos y tendría que darse en dosis masivas para que fuera efectivo (5). Debido a esta dificultad se ha preferido utilizar precursores de GSH y otros tiores, tales como l-cisteína, l-metionina, cistiamina y N-acetil-l-cisteína (NAC) (5, 52), así como el propiltiouracilo (PTU) (58). La administración de sulfato de sodio I.P. reduce significativamente la toxicidad del APAP y una combinación del sulfato con NAC supera el efecto que se obtendría si se dieran

por separado (12).

El hecho de que el NAPQI es el responsable de la toxicidad del APAP se han utilizado diferentes formas capaces de inhibir al sistema de oxidasas de función mixta (MFO), como el piperonil butóxido (PB) (8), el fenitrotión (24), la cimetidina (44), tiamina (51), además de dietas deficientes en proteínas (41).

Lake et. al. (38) reportaron que el ácido l-ascórbico, en combinación con varios compuestos sulfhidrilos inhiben la unión covalente del metabolito del APAP a macromoléculas.

Existe mucha controversia sobre qué tipo de tratamiento es el mejor para contrarrestar la intoxicación por APAP. La NAC es generalmente preferida por su eficacia y por el número limitado de sus efectos secundarios. La NAC es más efectiva si se administra por vía intraperitoneal (I.P.) por su acción inmediata y además porque así se evita el vómito, náuseas y en algunos casos coma, que se presenta si se dá por vía oral (P.O.)

A pesar de que se cuenta con algunas sustancias con efecto favorable en la intoxicación con APAP éstas todavía dejan mucho que desear. La búsqueda de nuevos tratamientos capaces de combatir eficazmente la intoxicación con APAP continúa.

El estudio de otras sustancias, consideradas como hepatoprotectoras en otros modelos de daño hepático tienen probabilidades de ser eficaces en el tratamiento de la intoxicación con APAP, tal es el caso de la silimarina cuyas propiedades se describen a continuación.

1.3.0.0 La Silimarina

1.3.1.0 Generalidades

La silimarina es una mezcla de sustancias extraídas del cardo Silybum marianum (L.) Gaertn. Esta planta pertenece a la familia asteraceae, es decir al grupo de las compuestas. El cardo mariano no debe confundirse con los representantes del género Cardus, ya que no tiene nada en común con estas plantas, es por eso que se le prefiere llamar S. marianum (39).

El extracto obtenido a partir de los granos de la planta es una mezcla de sustancias activas que consta de tres especies moleculares distintas: la silibina, la silidianina y la silicristina. Estas sustancias se caracterizan por poseer flavonoides y ser muy poco hidrosolubles. [Fig.4]

La silibina representa el compuesto más activo de la silimarina, aunque la silidianina y la silicristina presentan actividades cualitativas similares pero son menos potentes (71).

1.3.2.0 Biotransformación

La silimarina es rápidamente conjugada en el hígado con sulfatos y ácido glucurónico. Los conjugados pasan al plasma y a la bilis con una recuperación mayor al 80% de la dosis administrada por vía intravenosa (I.V.). Esto nos señala la existencia de un ciclo enterohepático (39).

1.3.3.0 Propiedades hepatoprotectoras

Vogel fue el primero en demostrar el efecto hepatoprotector

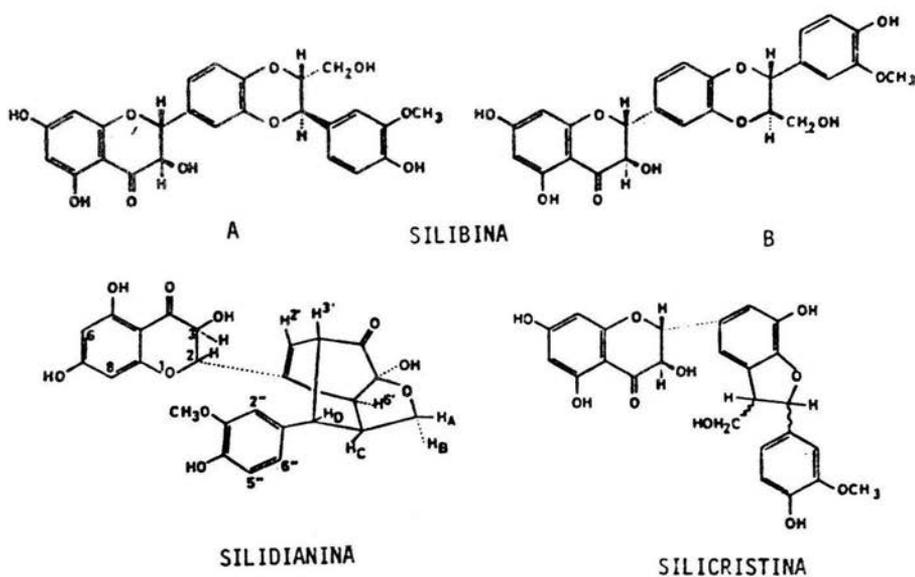


Fig. 4. Especies moleculares presentes en la silimarina. A y B representan 2 isómeros de la silibina. Tomado de Valenzuela A., Guerra, R. and Videla L.A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+) cyanidanol-3: Comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Médica* 438, 1986.

de la silimarina en daño hepático experimental provocado por faloidina. (67-70).

Posteriormente su efecto protector y curativo fue confirmado en animales intoxicados con tetracloruro de carbono (46,47), d-galactosamina (53), etanol (48), fenilhidrazina (62), halotano (54), praseodimio y otros lantánidos (57). También ha sido utilizada en la hepatectomía parcial quirúrgica por favorecer la regeneración hepáticas (40) y en la clínica así como en diferentes tipos de esteatosis y diversas enfermedades hepáticas (21).

En el caso de la regeneración hepática (hepatectomía parcial quirúrgica) la silimarina aumenta desde el segundo y tercer día el peso del hígado con relación a los controles (40). La silimarina previene considerablemente el aumento de la actividad de enzimas séricas causado por la d-galactosamina. Incrementa la conversión de UDP-hexosamina a UDP-acetilhexosamina en el hígado y facilita la normalización del contenido del ácido UDP-glucurónico en el hígado de las ratas (59).

La silimarina y la silibina (el compuesto más activo de la silimarina) son eficaces para prevenir la muerte de perros intoxicados con faloidina (66).

En la intoxicación con alcohol la silimarina normaliza los niveles de GSH, GSSG y la relación entre ambos (60).

Se ha reportado ue la silibina es capaz de mejorar notablemente los efectos tóxicos del halotano en el hígado (54) así como del praseodimio, cerio y lantano. También atenuó el

incremento en la retención de la bromosulfaleína y previno la acumulación de triglicéridos hepáticos inducida por estos agentes (57). En cuanto al mecanismo de acción de la silimarina se sabe poco, sin embargo la mayoría de los autores están de acuerdo en que por lo menos uno de los efectos de la silimarina es a nivel de las membranas (16,46,47).

La acelerada renovación de las membranas durante la administración de silimarina se acompaña de un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina (FA). La hipótesis más probable según Desplaces (16) indica que el cambio en la actividad de la FA se debe a un cambio provocado por la silimarina en las membranas, modificando su estado, posiblemente "estabilizándola". Esto podría llevarse a cabo modificando la composición lipídica, tal vez disminuyendo el cociente colesterol/fosfolípidos, como lo hace la colchicina (73) o normalizando la proporción de fosfolípidos en la membrana plasmática (47).

También se acepta que la silimarina previene o inhibe la lipoperoxidación (4,47). La silibina es un potente inhibidor de la lipoperoxidación del linoleato inducida por sales de hierro (64) y de la lipoperoxidación microsomal iniciada por NADPH-Fe²⁺-ADP (61). Además la silibina protege a los eritrocitos de rata contra la lipoperoxidación inducida por fenilhidrazina y de la hemólisis (63). Otra propiedad protectora de la silimarina y la silibina es su efecto antioxidante (62).

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción de la

silimarina no es del todo conocido. Últimamente se han realizado estudios, los cuales sugieren que la silimarina, posiblemente tiene actividad inmunomoduladora (20). Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para determinar con más precisión el mecanismo de acción de la silimarina.

1.4.0.0 Evaluación de los marcadores de daño hepático

La actividad funcional del hígado y su variedad de respuesta al daño dificulta la selección de los procedimientos apropiados para prevenirlo. La determinación de la actividad de las enzimas hepáticas, liberadas a la sangre durante el daño hepático constituye una de las herramientas más útiles en los estudios de hepatotoxicidad. La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para la determinación del daño hepático fue introducida en 1930 y 1940 con la demostración de la actividad sérica anormal de la fosfatasa alcalina (FA) (50) y colinesterasa (7) en el daño hepático.

Sin embargo, el descubrimiento en 1950 de que la actividad de las diferentes transaminasas séricas estaban aumentadas por destrucción de los tejidos, representa un verdadero avance en los métodos enzimáticos séricos. Subsecuentemente se han identificado en la sangre otras enzimas que se elevan en casos de daño hepático.

Zimmerman (74) ha identificado cuatro categorías principales de enzimas séricas basadas en su especificidad y sensibilidad a los diferentes tipos de daño hepático:

1) Enzimas cuya elevada actividad sérica refleja daño colestático más sensible que daño parenquimatoso, como la FA, 5'-nucleotidasa y gamma glutamil transpeptidasa (GGTP).

2) Enzimas que indican daño en el parénquima hepático producido por un agente citotóxico. Este grupo se ha subdividido en:

a) Enzimas inespecíficas que pueden reflejar daño a tejidos extrahepáticos, como la transaminasa glutámico oxalacética y la lactato deshidrogenasa.

b) Enzimas localizadas principalmente en el hígado, como la transaminasa glutámico pirúvica (TGP).

c) Enzimas que están localizadas casi exclusivamente en el hígado como la ornitina carbamil transferasa y la sorbitol deshidrogenasa. Estas enzimas pueden ser usadas particularmente en el estudio de agentes con potencial hepatotóxico desconocido.

3) Enzimas que son insensibles a daño hepático, pero que se elevan cuando hay daño tejidos extra hepáticos, ejemplo la creatina fosfocinasa.

4) Enzimas que disminuyen su actividad sérica cuando existe daño hepático, como la colinesterasa.

El análisis del potencial hepatotóxico de un agente químico está incompleto si carece de una descripción histológica de la lesión producida. Existen tinciones histológicas específicas que con el empleo de la microscopía de luz constituyen un método tradicional para demostrar y definir el tipo de daño hepatotóxico. Las anomalías bioquímicas observadas en el daño hepático pueden apoyarse con la evidencia de esteatosis o

necrosis. La microscopía de luz sólo proporciona una estimación aproximada para la cuantificación del grado del daño. La demostración de lesiones hepáticas características es un paso clave en el estudio de la toxicidad de diferentes compuestos y su modificación por manipulaciones fisiológicas o farmacológicas (76).

1.5.0.0 Objetivos

Con el fin de aportar información acerca del mecanismo de acción tóxico del APAP y la posible prevención del daño por silimarina nos planteamos los siguientes objetivos:

- * Estudiar el curso temporal de los niveles de GSH y procesos lipoperoxidativos que conducen al daño celular hepático posteriores a la administración de APAP.

- * Evaluar la capacidad hepatoprotectora de la silimarina en la intoxicación con APAP mediante marcadores de daño hepático en el suero y en el hígado de los animales intoxicados.

2.0.0.0 MATERIALES Y METODOS

2.1.0.0 Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (120-160g) con libre acceso a la comida y al agua.

Se hicieron 5 grupos de animales de 5 ratas cada uno. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

Grupo I: Tratamiento con APAP 500mg/kg p.o. suspendido en Carboximetil Celulosa (CMC) al 1%.

Grupo II: Pretratamiento con 3-Metil Colantreno (3-MC) 20mg/kg i.p. 72hr. antes de la administración de APAP 500mg/kg p.o. suspendido en CMC.

Grupo III: Administración de 3-MC y APAP igual que al grupo II, más silimarina 200mg/kg suspendida en CMC 1%, 24h antes de la administración de APAP.

Grupo IV: Control de CMC y 3-MC administrados igual que en el grupo II.

Grupo V: Control de 3-MC y silimarina administrados igual que en el grupo III.

Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos después de la administración de APAP ó CMC, como se indica en el apartado de resultados.

2.2.0.0 Obtención de las muestras y determinación de los marcadores de daño hepático.

2.2.1.1 Suero

Se obtuvo la sangre por punción cardíaca de las ratas

previamente anestesiadas con éter etílico. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de ensayo mantenidos en hielo. La sangre se centrifugó, en una centrifuga Beckman TJ-6 a 1000xg, durante 15 min. a una temperatura de 4 grados centígrados. Posteriormente se procedió a separar el suero con pipetas Pasteur y se colocaron en tubos etiquetados para posteriormente medirles la actividad de las enzimas Fosfatasa Alcalina (FA), Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGTP) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP).

2.2.1.1 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA)

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para obtener fosfato inorgánico y p-nitrofenol el cual se lee a 410 nm (3).

2.2.1.2 Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (GGTP)

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo por los métodos establecidos por Glossman y Neville (25), los cuales implican la obtención de gamma glutamil-p-nitroanilida, y de un receptor gamma glutamilo como lo es la glicilglicina, a través de la actividad de la GGTP.

2.2.1.3 Determinación de la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

La actividad de la enzima TGP se determinó por el método de Reitman-Rankel (36), en el que se mide el complejo formado por

piruvato y 2,4-dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la alanina y el alfa-ceto-glutarato. El complejo colorido de hidrazina absorbe a 532 nm.

2.2.2.0 Muestras de hígado

Para obtener las muestras de hígado los animales se sacrificaron previa anestesia con éter etílico se extrajo la sangre por punción cardíaca para eliminar la mayor cantidad de sangre contenida en el hígado, y éste rápidamente se retiró y se colocó en un vaso sumergido en hielo. Puesto que las muestras de hígado se utilizaron para varias determinaciones, se siguieron diferentes procedimientos para su preparación. Se tomaron muestras para la determinación del grado de lipoperoxidación, el contenido de GSH y el de glucógeno hepáticos.

2.2.2.1 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (6). Este método se basa en la formación de un complejo colorido que resulta de la unión de la proteína con el colorante azul brillante de Coomassie, el cual absorbe a 595nm.

2.2.2.2 Determinación del grado de lipoperoxidación

Para medir el grado de lipoperoxidación se pesan 0.5 g del hígado y se homogenizan en un homogenizador Dounce con émbolo flojo sumergido en un recipiente con hielo. Posteriormente se tomaron las alícuotas respectivas para realizar inmediatamente la determinación mediante formación de un complejo con el ácido

tiobarbitúrico (TBA) (10). Este método se basa en la reacción del malondialdehído (MDA), un producto de la degradación de la lipoperoxidación, con el TBA para producir un cromóforo TBA-MDA, dando como resultado la formación de un producto que tiene un máximo de absorción a 532 nm.

2.2.2.3 Determinación del glutatión reducido (GSH)

Se pesaron 0.3 g del hígado y se homogenizaron con 1.2 ml. de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en EDTA 5 mM. El homogenado se centrifugó 20 min. a 12000 RPM, en un rotor Beckman JA21 y se tomaron alícuotas del sobrenadante para medir el contenido del GSH utilizando la técnica de Ellman (18), la cual se basa en la reacción del GSH con el ácido 5'5-ditiobis-2-nitrobenzoico para formar el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo que absorbe intensamente a 412 nm.

2.2.2.4 Determinación del contenido de glucógeno hepático

Para la determinación del contenido de glucógeno se pesaron 0.5g. del hígado y se colocaron en tubos rotulados. Las muestras se almacenaron congeladas hasta el momento de la determinación del contenido de glucógeno con el reactivo de antrona (22). Este método se basa en la formación de un complejo colorido que resulta de la unión del glúcido con la antrona, el cual absorbe a 620 nm.

2.2.2.5 Estudio histopatológico del hígado

Se realizaron cortes del hígado de aproximadamente 3mm. de

grosor que se colocaron en frascos que contenían formol amortiguado (formol 10% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4), para hacer la técnica histológica y tefir con hematoxilina-eosina, y realizar posteriormente el análisis histopatológico bajo microscopía de luz.

2.3.0.0 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó la prueba de Tukey para comparar los valores a diferentes tiempos con sus respectivos controles. El análisis de la prueba de "t" de Student se usó para comparar el grupo de APAP con el grupo de APAP + silimarina a cada tiempo. En todos los casos se consideró significativa la diferencia cuando $p < 0.05$.

3.0.0.0 RESULTADOS

La administración de APAP a ratas no pretratadas con 3-MC no produjo alteraciones en los indicadores de daño hepático medidos 18 horas después de la intoxicación. Sin embargo el grupo al cual se le indujo el sistema microsomal con el pretratamiento de 3-MC y luego se intoxicó con APAP mostró daño evidente y significativo al compararse con el grupo control normal y con el que sólo recibió APAP. El grupo que recibió únicamente pretratamiento con 3-MC mostró valores similares a los grupos control [Fig. 5].

Debido a que el daño hepático sólo se produjo en ratas pretratadas con 3-MC en todos los experimentos posteriores se pretrataron a los animales con éste inductor del metabolismo.

La Fig. 6 muestra que la administración de APAP no aumentó significativamente el grado de lipoperoxidación hepática en las primeras 3 horas posteriores a la intoxicación. Sin embargo a las 4 y 6 horas se presentó un aumento significativo en los niveles de MDA hepático (indicador de lipoperoxidación) de 3 veces por encima del valor del control. A las 18 horas de la intoxicación con APAP, el grado de lipoperoxidación disminuyó hasta alcanzar niveles semejantes al control. Posteriormente, a las 24 horas se observó un nuevo incremento de los niveles de MDA hepático, este último fue menor al que se presentó a las 4 y 6 horas. En la misma figura se observa claramente que la silimarina previno significativa y totalmente el aumento del grado de lipoperoxidación producido por el APAP a todos los tiempos estudiados.

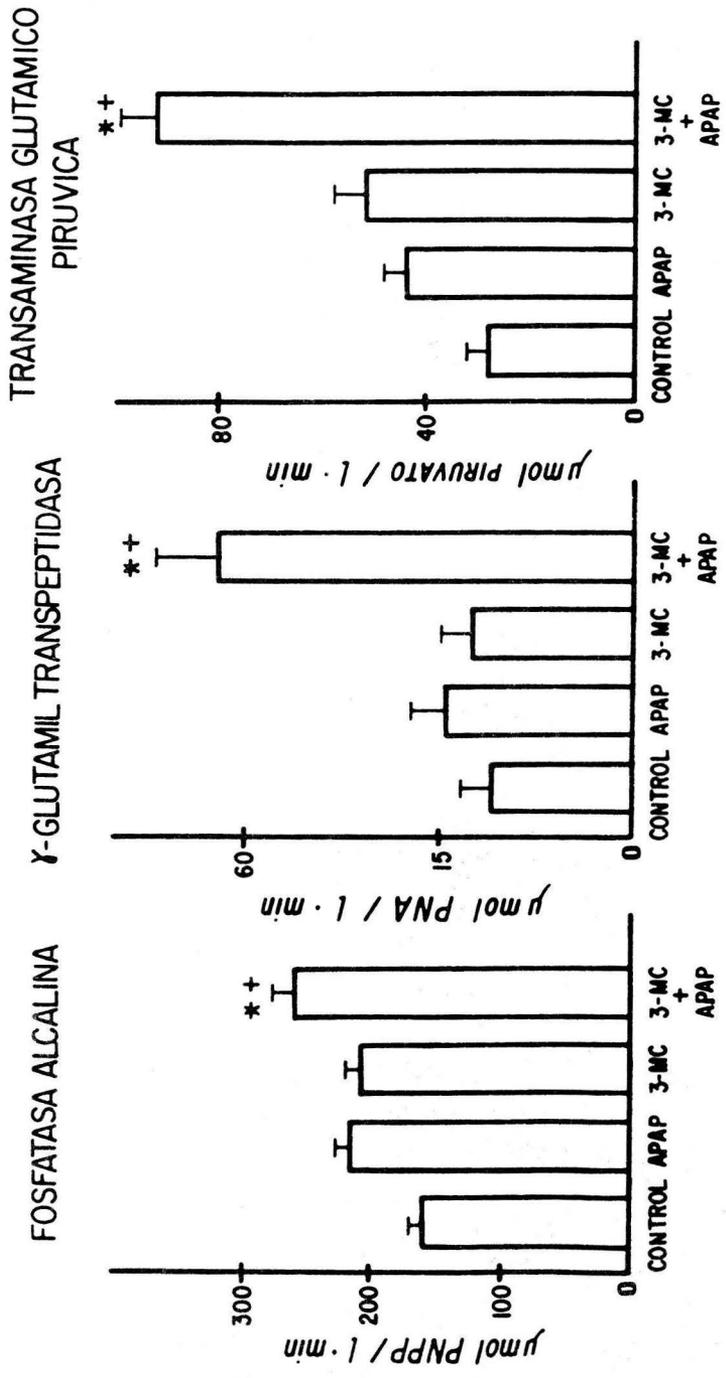


Fig. 5. Actividad de la fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa y transaminasa glutámico pirúvica, medida en suero de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y ratas que recibieron un pretratamiento con 3-MC (20 mg/kg) i.p. 72 horas antes de la administración de APAP. Las ratas se sacrificaron a las 18 horas después de la administración del APAP. Los resultados se muestran como la media de 5 ratas ± E.E.M. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. *

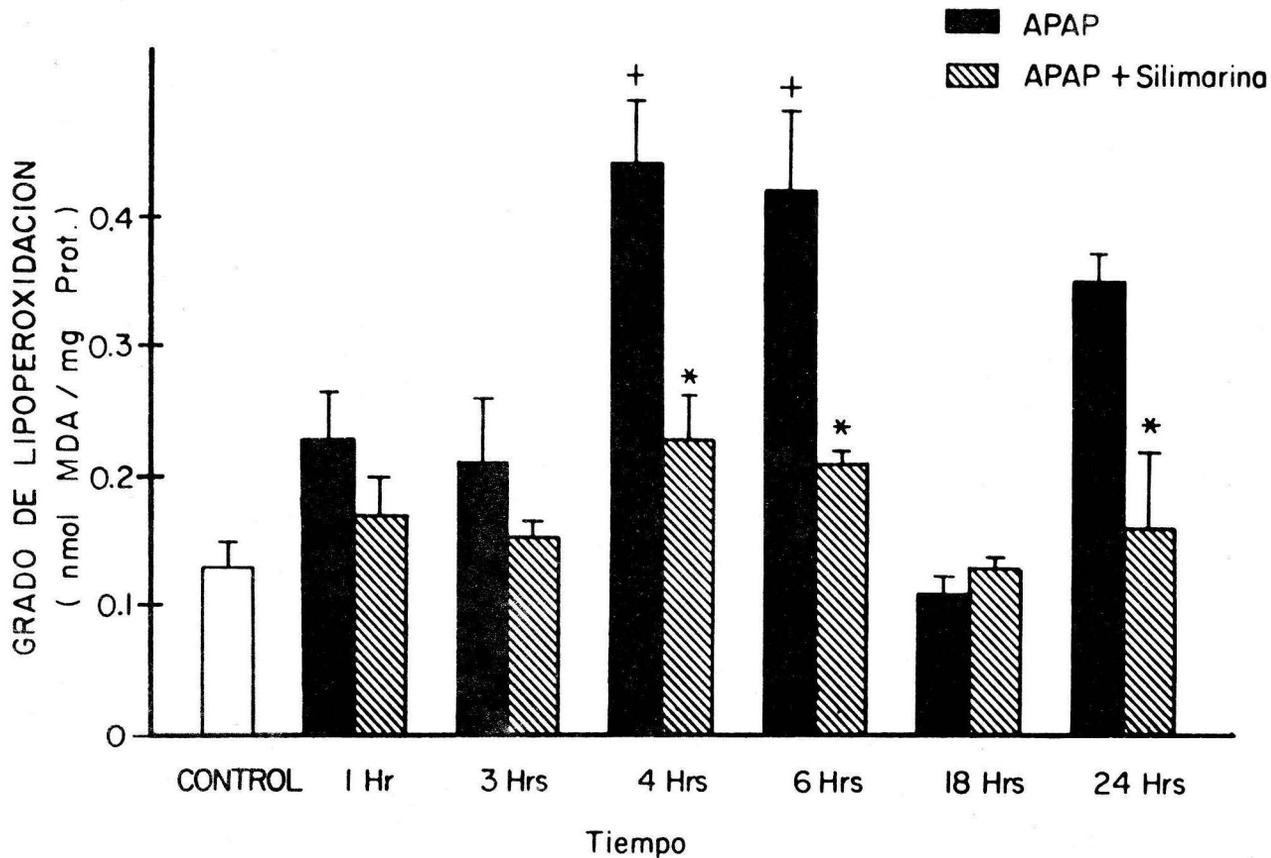


Fig. 6. Grado de lipoperoxidación hepática en homogenados de hígado de ratas tratadas con APAP (50 mg/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) p.o. administrada 24 horas antes del APAP. Las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas después de la administración del APAP. Los resultados se muestran como la media de 5 ratas \pm E.E.M. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. * Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

El APAP disminuyó los niveles de GSH hepático [Fig. 7] aproximadamente un 60-70% desde la primera hora, con respecto al grupo control y los niveles de GSH hepático se mantuvieron bajos hasta la sexta hora. A las 18 horas el contenido de GSH hepático mostró valores de aproximadamente 2 veces el valor del control, y se mantuvieron altos hasta las 24 horas. Este incremento se considera un efecto de "rebote" debido a los niveles tan bajos de GSH hepáticos en las primeras horas. La administración de silimarina previa a la intoxicación con APAP, no produjo ningún cambio en los niveles de GSH de la primera hasta la sexta hora comparados con los grupos que sólo recibieron APAP. Sin embargo, el aumento observado a las 18 y 24 horas fue estadísticamente menor en el grupo protegido con silimarina con respecto a los valores obtenidos en el grupo que sólo recibió APAP.

El GSH en sangre se mantuvo dentro de los límites normales en todos los grupos (no se muestra).

En la Fig. 8 se muestra que el contenido de glucógeno hepático disminuyó un 60% desde la primera hora de la intoxicación con APAP y a las 4 horas se presentaron niveles más bajos en el contenido de glucógeno (80% por debajo de los niveles del control). A partir de este momento, las cantidades de glucógeno aumentaron gradualmente pero no alcanzaron niveles normales. El valor más alto se presentó a las 24 horas donde se alcanzó el 60% del valor normal. El pretratamiento de silimarina no mejoró la caída del contenido de glucógeno hepático inducido por APAP desde la primera hasta la sexta hora. Sin embargo, este

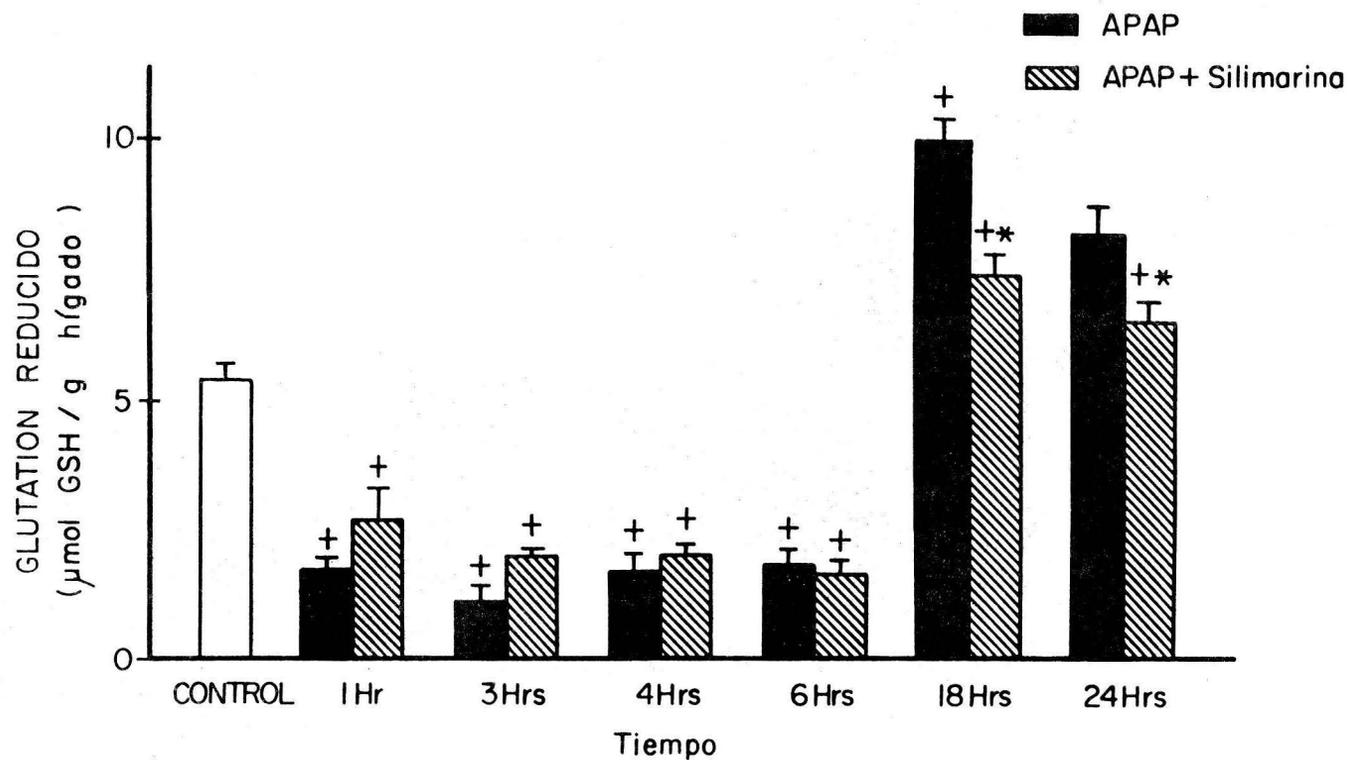


Fig. 7. Contenido de glutati3n reducido hep3tico de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) p.o. Las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas despu3s de la administraci3n de APAP. Los resultados se expresan como la media de 5 ratas \pm E.E.M. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. * Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

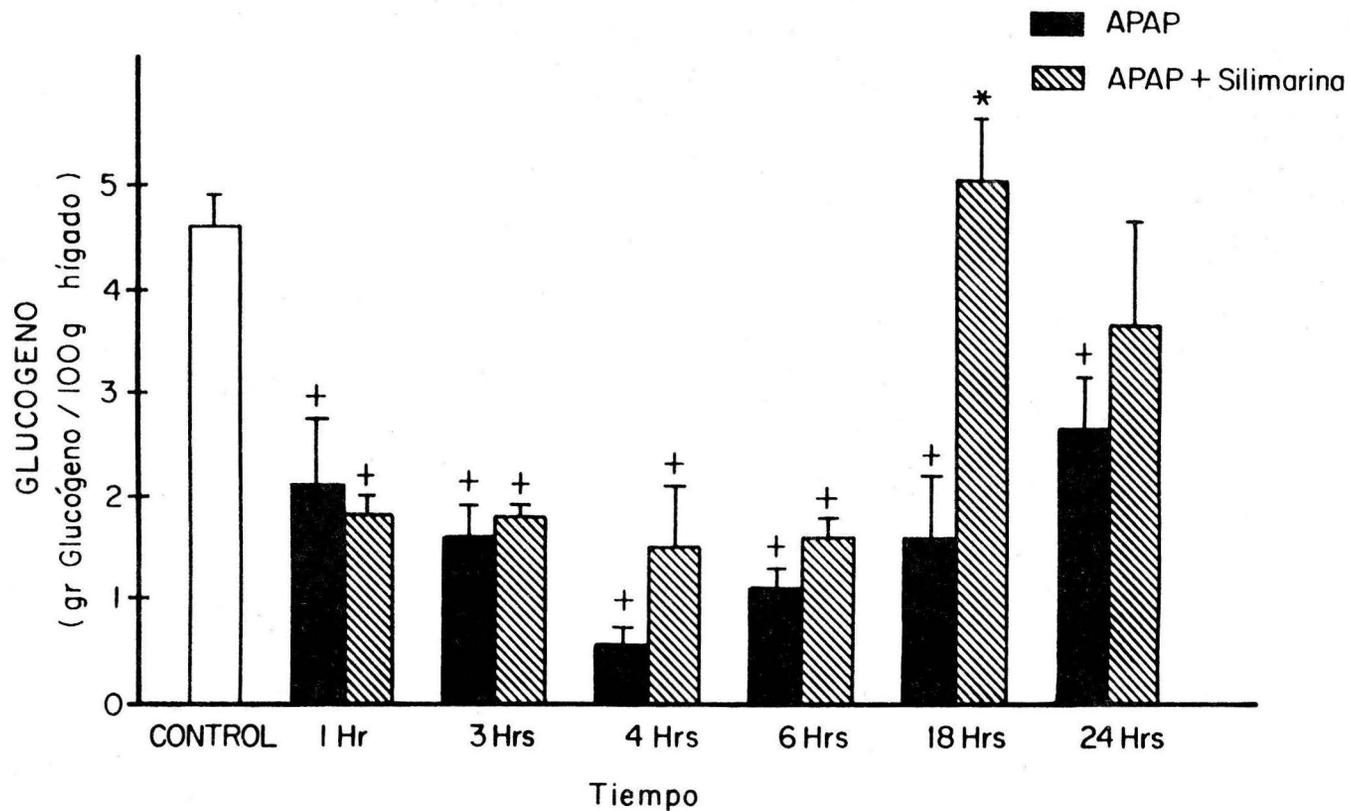


Fig. 8. Contenido de glucógeno de hígado de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) p.o. Las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas después de la administración de APAP. Los resultados se expresan como la media de 5 ratas \pm S.E.M. ⁺ Significa $p < 0.05$ v.s. control. ^{*} Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

flavonoide fue capaz de reestablecer totalmente el contenido de glucógeno a las 18 y 24 horas después de la administración de APAP.

Al evaluar los marcadores séricos de daño hepático, la Fosfatasa Alcalina (FA) [Fig. 9], la Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGTP) [Fig. 10] y la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) [Fig. 11]; se encontró un comportamiento similar en las tres enzimas. En las primeras 6 horas posteriores a la intoxicación con APAP no se presentaron modificaciones en las actividades enzimáticas séricas los grupos tratados con 3-MC + APAP y de silimarina únicamente. Sin embargo a las 18 horas de la intoxicación se observó un incremento marcado en la actividad de estos tres indicadores de daño, manteniéndose elevados hasta las 24 horas. En los grupos pretratados con silimarina se presentó una prevención total en el aumento de la actividad enzimática de la FA, la GGTP y la TGP, producido por el APAP a las 18 y 24 horas.

La silimarina por sí misma no modificó ninguno de estos parámetros.

La Fig. 12 nos muestra un corte de hígado de rata control teñido con hematoxilina-eosina donde se aprecia la arquitectura lobular normal del hígado. En la Fig. 13 podemos apreciar que 18 horas después de la administración de APAP el hígado presenta áreas de necrosis y una cantidad elevada de células inflamatorias. En los corte de los hígado de las ratas pretratadas con silimarina [Fig. 14] se apreció un parénquima hepático con pequeñas áreas de necrosis.

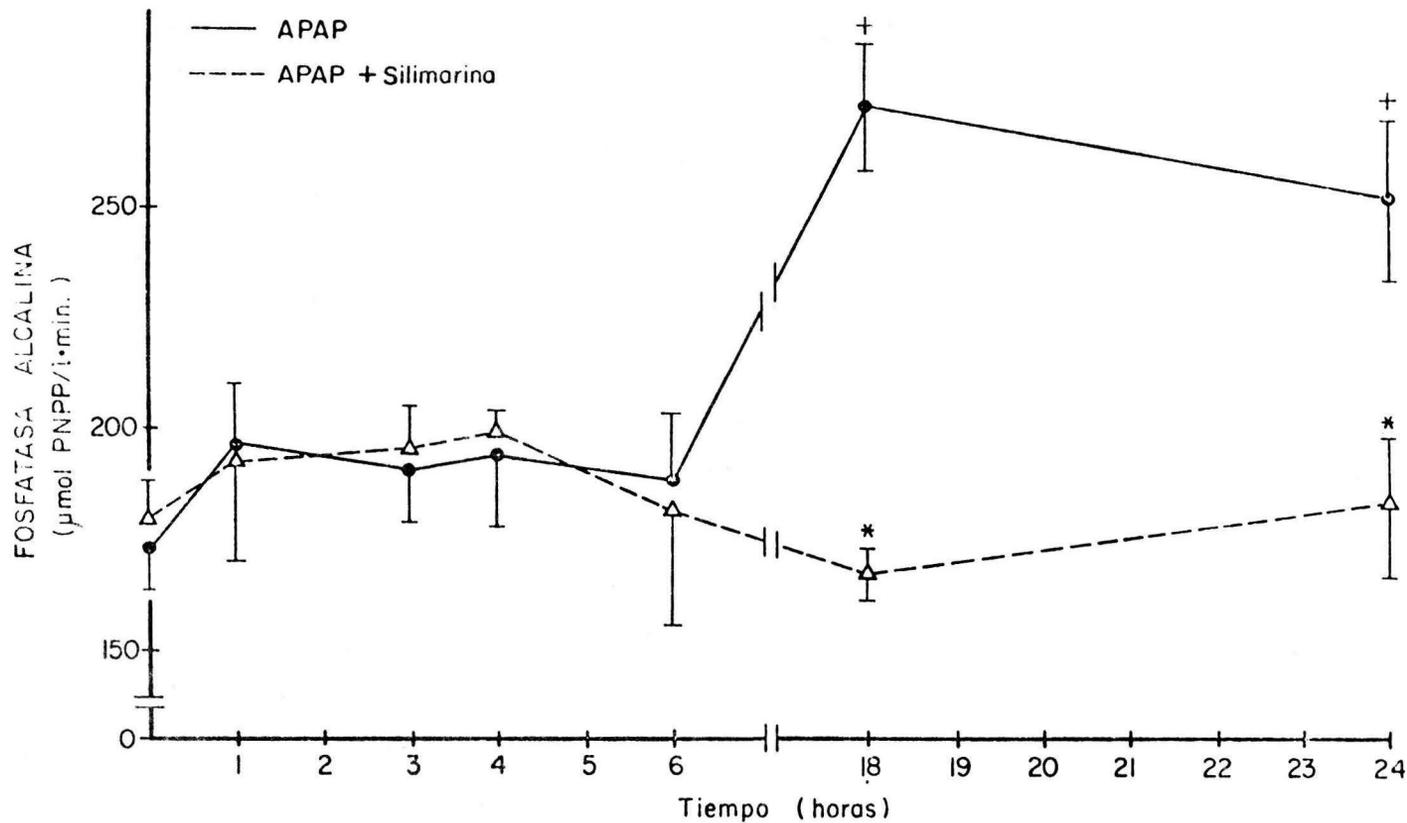


Fig. 9. Actividad de la fosfatasa alcalina sérica de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) p.o. Las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas después de la administración de APAP. Los resultados se muestran como la media de 5 ratas ± E.E.M. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. * Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

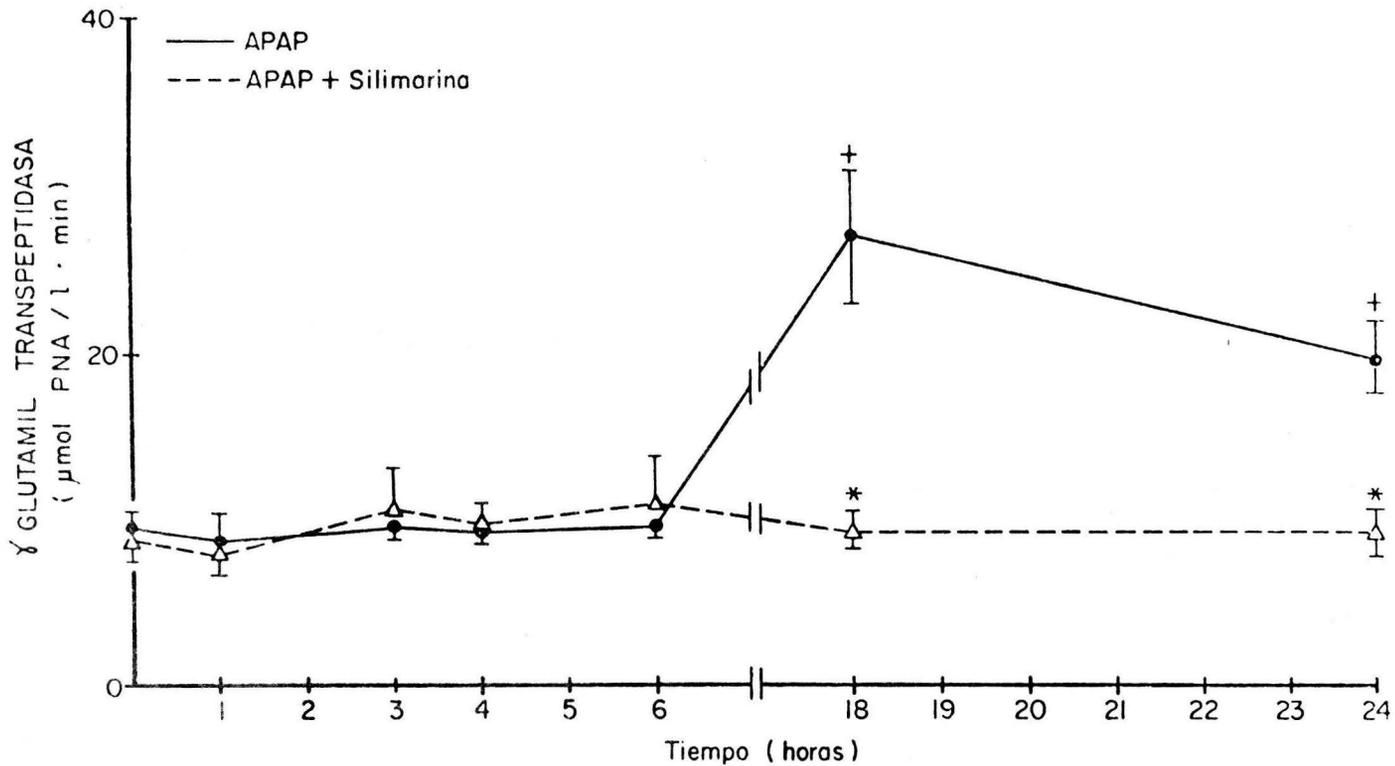


Fig. 10. Actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa sérica de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y silimorino (200 mg/kg) p.o. las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas después de la administración de APAP. Los resultados se muestran como la media de 5 ratas \pm E.E.M. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. * Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

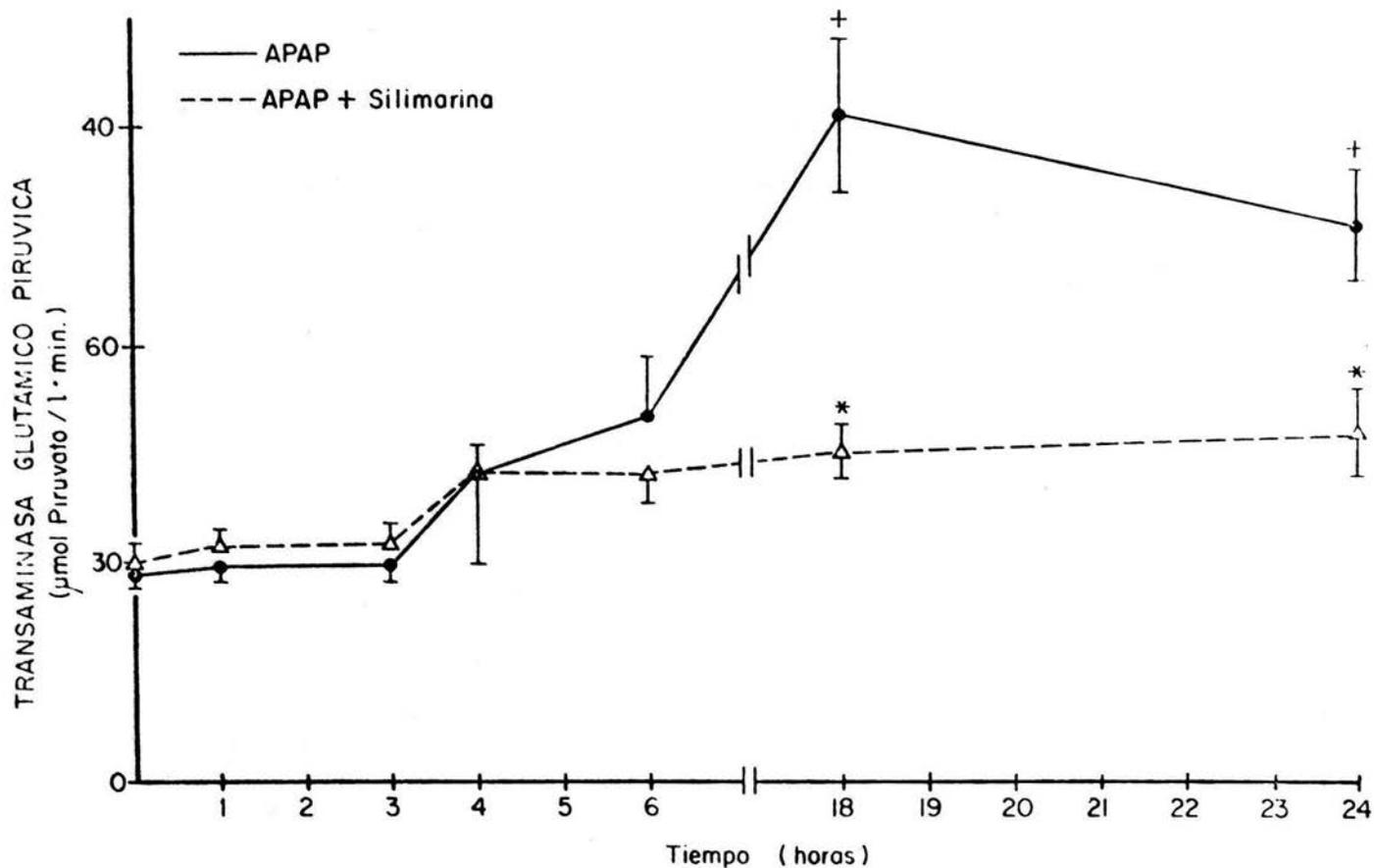


Fig. 11. Actividad de la transaminasa glutámico pirúvica de ratas tratadas con APAP (500 mg/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) p.o. Las ratas se sacrificaron 0, 1, 3, 4, 6, 18 y 24 horas después de la administración de APAP. Los resultados se muestran como la media de 5 ratas \pm I.E.E. + Significa $p < 0.05$ v.s. control. * Significa $p < 0.05$ v.s. APAP.

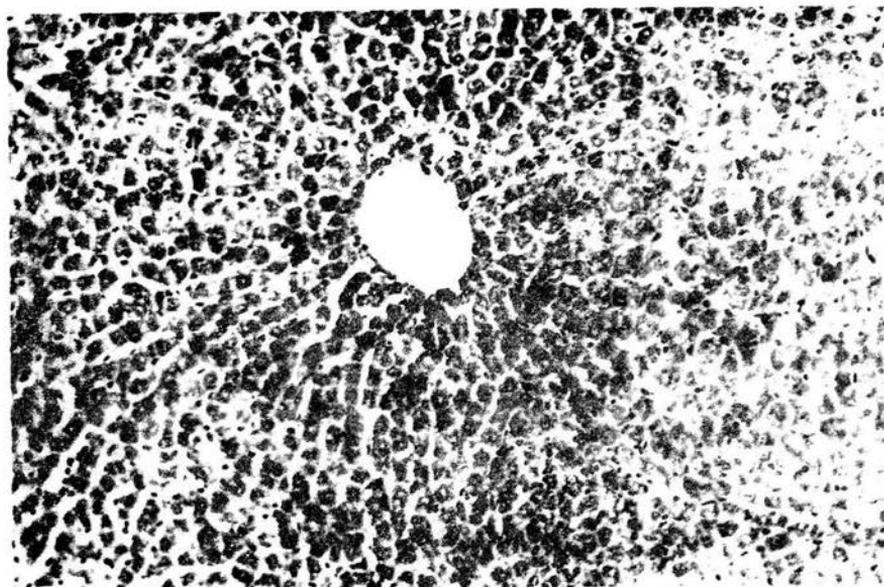


Fig. 12. Tinción de hematoxilina-eosina de un corte de hígado de rata control.

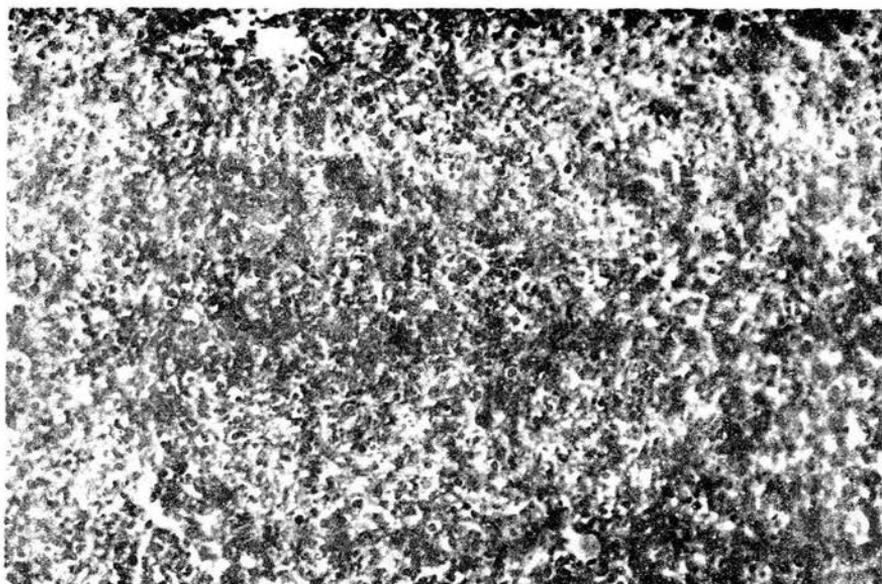


Fig. 13. Tinción de hematoxilina-eosina de un corte de hígado de rata tratada con APAP (500 mg/kg) p.o. y pretratada con 3-MC (20 mg/kg) i.p. sacrificada a las 18 horas después de la intoxicación.

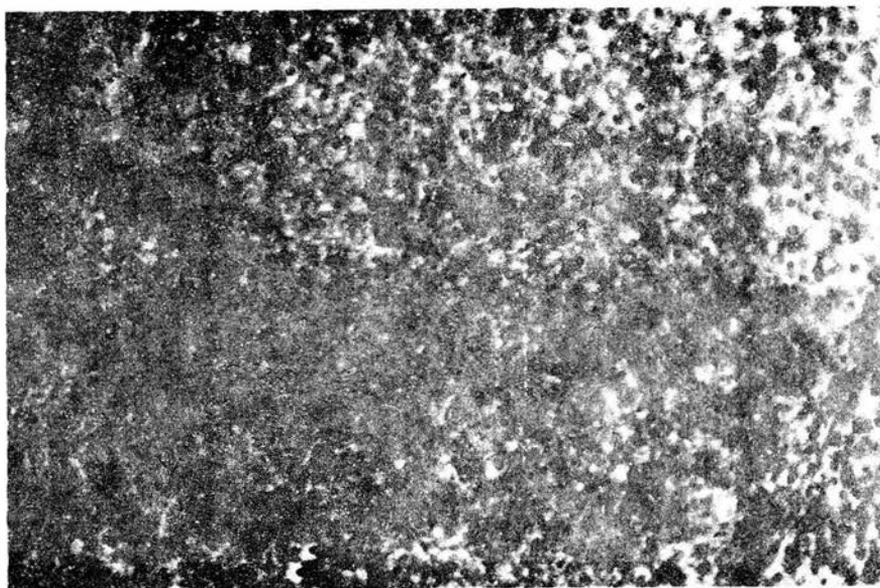


Fig. 14. Tinción de hematoxilina-eosina de un corte de hígado de rata tratada con APAP (500 mg/kg) p.o. y pretratada con 3-MC (20 mg/kg) i.p. y silimarina (200 mg/kg) p.o. sacrificada a las 18 horas después de la intoxicación con APAP.

4.0.0.0 DISCUSION

El APAP es considerado como uno de los analgésicos antipiréticos más seguros si se ingiere en dosis terapéuticas. Cuando se ingieren sobredosis (>10g) es capaz de producir daño hepático severo caracterizado por necrosis centrilobulillar. En general sobredosis mayores de 15g resultan letales en el hombre (52).

El conocimiento del mecanismo fisiopatológico del APAP es útil para implementar una terapéutica adecuada para los intoxicados. El presente estudio aporta información sobre el mecanismo de toxicidad del APAP y además de la capacidad hepatoprotectora de la silimarina en la intoxicación con este analgésico.

Al analizar los resultados encontramos que para producir daño hepático en la rata con 500 mg/kg de APAP p.o. es necesario inducir el metabolismo microsomal. En este trabajo se utilizó el 3-MC con este fin pero resultados semejantes se obtienen estimulando el metabolismo con fenobarbital (34). Estos resultados confirman que la toxicidad del fármaco depende de su metabolismo por el sistema enzimático del Cit. P₄₅₀ (34,44).

Debido a que no todos los animales tratados con APAP son susceptibles al tóxico en este trabajo sólo se analizaron los datos de los animales que fueron sensibles a la acción tóxica del fármaco.

También se encontró que a las 18 horas de la administración

aguda de APAP, se presenta un máximo en los marcadores séricos de daño hepático (FA, GGTP y TGP). Asimismo puede apreciarse que el pretratamiento con silimarina previno totalmente el incremento producido por el APAP en estos marcadores de daño.

La silimarina no fue capaz de prevenir la disminución en el contenido de glucógeno producida en las primeras horas después de la intoxicación con APAP. En general se ha visto que la pérdida de glucógeno ocurre en respuesta a alteraciones fisiológicas aún no muy severas y que es difícil de prevenir. Sin embargo, a las 18 horas de la intoxicación, el glucógeno permaneció bajo en el grupo que sólo recibió APAP, pero mostró valores normales en el grupo que recibió APAP + silimarina indicando una protección total. Estos resultados bioquímicos fueron corroborados por el análisis histopatológico de cortes de hígado de ratas de los diferentes grupos.

El mecanismo hepatotóxico del APAP se ha atribuido principalmente al enlace covalente del metabolito reactivo NAPQI a proteínas. La unión del NAPQI a proteínas hepáticas se ha confirmado mediante técnicas de detección inmunoquímicas tanto en experimentos in vitro como in vivo (1,2) y la unión se observó particularmente en los grupos SH de las proteínas (43).

El GSH es considerado como la biomolécula más importante que protege contra la citotoxicidad inducida por muchos xenobióticos. El GSH participa en la eliminación de xenobióticos reactivos mediante reacciones de conjugación en la reducción de hidroperóxidos y como un atrapador directo de radicales libres

(11).

Como ya se mencionó, el APAP se conjuga con el GSH y así se elimina. Cuando se consume un 60-70% del GSH se observa daño tisular. Los resultados aquí presentados muestran que al administrar APAP en ratas pretratadas con 3-MC los niveles de GSH disminuyeron aproximadamente entre un 60-80% entre la primera y la sexta hora después de la intoxicación. Estos resultados confirman lo reportado en la literatura (5,11,14,52).

En el modelo de daño utilizado en nuestros experimentos a las 18 horas después de la intoxicación con APAP se observó el máximo daño evidenciado por los marcadores medidos. El GSH mostró un efecto bifásico ya que después de la caída se elevó sobrepasando los niveles normales.

Se sabe que el hígado puede sintetizar rápidamente grandes cantidades de GSH para prevenir el daño celular, ya que se ha encontrado que la cantidad de metabolitos formados por los conjugados de GSH pueden exceder varias veces la cantidad inicial de GSH presente en el hígado (69). Este efecto se ha comprobado usando dietil maleato, un agente capaz de agotar la concentración de GSH. Después del tratamiento con dietil maleato, la velocidad de síntesis del GSH aumenta. Otros compuestos que también agotan al GSH son la furona y el 2-ciclohexona-1-ona y sus efectos sobre los niveles del GSH también muestran un rápido incremento en la síntesis de GSH después de su consumo. Este efecto está relacionado al hecho de que el glutati6n regula su biosíntesis por inhibici6n de retroalimentaci6n (42).

Por otro lado, el incremento en la actividad de la GGTP en suero después de la intoxicación con APAP nos indica que esta enzima se ha liberado de la membrana de los hepatocitos. Tomando en cuenta que la GGTP constituye el primer paso en el proceso de degradación del GSH, una disminución en la actividad de esta enzima en la membrana conduciría a un aumento en el contenido hepático de GSH. Debido a lo anterior se explicarían los altos niveles del tripéptido a las 18 y 24 horas después de la intoxicación.

La acción hepatoprotectora de la silimarina contra xenobióticos distintos del APAP que también inducen un consumo considerable del GSH ha sido previamente descrita (62,65). Se ha sugerido que la silimarina es capaz de incrementar el contenido de GSH hepático cuando se administra por vía I.P. (11). Sin embargo, en el modelo experimental de este estudio la silimarina no aumentó los niveles de GSH y tampoco previno su disminución inducida por el APAP.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los de McLean *et.al.* (17), quienes encontraron en un modelo *in vitro* que algunos flavonoides no incrementan los niveles de GSH ni previenen su disminución pero que sin embargo protegen a las células del daño por APAP. Ellos también observaron que los flavonoides protegían sin interferir con la unión covalente del fármaco, sugiriendo que estos compuestos no actúan inhibiendo el metabolismo o la unión del metabolito reactivo a macromoléculas.

Se puede concluir que el consumo de GSH (este trabajo) y la unión covalente del metabolito (17) no son causas suficientes

para provocar la muerte celular. No obstante la silimarina bloquea en alguna parte la secuencia de pasos que terminan en la muerte celular.

Existe una gran controversia sobre el papel que juegan los procesos lipoperoxidativos en los mecanismos de muerte celular. Muchos compuestos que pueden causar daño letal a las células son primeramente metabolizados a radicales libres electrofilicos. Se ha sugerido que los radicales libres inician el daño peroxidativo en los lípidos de las membranas. En estas reacciones los radicales libres interactúan con ácidos grasos poliinsaturados para formar lipoperoxiradicales (ROO^{\cdot}) que a su vez producen lipohidroperóxidos ($ROOH$) y nuevamente radicales lipoperóxidos. A esta sucesión de eventos se le llama "cascada peroxidativa" y lleva a que se consuman muchos lípidos de la membrana provocando un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática y finalmente la muerte celular (5).

La génesis de lipoperóxidos no es el único factor derivado de la intoxicación con APAP. Algunos autores afirman que la lipoperoxidación es una consecuencia de la intoxicación aguda (72), pero otros niegan la existencia de un "stress" peroxidativo como la única causa que produce la droga en ratas alimentadas (56). Los resultados de este trabajo muestran claramente que la intoxicación con APAP está asociada con un incremento significativo de sustancias que reaccionan con TBA para formar MDA. Fairhurst *et.al.* (19) indujeron un aumento de la formación lipoperóxidos, en un sistema *in vitro* usando

mitocondrias de hígado de rata incubadas con APAP. En este experimento se observó que cuando los niveles de GSH alcanzan un mínimo se hace evidente el daño causado por los lipoperóxidos que no son captados endógenamente por el GSH.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los de Fairhurst, quien observó un aumento en la formación de lipoperóxidos al disminuir los niveles de GSH. En el grupo que recibió silimarina + APAP la lipoperoxidación no ocurrió a pesar de la disminución del nivel de GSH hepático. Estos resultados sugieren fuertemente que el mecanismo hepatoprotector de la silimarina en la intoxicación con APAP, se debe a su capacidad para prevenir el daño peroxidativo aun cuando se haya agotado el GSH. Es probable que actúe como un atrapador de radicales libres protegiendo a las membranas en general.

La capacidad de la silimarina para "estabilizar las membranas" puede ser la responsable de la mejoría tisular, evitando la salida de las enzimas citosólicas o la liberación de las enzimas membranales a la sangre. Investigaciones posteriores deberán enfocarse al estudio de la actividad de la glutatió-S-transferasa ya que otros antioxidantes (30) actúan a ese nivel incrementando el potencial reductor del GSH.

5.0.0.0. BIBLIOGRAFIA

1. Bartolone, J., Beierschmitt, W., Birge, R., Emeigh, S., Wyand, S., Cohen, S. and Khairallah, E. Selective acetaminophen metabolite binding to hepatic and extrahepatic proteins: An *in vivo* and *in vitro* analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99:240, 1989.
2. Bartolone, J., Sparks, K., Cohen, S. and Khairallah, A. Immunochemical detection of acetaminophen-bound liver proteins. *Biochem. Pharmacol.* 36(8):1193, 1987.
3. Berger, L. and Rudolph, G.N. Alkaline and acid phosphatase. *Standard Methods of Clinical Chemistry*. Vol. 5, Ed. Meites, Academic Press, 1963.
4. Bindoli, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N. Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 26:2405, 1977.
5. Boobis, A.R., Fawthrop, D.J. and Davies, D.S. Mechanisms of cell death. *TIPS* 10:275, 1989.
6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248, 1976.
7. Brauer, R.W. and Root, M.A. The effect of CCl_4 induced liver injury upon the acetylcholine hydrolyzing activity of blood plasma of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 88:109, 1946.
8. Brady, J.T., Montelius, D.A., Beierschmitt, W.P., Wyand, D.S., Khairallah, E.A. and Cohen, S.D. Effect of piperonyl butoxide post-treatment on acetaminophen hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 37(10):2097, 1988.
9. Bucher, M.L.R. and Swaffield, M.N. Rate of incorporation of labeled thymidina into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to amount of liver excised. *Cancer Res.* 24:1611, 1964.
10. Buege, J.A. and Austin, S.D. *Methods in Enzymology* [30] LII, 302, 1978.
11. Campos, R., Garrido, A., Guerra, R. and Valenzuela, A. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Medica* 55:417, 1989.

12. Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. **Ann. Rev. Biochem.** 56:395, 1987.
13. Charles, L., Witte, M.D. and Marlys, H. Hepatic circulation. **The Liver. Normal and abnormal functions. Part A.** Edited by Frederick, F. Becker, 1974.
14. Davis, D.C., Potter, W.Z., Jollow, D.J. and Mitchell, J.R. Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. **Life Sci.** 14(11):2099, 1974.
15. Davis, M., Simmons, C.J., Harrison, G.N. and Williams, R. Paracetamol overdose in man: relationship between pattern of urinary metabolites and severity of liver damage. **Q.J. Med.** 45(178):181, 1976.
16. Desplaces, A. et al. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. **Drug Res.** 25(1):89, 1975.
17. Devalia, J.L., Ogilvie, R.C. and McLean A.E.M. Dissociation of cell death from covalent binding of paracetamol by flavones in a hepatocyte system. **Biochem. Pharmacol.** 31(23):3745, 1982.
18. Ellman, R.L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 82:70, 1959.
19. Fairhurst, S., Barber, D.J., Clark, B. and Horton, A.A. Studies on paracetamol-induced lipid peroxidation. **Toxicol.** 23:249, 1982.
20. Fehér, J., Cornides, A., Pál, J., Láng, I. and Csomós, G. Liver cell protection in toxic liver lesion. **Acta Physiol.** 72(1-3):285, 1989.
21. Fintelmann, V. Zur therapie der fettleber mit silymarin. **Theraplewoche** 20:23, 1970.
22. Fong, I., Schoffner, F.C. and Kerk, P. The ultramicrodetermination of glycogen in liver. A comparison of the anthrone and reducing sugar methods. **Arch. Bioch. Bioph.** 45:319, 1953.
23. Ganong, W.F. **Manual de Fisiología Médica.** 5a. Ed. El Manual Moderno, 1976.
24. Ginsberg, G.L., Placke, M.E., Wyand, D.S. and Cohen, S.D. Protection against acetaminophen-induced hepatotoxicity by prior treatment with fenitrothion. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 66:383, 1982.
25. Glossmaun, M. and Neville, D.M. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. **FIBS Letters** 19(4):340, 1972.

26. Goodman, G.A., Goodman, S.L., Rall, W.T. and Murad, F. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Panamericana. 7a. ed. pp. 659-661, 1986.
27. Hans, E. and Sherrick, J.C. *Morphology of the liver*. Ed. Academic Press, 1969.
28. Harrison, T.R. *Principles of internal medicine*. 6a. ed. Ed. McGraw-Hill Book Company, 1978.
29. Horton, A.A. and Fairhurst, S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 18(1):27, 1987.
30. Huang-Chen, L. and Amy-Shiau, Ch. Induction of glutathione-S-transferase activity by antioxidants in hepatocyte culture. *Anticancer Res*. 9:1069, 1989.
31. Jenner, P. and Test, B. Concepts in drug metabolism. Part A, vol. 10 Ed. Marcel Dekker Inc., 1980.
32. Jenner, P. and Test, B. Concepts in drug metabolism. Part B, Vol. 10. Ed. Marcel Dekker Inc., 1980.
33. Jollow, D.J., Mitchell, J.R. et. al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187:195, 1973.
34. Jollow, D.J., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Hashimoto, M. and Mitchell, J.R. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacol.* 12:251, 1974.
35. Jones, A.L. y Mills, E.S. Hígado y vesícula biliar. Greep, R.D. and Weiss, J. *Histología*. 3a. ed. Ed. El Ateneo, 1978.
36. King, J. *Enzimología Clínica Práctica*. Ed. Acribia, 1968.
37. La Du, M.D. and Mandel H.G. *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*. Ed. Williams and Wilkins C, 1971.
38. Lake, G.F., Harris, R.A., Phillips, J.C. and Gangolli, S.D. Studies on the effects on L-ascorbic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity. 1. Inhibition of the covalent binding of acetaminophen metabolites of the hepatic microsomes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60:229, 1981.
39. Lecomte, J. Les propriétés pharmacologiques de la silibine et de la silymarine. *Revue Médicale de Liegl*. 30(4):104, 1975.
40. Maglulio, E., Carosi, P.G., Minoli, L. and Gorinis, T. *Drug Res*. 23:161, 1973.
41. McLean, E.M. and Day, P.A. The effect of diet on the

- toxicity of paracetamol and the safety of paracetamol methionine mixture. *Biochem. Pharmacol.* 24(1):37, 1975.
42. Meister, A. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. *Methods in enzymology*, vol 113. Academic Press. Inc. 1985.
 43. Mitchell, J.R., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Jollow, D.J. and Keiser, H. Acetaminophen-induced hepatic injury: Protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16(4):676, 1974.
 44. Mitchell, M.C., Schenker, s., Avant, G.r. and Speeg, K.V. Cimetidine protects against acetaminophen hepatotoxicity in rats. *Gastroenterology* 81:10052, 1981.
 45. Mitchell, J.R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187:211, 1973.
 46. Mourelle, M., Muriel, P., Favari, L. and Franco, T. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fund. Clin. Pharmacol.* 3:183, 1989.
 47. Muriel, P. and Mourelle, M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J. Appl. Toxicol.* En prensa. 1990.
 48. Platt, D. und Schnorr, B. Biochemische und elektronenoptische untrsuchungen sur frage der beeinflussbarkeit der aethanol-schadigung der rattenleber durch silymarin. *Arzneim-Forsch (Drug Res.)*. 21:1206, 1971.
 49. Robbins, H.A. *Patologia estructural y funcional*. 4a. ed. Ed. Interamericana, 1976.
 50. Roberts, W.M. Blood phosphatase and the Van Den Bergh reaction in the differentiation of the several types of jaundice. *Br. Med. J.* 1:734, 1933.
 51. Ruchirawat, M., Aramphongphan, A., Tanphaichitr, V. and Bandittanukool, W. The effect of thiamine deficiency on the metabolism of acetaminophen (paracetamol). *Biochem. Pharmacol.* 30(14):1901, 1981.
 52. Savides, C.M. and Oehme, W.F. Acetaminophen and its toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 3(2):96, 1983.
 53. Schriewer, H. and Rauen, H.M. Die antihepatotoxische wirkung von parenteral verabreichern silymarin bei der galactosamin-hepatitis der ratte. *Arzneim Forsch (Drug Res.)* 23:159, 1973.
 54. Siegers, C.P., Fruhling, a. and Younes, M. Influence of dithiocarb, (+)-catechind and silybine on halotane

- hepatotoxicity in the hypoxic rat model. *Acta. Pharmacol. et Toxicol.* 53:125, 1983.
55. Slattery, J.T. and Levy, G. Acetaminophen kinetics in acutely poisoned patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 25(2):184, 1979.
 56. Smith, C.V. and Mitchell, J.R. Acetaminophen hepatotoxicity in vivo is not accompanied by oxidant stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133(1):329, 1985.
 57. Strubelt, O., Siegers, C.P. and Younes, M. The influence of silybine on the hepatotoxic and hypoglycemic effects of praseodymium and other lanthanides. *Drug Res.* 30(10):1960, 1980.
 58. Tee, L.B.G., Boobis, A.R., Huggett, A.C. and Davies, D.S. Reversal of acetaminophen toxicity in isolated hamster hepatocytes by dithiothreitol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83:294, 1986.
 59. Tyutyukova, N. et al. Hepatoprotective effect of silymarin (carsil) on liver of d-galactosamine treated rats. *Biochemical and Morphological Investigations. Meth. and Find Exp. Clin. Pharmacol.* 3(2):71, 1981.
 60. Valenzuela, A. et al. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 34(2):2209, 1985.
 61. Valenzuela, A. and Guerra, R. Differential effect of silybin on the Fe^{2+} -ADP and t-butyl hydroperoxide-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 42:139, 1986.
 62. Valenzuela, A. and Guerra, R. Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS Letters* 181(2):291, 1985.
 63. Valenzuela, A., Guerra, R. and Garrido A. Silybin dihemisuccinate protects rat erythrocytes against phenylhydrazine-induced lipid peroxidation and hemolysis. *Planta Médica* 402:, 1987.
 64. Valenzuela, A., Guerra, R. and Videla, L.A. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-Cyanidanol-3: Comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Médica* 438, 1986.
 65. Valenzuela, A., Lagos, C., Schmidt, K. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 34(12):2209, 1985.
 66. Vogel, G. Protection by silybin against amanita phalloides in beagles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73:355, 1984.

67. Vogel, G. Silymarin, das antihepatotoxische Wirkprinzip aus *Silybum marianum* (L) Gaertn; als antagonist der Phalloidin Wirkung. *Arzneim Forsch (Drug Res.)* 18:1063, 1968.
68. Vogel, G. und Teme, I. Die curative antagonisierung des durch phalloidin hervorgerufenen leberschadens mit silymarin als modell einer antihepatotoxischen therapie. *Arzneim Forsch (Drug. Res.)*. 19:613, 1969.
69. Vogel, G. and Trost, W. Possibilities to antagonise the experimental poisoning by the toxic components of the toadstool *Amanita phalloides* fries. *Digestion* 8:556, 1973.
70. Vogel, G. and Trost, W. Neutralization of the lethal effects of phalloidine and amanitine in animal experiments by substances from the seeds of *Silybum marianum*. Gaertn. *Arch. Pharmacol.* 282:102, 1974.
71. Wagner, H., Diesel, P., and Seitz, M. Zur chemie und analytik von silymarin aus *Silybum marianum*. Gaertn. *Arzneim Forsch. (Drug Res.)* 24:466, 1974.
72. Wendel, A., Feuerstein, S. and Konz, K.H. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 28:2051, 1979.
73. Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind, M. and Mourelle, M. Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of cholesterol/phospholipid ratios. *Lab. Invest.* 53(5):541, 1985.
74. Zimmerman, H.J. Hepatic injury caused by therapeutic agents. The liver normal and abnormal functions part A. Marcel Dekker. I.N.C., New York, 1974.
75. Zimmerman, H.J. Hepatotoxicity. Ed. Appleton-Century-Crofts, 1978.
76. Zimmerman, H.J. Chemical injury and its detection. En: Toxicology of the liver. G.L. Plaa y W.R. Hewitt (Eds.) Raven Press New York, 1982.