



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

Departamento de
Exámenes Profesionales

**" EVALUACION DE LAS PROPIEDADES
HEPATOPROTECTORAS DE ALGUNOS
ANALOGOS DEL ACIDO CAFEICO.
IMPORTANCIA DEL REGIMEN DE
DOSIFICACION "**

P U B L I C A C I O N

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A**

MA^g MAGDALENA RICO ALMANZA

A S E S O R E S :

DR. VICTOR M. PEREZ ALVAREZ

M. EN F. C. MA. EUGENIA POSADA GALARZA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX., 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos :

La Publicación: Evaluación de las propiedades hepatoprotectoras de algunos
análogos del ácido caféico. Importancia del régimen de
dosificación.

que presenta la pasante: María Magdalena Rico Almanza
con número de cuenta: 09361368-2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Noviembre de 2002

PRESIDENTE Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL M. en F. C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

SECRETARIO Q.F.B. Ma. Virginia Oliva Arellano

PRIMER SUPLENTE Q.F.I. Guadalupe Koizumi Castro

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Tais Nopal Guerrero

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

DEDICATORIA

A MI FAMILIA



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor M. Pérez Álvarez, por haberme brindado su apoyo y su gran ayuda incondicional para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Eduardo Fernández, por su invaluable amistad y ayuda incondicional.

Al Biól. Mario G. Moreno, por su valiosa colaboración y enseñanza de las técnicas bioquímicas para llevar a cabo este proyecto.

Al Sr. Antonio Trujillo, por el apoyo técnico en la fase terminal del trabajo.

A la QFB. Martha Noyola, por sus acertados consejos, para la presentación del trabajo.



A la M. en F. C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza, por la tutoría interna del presente trabajo.



Al Ing. Químico Miguel Angel Nieto, (compañero de la FESC), por su entrañable y muy especial amistad.



A la generación 20 de la licenciatura de QFB
(compañeros de la FESC)



A los integrantes del jurado, por afinar los detalles de este trabajo:
QFI. Leticia Zúñiga Ramírez
QFB. Ma. Virginia Oliva Arellano
QFI. Guadalupe Koizumi Castro
QFB. Tais Nopal Guerrero.

Dose-Regimen Dependent Caffeic Acid Prevention of Acute Liver Damage

VICTOR PÉREZ-ALVAREZ*¹, ROSA AMALIA BOBADILLA², ALEJANDRO ALIAS¹,
MAGDALENA RICO¹ & PABLO MURIEL¹¹Departamento de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV IPN, Apartado Postal 14-740, México 07000 D.F., México;²Departamento de Fisiología y Farmacología, Escuela Superior de Medicina del IPN
Plan de San Luis y Díaz Mirón, Casco de Santo Tomás, México DF, CP 11340

3,4-Dihydroxycinnamic acid (caffeic acid, CAF) is a natural phenolic compound widely distributed in vegetables, fruits, tea, and Chinese herbs [1] for which diverse biological effects have been described. The presence of a catechol group in the molecule makes it structurally similar to endogenous compounds such as adrenergic neurotransmitters. As with the latter, CAF is easily oxidized [1].

Liver damage has been associated with deflection of arachidonic acid metabolism toward lipoygenase products, with a simultaneous decrease of the synthesis of cytoprotective prostaglandins. Accordingly, we have demonstrated that leukotriene synthesis inhibition protects the liver from acute damage induced by CCl₄ [2]. Besides, administration of CAF prevented liver damage and ameliorated liver fibrosis induced by CCl₄ in the rat [4], presumably as a result of its strong and specific inhibitory activity toward 5- and 12-lipoxygenase [3].

Literature describing the pharmacokinetics of CAF is scarce, but a short half-life for the compound has been demonstrated in the rabbit [1]. The aim of this work is to evaluate the best regimen of administration of caffeic acid to display the best hepatoprotective properties using an acute liver damage model in the rat, as shown by biochemical markers of hepatic damage.

MATERIALS AND METHODS: Male Wistar rats weighing 250-300 g fed *ad libitum* a Purina chow diet were used in these experiments. Acute liver damage was produced by CCl₄ administration (4 g/kg) dissolved in olive oil (1:1). Three experimental groups were used (n=8). The first one (control) received olive oil by means of an intragastric tube (group A). The second group was given only CCl₄ (group B). The third group was divided into five subgroups. Subgroups 1 and 2 received 3 doses of 50 mg/kg of CAF as follows: 12 h before, simultaneously with, and 12 h after CCl₄ administration (subgroup C); 6 h before, at the time, and 6 h after CCl₄ administration (subgroup D). In the third regimen, CAF was administered twice: 3 h before and simultaneously, with CCl₄ (subgroup E). In the fourth and fifth regimen the caffeic acid was administered once 2 h before (subgroup F) and at the moment of CCl₄ administration (subgroup G), respectively.

Rats were anesthetized with diethyl ether 24 h after CCl₄ administration. Blood was obtained by heart puncture and the liver was excised. Serum was used for determination of γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) [5], alkaline phosphatase [6], and alanine aminotransferase (ALT) [7] activities. Total serum bilirubins were measured using a kit (Merck, Mexico). Pieces of the liver were analyzed for glycogen determination [9] and lipid peroxidation products [10]. For statistical

analysis Student's *t*-tests for unpaired samples were performed and a difference was considered significant when $p < 0.05$.

Table 1. Effects of caffeic acid dose regimen (CAF, 50 mg/kg) on the serum enzymatic activities of CCl₄-challenged rat

Treatment	Alkaline Phosphatase $\mu\text{mol/lmin}$	γ -GTP $\mu\text{mol/lmin}$	ALT $\mu\text{mol/lmin}$
A	114.35 \pm 8.71	2.651 \pm 0.46	39.15 \pm 0.85
B	184.71 \pm 10.29	28.78 \pm 3.71	112.31 \pm 1.93
C	145.76 \pm 12.01*	26.94 \pm 1.78*	110.26 \pm 2.09
D	100.97 \pm 4.18*	34.14 \pm 7.54	105.56 \pm 2.04*
E	176.23 \pm 24.83	24.78 \pm 7.46	115.60 \pm 2.16
F	97.8 \pm 12.19*	31.3 \pm 5.72	111.46 \pm 0.67
G	149.29 \pm 26.24	32.32 \pm 5.99	118.10 \pm 1.30

The values are means of separate determinations in duplicate assays for 8 different animals \pm SEM. * $p < 0.05$: Significantly different from CCl₄-treated group. A) Control, B) CCl₄, C) 3 doses (12 h), D) 3 doses (6 h), E) 2 doses (3 h), F) one dose (2 h), G) one dose (at the time). For more details see Materials and Methods section.

RESULTS: Carbon tetrachloride administration produced sharp increases in alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and γ -glutamyl transpeptidase serum activities, as well as in serum bilirubin levels and malondialdehyde production in liver homogenates. Hepatic glycogen content decreased. All the observed effects were significantly different from control values ($p < 0.05$). When CCl₄-treated rats were compared with those which received CCl₄ plus the lipoxygenase inhibitor (Table 1), the triple doses regimens of CAF (subgroup C) prevented the CCl₄-induced rise in alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase serum activities but had no significant effect on the activity of alanine aminotransferase. The 6 h regimen (subgroup D) significantly protected from the

increase in alkaline phosphatase and alanine aminotransferase serum activities but did not modify γ -glutamyl transpeptidase serum levels (Table 1). In the one dose treatment (subgroup F), only an alkaline phosphatase serum levels improved. All treatments but the subgroup D and F prevented the increase in lipid peroxidation (Fig. 1). No treatment succeeded in restoring glycogen levels to control values in this model of liver damage (Table 2).

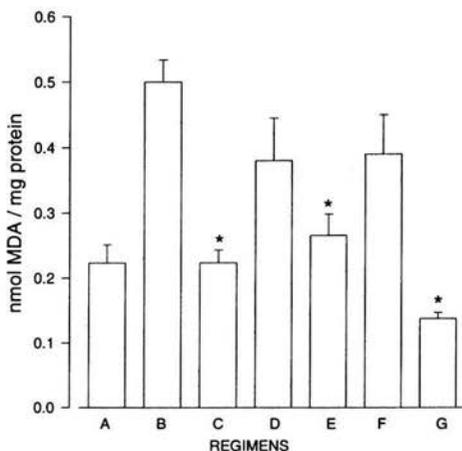


Figure 1. Effect of dose scheme of caffeic acid (50mg/kg) on the elevated lipid peroxidation levels induced by acute CCl_4 administration. Malondialdehyde (MDA) was measured in all the following groups: A) Control; B) CCl_4 ; Caffeic acid + CCl_4 schemes are C) 3 doses (12 h); D) 3 doses (6 h); E) 2 doses (3 h); F) one dose (2 h); G) one dose (at the time). For more details see Materials and Methods section.

DISCUSSION: This work was aimed at determining the optimal dose-regimen of CAF for preventing acute CCl_4 induced liver damage. It was observed that three doses of CAF were needed to afford a significant protection.

As a period of time (6-12 h) between CAF and CCl_4 administration was necessary to see the hepatoprotective effect, it is possible that CAF needs to be biotransformed to produce its favorable action. Indeed, Gumbinger *et al.* [10] demonstrated CAF oxidation products and metabolites formed by liver biotransformation could be responsible for biological effects *in vivo*.

Products of CAF oxidation include cyclolignan derivatives as well as feluric and isofeluric acid as methylation products. As repeated doses of CAF were required to observe a significant hepatoprotective effect, and as CAF has a short half-life time [1], we speculate that an active metabolite accumulation is required to achieve appropri-

ate protection. However, it is not known which of the metabolites may be responsible for the observed effects.

Table 2. Effects of caffeic acid dose regimen (CAF, 50 mg/kg) in the liver glycogen and serum bilirubins of CCl_4 -challenged rat

Treatment	Direct Bilirubin $\mu\text{mol/l}$	Total Bilirubin $\mu\text{mol/l}$	Liver Glycogen g/100 g wet tissue
A	5.12 \pm 0.387	0.375 \pm 0.04	3.68 \pm 0.18
B	33.79 \pm 4.494	33.36 \pm 3.21	0.33 \pm 0.10
C	14.71 \pm 9.51*	6.24 \pm 2.45*	0.17 \pm 0.03
D	39.24 \pm 7.39	27.72 \pm 10.53	0.22 \pm 0.024
E	30.2 \pm 9.36*	18.76 \pm 6.60	0.47 \pm 0.07
F	26.37 \pm 11.08	28.08 \pm 11.34	0.07 \pm 0.01
G	54 \pm 11.51	47.76 \pm 8.18	0.13 \pm 0.05

The values are means of separate determinations in duplicate assays for 8 different animals \pm SEM. * $p < 0.05$: Significantly different from CCl_4 -treated group. A) Control, B) CCl_4 , C) 3 doses (12 h), D) 3 doses (6 h), E) 2 doses (3 h), F) one dose (2 h), G) one dose (at the time). For more details see Materials and Methods.

The present work points out the importance of initially establishing suitable schedules of administration when evaluating hepatoprotective properties of CAF. The biological activity of CAF metabolites deserves further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS: The technical assistance of Mr. Antonio Sanchez Trujillo (Departamento de Farmacología y Toxicología CINVESTAV-IPN) is gratefully acknowledged. This work was supported in part by the grant number 26829 CONACYT (Mexico).

REFERENCES

- Uang YS & Hsu KY: *Biopharm Drug Disp* 18:727 (1997).
- Pérez-Alvarez V, Bobadilla-Lugo RA, Muriel P, Favari L & Villanueva-Lopez C: *Pharmacol* 47: 330 (1993).
- Koshihara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y & Tatsuno T: *Biochim Biophys Acta* 792:92 (1984).
- Reyes MT, Mourelle M, Hong E, Muriel M: *Drug Devel Res* 36:125 (1995).
- Glossman M & Neville DM: *FEBS letters* 19:340 (1972).
- Bergmeyer HV, Grabl M & Walter HE: *Enzymes* (ed) HV Bergmeyer, *Methods in Enzymatic Analysis*, Verlag-Chemie, Weinheim 1983, p. 267.
- Reitman S & Frankel S: *Am J Clin Pathol* 28:56 (1957).
- Morris DL: *Science* 107: 254 (1948).
- Buege JA & Aust SD: *Methods Enzymol* 53:302 (1978).
- Gumbinger HG, Vashliensieck U & Winterhoff H: *Planta Med* 59: 491 (1993).

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	2
1.1. GENERALIDADES.	3
ANTECEDENTES DEL <i>ÁCIDO CAFÉICO</i> .	
1.1.1. PROPIEDADES QUÍMICAS (IARC, 1991)	
1.1.2. IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA:	
1.2. DESCRIPCIÓN DEL HÍGADO	4
1.2.1. ÓRGANO BLANCO	
1.3. MODELO EXPERIMENTAL DEL CCl_4	5
1.4. MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO	6
1.5. FARMACOLOGÍA DEL <i>ÁCIDO CAFÉICO</i>	8
1.5.1. ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL <i>ÁCIDO CAFÉICO</i>	9
1.5.1.1. CAPTADOR DE RADICALES LIBRES (RLs)	
1.5.1.2. INHIBIDOR ALTAMENTE ESPECÍFICO DE LA ENZIMA 5-LIPOOXIGENASA:	10
1.6. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DEL CAF	11
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN	12
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	13
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL	15
4.1.1. ADMINISTRACIÓN DEL CAF DE ACUERDO A LOS ESQUEMAS PROPUESTOS PARA SU EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.	
4.1.2. ADMINISTRACIÓN DEL <i>ÁCIDO CAFÉICO</i> Y SUS DERIVADOS.	16
4.2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	17
4.2.1. MARCADORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (DAÑO AL HEPATOCITO)	
4.2.2. DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LIPOPEROXIDACIÓN	
4.2.3. MARCADORES QUE DETECTAN TRANSPORTE DE ANIONES ORGÁNICOS	18
4.2.4. MARCADOR QUE DETECTA LA CAPACIDAD DE BIOSÍNTESIS DEL HÍGADO.	
CAPÍTULO V. RESULTADOS	19
5.1. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL. RESULTADOS	
5.2. GRÁFICOS	20
5.3. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL. RESULTADOS	24
5.4. GRÁFICOS	25
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN	29
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO VIII. PROPUESTA	31
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA	32
CAPÍTULO X. ANEXO.	35
10.1. ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS.	

I. INTRODUCCIÓN

En el organismo del ser humano como en el de todos los mamíferos se cuenta para su defensa con un componente principal que es el hígado; órgano blanco de la acción de numerosos agentes tóxicos o xenobióticos, entendiéndose por tales a aquellas sustancias que ingresan en el organismo procedentes del exterior y que provocan en la glándula lesiones morfofisiológicas que van desde el daño macroscópico hasta el subcelular.

Actualmente no existen fármacos seguros y eficaces que provengan y/o se pueden administrar en períodos de tratamientos largos, dentro de un cuadro clínico de daño hepático (agudo y crónico), por lo que es imprescindible la creación de nuevos agentes terapéuticos para las enfermedades del hígado.

En años recientes, se ha evidenciado la importancia de los agentes antioxidantes y de los productos del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico en la patogénesis del daño hepático tanto agudo como crónico, Keppler et al. (1985) demostraron que los fármacos que interfieren con la síntesis de los *leucotrienos* (LTs) previenen o reducen el incremento de las actividades enzimáticas en el plasma después del daño hepático agudo producido por *Galactosamina* en ratas o por endotoxinas en ratones. Estos resultados concuerdan con la literatura (Mourelle, et al. 1987) ya que inhibidores de la síntesis de LTs como el *Ácido Norhidroguaiarético*, *Ácido Caféico* y el *Nafazatom* pueden prevenir el daño hepático agudo producido por el xenobiótico *Tetracloruro de Carbono* (CCl_4).

Debido a lo anterior, hemos tenido el particular interés de evaluar las propiedades hepatoprotectoras del *Ácido Caféico* (CAF) en un modelo de daño hepático agudo por CCl_4 en rata.

El proyecto de evaluación consiste principalmente en determinar cual de los tres derivados (*Ácido 3-hidroxicinámico*, *Ácido 4-hidroxicinámico*, *Ácido 3 - 4 dihidroxihidrocínámico*) del *Ácido 3,4-dihidroxicinámico*, a probar es el que mejor protege al hígado del ataque del CCl_4 . Y determinar cual es el régimen de dosificación óptimo para evaluar las propiedades hepatoprotectoras del CAF.

La primera parte experimental que corresponde a la determinación del mejor régimen que mostró mayor capacidad hepatoprotectora, se ha publicado ya a manera de artículo con el título: *DOSE-REGIMEN DEPENDENT CAFFEIC ACID PREVENTION OF ACUTE LIVER DAMAGE* en *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (USA), volumen 42, pág. 17-18, año 1999, con el soporte de CONACYT No. 26829 (México).

La parte teórica - experimental se realizó en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), con la dirección del Dr. Víctor M. Pérez Álvarez y las siguientes colaboraciones de: Dr. Pablo Muriel, Alejandro Alias y Dra. Rosa A. Bobadilla y una servidora, autora del presente trabajo.

1.1. GENERALIDADES.

ANTECEDENTES DEL ACIDO CAFÉICO.

ÁCIDO 3,4 DIHIDROXICINÁMICO

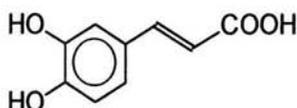


Figura 1.

1.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS (IARC, 1991):

- ✳ Nombre químico: Ácido 3,4-dihidroxicinámico.
- ✳ Se presenta como prismas amarillos parduzcos.
- ✳ Su punto de fusión es 225 °C.
- ✳ La solubilidad: Es ligeramente soluble en agua fría; soluble en agua caliente y etanol frío.
- ✳ La estabilidad en cuanto a su estructura química: el *Ácido Caféico* existe como cis y trans, pero comercialmente es disponible en un 97-99% como isómero trans.
- ✳ Compuesto fenólico ampliamente distribuido en vegetales, frutas, y hierbas chinas.

1.1.2. IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA:

La molécula del *Ácido Caféico* (CAF) presenta un grupo catecol, lo que la asimila a los compuestos endógenos tales como las Catecolaminas que son neurotransmisores del sistema simpático suprarrenal como la Dopamina, Noradrenalina y Adrenalina.

Se ha comprobado que el *Ácido Caféico* es una molécula con gran actividad biológica (Gumbinger, et al., 1993) :

Actividad Inhibitoria:

- a) Posee una alta especificidad inhibitoria sobre la enzima 5 y 12 *Lipooxigenasa*, el resultado de ello es la inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la síntesis de los tromboxanos y *Leucotrienos* (LTs).
- b) Actúa como inhibidor competitivo de DOPA Descarboxilasa debido a la similar estructura a la levodopa.
- c) También es un inhibidor de la Xantina Oxidasa.

- d) Posee efectos inhibitorios sobre la liberación de la histamina, así como actividad antiviral.

Actividad Antioxidante:

- e) Efecto inhibitorio sobre el daño lipídico metabólico. Es un buen antioxidante.
- f) Los productos de oxidación (ácido ferúlico y ácido isoferúlico, ambos derivados de los ciclolignanos) del *Ácido Caféico*, poseen también actividad antigonadotrópica.

1.2. DESCRIPCIÓN DEL HÍGADO

1.2.1. ÓRGANO BLANCO

El hígado es un órgano que se divide en un lóbulo derecho y un lóbulo izquierdo por el ligamento falciforme. Las células hepáticas de acuerdo a los estudios histoquímicos y ultraestructurales revelan una importante heterogeneidad funcional.

Principalmente el hígado se compone de 5 diferentes tipos de células lo cuál dan un 80% en su volumen (Rojkind, 1994) el 20 % restante lo ocupan los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. Los hepatocitos, células muy grandes y abundantes, conforman el 50 - 60% del volumen hepático. Las células parenquimatosas o sinusoidales corresponden a los otros cuatro tipos, en general son menores en tamaño y numerosas.

Células de Kupffer: Miembros del sistema retículo endotelial se adhieren fuertemente a las células endoteliales, tienen características fagocíticas y son fuente de sustancias vasoactivas, prostaglandinas, *leucotrienos*, interleucinas, óxido nítrico, etc. La estructura y morfología del núcleo de la célula de *kupffer* se parece al de un macrófago, poseyendo uno o dos nucleólos.

Dichas células participan en la respuesta de defensa no específica cuando el hígado sufre alguna lesión (Decker, 1990).

En el hígado se encuentran las enzimas que integran las principales vías metabólicas. Por ejemplo, los hepatocitos periportales llevan a cabo la glucogenólisis y la gluconeogénesis, los hepatocitos cercanos a la vena central se encargan de la glicólisis y síntesis de glucógeno.

Otro ejemplo de enzimas de importancia son las monooxigenasas, éstas se encuentran en grandes cantidades en el hígado y en otros tejidos y principalmente en las membranas del retículo endoplásmico liso. Estas enzimas forman el conjunto de los *citocromos P-450*, mayores catalizadores en el metabolismo de xenobióticos, el cual los hace mas hidrofílicos y facilita con ello su excreción.

1.3. MODELO EXPERIMENTAL DEL CCl_4

El modelo de daño agudo hepático inducido por CCl_4 , en animales de experimentación ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la necrosis y esteatosis del hígado, ambos estados patológicos tipifican los casos clínicos de la cirrosis hepática (Mourelle, 1988; Recknagel, 1974; Dinman, 1967; Cagen, 1980).

En este caso la hepatitis aguda o subaguda inducida por el CCl_4 , muestra cambios histológicos y bioquímicos primordialmente en hígado; en el daño predomina la permeación inflamatoria con polimorfonucleares y leucocitos y cambios en la fluidez de la membrana del hepatocito liberando sustancias quimiotácticas (Cotran RS, et al., 1989; Rubin E, et al., 1967).

Kim HJ, et al., (1990), demostraron que después de la administración de un rango de concentraciones que van de 10 mg hasta 2000 mg/Kg de peso en ratas, resulta en función de la dosis, un incremento en niveles enzimáticos en suero, una disminución de la actividad del *citocromo P-450* hepático y un aumento de lesiones centrilobulares en el hígado a las 24 horas después de la dosificación.

Mourelle M. (1988), indica que las alteraciones en los hepatocitos del retículo endoplásmico aparecen a los primeros 15 minutos, y a la hora, estos cambios se dan en el aparato de Golgi, membrana plasmática y mitocondria, dichos cambios son relacionados con la peroxidación de ácidos grasos en la estructura de la membrana celular así como en la generación de radicales libres que se producen en el metabolismo del CCl_4 , los cambios también se presentan por la inactivación de la bomba de calcio. En general, estas alteraciones producen muerte celular en el hígado, lo cual eleva la liberación de enzimas (marcadores de daño en sangre intrahepática).

1.4. MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO

El daño hepático no es una sola entidad. La lesión observada no depende solo del agente químico involucrado sino también del período de exposición. Después de la exposición aguda, normalmente se encuentra acumulación de lípidos en el hepatocito, necrosis celular o disfunción hepatobiliar (Rodríguez y Pérez-Álvarez 1990).

Diferentes alteraciones bioquímicas pueden llevar al mismo punto final, no existe un mecanismo único que determine la aparición de cambios degenerativos en el hepatocito o alteraciones en su función, (Plaa, 1982). Por ejemplo, la *Fosfatasa Alcalina*, que es una ectoenzima de la membrana plasmática del hepatocito, al aumentar sus niveles séricos normales, significa que existe daño en la membrana celular del hígado (Kaplan 1986); y la liberación al suero de γ -*Glutamyl Transpeptidasa*, enzima anclada en la membrana plasmática a nivel del campo canalicular, significa daño a la célula y daño y de este modo daño al hígado. Es importante puntualizar que la actividad de esta última enzima es considerada como uno de los mejores indicadores del daño hepático (Plaa y Hewitt 1982; Bulle et al., 1990).

Las pruebas de función hepática permiten a los bioquímicos estimar el trastorno de la función hepática y puede ser categorizada convenientemente para indicar el tipo de daño hepático en:

1. Necrosis celular
2. Inhibición de la secreción biliar o colestasis.
3. Defectos en la síntesis celular.
4. Defectos de la función excretora hepática (refiriéndose al recambio de bilirrubina y aniones orgánicos, los cuales comparten la misma ruta metabólica dentro del hígado).

El marcador de daño hepático es la prueba de funcionamiento que permite:

- Reconocer el tipo de daño
- Establecer la severidad de la disfunción,
- Evaluar la respuesta al tratamiento
- Evolución de la enfermedad.

Y dentro de los marcadores de daño hepático destacan los siguientes:

- La determinación de *Bilirrubinas* (Total y Directa) en suero.
- La actividad de la *Fosfatasa Alcalina* en suero (*FA*).

- La actividad de la *Transaminasa Glutámico Pirúvica* en suero (*TGP*) o también conocida como *Alanino Amino Transferasa (ALT)*.
- La actividad de la γ - *Glutamil Transpeptidasa* en suero (γ -*GTP*).
- La determinación del contenido de *Glucógeno Hepático*.
- La *Lipoperoxidación Hepática*.

1.- Cuando ocurre necrosis de las células muchas enzimas son liberadas al torrente circulatorio. Se considera que las aminotransferasas o transaminasas son indicadores sensibles del daño hepático (Debroe M.E. 1975, Ellis G., 1978) y permiten el reconocimiento de enfermedades agudas hepatocelulares, como la hepatitis. Debido a que la *ALT* deriva casi exclusivamente del hígado es uno de los indicadores más específico de daño al hepatocito. Otras enzimas relativamente específica son la *Deshidrogenasa Isocítrica* y la *Lactato Deshidrogenasa*, (Martínez, et al.,1984).

2.- La enzima marcadora de la colestasis usada más frecuentemente es la *Fosfatasa Alcalina* que se encuentra en una variedad de tejidos diferentes al hígado. El nivel sérico normal de esta enzima se ha pensado que deriva de 4 fuentes potenciales: hígado, hueso, intestino o la placenta en el tercer trimestre del embarazo. La elevación de la isoenzima hepática ocurre cuando hay un ligero deterioro de la función secretoria biliar y se cree que es producida por la regurgitación de la *Fosfatasa Alcalina* del canalículo a la circulación. (Anthony, et al. 1979).

La *Leucina Amino Peptidasa* y la *5' Nucleotidasa* son otros marcadores útiles de la función secretoria biliar pero son medidas menos rutinarias. La enzima *Gama-Glutamil Transpeptidasa* (γ - *GTP*) también refleja sensiblemente la colestasis, sin embargo también se eleva en la hepatitis y en la enfermedad hepática alcohólica, aunque algunos autores consideran mas sensible a la γ - *Glutamil-Transpeptidasa*, que a las otras enzimas (Lum G, et al., 1972). Por lo tanto, el parámetro bioquímico más crítico de la colestasis, es la retención de los ácidos biliares en el suero. La elevación de los ácidos biliares en ayunas siempre indican un deterioro de la secreción biliar (Martínez, et al.,1984).

3.- Las medidas que reflejan la capacidad sintética de las células hepáticas incluyen el nivel de albúmina sérica y el tiempo de protrombina.

4.- La medida de la *Bilirrubina* sérica tanto conjugada como no conjugada es la prueba que se usa con más frecuencia para determinar los efectos de la función excretora hepática. Debido a que la *Bilirrubina* comparte la misma ruta excretora que los iones orgánicos (ejemplo bromosulfaleína) se utiliza una variedad de medidas de la función hepática basadas en este hecho. (Reitman, et al., 1957).

5.- La capacidad de biosíntesis del hígado. Una de las funciones metabólicas del hígado es regular los niveles de la glucemia. Los carbohidratos se almacenan como glucógeno en hígado mediante el paso reversible de glucosa a glucógeno. Cuando existe insuficiencia hepática aguda se produce con frecuencia una hipoglucemia por la disminución de la gluconeogénesis (González-Vilchez, 1996). Por lo que en un modelo experimental de daño hepático agudo es posible tomar muestras de hígado en las que se hacen diferentes determinaciones, entre ellas, la concentración de *Glucógeno*.

6.- La *Lipoperoxidación hepática*. En general es un proceso que se lleva a cabo a nivel de las membranas celulares. Este proceso consiste en una serie de reacciones que se llevan a cabo entre radicales libres (*RLs*) y los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas; en condiciones normales se producen radicales libres en el organismo, pero estos son captados por los sistemas antioxidantes para ser eliminados. Cuando existe alguna alteración en los antioxidantes o bien cuando se origina una producción excesiva de *RLs* por agentes exógenos (alcohol etílico, CCl_4 , entre los más importantes agentes exógenos) entonces sobreviene la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, originando la pérdida de fluidez y alteraciones de la membrana y como consecuencia la muerte celular, (Horton A. A; Tribble D. L., 1987).

Por lo tanto, la principal acción de los *RLs* se da en los lípidos causando peroxidación, y el método para medir el daño causado en membranas celulares se fundamenta en la cuantificación de los productos de reacción de *RLs* con los lípidos poliinsaturados.

1.5. FARMACOLOGÍA DEL ÁCIDO CAFÉICO

Para la farmacocinética del CAF, la literatura al respecto es escasa, pero (Uang, et al. 1997) demuestra que el CAF posee un tiempo de vida media corta administrado por vía intravenosa en conejo.

Además el *3,4-Ácido Dihidroxicinámico* (Reyes, 1995) una vez administrado previene el daño hepático y aminora la fibrosis del hígado inducida por CCl_4 en rata (probablemente debido a su alta especificidad inhibitoria hacia la enzima *5-lipoxigenasa* y *12-lipoxigenasa*). Por otra parte, se considera que los fármacos que incrementan las prostaglandinas mientras disminuyen los *leucotrienos*, protegen al hígado de un estímulo nocivo (Mourelle M, et al., 1987; Pérez-Álvarez V. et al. 1993).

1.5.1. ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL ACIDO CAFÉICO

El órgano que muy frecuentemente es afectado por una gran variedad de patologías agudas o crónicas es el hígado; entre estas se mencionan las hepatopatologías por trastornos vasculares, metabólicos, tóxicos, obstructivos y neoplásicos sin olvidar las que en nuestro país son las más representativas como es la parasitosis, y las hepatopatías por alcoholismo. Ambas enfermedades hepáticas pueden evolucionar a un cuadro clínico cirrótico irreversible.

Al respecto, en estudios ya realizados, se ha concluido que el *Ácido Caféico* posee dos vías de acción hepatoprotectora (Pérez-Álvarez V. et al. 1993):

- ⊛ ***Inhibición de la Enzima 5-lipoxigenasa.***
- ⊛ ***Atrapador de radicales libres.***

1.5.1.1. CAPTADOR DE RADICALES LIBRES (RL) :

En un sistema biológico, la vía principal para la formación de *RL* es la enzimática. Para que un compuesto pueda generar *RL* debe tener alta afinidad por los electrones y de ésta manera ser reducidos por los sistemas enzimáticos del tipo de las monooxigenasas.

El *Ácido Caféico* se conoce (Pérez-Álvarez V. et al. 1993) como un buen antioxidante del tipo no enzimático y/o exógeno que neutraliza a los radicales libres generados por el *tetracloruro de carbono*. (Ramírez, 1996). Por otro lado es bien conocido que el CCl_4 , es convertido por el sistema *citocromo P-450* del hígado a radicales triclorometilos, los cuales son especies altamente reactivos y causa lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados en membranas de células (Farber, J.C. 1987; Muriel P. Y Mourelle M.1992)

1.5.1.2. INHIBIDOR ALTAMENTE ESPECÍFICO DE LA ENZIMA 5-LIPOOXIGENASA:

El proceso de inflamación es un estado patológico celular que se desarrolla en casos de hepatitis aguda inducida por fármacos o agentes tóxicos. Dentro de este proceso (Pérez-Álvarez V. et al. 1993) se ven involucrados diversas sustancias, como los mediadores de inflamación liberados, conocidos como los *leucotrienos* (LTs), (Keppler D., Hagmann W., et al. 1985) siendo estos los metabolitos de la enzima 5-*lipoxigenasa*; ambos, productos del metabolismo del *Ácido Araquidónico*.

Las *lipoxigenasas*, enzimas solubles localizadas en el citosol, se encuentran en intestino, plaquetas, mastocitos y leucocitos. La principal enzima de este grupo es la 5-*lipoxigenasa* –primer enzima en la biosíntesis de los *leucotrienos*, leuco por que se encuentran en los leucocitos o células blancas y trienos por que contienen un sistema de trieno conjugado de doble enlaces; el *leucotrieno LTB₄* puede encontrarse en exudados y en muchas condiciones de inflamación incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, y colitis ulcerativa (Rang H.P. et al. 1995).

El papel de las enzimas *lipoxigenasas* en el control y regulación de *leucotrienos* está basado en el hecho de que la formación de varios LTs son dependientes de la cantidad de enzima y en particular si ella está presente. A la inhibición de las enzimas *lipoxigenasas* puede ocurrir una disminución en la acumulación de leucocitos (Samuelsson B., 1996)

En general a la liberación de los siguientes *leucotrienos*:

- ⊗ *LTB₄* muestran una actividad quimiotáctica potente.
- ⊗ *LTC₄*, *LTD₄* y *LTE₄* exhiben propiedades proinflamatorias marcadas.
- ⊗ *LTC₄* y *LTD₄* pueden generar exudación plasmática aguda.

Los *leucotrienos* pueden originarse directamente de los hepatocitos y también de otras células del hígado como las células *Kupffer*, mastocitos o por sus principales responsables en la respuesta inflamatoria: macrofágos y leucocitos.

Por otra parte, las moléculas con actividad biológica en la respuesta inflamatoria, siendo una de ellas el CAF, se ha demostrado que éste (Koshihara, et al. 1984) puede interferir con la síntesis de los leucotrienos, inhibiendo sus posibles efectos, alcanzando con ello una protección parcial en la elevación en las actividades enzimáticas en plasma después del daño agudo en hígado inducido por *Tetracloruro de Carbono*. (Pérez-Álvarez, 1993).

1.6. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DEL CAF

En relación a la estructura - actividad de los grupos sustituyentes: *4-hidroxi*, *3-hidroxi*, *3,4-dihidroxi* y la presencia del doble enlace en la molécula del *Ácido Caféico*, no existe literatura que fundamente en cuál de los grupos sustituyentes recae el efecto hepatoprotector; al respecto, consideramos que al ser sustituidos alguno de estos grupos, el efecto se interprete por la reducción de los niveles enzimáticos más significativos en un modelo de daño hepático por *Tetracloruro de Carbono*, posteriormente a la evaluación de los marcadores de daño.

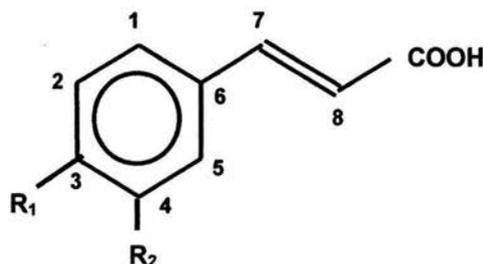


Figura 2.

Tabla 1. Relación estructura actividad del *Ácido Caféico* y sus derivados

MOLÉCULA	R ¹	R ²	Δ^{7-8}
Ácido 3, 4 dihidroxicinámico	HO	HO	+
Ácido 3-hidroxicinámico	HO	H	+
Ácido 4-hidroxicinámico	H	HO	+
Ácido 3, 4 dihidroxihidrocinámico	HO	HO	-

II. JUSTIFICACIÓN

Dado que las patologías hepáticas ocupan un lugar importante en nuestro país y para su tratamiento no se cuenta con fármacos selectivos y seguros, nos proponemos realizar el diseño y evaluación farmacológica de un grupo de derivados del *Ácido 3,4 dihidroxicinámico*, potenciales inhibidores de la *5-lipooxigenasa* que pueden tener efectos benéficos dentro de la patología aguda que envuelve al hígado.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Evaluar las propiedades hepatoprotectoras del CAF (*Ácido Caféico*) y 3 análogos en un modelo de daño hepático agudo por CCl_4 en rata.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el mejor régimen de dosificación del *Ácido Caféico* administrado por vía oral en un intervalo dado de tiempo.
2. Evaluar la actividad hepatoprotectora del CAF y los *Ácidos 3-4 dihidroxihidrocinámico, 3-hidroxicinámico y 4-hidroxicinámico*, mediante marcadores enzimáticos en hígado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- ❖ Se utilizaron ratas macho tipo Wistar de peso entre 200 y 300g, las cuales fueron alimentadas *ad libitum* con purina chow.
- ❖ Se emplearon grupos experimentales, con una n=8 cada uno.
- ❖ La lesión aguda del Hígado (Modelo de daño Hepático) fue producida por la administración de CCl_4 (4g / kg de peso) disuelto en *aceite de oliva* (1:1).
- ❖ Se manejaron grupos control administrándosele solamente *aceite de oliva* (1ml / kg de peso).
- ❖ Para la administración del agente tóxico CCl_4 , CAF y sus derivados así como el agente control (vehículo del *Tetracloruro de Carbono: Aceite de Oliva*) se utiliza la vía oral (tubo intragástrico).
- ❖ Todas las ratas fueron anestesiadas con dietil éter 24 hs., después de la administración del CCl_4 . La sangre obtenida por punción cardíaca se colocó en tubos de ensaye de 13x100 mm y puestos en un baño de hielo; posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm y el suero obtenido se utilizó para la determinación de los siguientes marcadores de daño hepático: *Gamma-Glutamil-Transpeptidasa (GTP)*, *Fosfatasa Alcalina (FA)*, y *Alanino-Aminotransferasa (ALT)*. Las *Bilirubinas Totales* del suero fueron medidas usando un Kit analítico de prueba (Merck, México).
- ❖ Se obtuvieron también muestras del hígado mediante la excisión del órgano y fueron manejadas para la determinación del *Glucógeno* y los productos de la *Peroxidación de Lípidos* de membrana.
- ❖ En el análisis estadístico se empleó la prueba *t de Student* y se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

4.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se dividió en dos etapas, la primera fue encontrar el mejor régimen de dosificación, para después en la segunda etapa usarlo en la administración del *Ácido Caféico* y sus derivados.

4.1.1. Administración del CAF de acuerdo a los esquemas propuestos para su evaluación farmacológica.

El *Ácido Caféico* se resuspende en una solución de CMC (*Carboximetil celulosa*) al 0.5 % y se administra en los esquemas propuestos dando como resultado 5 regímenes diferentes de dosificación, a intervalos de tiempo también diferentes.

(Grupo A) : El primer grupo denominado control, recibió el *aceite de oliva*

(Grupo B) : Segundo grupo, fué administrado con CCl_4

El tercer grupo se divide en subgrupos de acuerdo a los correspondientes esquemas propuestos para la administración del *Ácido 3-4 hidroxicinámico (CAF)*:

Esquema 1: 3 dosis de CAF (50 mg/kg)

Los subgrupos C y D recibieron 3 dosis de 50 mg/kg. de CAF como sigue:

(Subgrupo C) Régimen 1 : 12h antes, simultáneamente al CCl_4 , y 12 h después de la administración del CCl_4 .

(Subgrupo D) Régimen 2 : 6h antes, simultáneamente al CCl_4 , y 6h después de la administración del CCl_4 .

Esquema 2: CAF (50 mg/kg) fue administrado dos veces:

(Subgrupo E) Régimen 3 : 3h antes y simultáneamente al CCl_4

Esquema 3: CAF (50 mg/kg) fue administrado una sola vez :

(Subgrupo F) Régimen 4 : 2h antes del CCl_4

(Subgrupo G) Régimen 5 : simultáneamente a la administración del CCl_4 .

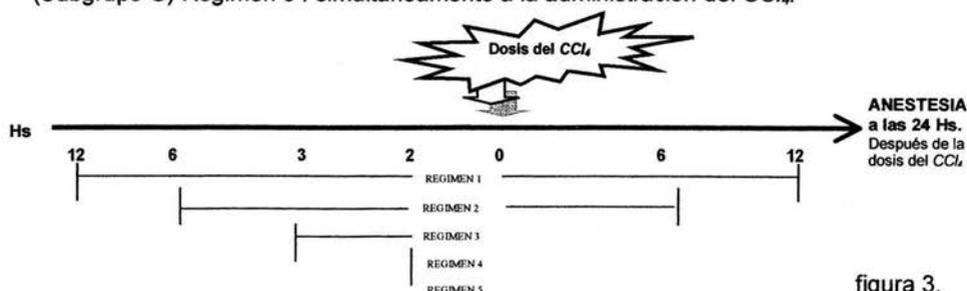


figura 3.

4.1.2. Administración del **Ácido Caféico** y sus derivados.

Se realizó el estudio de los derivados del *Ácido Caféico* empleando para ello, el régimen de dosificación que resultó ser mas favorable para la actividad biológica.

En primer lugar se evaluó el *Ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico*, en segundo término al *Ácido 3-hidroxicinámico* y por último al *Ácido 4-hidroxicinámico*.

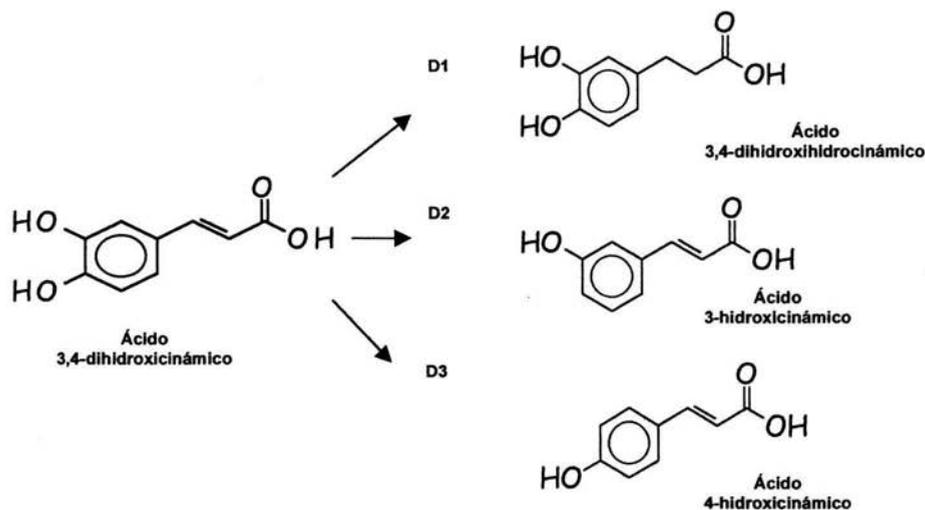


Fig. 4

El CAF y sus derivados se dispersaron cada uno en una solución de CMC (*Carboximetilcelulosa*) al 0.5 %.

Los tratamientos se dieron de la siguiente manera:

Tabla 2. Administración del CAF y sus derivados

GRUPOS	TRATAMIENTOS
1	CONTROL (ACEITE DE OLIVA)
2	TETRACLORURO DE CARBONO (0.5 ml / 100 g DE PESO)
3	CAF (50 mg/kg de peso) + CCl ₄
4	DERIVADO 1 (50 mg/kg de peso) + CCl ₄
5	DERIVADO 2 (50 mg/kg de peso) + CCl ₄
6	DERIVADO 3 (50 mg/kg de peso) + CCl ₄

4.2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES DE DAÑO:

4.2.1. Marcadores de Actividad Enzimática (Daño al hepatocito)

Del suero de cada muestra problema se determinaron las siguientes actividades enzimáticas:

✓ ***γ-Glutamil Transpeptidasa (γ-GTP)***, Glossman 1972.

Se emplea como sustrato la Glutamil-p-Nitroanilida que en presencia de la enzima *γ-Glutamil Transpeptidasa* y de un receptor del grupo γ -1- glutamil (Glicil Glicina), genera un complejo γ -1- glutamiliglicil glicina y p-nitroanilina. Se leen absorbancias a $\lambda = 410$ nm.

✓ ***Fosfatasa Alcalina (FA)***, Bergmeyer 1983.

El fundamento para determinar la actividad de la enzima se basa en la hidrólisis del sustrato p-nitrofenilfosfato por la *Fosfatasa Alcalina* para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cuál se lee a una longitud de onda de 410 nm.

✓ ***Alaninoamino Transpeptidasa (ALT)***, Reitman et al., 1957.

(Transaminasa Glutámica Pirúvica <<TGP>>)

La actividad de la **ALT** se determinó por el método de Reitman-Frankel en el que se mide el complejo formado por el Piruvato y la 2,4 Dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la Alanina y el Alfa-oxoglutarato, formándose un complejo colorido que absorbe a 515 nm.

4.2.2. Determinación de los Productos de Lipoperoxidación Buege, 1978.

Para este fin se tomó 0.5 g de muestra de hígado.

✓ **Determinación de la Peroxidación Lipídica:**

La determinación del grado de la *Peroxidación Lipídica* se basa en la cuantificación de uno de los productos terminales del mecanismo de la *Lipoperoxidación* que es el *Malondialdehído (MDA)*. Esto es, dos moléculas de Ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de *MDA*, formando un pigmento rojo que absorbe a una longitud de onda 535 nm, y se reporta en nmoles de *MDA* por cada g de proteína.

✓ **Determinación de Proteínas** (Bradford, M. 1976) :

La determinación se efectúa por el Método de Bradford (1976), en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomassie G-250. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. La formación del complejo colorante-proteína da rápidamente y permanece en solución por un tiempo relativamente largo (1 hora). El complejo formado se puede detectar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm.

4.2.3. Marcadores que detectan transporte de aniones orgánicos:

Se determinaron también del suero las *Bilirrubinas Totales* y *Bilirrubinas Directas*, utilizando un kit de Bilirrubinas (Merck), siguiendo el método que indica el proveedor.

✓ **Bilirrubinas Totales** (Jendrassik L., 1938; Schellong G., 1960)

La *bilirrubina* forma con el ácido sulfanílico diazotizado un colorante azóico, que en solución neutra es rojo y en solución alcalina azul. El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente.

La *bilirrubina total* en suero o plasma, se determina según Jendrassik y Grof, por copulación con ácido sulfanílico diazotizado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución II alcalina de Fehling, se forma azobilirrubina azul, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (coloración mixta verde), de manera selectiva por fotometría a 578 nm.

✓ **Bilirrubinas Directas**

La *bilirrubina directa* se mide según Schellong y Wende sin adición de álcali, como colorante azoico rojo a 546 nm.

La *bilirrubina indirecta* se obtiene de la diferencia de la *bilirrubina total* y la *bilirrubina directa*. La *bilirrubina directa*, principalmente los glucurónidos hidrosolubles de bilirrubina, reacciona a los 5 minutos sin la adición de un acelerador. La *bilirrubina libre*, bajo estas condiciones, reacciona más lentamente.

4.2.4. Marcador que detecta la capacidad de biosíntesis del hígado.

✓ **Glucógeno**, Morris 1948.

Se toma 0.5 g de hígado, para determinar el nivel de *Glucógeno*. Se realiza una digestión en caliente de la muestra de hígado. La muestra se hidroliza con KOH al 30%, produciendo glucosa, y por el factor de Morris, se convierte en glucógeno. La concentración de glucosa se determina usando el reactivo de Antrona [9(10H)-Antracena], de dicho reactivo se prepara una solución al 0.2 % (0.2 g en 100 ml de

ácido sulfúrico concentrado) y de la hidrólisis que se realiza previamente con hidróxido de potasio se producen monosacáridos los cuales con el Ácido sulfúrico reaccionan y dan el producto Furfural éste a su vez reacciona con la Antrona dando un complejo colorido verde-azul. La determinación de la reacción final se realiza por el método de espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm.

V. RESULTADOS

5.1. Primera etapa experimental :

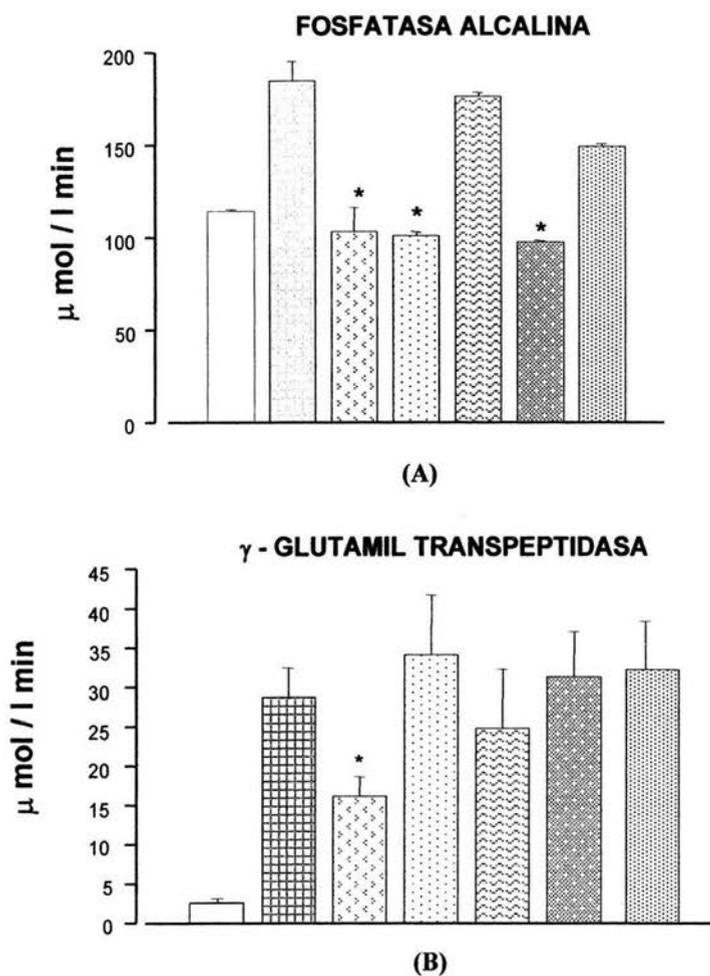
Cuando se induce el daño experimental en el hígado por CCl_4 está bien establecido que los niveles séricos de las enzimas como son la *Fosfatasa Alcalina*, y *Alanino Amino Transferasa* aumentan y en cambio el nivel de *Glucógeno* en hígado disminuye como se puede ver en los respectivos gráficos de las figuras 5, 7 y 8.

Cuando las ratas tratadas con CCl_4 fueron comparadas con las que recibieron CCl_4 más el inhibidor del lipoxigenasa, todos los efectos observados fueron parcialmente diferentes de los valores control ($p < 0.05$). El régimen en donde se administraba el CAF tres veces (el subgrupo C) disminuyó el incremento de las actividades séricas *Fosfatasa Alcalina* y *Gamma Glutamil Transpeptidasa* inducido por CCl_4 , (fig.5) pero no tuvo ningún efecto de disminución significativo en la actividad de la *Alanino Amino Transferasa*, (fig. 6).

El régimen de 6h (subgrupo D) disminuyó significativamente el nivel de actividad sérica de la *Alanino Aminotransferasa* (Fig. 6) y de la *Fosfatasa Alcalina*, pero no modificó el nivel de actividad en suero de la *Gamma Glutamil Transferasa* (Fig. 5)

En cuanto al tratamiento de una sola dosis (el subgrupo F), sólo se observó una mejoría en el nivel sérico de la *Fosfatasa Alcalina*, (Fig. 5). En todos los tratamientos excepto en los tratamientos de los subgrupos D y F se observó con respecto al grupo control de daño, una disminución significativa en la *Peroxidación del Lípidos*, (fig. 7). Ningún tratamiento mostró tener éxito en mejorar los niveles de glucógeno en este modelo del daño del hígado, (fig. 8).

A continuación, las siguientes figuras de gráficos muestran la actividad biológica del *Ácido Caféico* y tratamientos de administración propuestos en cada marcador de daño evaluado.



REGIMENES DE DOSIFICACION

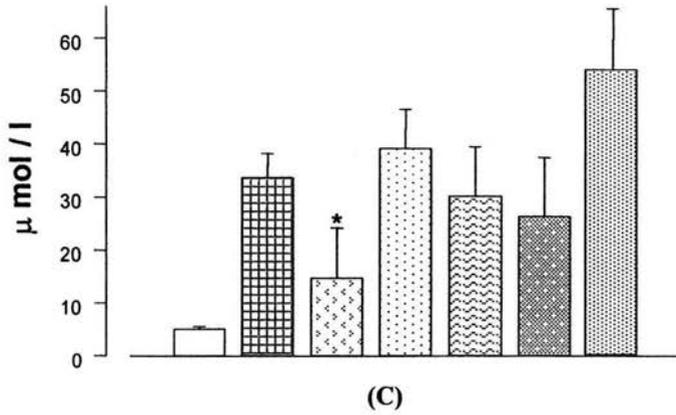
Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

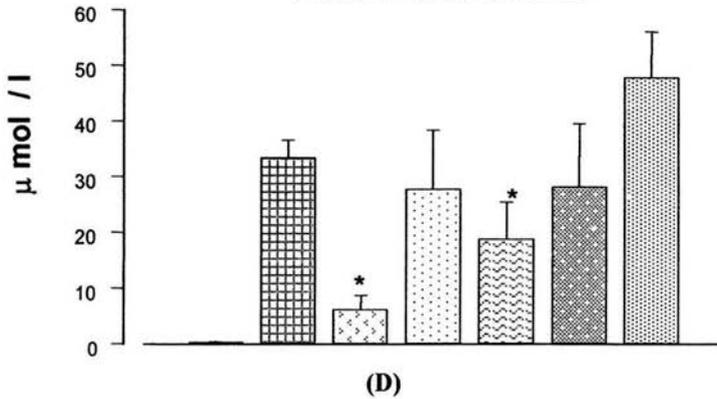
□ A : Aceite de Oliva	▨ C : 3 dosis (12 h)	▩ F : 1 dosis (2 h)
▣ B : CCl ₄	◻ D : 3 dosis (6 h)	▤ G : 1 dosis (40 min)
	◌ E : 2 dosis (3 h)	

FIG. 5

BILIRRUBINA TOTAL



BILIRRUBINA DIRECTA



REGIMENES DE DOSIFICACION

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

□ A : Aceite de Oliva

▣ B : CCl₄

▤ C : 3 dosis (12 h)

▥ D : 3 dosis (6 h)

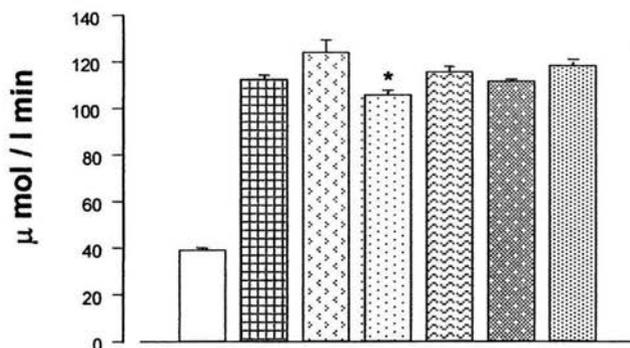
▧ E : 2 dosis (3 h)

▨ F : 1 dosis (2 h)

▩ G : 1 dosis (40 min)

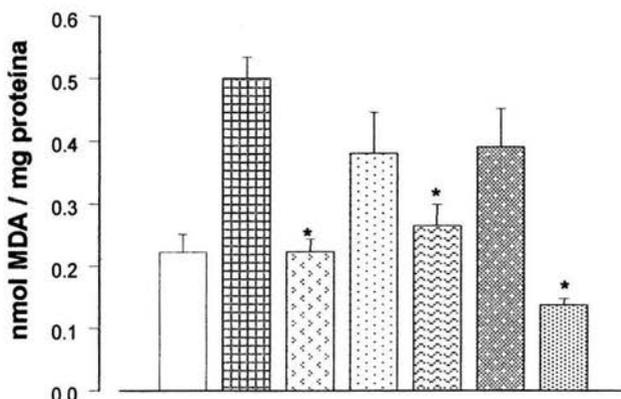
FIG. 6

ALANINOAMINO TRANSFERASA



(E)

PRODUCTOS DE LIPOPEROXIDACIÓN



(F)

REGIMENES DE DOSIFICACION

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

□ A : Aceite de Oliva

▣ B : CCl₄

▤ C : 3 dosis (12 h)

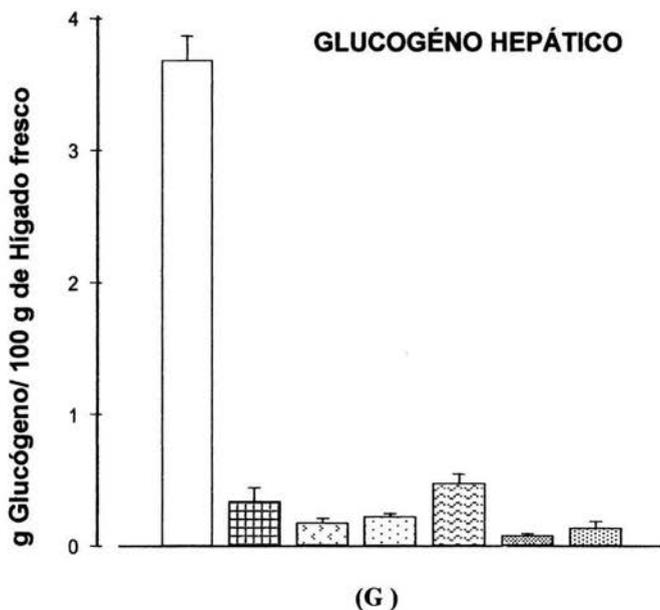
▥ D : 3 dosis (6 h)

▧ E : 2 dosis (3 h)

▨ F : 1 dosis (2 h)

▩ G : 1 dosis (40 min)

FIG. 7



REGIMENES DE DOSIFICACION

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.
 *p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

□ A : Aceite de Oliva

▣ B : CCl₄

▤ C : 3 dosis (12 h)

▥ D : 3 dosis (6 h)

▧ E : 2 dosis (3 h)

▨ F : 1 dosis (2 h)

▩ G : 1 dosis (40 min)

FIG. 8

5.2. Segunda etapa experimental :

La segunda parte del protocolo se encaminó a determinar la actividad biológica del *Ácido Caféico* y sus derivados (*Ácido 3,4-dihidroxihipocinámico*; *Ácido 3-hidroxihipocinámico* y *Ácido 4-hidroxihipocinámico*) empleando para su evaluación, el régimen de 12 horas.

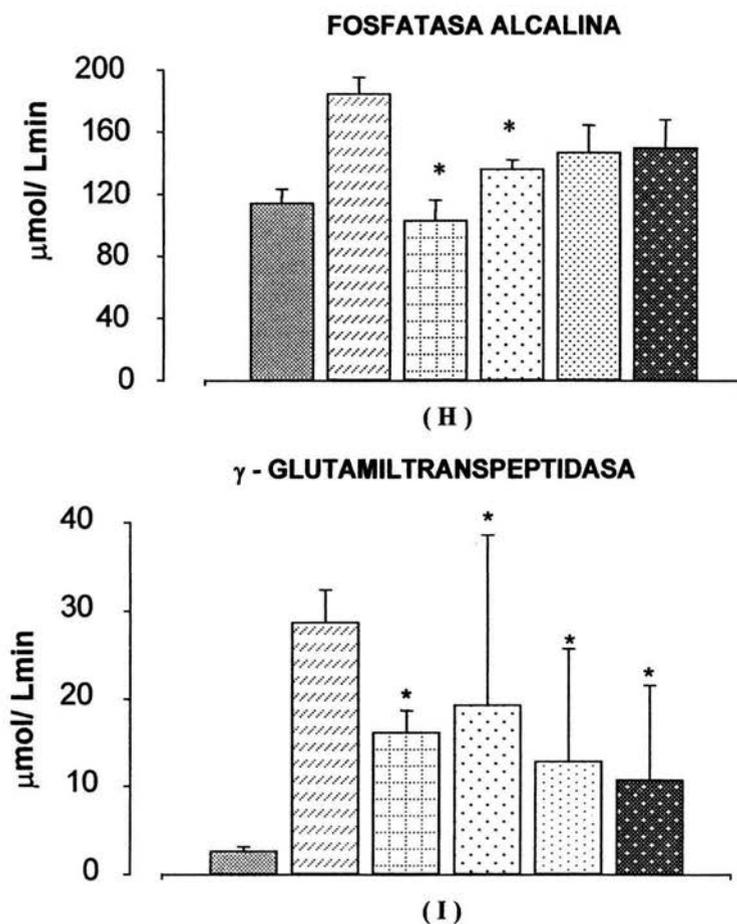
En cuanto a los grupos tratados con *Ácido Caféico* y derivados más *Tetracloruro de Carbono* demostraron disminuir de manera significativa la actividad sérica de la *Fosfatasa Alcalina* y de la *Gammaglutamil Transpeptidasa*, (fig. 9)

En el derivado 1 (*Ácido 3,4-dihidroxihipocinámico*) se observó que hubo una disminución significativa de los mismos marcadores (fig. 9) y al igual que el *Ácido Caféico* no presentó mejoría en la *Alaninoamino Transferasa*, *Lipoperoxidación* y tampoco un buen resultado en los niveles de *Glucógeno* (fig. 10 y 12). El segundo derivado (*Ácido 3-hidroxihipocinámico*) presentó una disminución en la *Gammaglutamil Transpeptidasa* y en la *Lipoperoxidación* (fig. 9 y 10), pero sin obtener mejoría en *Alaninoamino Transferasa*, *Fosfatasa Alcalina* y *Glucógeno* (fig. 9, 10 y 12)

Por último el tercer derivado (*Ácido 4-hidroxihipocinámico*) reportó una mejoría en todos los marcadores bioquímicos con excepción de la *Fosfatasa Alcalina*, (fig. 9-12)

En cuanto a los niveles de *Bilirrubina* los tres derivados fueron capaces de disminuir de manera significativa tanto la *Bilirrubina Directa* como la *Bilirrubina Total*. El *Ácido Caféico* solo pudo disminuir los niveles de *Bilirrubina Directa* pero no así los de las *Bilirrubinas Totales* (fig. 11)

A continuación, los siguientes gráficos muestran la actividad del *Ácido Caféico* y sus derivados administrados bajo el régimen de 12 hs.



DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

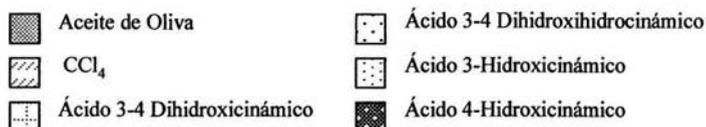
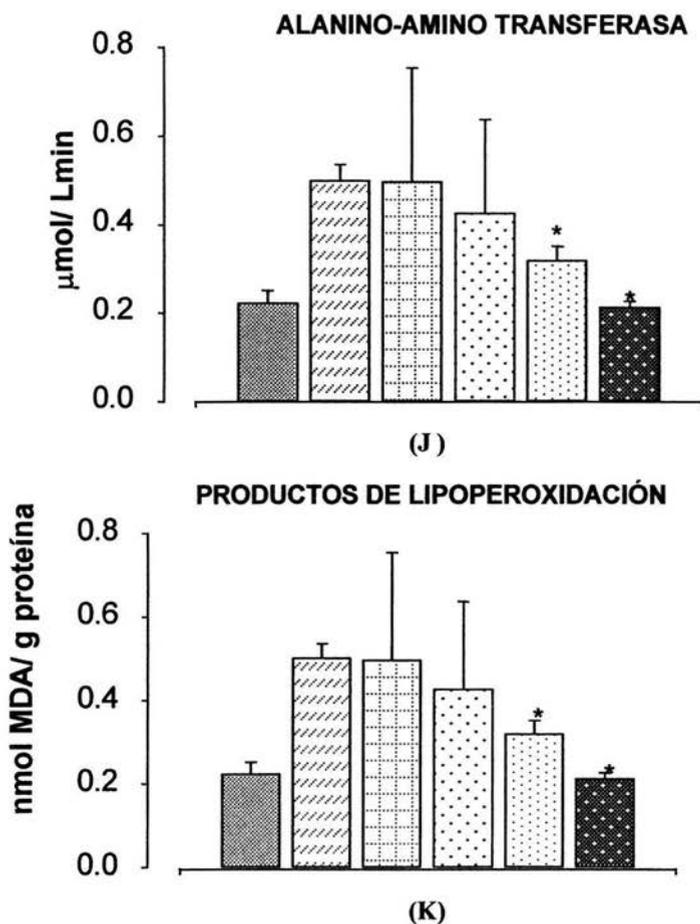


FIG. 9



DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8, ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

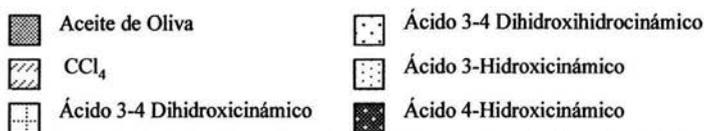
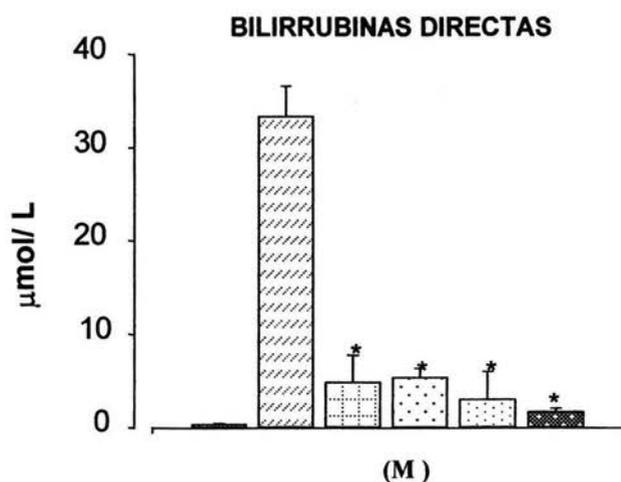
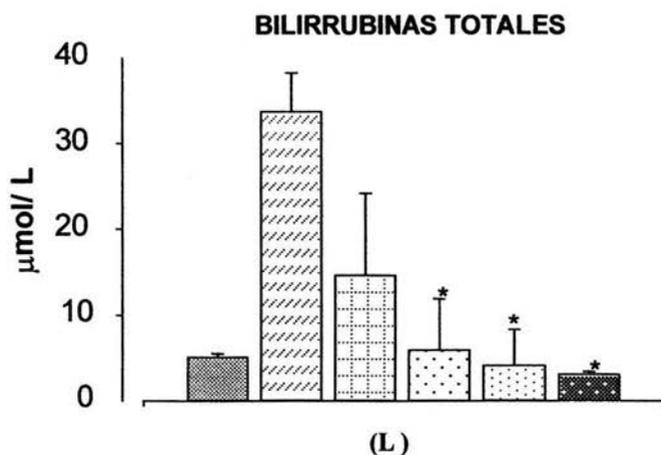


FIG. 10



DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8, ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

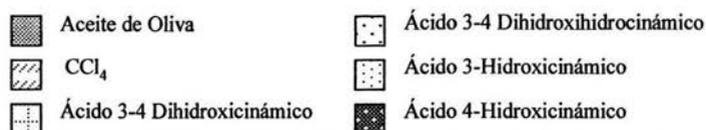
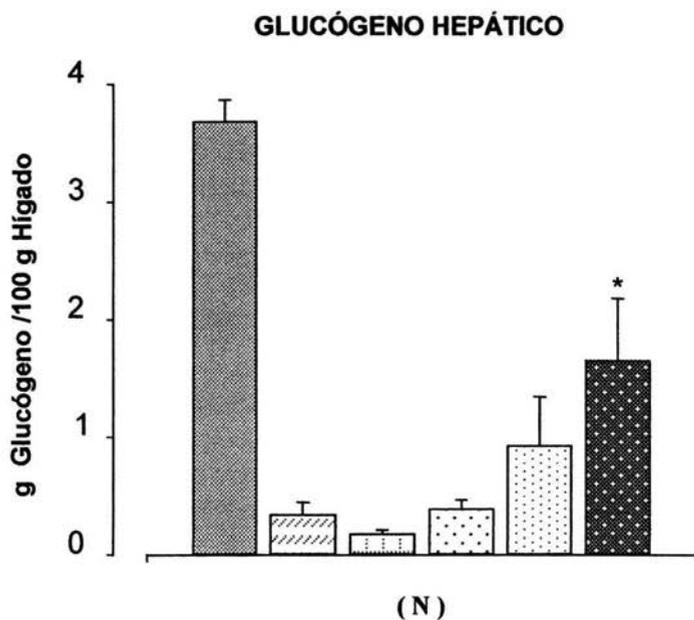


FIG. 11



DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO

Los valores son medias de determinaciones por separado de ensayos por duplicado, n= 8 , ± E.E.M.

*p<0.05: Con una diferencia significativa con respecto al grupo tratado de CCl₄

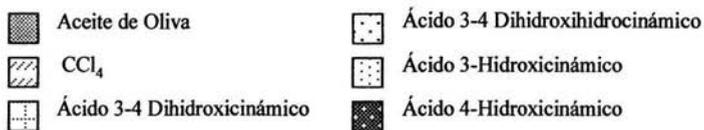


FIG. 12

VI. DISCUSIÓN

Este trabajo se realizó principalmente para determinar el mejor régimen con el cual el *Ácido 3,4-dihidroxicinámico (Ácido Caféico, CAF)* pudiera prevenir el daño agudo hepático inducido por el CCl_4 . Se observó que cuando se administró el *Ácido Caféico* en tres ocasiones se obtenía una actividad biológica benéfica, en la reducción de niveles enzimáticos, esto se demostró en los dos primeros regímenes para el *Ácido Caféico* con un lapso de 6h y 12h.

Se debe considerar que el efecto biológico, tiene relación con el metabolismo del *Ácido Caféico* y que posiblemente dependa de la biotransformación del mismo para producir una acción favorable.

De hecho, Gumbinger et al (1993) demostraron que productos de la oxidación y los metabolitos del *Ácido Caféico* formados por la biotransformación del hígado pueden ser responsables de efectos biológicos in vivo.

Los productos de la oxidación del *Ácido Caféico* incluyen derivados cicloglicanos, así como el *Ácido Felúrico* e *Isotelúrico* como productos de la metilación del mismo.

Mientras, con los resultados obtenidos se puede asumir que se requieren de más número de dosis del *Ácido Caféico* para observar un efecto hepatoprotector significativo y puesto que se ha señalado que el *Ácido Caféico* tiene una vida media corta (Uang Y.S y Hsu K.Y. 1997); pensamos que debe de existir la acumulación de algún metabolito activo para alcanzar una protección hepática apropiada.

Sin embargo, no se sabe específicamente cual de los metabolitos puede ser responsable de los efectos observados. Por lo tanto, se precisa establecer los esquemas de dosificación para la administración del *Ácido Caféico* y de esa manera evaluar las características hepatoprotectoras del mismo.

El *Ácido Caféico* y sus derivados resultaron ser sustancias biológicamente activas que aminoran el daño hepático inducido por CCl_4 . El mecanismo de acción de estas sustancias parece estar relacionado con su capacidad para captar *radicales libres*.

Es importante la estructura química para que se exprese la actividad biológica de los derivados del *Ácido Caféico*. El número y la posición de los grupos hidroxilos sobre el anillo aromático y el doble enlace son determinantes para que se mantenga esta actividad.

VII. CONCLUSIONES

- ⊗ Se requieren de más número de dosis del *Ácido Caféico* para que el efecto del CAF sea significativa y puesto que el *Ácido Caféico* tiene una vida media corta (Uang Y.S y Hsu K.Y. 1997); es posible que sea necesario después de la biotransformación, la acumulación de algún metabolito activo para alcanzar la acción biológica.
- ⊗ No se sabe específicamente cual de los metabolitos puede ser responsable de los efectos que se observaron para el régimen de las 12 h. Por lo tanto, se precisa establecer los esquemas de dosificación múltiple para la administración del *Ácido Caféico* y de esa manera evaluar las características hepatoprotectoras del mismo.
- ⊗ En relación a la segunda parte experimental, el derivado *3,4-hidroxihipocinámico* no mostró diferencia significativa con respecto a las propiedades hepatoprotectoras del CAF en este modelo de daño, esto sugiere que el doble enlace tiene una participación en la actividad biológica en cada marcador de daño evaluado.
- ⊗ En contraste a lo anterior, el sustituyente *4-OH* parece ser muy importante en la actividad farmacológica determinada ya que se observó que el análogo más potente que reduce el daño hepático agudo es el ácido *4-hidroxicinámico*. El o los mecanismos por el cual esta sustancia es activa están por ser definidos.

VIII. PROPUESTA

- ✧ Es importante aclarar que la determinación de la actividad biológica de los metabolitos del *Ácido Caféico* merece una investigación adicional en nuestro modelo.
- ✧ Determinar en estas sustancias las propiedades reductoras del daño hepático en otros modelos de daño hepático.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Anthony, E. et al.** Chemical Diagnosis of disease. Brown, F. Mitchel D. Young (Eds.) Elsevier-North Holland Biomedical Press., 1979.
2. **Bergmeyer HV, Grabl M & Walter HE** : Enzymes. Ed. HV Bergmeyer. Verlag-Chemie. Methods in enzymatics analysis, Weinhein, p. 267; 1983.
3. **Buege JA, Aust SD**: Microsomal lipid peroxidation; In Methods in Enzymology; Ed. Academic Press, New York; 53:302-305, 1978.
4. **Bulle F., Mavier E., Zafrani A., Preaux M., Lescs S., Dhumeaux D., Guellaën.,** Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidasa release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat. A histochemical, biochemical and molecular approach. Hepatology; 11, 545-550, 1990.
5. **Bradford, M.** A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the die binding. Annal Bichem. 72: 248-254, 1976.
6. **Cotran RS, Kumar VF, Robbins SL.,** Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, Saunders, 1989.
7. **Decker K.** Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). Eur J Biochem 1990; 192:245.
8. **Dinman BD, Hamdi EA, Fox CD, Frajola WJ.,** CCl₄ toxicity. III: Hepato-structural and enzymatic changes, Arch Environ Health; 7:630, 1967.
9. **Cagen SZ, Klassen CD.,** Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: studies in developing rats and protection by zinc. Fed Proc; 39: 3124-3128, 1980.
10. **Farber, J.C,** Xenobiotics, drug metabolism and liver injury. In Farber, E., et al (eds.): Pathogenesis of Liver Diseases. Baltimore, Williams & Wilkins, 1987.
11. **Glossman M, Neville DM.,** Glutamyl Tranferase in kidney brush border membranes. FEBS Lett 19:340-344, 1972.
12. **González-Vilchez,** "El laboratorio en el diagnóstico bioquímico de las enfermedades hepáticas". **Tratado de hepatología,** Universidad de Sevilla-Shering-Plough, S.A.España, Tomo II; Cap. 18, pp. III,209-214, 1996.
13. **Goodman, A.,** Serum alkaline phosphatase activity in disease of the eskeletal and hepatobiliar system, a consideration of the current status. Am J Med. 27:875-901, 1959.
14. **Gumbinger H., Vahlensieck U., Winterhoff H W. R. ,** Metabolism of Caffeic Acid in the Isolated Perfused Rat Liver. Planta Med 59: 491, 1993.

15. **Horton A.**, Lipid Peroxidation and Mechanisms of toxicity. Department of Biochemistry, University of Birmingham. Birmingham, England. Vol. 18, Issue 1. 1987.
16. **IARC.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56 Caffeic Acid, Lyon, pp. 115-131, 1991.
17. **Kim H., Odend'Hal S., Bruckner J.**, Effect Oral Dosing Vehicles on the Acute Hepatotoxicity of Carbon Tetrachloride in Rats., *Toxicology and Applied Pharmacology* 102, 34-49, 1990.
18. **Kepler D., Hagmann W., et al.**, The Relation of Leukotrienes to Liver Injury. *Hepatology* 5: 883-881, 1985.
19. **Koshihara Y., Niechi T., Murota S., Tatsuno T.**, Caffeic acid is selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophys Acta* 792:92-97, 1984.
20. **Martínez-Calva I., Campos-Apáez E., Rosales-Vega., Mourelle M.**, Vitamin E improves membrane lipid alteration by CCl₄ intoxication. *J. Appl Toxicol.* 4(5):270-72, 1984.
21. **Morris DL.**, Quantitative determination of carbohydrates with Drey-wood's anthrone reagent. *Science* 107:254-255, 1948.
22. **Muriel P., Mourelle M.**, Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver: Role of S-adenosyl-L -methionine. *J. Hepatol* 14:16-21, 1992.
23. **Mourelle M., Amezcua J.L., Pérez-Álvarez V.**, Reduction of apparent indicators of liver cirrhosis in rats by the arachidonate lipoxygenase inhibitor BW755C. *Eur. J Pharm.*134:175-180, 1987.
24. **Pérez-Álvarez V., Bobadilla-Lugo RA., Muriel P., Favari L., Villanueva-López C.**, Effects of leukotriene synthesis inhibition on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology* 47:330-336, 1993.
25. **Plaa G., Hewitt W.**, Detection and evaluation of chemical induced liver injury. In: *Principles and Methods of Toxicology* (Ed.: W. Hayes) Raven Press, New York Pag. 407-45, 1982.
26. **Ramírez González; G.Baños de McCarthy.**, Tratado de Hepatología, Universidad de Sevilla-Shering-Plough, S.A.España, Tomo II; pp.II 177-85, 641-644, 1996.
27. **Rang HP., et al**, *Pharmacology*; Ed. Churchill Livingstone, USA., Cap. 11 pp. 235-237, 1995.
28. **Recknagel RO, Glende EA, Ugazio G, Koch RR, Srinivasan S.** New data in support of the lipo-peroxidation theory for carbon tetrachloride liver injury, In: Eliakim M, Eshchar J, Zimmerman HJ, eds. *International Symposium on Hepatotoxicity*, New York: Academic Press, 7-17, 1974.

29. **Reitman S., Frankel S.**, A colorimetric method for the determination of serum oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin. Patol.* 28: 56-63, 1957.
30. **Reyes M.T., Mourelle M., Hong E., Muriel P.** Caffeic acid prevents liver damage and ameliorates liver fibrosis induce by CCl4 in the rat. *Drug Devel. Res.* 36: 125-128, 1995.
31. **Rodriguez L., Pérez-Álvarez V.**, Reduction of hepatic collagen synthesis by colcheceine in cirrhotic rat liver" *Biochem. Pharmacol. (life Sci. Adv)* 9: 157-163, 1990.
32. **Rojkind M., Greenwel P.**, Extracellular matrix: the liver: Biology and Pathobiology. Eds. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D y Shafritz DA. Ed. New York, Raven Press, p.p. 841; 1994.
33. **Rubin E., Lieber ChS.**, Early fine structural changes in the human liver induced by alcohol. *Gastroenterology*; 52:1-13, 1967.
34. **Samuelsson B., M.D., PhD**; Biochemical studies of leukotrienes, Department of Medical Biochemistry and Biophysics (MBB), Div. of Physiological Chemistry II, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 1996.
35. **Tribble D., Tak Yee Aw., Dean P.**, The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. Department of Biochemistry, Emory University School of Medicin, Atlanta, Georgia; 30322 vol. 7 No. 2 p.p. 377-387; 1987.
36. **Uang Y.S., Hsu K.Y.**, A dose-dependent pharmacokinetic study on Caffeic Acid in rabbits after intravenous administration. *Biopharmaceutics And Drug Disposition*: 8, 727-736,1997.

X. ANEXO

10.1. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ÁCIDO 3,4 DIHIDROXICINÁMICO	3
FIGURA 2. RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD DEL CAF.	11
FIGURA 3. ESQUEMAS DE DOSIFICACIÓN	15
FIGURA 4. EL CAF Y SUS DERIVADOS (D1, D2 Y D3).	16
FIGURA 5. FA Y GTP (REGIMEN DE DOSIFICACIÓN)	20
FIGURA 6. BT Y BD (REGIMEN DE DOSIFICACIÓN)	21
FIGURA 7. ALT Y LPP (REGIMEN DE DOSIFICACIÓN)	22
FIGURA 8. GLUCÓGENO (REGIMEN DE DOSIFICACIÓN)	23
FIGURA 9. FA Y GTP (DERIVADOS DEL CAF)	25
FIGURA 10. ALT Y LPP (DERIVADOS DEL CAF)	26
FIGURA 11. BT Y BD (DERIVADOS DEL CAF)	27
FIGURA 12. GLUCÓGENO (DERIVADOS DEL CAF)	28

10.2. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DEL <i>ÁCIDO CAFÉICO</i> Y SUS DERIVADOS	11
TABLA 2. ADMINISTRACIÓN DEL CAF Y SUS DERIVADOS	16