

Efecto de los antiinflamatorios no esteroideos en el daño hepático por tetracloruro de carbono. Implicaciones clínicas.¹

Martha Zentella de Piña², Cecilia Fernández de la Regata³, Armando Díaz Belmont⁴

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, ³Pasante en Servicio Social, CAPRA, Hospital General de la SSA, y ⁴Clínica de Atención de Problemas Relacionados con el Alcohol (CAPRA), Hospital General de México, SSA.

(Recibido, noviembre 2, 1992; aceptado, febrero 18, 1993)

RESUMEN

En este trabajo se describen las modificaciones inducidas por dos antiinflamatorios no esteroideos sobre las acciones hepatotóxicas del tetracloruro de carbono (CCl₄). No hay duda de que el solvente orgánico produjo un daño hepático importante a juzgar por los aumentos en la actividad de las enzimas séricas, el mayor índice lipoperoxidativo y los niveles más altos en los triacilglicéridos (TAG) hepáticos. En las ratas tratadas con CCl₄, el ácido acetilsalicílico (aspirina) revirtió la elevación en los TAG del hígado, pero no modificó substancialmente la capacidad lipoperoxidativa activada por el tóxico. En cambio, el piroxicam previno totalmente la acción tóxica del CCl₄, evaluada como actividad lipoperoxidativa y niveles de TAG en el hígado. Se discuten distintas alternativas sobre el mecanismo de acción del piroxicam para atenuar las lesiones agudas producidas por el CCl₄.

Palabras clave: Antiinflamatorios no esteroideos-Daño hepático-Hepatotóxicos-Lipoperoxidación.

Summary

The action of aspirin and piroxicam on the acute liver damage produced by carbon tetrachloride (CCl₄) was investigated. Oral administration of a single dose of CCl₄ to rats resulted in an increase in the serum activity of transaminases and higher values of serum bilirubin. These biochemical indicators were not controlled by the NSAIDs treatment. However, aspirin prevented the elevation in liver triacylglycerides content produced by CCl₄, but had no effect on the increased hepatic lipoperoxidative index caused by CCl₄. Piroxicam prevented the toxic effects of CCl₄ assessed by the levels of hepatic lipoperoxidation and triacylglycerides. The mechanism by which the NSAIDs affected the toxic effect of CCl₄ is discussed.

Key Words: Non steroidal antiinflammatory drugs-Liver cell damage-Hepatotoxin-Lipoperoxidation.

Introducción

El estudio de las bases moleculares de las enfermedades es una de las áreas de intensa y fructífera investigación a nivel internacional. Una de las metas indudables de la medicina de fines del siglo XX es la de estudiar y comprender cada una de las enfermedades a nivel molecular. Nunca como ahora se ha estado en posibilidad de lograrlo. Numerosos

esfuerzos a nivel internacional comprenden el análisis y estudio de las bases moleculares de la enfermedad.

Los radicales libres, definidos como fragmentos moleculares que han perdido un electrón¹, han adquirido una enorme importancia en el análisis de las bases moleculares de un variado número de enfermedades entre las que se encuentran el cáncer, la aterosclerosis, las inflamaciones y muchas más². En el metabolismo normal el principal y más abundante

¹ Apoyo parcial: IN-208992 de DGAPA-UNAM

radical libre que se produce en condiciones fisiológicas es el radical superóxido, el cual se representa con el símbolo del oxígeno molecular con un punto (O_2^{\cdot}), con ello se indica que tiene un electrón sin su pareja, un electrón sustraído, por lo cual se generó el radical libre. En condiciones patológicas la degradación de numerosos agentes xenobióticos da lugar a la formación de radicales libres no fisiológicos; un ejemplo clásico es el del tetracloruro de carbono (CCl_4), solvente ampliamente usado para desmanchar ropa, que en el hígado forma el radical libre CCl_3 , responsable de los efectos tóxicos del CCl_4 ³.

Todas las células disponen de mecanismos y moléculas para la desaparición de los radicales libres formados en su interior; el tema no se analiza aquí por no ser parte medular de este trabajo. Los farmacólogos han apreciado la conveniencia de activar o reforzar los sistemas celulares responsables de la desaparición de los radicales originados en ciertos tejidos. En este trabajo se consideró conveniente explorar la capacidad de dos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para abatir la poza de radicales libres producidos por la intoxicación con CCl_4 . Habiendo menos radicales libres se esperaría una menor lesión tisular.

Desde 1973 se demostró que la toxicidad del CCl_4 depende de su capacidad para formar el radical libre CCl_3 y que ello origina una descomposición peroxidativa de los lípidos estructurales hepáticos⁴. En apoyo a lo anterior se incluyen las observaciones sobre el efecto protector de algunos antioxidantes en el control de la hepatotoxicidad ocasionada por el CCl_4 ⁵.

En este trabajo se estudia el posible papel antioxidante del ácido acetilsalicílico (aspirina) y el piroxicam. Ambos fármacos son AINEs que, en determinados sistemas, han mostrado capacidad para inhibir la generación de radicales libres del oxígeno⁵. Por otro lado, la aspirina, la indometacina y el ibuprofen impiden selectivamente la liberación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) en granulocitos estimulados con zimósán⁶. Por último, entre media docena de AINEs ensayados, el piroxicam mostró la mayor capacidad para inhibir la generación del radical O_2^{\cdot} en neutrófilos estimulados⁸. El conjunto de antecedentes anotados sirvieron de base para establecer la siguiente pregunta ¿la aspirina y/o el piroxicam podrán prevenir la acción tóxica del CCl_4 en el hígado? Nuestra hipótesis de trabajo es que ambos AINEs disminuirán

la toxicidad del CCl_4 al abatir la poza de los radicales libres por él originados.

Material y métodos

Se emplearon ratas macho, cepa Wistar, con un peso de 200 a 250 g y mantenidas con agua *ad libitum*. Los animales se ayunaron por 16 horas antes del tratamiento y permanecieron con ayuno hasta su sacrificio, 12 ó 24 horas después del tratamiento. El CCl_4 se empleó en una dilución 1:3 con aceite de maíz y fue administrado mediante una sonda orogástrica a la dosis de 1 ml de la mezcla/100 g de peso corporal. Inmediatamente después los animales recibieron por la misma vía una dosis de piroxicam (10 mg/kg de peso corporal) suspendida en una solución de glicerol/agua al 25% (7.5 mg de piroxicam/5 ml de solución). Alternativamente, en lugar de piroxicam, a otro grupo de ratas se le administró, por idéntica vía, una dosis de aspirina (56 mg/kg de peso corporal) suspendida en una solución de glicerol/agua al 25% (50 mg de aspirina/5 ml de solución). Las dosis de los AINEs empleadas son las recomendadas por Wiseman como dosis analgésicas para rata⁹. Las ratas control recibieron cantidades equivalentes del vehículo. Se formaron seis grupos de animales en base a lo que les fue administrado: (a) aceite + glicerol/agua, (b) CCl_4 en aceite + glicerol/agua, (c) aceite + piroxicam en glicerol/agua (d) CCl_4 en aceite + piroxicam en glicerol/agua, (e) aceite + aspirina en glicerol/agua y (f) CCl_4 en aceite + aspirina en glicerol/agua. Las ratas se sacrificaron por decapitación 12 ó 24 horas después del tratamiento con CCl_4 ; se colectó la sangre en etilén diamino tetraacetato (EDTA) y se obtuvo el suero mediante centrifugación.

El hígado fue extraído para determinar el contenido de triacilglicéridos (TAG) y un índice de lipoperoxidación. El índice de lipoperoxidación se midió con el empleo del ácido tiobarbitúrico¹⁰ directamente en el homogenado de hígado preparado en agua bidestilada (1:9 v/v); las modificaciones al método original se hicieron según el trabajo de Hernández Muñoz y cols.¹¹. Se usó como coeficiente de extinción del complejo de color formado entre el malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico el de $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ¹². La cantidad de TAG en el hígado se midió por el método de Butler et al¹³; las proteínas hepáticas se determinaron de acuerdo al método descrito en la referencia¹⁴, empleando albúmina bovina como estándar y KCN para corregir la turbidez¹⁵.

En el suero de los animales se midió la actividad de la transaminasa glutámico-oxalacética (TGO) y de la

CUADRO 1. Efecto del piroxicam y de la aspirina sobre algunos indicadores de lesión hepática inducida con CCl₄.

Indicador	Tiempo de tratamiento	Grupos Experimentales					
		Horas	Control	CCl ₄	Piroxicam	CCl ₄ + Piroxicam	Aspirina
TGP U/dl	12	43±2.19 (6)	897±86.0 (15)	53±8 (6)	828±9.5 (14)	42±95 (7)	776±90 (4)
	24	42±4 (4)	932±39.5 (12)	53±17.8 (10)	812±13.2 (13)	- - - - -	- - - - -
TGO U/dl	12	103±6 (9)	644±80 (15)	195±33 (10)	745±105 (14)	143±11 (7)	683±72 (4)
	24	98.4±4 (4)	383±48 (12)	286±54 (10)	379±39 (12)	- - - - -	- - - - -
Bilirrubina mg/dl	12	0.55±.041 (7)	0.79±0.66 (15)	0.63±0.82 (6)	0.85±.066 (13)	0.50±.00 (4)	0.54±.019 (4)
	24	0.50±.00 (8)	1.57±.214 (12)	.67±.042 (10)	1.37±.213 (13)	- - - - -	- - - - -

glutámico-pirúvica (TGP) por el método de Reitman y Frankel¹⁶. También en el suero se efectuó la determinación de bilirrubina por el método de Malloy¹⁷. Los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma Chemical Co, San Luis, Missouri, EUA, a excepción del CCl₄, que procedió de Merck de México. El análisis estadístico se hizo con el empleo de la prueba t de Student.

Resultados

El Cuadro 1 consigna los resultados obtenidos en las determinaciones séricas de transaminasas y de bilirrubina. En vista de que sólo muestran los esperados aumentos en el grupo tratado con CCl₄; su descripción se omite, pues ninguno fue significativo.

Las ratas se sacrificaron a las 12 ó 24 hr después de haber sido tratadas, tal como se indica en material y métodos. Las cifras representan el promedio ± el error tipo y en paréntesis el número de ensayos individuales.

La administración de CCl₄ estimuló la actividad lipoperoxidativa hepática y produjo un aumento en el contenido de triacilglicéridos del hígado (Fig.1), observable a las 24 horas de tratamiento. El piroxicam solo no modificó los valores de estos marcadores de toxicidad y la aspirina sola elevó de manera estadísticamente no significativa el índice de lipoperoxidación, medido como malondialdehído (MDA) producido. La administración de piroxicam, simultáneamente con el CCl₄, ocasionó un regreso a la normalidad hepática, tanto en la actividad

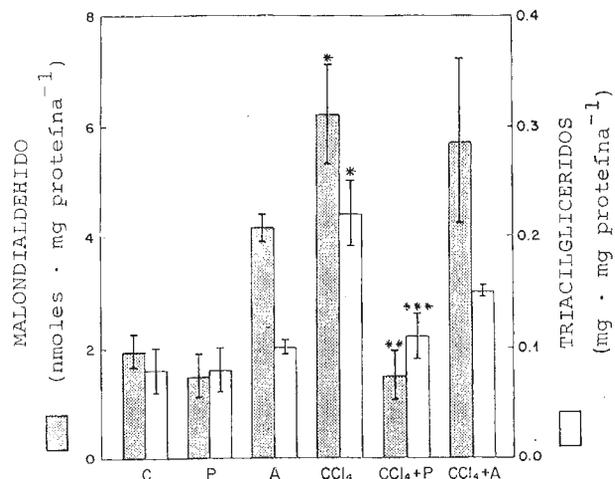


Fig. 1. Efecto del CCl₄, solo y combinado con aspirina o con piroxicam, sobre el índice endógeno de lipoperoxidación hepática, medida como malondialdehído (MDA, barras punteadas), y la poza de triacilglicéridos (TAG, barras claras) en el hígado. Las ratas se sacrificaron 24 horas después del tratamiento. Las barras representan el promedio ± el error tipo de seis determinaciones independientes. Código: C = aceite + glicerol/agua; P = aceite + piroxicam en glicerol/agua; CCl₄ = CCl₄ en aceite + glicerol agua; CCl₄ + P = CCl₄ en aceite + piroxicam en glicerol/agua; CCl₄ + A = CCl₄ en aceite + aspirina.

* Significación estadística al comparar con el control: $p < 0.001$.

** Significación estadística al comparar con el grupo tratado con CCl₄: $p < 0.001$.

*** Significación estadística al comparar con el grupo tratado con CCl₄: $p < 0.01$.

lipoperoxidativa de los lípidos como en el contenido de TAG. Por su parte, los animales tratados con CCl₄ y aspirina manifestaron un regreso a la normalidad en el contenido hepático de TAG, pero persistió el aumento en el grado de lipoperoxidación. (Fig.1). Es

conveniente aclarar que los AINEs usados en este trabajo, solos o en combinación con el CCl_4 , no produjeron en los animales que los recibieron efectos colaterales apreciables en la sobrevida, el aspecto físico o el comportamiento.

Discusión

El efecto protector de ambos fármacos se observó en las determinaciones de triacilglicéridos hepáticos, mientras que en el índice de lipoperoxidación sólo el piroxicam ejerció un efecto atenuante. En las mediciones de transaminasas séricas y de bilirrubina los fármacos definitivamente no mostraron efecto protector. Una posible explicación a esta discrepancia es que el control de los fármacos sobre la elevación de TAG hepáticos sea uno de los primeros eventos que se instalan en función del tiempo. Respecto a la disminución del índice de lipoperoxidación como indicador de daño por radicales es probable que también sea un resultado temprano de la acción del fármaco sobre el control de las reacciones en cadena, ejercidas por los radicales libres, y que las determinaciones de las enzimas indicativas de lesiones inflamatorias y necróticas requieren tiempos mayores de la acción del fármaco para su regreso a la normalidad. En relación a la dosis empleada, la vida media del piroxicam en la rata es de 9 a 16 horas⁹ y de la aspirina, que es hidrolizada casi inmediatamente, su principio activo, el ácido salicílico, tiene una vida media de 2 a 30 horas dependiendo de la dosis¹⁸. Si los estudios se prolongan más de 24 horas es recomendable emplear otro esquema de dosis.

Vane, el investigador que descubrió la acción inhibitoria de la aspirina sobre la síntesis de prostaglandinas¹⁹, asegura que a pesar de la vasta experiencia clínica en el uso de los AINEs para el tratamiento del dolor, la fiebre y la inflamación local, el mecanismo de acción de estos fármacos aún no se ha esclarecido totalmente²⁰. Parte de la actividad antiinflamatoria de los AINEs podría relacionarse con su capacidad para inhibir la actividad de la ciclooxigenasa y, por lo tanto, la producción de

prostaglandinas²¹. Por otra parte, la acción de los antiinflamatorios se ha relacionado con su capacidad para inactivar radicales libres en los sistemas biológicos. Al respecto existen experimentos ilustrativos, algunos de ellos mencionados en la introducción de este trabajo. En 1983, Hiller y Wilson estudiaron la capacidad de los radicales libres hidroxilo para reaccionar con varias drogas antiinflamatorias durante la radiolisis del agua y confirmaron que los radicales hidroxilo reaccionan rápidamente con ellas²². El grupo de Sagone informó que la aspirina, la indometacina y el ibuprofen selectivamente bloquean la salida de radicales hidroxilo de granulocitos estimulados con zimósán⁶. Esto sugiere que el efecto principal del antiinflamatorio podría ser precisamente el de impedir la salida de radicales hidroxilo de las células fagocíticas. En la literatura también existen datos sobre la capacidad de los salicilatos para reaccionar en forma rápida y selectiva con los radicales hidroxilo. Como se mencionó antes, el piroxicam es el AINE con mayor capacidad para inhibir la generación de aniones superóxido en neutrófilos expuestos a estímulos apropiados⁸.

En los experimentos aquí descritos el piroxicam aventajó a la aspirina en su capacidad para revertir la acción lipoperoxidativa del CCl_4 . Los datos de la literatura indican que la aspirina influye sobre los radicales OH^\cdot y el piroxicam lo hace sobre los radicales O_2^\cdot . Por consiguiente, será interesante ensayar la capacidad para revertir las acciones tóxicas del CCl_4 de otros compuestos que abatan los niveles celulares del radical O_2^\cdot . Otra posibilidad es que el piroxicam, y no la aspirina, disminuya la poza del radical CCl_3 formado a partir del hepatotóxico usado.

Los datos incluidos en este trabajo no permiten asegurar un mecanismo de acción preciso para el piroxicam, pero los resultados tienen, potencialmente, un enorme interés práctico: las intoxicaciones debidas a la presencia de radicales libres pueden ser manejadas más satisfactoriamente con algunos de los antiinflamatorios no esteroideos.

Referencias

- 1.- Slater TV. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
- 2.- Halliwell B. Oxygen radicals and tissue injury. En: Halliwell B, ed. *The Upjohn Co. USA* 1988;139-43.
- 3.- Poyer JL, McCay PB, Lai EK, Janzen EG, Davis ER. Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* 1980; 94:1154-60.

- 4.- Rechnagel RO, Glende EA Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 1973;2:263-97.
- 5.- Comporti M. Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985;53:599-623.
- 6.- Sagone AL Jr, Wells RM, DeMocko C. Evidence that OH⁻ production by human PMNs is related to prostaglandin metabolism. *Inflammation*. 1980;4:65-71.
- 7.- Sagone AL Jr, Husney RM. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: Evidence that those drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol* 1987;138:2177-83.
- 8.- Kaplan HB, Edelson HS, Korchak HM, Given WP, Abramson S, Weissman G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory agents on human neutrophil functions *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:3718.
- 9.- Wiseman EH. Review of preclinical studies with piroxicam: Pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. *Roy Soc Med Int Cong Symp Series* 1978;1:11-23.
- 10.- Ottolenghi A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch Biochem Biophys* 1959;79:355-63.
- 11.- Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz MM, García-Sainz A, Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 1984;33:2599-604.
- 12.- Player TJ, Miller DJ, Horton AA. Age-dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Comm* 1977;78:1397-402.
- 13.- Butler JM Jr, Maling HM, Horning MG, Brodie BB. The direct determination of liver triglycerides *J Lipid Res* 1961;2:95-6.
- 14.- Cleland KW, Slater EC. Respiratory granules of heart muscle. *Biochem J* 1953;53:547-56.
- 15.- Keyser JW, Vaughn J. Turbidities in the estimation of serum proteins by the biuret method. *Biochem J* 1949;44:XXII.
- 16.- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Path* 1956;28:5663.
- 17.- Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937;119:418-90.
- 18.- Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier, 1988; 491-8.
- 19.- Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism for aspirin-like drugs. *Nature* 1971; 231:232-5.
- 20.- Flower R, Moncada S, Vane JR. Analgesic antipyretics, anti-inflammatory agents: Drugs employed in the treatment of gout. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman LS, Gilman A, eds. USA: MacMillan, 1985.
- 21.- Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs. *FASEB J* 1987;2:89-96.
- 22.- Hiller KO, Wilson RL. Hydroxyl-free radicals and anti-inflammatory drugs: Biological inactivation studies and reaction rate constants. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2109-11.