

Centro Nacional de Toxicología

EFFECTO HEPATOPROTECTOR INDUCIDO POR EL FLAVONOIDE *ASTILBINA* FRENTE A UN MODELO ANIMAL TRATADO CON TETRACLORURO DE CARBONO

Lic. Gema Selema de la Morena¹ y Dr. Jorge Martínez Pérez²

RESUMEN

En este estudio los niveles de Malondialdehído, Transaminasa Glutámico Pirúvica y la Fosfolipasa A₂ se determinaron en homogenato de hígado de ratas hembras para comprobar el posible efecto antilipoperoxidativo del flavonoide *Astilbina* (40 mg/g) frente al modelo de toxicidad de Tetracloruro de Carbono (0,001 ml/g), considerándose también el peso corporal y del hígado al sacrificar los animales. Los resultados preliminares obtenidos después de 18 h de cada tratamiento sugieren un efecto hepatoprotector del flavonoide, dado por la disminución de los niveles de lipoperóxidos, de la Transaminasa Glutámico Pirúvica y la Fosfolipasa A₂ para a < 0,05 *contra* la toxina utilizada.

Descriptores DeCS: MALONDIALDEHIDO/análisis; FOSOFILIPASAS A/química; ALANINA TRANSAMINASA/química; HIGADO/enzimología; TETRACLORURO DE CARBONO/toxicidad; RATAS SPRAGUE-DAWLEY.

ABSTRACT

In present study, malonyaldehyde, glutamic pyruvic transaminase (GPT), and A Phospholipase levels, were determined in female rats liver homogenate, to confirm potential antilipoperoxidant effect of flavonoid *Astilbina* (40 mg/g) versus toxicity model of carbon tetrachloride (0.001 ml/g), also assessing body and liver weight when animals were sacrificed. Preliminary results, obtained after 18 hours of each treatment, suggest an hepatoprotective effect of flavonoid, in view of decrease in lipoperoxide levels of GPT and A₂ phospholipase of < 0.05 against toxine used.

Subject headings: MALONDIALDEHYDE/analysis; PHOSPHOLIPASES/chemistry; LIVER/enzimology; RATS; SPRAGUE-DAWLEY.

Como es conocido, el efecto hepatotóxico del Tetracloruro de Carbono (CCl₄) está mediado por la formación de radicales libres. El hígado es uno de los órganos más afectados por reacciones de oxidación debido a la importancia que tiene el metabolismo en el origen de estos radicales libres.

Los radicales libres entre otras cosas, provocan una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (traducción de señales, secreción y endocitosis).¹

Proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, es de suma importancia y los agentes que son capaces de hacerlo son llamados hepatoprotectores.

Si se recurre a la Fitoterapia, como alternativa terapéutica, encontraremos a los flavonoides, los cuales ocupan un lugar cimero en nuestros tiempos, por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores.

¹ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

² Doctor en Ciencias.

Los Flavonoides constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal, particularmente en las partes aéreas. Se pueden presentar tanto libres como en forma de glicósidos (O- y C-glicósidos). Estos últimos se localizan comúnmente dentro de las estructuras celulares (ejemplo vacuolas) de hojas, flores y tallos. Las formas libres de sus derivados sencillos son comunes en exudados vegetales (ejemplo: ceras, mucílago, aceites, leche).

Presentan en común un esqueleto hidrocarbonado básico del tipo C₆-C₃-C₆ derivado del ácido shikímico y 3 restos de acetatos. Numerosos extractos vegetales y formulaciones farmacocinéticas que contienen flavonoides se encuentran hoy en día en el mercado. Un estudio reciente demostró el efecto hepatoprotector de un flavonoide frente al daño causado por CCl₄.²

Teniendo en cuenta la necesidad de prevenir o proteger al hígado de los procesos de peroxidación lipídica y la actividad antioxidante demostrada por estos productos, nos propusimos estudiar las propiedades antiperoxidante de un flavonoide frente al modelo de toxicidad del CCl₄.⁴

MÉTODOS

En la experiencia se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* (SD) del sexo femenino, en un rango de peso corporal entre 150-200 g provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Santiago de Las Vegas, Cuba.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Grupo	Cantidad de Animales	Sustancia administrada	Tipo de tratamiento
I	10	Control basal	18
II	10	CCl ₄ (i.p)	18
III	10	Flavonoide + CCl ₄ (i.p)	18
IV	10	Control DMSO (i.p)	18

Los animales se sacrificaron previa narcosis con éter al cabo de las 18 h de tratamiento.

El flavonoide se les administró a los animales en dos dosis: 2 h antes y 2 h después del CCl₄. El mismo procedimiento se realizó para el grupo control del Dimetil Sulfoxido (DMSO).

Los animales se sometieron a un ayuno de 24 h antes de administrarles las sustancias de ensayo.

Se preparó el homogenato, tomándose 2 g de tejido hepático y se añadió 8 mL del *Buffer* KCl/Histidina conteniendo 20 mg/mL de Lisina acetilsalicilato (pH=7.4), homogenizándose a 1 5000 rpm durante 15 min. El homogenato se centrifugó a 2500 rpm durante 40 min obteniéndose el sobrenadante al cual se le realizaron las

determinaciones de Lipoperóxidos (MDA), Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) y Fosfolipasa A₂ (FA₂). La concentración de proteínas totales (PT) también fue determinada.

SUSTANCIAS A ENSAYAR

El CCl₄ se preparó al 20 % y se mezcló con aceite vegetal en una relación (1:3).

Del fitofármaco ensayado se tomaron 3 g y se disolvieron en 3 mL de DMSO, añadiéndose agua destilada cantidad suficiente para 100 mL. Al hacer un análisis de pureza del flavonoide se obtuvo cromatográficamente un producto homogéneo. El DMSO fue preparado utilizando 3 mL de este en 50 mL de agua destilada. Este solvente fue escogido para lograr mejor biodisponibilidad del flavonoide, siendo reportado su uso en ensayos de cultivos celulares para evaluar hepatoprotectores.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

LIOPERÓXIDOS

La peroxidación lipídica fue determinada por la reacción con Ácido Tiobabútrico, midiéndose la formación de MDA a una D.O de 530 nm.³

TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA Y PROTEÍNAS TOTALES

Para la realización de las determinaciones se utilizó un Analizador Automático Hitachi modelo 705 y se siguieron las especificaciones de calidad establecidas para estos estudios por el Laboratorio Central del Hospital Dr. Carlos J. Finlay.

FOSFOLIPASA A₂

Se determinó por un método espectrofotométrico de liberación de fosfolípidos y ácidos grasos.⁴

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa NCSS (versión 6.0) 1995. Los datos se analizaron por grupo, comparándose el grupo control con los grupos tratados referente a todas las variables, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples de medias (todos contra todos). El nivel de significación fue para % < 0.05.

RESULTADOS

En todos los casos se manifestó un decrecimiento del peso corporal (tabla 1), lo cual puede deberse al ayuno a que se expusieron los animales antes (24 h) y durante el experimento (18 h). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos I y II con el grupo IV.

Con relación al peso del hígado se comportó de manera muy similar en todos los grupos, excepto para el grupo II, en el cual se observó un ligero aumento.

En los niveles de MDA (Tabla II) se observaron diferencias significativas entre todos los grupos.

El parámetro más utilizado en la investigación de agentes hepatoprotectores es la determinación de los niveles de TGP (tabla 2), en los que obtuvimos diferencias significativas para el grupo tratado con CCL₄ con relación a los grupos I, III y IV en cuanto al aumento de la actividad de la enzima, demostrándose el daño hepatocelular causado por este agente.

En cuanto a los niveles de FA₂ (tabla 2) se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos.

Para todos los grupos ensayados se reflejó un contenido proteico similar en cada homogenato de hígado no obteniéndose diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Aunque el peso corporal de todos los animales se manifestó de forma decreciente, pudimos corroborar el efecto anabólico que presentan los flavonoides debido a sus acciones sobre el metabolismo de constituyentes normales del organismo,⁵ no obstante se debe tener en cuenta el bajo peso corporal de los animales del grupo IV.

El flavonoide ejerció un efecto antilipoperoxidante frente a las reacciones radicalarias originadas por el CCL₄, aunque el efecto del fitofármaco está un tanto enmascarado por la acción del DMSO. Es evidente que en esta experiencia se ha disminuido la peroxidación lipídica por el CCL₄, mecanismo de acción conocido de este hepatotóxico, lo cual indica un efecto antioxidante que podría ser justificado, si tenemos en cuenta las propiedades reductoras de estos compuestos en la literatura.

Atendiendo que la enzima TGP es muy sensible a las afectaciones hepáticas, tanto por procesos fisiopatológicos como por procesos tóxicos o yatrógenos, siendo altamente específica para detectar lesiones celulares del parénquima hepático o trastornos de la permeabilidad de la pared celular podemos inferir que el flavonoide ha ofrecido un comportamiento característico de un agente antihepatotóxico, señalándose que los valores de la enzima tardan hasta 6 semanas o más en regresar a sus valores normales de forma espontánea. El % de protección calculado para el flavonoide a partir de la TGP fue de un 94 %. Comparando con los datos de la literatura es un porcentaje bastante alto con relación a otros flavonoides reconocidos como hepatoprotectores como son la *Silibina* con 94 % y *Silandrina* con 100 %, ⁶ siendo más representativo el efecto del flavonoide sobre este órgano, ya que los reportes de la literatura se refieren a cultivos celulares, pero en nuestro caso los resultados demuestran el efecto en el animal íntegro.

La disminución en la actividad de la enzima FA₂ producida se corresponde con los reportes de la literatura sobre el efecto de los flavonoides como captadores de radicales libres en el metabolismo del Ácido Araquidónico, o también se pudiera pensar en un efecto directo del flavonoide sobre la enzima.

TABLA 1. *Peso corporal y del hígado (gramos) de ratas SD Hembras.*

Parámetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Peso corporal (g)	172,7 ± 5,98 ^{*d}	171,5 ± 6,55 ^{*d}	168,6 ± 5,27	166,1 ± 3,75 ^{*a,b}
Peso del hígado (g)	7,08 ± 0,52 ^{*b}	7,71 ± 0,43 ^{*a,d}	7,39 ± 0,477	7,06 ± 0,34 ^{*b}

TABLA 2. *Valores de Química Sanguínea en ratas SD Hembras (Media y Desviación Estándar)*

Parámetro	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
MDA (nmolar)	506,4 ± 68,95 ^{*b,c,d}	1344,9 ± 214,41 ^{*a,c,d}	675,7 ± 60,53 ^{*a,b,d}	784 ± 44,62 ^{*a,b,c}
TGP (U/L)	60,6 ± 2,95 ^{*b}	119,5 ± 12,04 ^{*a,c,d}	64,1 ± 4,70 ^{*b,d}	59,1 ± 4,68 ^{*b,c}
FA ₂ (U/L)	4,75 ± 0,25 ^{*b,c}	5,65 ± 0,42 ^{*ac}	2,65 ± 0,42 ^{a,b}	
Prot. Tot (mg/dl)	67,4 ± 1,17	66,5 ± 1,43	66,4 ± 1,43	67 ± 2,26

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford; Clarendon Press 1989;1-152.
2. Closa D, Torres M, Hotter G, Bioque G, León OS, Gelpí E, et al. Prostanoids and free radicals in CL_4C - induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. Prostaglandins, Leukot, essential Fatty Acids 1997;56(4):331-4.
3. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods enzymol 1978;30:301-10.
4. Boehringer Manheim Bergmeyer Jüeguen. 3ed. Methods of enzymatic analysis 1983;vol.2:285-6.
5. Housset B. Biochemical Aspect of Free Radicals Metabolism. Bull Eur Physiopathol Respir 1987;23:287-90.
6. Recknagel RO, Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. CRC Crit Rev Toxicol 1973;2:263-97.

Recibido: 10 de diciembre de 1998. Aprobado: 13 de febrero de 1999.

Lic. Gema Selema de la Morena.

Centro Nacional de Toxicología (CENATOX). Ave 31 y 114. Apartado 14020. Marianao. Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 30-3252 y 20-8751.