

# REVISION BIBLIOGRAFICA

## METODOS PARA LA EVALUACION FARMACOLOGICA PRE-CLINICA DE MEDICAMENTOS HEPATOPROTECTORES. I. TOXICIDAD HEPATICA INDUCIDA POR EL TETRACLORURO DE CARBONO EN ROEDORES

R. Gonzalez Alvarez, C. Pascual Marquí, O. Ancheta Niebla y D. Remírez Figuerdo

*Departamento de Diagnóstico y Biomedicina, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba*

**RESUMEN.** El daño hepático inducido por agentes químicos y especialmente fármacos, constituye un importante y creciente problema en Medicina humana desde hace más de un cuarto de siglo y grandes esfuerzos son realizados en muchos países para desarrollar medicamentos efectivos y útiles para el tratamiento de la hepatitis y la cirrosis de etiologías diversas. Se describen algunos métodos para la evaluación farmacológica preclínica de los medicamentos hepatoprotectores, principalmente aquellos métodos en que el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) es utilizado para inducir las lesiones hepáticas en roedores. También son analizadas las principales características del daño inducido en el hígado por la exposición aguda y subcrónica al  $\text{CCl}_4$  así como los mecanismos de acción de los agentes que producen efectos hepatoprotectores.

**ABSTRACT.** Liver injury induced by chemicals and especially drugs constitute an important and increasing problem in Human Medicine since more than twenty five years ago and many efforts are carried out in many countries to develop useful effective drugs for the treatment of hepatitis and cirrhosis of various causes. Some methods are described for preclinical pharmacological evaluation of hepatoprotective drugs mainly those methods in which carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) is used to induce liver injury in rodents. Also the main characteristic of liver damage induced by acute and subchronic exposure to  $\text{CCl}_4$  are analyzed as well as the mechanisms of action of agents which induce liver protective effects.

### INTRODUCCION

El daño hepático inducido por agentes químicos ha sido reconocido como un importante problema toxicológico desde hace más de 100 años. A finales del siglo XIX llamó la atención de numerosos científicos las lesiones inducidas por el fósforo amarillo, la arsénamina y el cloroformo, los cuales fueron también estudiados en los animales de laboratorio durante las primeras cuatro décadas del siglo XX. Durante este período fue también señalada la correlación entre cirrosis hepática y el excesivo consumo de etanol<sup>1</sup>.

La hepatitis inducida por agentes químicos y en particular por fármacos se ha convertido en un problema de salud en el mundo, como consecuencia obviamente del consumo creciente de medicamentos. Estadísticas internacionales señalan que el 10 % de los casos reportados con hepatitis aguda son provocados por agentes químicos y que la hepatotoxicidad por drogas constituye el 45 % de los casos de hepatitis aguda en pacientes adultos de más de 50 años de edad<sup>2</sup>.

El daño hepático inducido por agentes químicos no constituye una entidad simple, la lesión observada no depende solamente del agente químico involucrado sino también del período de exposición. Después de la exposición aguda se encuentra frecuentemente acumulación de lípidos en los hepatocitos, necrosis celular o disfunción hepatobiliar, mientras cambios cirróticos o neoplásicos son considerados generalmente como resultado de la exposición crónica<sup>2</sup>.

Algunas formas de daño hepático son reversibles, mientras otras se traducen en lesiones permanentes del órgano, es decir, alteraciones irreversibles. La mortalidad asociada con diversas formas de daño hepático es variable. La incidencia de las lesiones puede variar entre las especies y es dependiente generalmente aunque no siempre de las dosis utilizadas del tóxico<sup>3</sup>.

La vulnerabilidad marcada del hígado al daño inducido por agentes químicos es consecuencia de:

- a) su proximidad anatómica al suministro sanguíneo proveniente del tracto digestivo.
- b) la capacidad del hígado de concentrar y biotransformar sustancias químicas diversas.
- c) su papel en la excreción de xenobióticos o sus metabolitos a través de la bilis<sup>3</sup>.

Morfológicamente, el daño del hígado puede manifestarse de diferentes formas. Los efectos agudos pueden consistir en una acumu-

lación de lípidos (esteatosis) y la aparición de procesos degenerativos que conducen a la muerte celular (necrosis). El proceso necrótico puede afectar grupos pequeños de células parenquimatosas aisladas (necrosis focal), grupos de células localizadas en zonas (necrosis centrolobulillar o periportal) o virtualmente todas las células dentro de un lóbulo hepático (necrosis masiva).

La acumulación de lípidos puede también ser por zonas o de naturaleza mas difusa. Aunque el daño hepático agudo puede consistir tanto en acumulación de grasa así como en necrosis, no necesariamente ambas alteraciones tienen que existir simultáneamente. Cuando la lesión es de tipo colostático, esta trae como resultado la disminución del flujo de bilis con retención de sales biliares y de bilirrubina con la subsiguiente aparición de ictericia.

La naturaleza diversa de la actividad funcional del hígado y su respuesta variable al daño inducido convierte a la selección de modelos y técnicas apropiadas para el pesquizado farmacológico de sustancias hepatoprotectoras en un objetivo complejo. El propósito de este artículo es exponer varios modelos y técnicas importantes y útiles en que se utiliza el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) para la detección y evaluación del daño hepático inducido y su control farmacológico, en animales de laboratorio atendiendo fundamentalmente a su factibilidad de ejecución en los laboratorios de Farmacología y Toxicología Experimental existentes en Cuba, permitiéndoles tanto detectar con una relativamente alta sensibilidad y precisión sustancias farmacológicamente activas, así como obtener valiosa información sobre algunos aspectos de sus posibles mecanismos de acción.

### MODELOS EXPERIMENTALES DE HEPATOTOXICIDAD

Aunque a una cifra mayor de 600 compuestos químicos y (o) fármacos se le han atribuido efectos hepatotóxicos en el hombre<sup>4</sup>, los mecanismos que intervienen en la inducción de la hepatitis se desconocen para la inmensa mayoría de ellos y solo un reducido número de estos compuestos (Tabla I) han sido adecuadamente caracterizados y estudiados en animales de experimentación<sup>5</sup> y a su vez utilizados como modelos experimentales para el pesquizado farmacológico de sustancias hepatoprotectoras. De esos compuestos hepatotóxicos, el tetracloruro de carbono ha sido el mas utilizado internacionalmente con ese fin.

**Tabla 1**

TETRACLORURO DE CARBONO	CICLOHEXAMINA
CLOROFORMO	FENACETINA
TRICLOROETILENO	TETRACICLINA
TETRACLOROETANO	FUROSEMIDA
BROMOBENCENO	BERILIO
DIMETILAMINOAZOBENCENO	EMETINA
TIOACETANINA	ALCOHOL ALILICO
ALCALOIDES DE LA PIRROLIZIDINA	ACIDO VALPROICO
AFLATOXINAS	ETANOL
ACIDO TANICO	ADRIAMICINA
ETIONINA	METOTREXATE
AZASERINA	MITOMICINA
GALACTOSAMINA	MERCPTOPURINA
PARACETANOL	PAPAVERINA
ISONIACIDA	URETANO
ERITROMICINA	METILTESTOTERONA
CLOROPROMACINA	ANTICONCEPTIVOS ORALES
IMIPRAMINA	CARBAMAZEPINA
KETOCONAZOL	AMIODARONA
ALFAMETILDOPA	HELOTANO
AMITRIPTILINA	

#### **Tetracloruro de carbono**

La hepatitis tóxica inducida por el CCl<sub>4</sub> tiene las siguientes características:

a) Las lesiones aparecen frecuentemente después de un período latente, breve y predecible, observándose al microscopio electrónico lesiones características a las 24 h de su administración.

b) La severidad de las lesiones están relacionadas con la dosis administrada del tóxico (relación dosis-efecto).

c) En una primera fase produce fundamentalmente esteatosis hepática. Posteriormente, se desarrolla progresivamente la necrosis y con la administración crónica durante 8 semanas induce cirrosis hepática experimental. Por estas razones se ha convertido en una sustancia de referencia no solo para caracterizar el daño hepático y estudiar sus mecanismos de inducción, sino también, para la búsqueda de nuevos medicamentos con propiedades y efectos hepatoprotectores.<sup>6,7</sup>

Su administración en forma aguda afecta las mitocondrias, el retículo endoplásmico y las membranas celulares, incluyendo la envoltura nuclear. Por microscopía electrónica se puede observar que las cisternas del retículo endoplásmico están dilatadas. Una hora después de la inyección del tóxico se observan vacuolas en el citoplasma y una pérdida de partículas ribosomales de las superficies de las membranas.<sup>1</sup>

Desde el punto de vista bioquímico produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, una inhibición de la síntesis de proteínas asociada con la afectación del retículo endoplásmico<sup>8</sup> así como una infiltración grasa del hígado a expensas fundamentalmente de los triglicéridos.<sup>1</sup>

Posteriormente a su administración la actividad de un número determinado de enzimas mitocondriales y citoplasmáticas hepáticas se hallan incrementadas en el plasma. Así las actividades plasmáticas de las transaminasas aspartato aminotransferasas (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT), glutatión transferasa, dehidrogenasa del ácido láctico, aldolasa y dehidrogenasa isocítica entre otras han sido utilizadas como indicadores diagnósticos de lesión hepática.

Teniendo en cuenta que en general las actividades plasmáticas de las enzimas citoplasmáticas se incrementan más rápidamente que las enzimas mitocondriales, la determinación de ALAT se convierte en un método de elección.<sup>9</sup>

Con relación a los mecanismos de acción responsables de los efectos hepatotóxicos del CCl<sub>4</sub> se han argumentado fundamentalmente dos:

El primero contempla que el CCl<sub>4</sub> es activado hasta su conversión en un radical libre que interactúa entonces con material rico en lípidos de las membranas, produciendo un incremento de la peroxidación lipídica cuestión que ha sido demostrada in vivo e in vitro, constituyendo la base de la teoría que reconoce este proceso como la causa de las lesiones hepáticas inducidas por el CCl<sub>4</sub>.<sup>10</sup> A este mecanismo de acción lo sustenta el hecho de que sustancias antioxidantes como la vitamina E, la silimarina, el cianidanol, el propil galato y el dietil ditiocarbamato entre otros protegen al hígado de las lesiones inducidas por el CCl<sub>4</sub>.<sup>11-13</sup>

El segundo sostiene que los metabolitos tóxicos del CCl se unen a macromoléculas celulares, principalmente, proteínas y especialmente, a grupos sulfidrilos lo cual implica la afectación de un número de sistemas enzimáticos importantes de la célula.

Esta teoría ha sido defendida por algunos autores<sup>14,15</sup> siendo considerada de mayor relevancia que la de la peroxidación lipídica para explicar la hepatotoxicidad del CCl<sub>4</sub>. Evidencias que apoyan este último punto de vista se ha obtenido de experimentos en los cuales el pirazol protege parcialmente al hígado de la necrosis disminuyendo la intensidad de las uniones covalentes de los metabolitos reactivos del CCl<sub>4</sub> a los componentes celulares, sin afectar la peroxidación lipídica.<sup>16</sup>

#### **Metodos para inducir daño hepático agudo por tetracloruro de carbono**

**Descripción:** Ratas macho Sprague Dawley de 200 a 250 g, el alimento les fue retirado de 12 a 14 h antes de la administración del CCl<sub>4</sub> pero el agua fue dada ad libitum. Los animales se pesan y posteriormente se les administra el tóxico por vía i.p en una dosis de 1 mL/kg de peso de una solución preparada al 20 % V/V en aceite vegetal. Todas las administraciones del CCl<sub>4</sub> fueron realizadas a 1 hora determinada y 3 después se le extrae sangre a las ratas para determinación de ALAT, se sacrifican y sus hígados son extraídos y procesados para la determinación de triglicéridos y la realización de estudios morfológicos.<sup>17</sup>

Un procedimiento similar puede ser realizado administrando el CCl<sub>4</sub> por vía intragástrica en una solución en aceite vegetal (1:1, v/v), a razón de 0,5 mL/100g de peso. En este caso, los animales se sacrifican 24 horas después de la intoxicación y se les realizan los estudios bioquímicos, histológicos y/o ultraestructurales referidos.

También pueden utilizarse con los mismos fines ratones de 25 a 30 g de peso a los cuales se le administra por vía intraperitoneal una dosis de 10 mL/kg de peso de una solución de 0,2 mL de CCl en 10 mL de aceite vegetal. Los animales son sacrificados para las determinaciones previamente citadas 4 h después de la administración del compuesto. La sustancia o producto a evaluar puede administrarse 30 min antes del CCl<sub>4</sub><sup>18</sup> o 3 y 6 h después del tóxico en el caso de que las ratas sean sacrificadas a las 24 h.<sup>19</sup>

Se considera necesario incluir en los experimentos dos grupos controles uno que recibe únicamente el producto a evaluar y otro en el que solo se administre a los animales el vehículo en que se disuelve este. Debe evitarse la utilización del dimetilsulfóxido como solvente porque se ha detectado que tiene propiedades hepatoprotectoras.<sup>19</sup>

En los casos que la sustancia a evaluar sea insoluble se prefiere suspenderla en carboximetilcelulosa al 0,7 % ya que carece de efectos en el hígado.

#### **Cirrosis experimental inducida y su control farmacológico**

El aumento del tejido conjuntivo del hígado y en particular de colágeno es un evento esencial en el desarrollo de la cirrosis. Tanto en hígados humanos como de animales tratados con CCl<sub>4</sub>, la incorporación de prolina en la colágena se incrementa.<sup>20,21</sup>

Un mecanismo esencial a través del cual diversos agentes etiológicos pueden dar lugar a una cirrosis, es la producción aumentada de tejido fibroso, se han utilizado diversos agentes con probable actividad antifibrogénica en el manejo terapéutico de los pacientes con cirrosis que incluyen los compuestos siguientes:

1- Análogos de prolina: Estos compuestos compiten con la prolina por el RNAt incorporándose así en la molécula de la colágena. La incorporación de este compuesto extraño en la molécula cambia el eje de su hélice lo que interfiere las reacciones de hidroxilación. Como consecuencia, no se forma la triple hélice y la colágena no se

transporta a velocidad normal hacia el espacio extracelular, sino que se degrada intracelularmente <sup>21</sup>.

2- Agentes quelantes de hierro. Entre estos agentes se destaca la deferoxamina, que además de inhibir la peroxidación lipídica y ser un agente secuestrador de radicales de oxígeno, <sup>22</sup> inhibe también la hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina de la colágena, impidiendo la formación de la triple hélice y el movimiento transcelular de procolágena. No hay glucosilación <sup>23</sup>.

3- Agentes latirogénicos. Son agentes que inhiben la acción de enzima lisiloxidasas y por lo tanto, impiden la formación de los enlaces intra e intermoleculares en la molécula de colágena. Un ejemplo notable entre estos agentes lo es la penicilamina que se combina con los grupos aldehído de la molécula de colágena por lo que no se forman los enlaces intra o intermoleculares. También inhibe a la lisiloxidasas ya que la penicilamina ejerce efecto quelante sobre los iones Cu un cofactor de la enzima <sup>21</sup>.

4- Corticosteroides. Los corticosteroides tienen un efecto antiinflamatorio en general y también son capaces de inhibir a la enzima prolilhidroxilasa <sup>21</sup>.

5- Colchicina. Entre los distintos compuestos con actividad antifibrinogénica, la colchicina es la que en la actualidad se considera con mayores posibilidades de éxito, ya que posee varios efectos farmacológicos que resultan beneficiosos para el tratamiento de la cirrosis hepática. Tiene la propiedad de impedir la polimerización de la tubulina para formar los microtúbulos y como consecuencia inhibe el transporte transmembrana de la colágena <sup>24</sup>. También aumenta la producción de colagenasa, enzima responsable de la degradación extracelular de la colágena <sup>25</sup> y ejerce efecto antiinflamatorio <sup>23</sup>.

#### **Método de Intoxicación crónica con tetracoloruro de carbono en la rata para inducción de cirrosis hepática**

Un método utilizado para producir intoxicación crónica con CCl<sub>4</sub> ha sido descrito por Mourelle <sup>26</sup> con ligeras modificaciones, utilizando ratas Sprague Dawley machos con un peso inicial entre los 50 y 75 g a las cuales se les inyecta por vía intraperitoneal 0,25 mL de la solución de CCl<sub>4</sub> en aceite vegetal cada tercer día durante 8 semanas, empleando concentraciones crecientes cada semana: CCl<sub>4</sub>: aceite 1:7; 1:6; 1:5; 1:4; y 1:3 hasta la octava semana.

Los animales se sacrificaron 2 días después de la última administración. Este esquema de intoxicación fue diseñado con el fin de mantener aproximadamente la misma dosis de CCl<sub>4</sub> por gramo de peso de las ratas durante todo el proceso.

La sustancia o producto a evaluar debe administrarse diariamente a los animales o por lo menos cinco veces a la semana durante el período que dura el experimento.

Los parámetros bioquímicos que evidencian la cirrosis experimental inducida por el CCl<sub>4</sub> en este modelo en ratas son: los incrementos del contenido de colágena en el hígado, así como el aumento de las actividades séricas de la fosfatasa alcalina, alanina amino transferasa y la gamma glutamil transpeptidasa, a lo que se añaden los incrementos de las concentraciones séricas de bilirrubina y el colesterol.

Los métodos aquí expuestos han sido más detalladamente descritos en trabajos anteriores <sup>3,18,26,27</sup>.

Las determinaciones de los parámetros antes referidos se complementan con los estudios histopatológicos y ultraestructurales que deben realizarse a los hígados de las ratas que fueron tratadas crónicamente con el CCl<sub>4</sub>.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Plaa, G.L. In: **The Basic Science of poisons**. MacMillan Publishing Company, U.S.A., 206-231, 1980.
2. Benhamou J.P. In: **Liver Cells and Drugs**, John Libbey Eurotext, France, 3-12, 1988.
3. Plaa G.L. and Hewitt W.R. In: **Principles and Methods of Toxicology**, Raven Press, U.S.A., 599-628, 1989.
4. Stricker B.H. and Spoelstra P. In: **Drug-Induced hepatic In-Jury**, Elsevier, Netherlands, 30-60 1985.
5. Pessayre D. and Larrey D. In: **Liver Cells and Drugs**, John Libbey Eurotext, France, 129-142, 1988.
6. Castro J.A. In: **Proceedings of 9th International Congress of Pharmacology**, MacMillan Press, U.S.A., 243-250, 1984.
7. Par A. and Javor T. *Acta Physiol. Hung.* 64, 409, 1984.
8. Smuckler E.A., Iserl O.A. and Benditt E.P. *J. Exp. Med.* 116, 55, 1962.
9. Plaa G.L. and Hewitt W.R. In: **Principles and Methods of Toxicology**, Raven Press, U.S.A., 407-445, 1982.
10. Recknagel R.O. and Glende E.A. *Toxicol.* 2, 263, 1973.
11. Masuda and Nakayama N. *Biochem. Pharmacol.* 31, 2713, 1982.
12. Housset B. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 23, 287, 1987.
13. Letteron P., Labbe G. and Degott C. *Biochem. Pharmacol.* 39, 2027, 1990.
14. Gillette J.R., Mitchell J.R. and Brodie B.B. *Am. Rev. Pharmacol.* 14, 271, 1974.
15. Slater T.F. In: **Free Radical, lipid peroxidation and cancer**. Academic Press, U.S.A. 243-270, 1982.
16. Bernal A.S., De Castro C.R., De Toranzo E.G.P., Marz A., De Ferreyra E.C., de Fenos O.M. and Castro J.A. *Br. J. Exp. Path.* 61, 505, 1980.
17. Gonzalez R., Ancheta O., Pascual C., Pellon R., Frutos N. and Millan V. *Biotechnol. Aplicada*, 8, 140-147, 1991.
18. Ferrelira, E.C., Fenos, O.M. and Castro, J.A. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 42, 3, 1983.
19. Park Y., Smith R.D., Combs A.B. and Kehrer J.P. *Toxicology* 52, 165, 1988.
20. Rojkind M. and Kershenovich D. *Biochem. Biophys. Acta* 378, 415, 1975.
21. Chojkier M. and Brenner D.A. *Hepatology* 8, 176, 1988.
22. Younes M., Sause Ch. and Siegers C.P. *J. of Appl. Toxicol.* 8, 261, 1988.
23. Barnhart E.R. *Physicians Desk Reference*, Medical Economics Company, U.S.A., 1989.
24. Ehrlich H.P., Ross R. and Borstein P.J. *Cell Biol.* 62, 390, 1974.
25. Harris E.D. and Krane S.M. *Arth. Rheum.* 14, 669, 1971.
26. Mourelle M., Amezcua J.L. and Perez-Alvarez V., *Eur. J. Pharmacol.* 134, 175, 1987.
27. De Leon A.L. and Rojkind M. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 737, 1985.