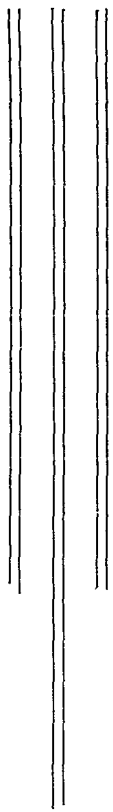


24. 23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"



EFFECTO CITOPROTECTOR DE UN ANALOGO
SINTETICO DE LA PROSTAGLANDINA E2 EN
CIRROSIS HEPATICA ALCOHOLICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

PABLO MUÑOZ PIEDRAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

I INTRODUCCION -----	1
1.-Generalidades sobre prostaglandinas-----	1
2.-Definición y mecanismo de acción de las prostaglandinas-----	4
3.-Vías de formación de las prostaglandinas-----	6
4.-Metabolismo de las prostaglandinas-----	7
5.-Prostaglandinas en procesos fisiopatológicos y cito- protección -----	10
6.-Consideraciones sobre el alcohol como hepatotóxico-----	19
7.-Enzimas hepáticas en la rata-----	24
II FUNDAMENTACION DEL TEMA-----	27
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	29
IV HIPOTESIS DE TRABAJO-----	30
V OBJETIVOS-----	31
VI MATERIAL Y METODOS-----	32
1.-Material biológico, equipo, materiales y reactivos-----	32
2.-Métodos-----	34
VII DESARROLLO-----	48
VIII RESULTADOS-----	50
IX DISCUSION DE RESULTADOS-----	59
X CONCLUSIONES-----	63
XI PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES-----	64
XII BIBLIOGRAFIA-----	65

INTRODUCCION

1.-Generalidades sobre las prostaglandinas

Las prostaglandinas son sustancias cuyo conocimiento es relativamente reciente en los sistemas biológicos, y aun sin llegar a una descripción total, hay evidencias suficientes para considerarlas como moléculas con participación directa en la homeostasis corporal, encontrándose en casi todos los fluidos y tejidos del organismo. (20)

Kurzrok y Lieb (16), estudiando los efectos del semen humano sobre músculo liso del endometrio (para fines de inseminación artificial) observaron que en algunos casos el músculo se contraía mientras que en otros la contracción ya iniciada cesaba (a pesar de tratarse de semen de la misma especie y la misma fibra muscular), concluyendo que la sustancia responsable se encontraba en el plasma seminal aun sin la presencia de espermatozoides.

Goldblatt y Von Euler (citado en 20), comunicaron que un compuesto aislado del líquido seminal y de las glándulas accesorias de la reproducción, poseía la propiedad de contraer el músculo liso, junto con una acción vasodepresora e antihipertensiva. Al estudiar su composición, se descubrió que se trataba de un ácido graso lábil a temperaturas elevadas dializable y soluble en alcohol.

Por el sitio en que se aisló se le dió el nombre de "prostaglandina", aunque este término es desafortunado, ya que el origen de estas sustancias no está en la prostata sino en las vesículas seminales.

Fue poco lo que pudo descubrirse acerca de las propiedades bioquímicas de las prostaglandinas, principalmente por ser sustancias que se producen en muy poca cantidad (debido a su gran potencia biológica (20)). Además son rápidamente degradadas por enzimas catabólicas, no pudiendo obtenerse en cantidades suficientes para su estudio.

Bergström y Sjoval (citado en 20), aislaron por primera vez las formas cristalinas de las prostaglandinas E_1 y F_1 alfa. Bergström, caracterizó la estructura de estos dos compuestos determinando que estaban formados por ácidos grasos insaturados de 20 carbonos con un anillo de ciclopentano entre los carbonos 8 y 12 (fig. 1)

Bergström y Van Dorp (citado en 20), sintetizaron la prostaglandina E_2 a partir de ácido araquidónico, demostrando una estrecha relación entre las funciones de las prostaglandinas y los nucleótidos cíclicos, principalmente el AMPc.

André y Nezamas (3), reportan que en el perro las prostaglandinas E_1 y E_2 inhiben la secreción gástrica de ácido durante la estimulación con histamina, alimentos o ambos. Además en la rata se evita el desarrollo de úlceras por "stress"

Estas observaciones condujeron a la síntesis de compuestos de administración oral mucho más potentes, demostrando su eficacia para disminuir la secreción ácida en el estómago en condiciones normales, de estimulación o ambas.

Más tarde se demostró la participación de las prostaglandinas en la producción de moco por las células de la mucosa gástrica, disminuyendo el daño causado por agentes como el ácido y la pepsina; a esta propiedad se le denominó "mucoprotección, siendo independiente de las propiedades antisecretoras (2, 20).

Karim (15), logró inducir el trabajo de parto con una prostaglandina, y reporta la inducción del aborto por medio de la prostaglandina $F_{2\alpha}$.

Hamberg (11), descubre dos precursores endoperoxídicos de las prostaglandinas (G_2 y H_2), describiendo la posible transformación de estas sustancias en tromboxanos.

Moncada y col. (22) descubrieron una sustancia de acción contraria a los tromboxanos a la que se llamó prostaciclina.

Del conocimiento así acumulado se estableció que los precursores endoperoxídicos de las prostaglandinas pueden originar (además de las prostaglandinas) tanto los tromboxanos como la prostaciclina por vías enzimáticas diferentes. Otros compuestos de importancia biológica son el ácido hidro-eicosatetranoico (HETE) y los leucotrienos, sintetizados a partir de ácido araquidónico.

2.-Definición y Mecanismo de acción de las Prostaglandinas.

Las prostaglandinas son un grupo complejo de ácidos grasos insaturados de 20 carbonos, con un anillo ciclopentano incluido entre los carbonos 8 y 12, que se sintetizan en casi todos los tejidos y ejercen en ellos efectos biológicos múltiples.

Las prostaglandinas se consideran derivados de los ácidos grasos y se cree están relacionados estrechamente con el HETE y los leucotrienos. Por fines didácticos se consideran derivados de una estructura hipotética: al ácido "prostanico" - cuya configuración se esquematiza a continuación. (fig. 1)

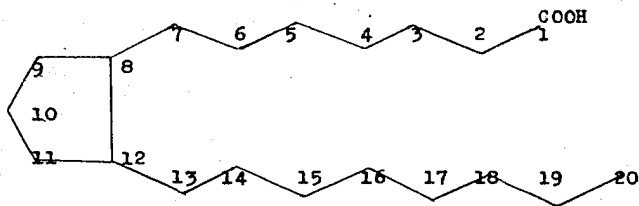


Fig. 1.-Fórmula estructural del ácido prostanico. (21)

Las prostaglandinas se consideran autacoides u hormonas de acción local ya que generalmente actúan en el mismo tejido que las origina. Su vida media es muy corta y pasan en cantidades mínimas a la circulación general. Se sintetizan localmente debido a múltiples estímulos como: el trauma mecánico, los cambios en la osmolalidad, cambios de pH y la presencia de sustancias extrañas. (20)

Cada tejido en particular formará las prostaglandinas que sirven a sus funciones. (20) Las modificaciones simples en la estructura de una prostaglandina pueden conducir a un cambio radical en su acción , así por ejemplo la prostaglandina E_1 inhibe la agregación plaquetaria, mientras que la prostaglandina E_2 la promueve a pesar de que ambas prostaglandinas difieren solo en la presencia de un doble enlace. (6)

Se considera que los efectos de las prostaglandinas anteriormente mencionados, puede explicarse por cambios en la concentración de los nucleótidos cíclicos, por medio de la regulación de la adenil ciclase, donde al parecer participa el calcio. (1)

3.-Vías de formación de las Prostaglandinas.

e) Vía de la cicloxigenasa o prostaglandina sintetasa.

Conduce a la formación de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Una vez que se pone en contacto el ácido araquidónico con la enzima se forman los endoperoxidos cíclicos E_2 y H_2 los cuales pueden entrar a alguna de las tres vías que llevan a la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. (fig. 2) (20)

b) Vía de la lipoxigenasa.

Conduce a la síntesis del HETE y los leucotrienos, las enzimas de esta vía actúan como competidoras para la oxigenación del ácido araquidónico libre. (fig. 3)

Muchas células poseen ambos sistemas (cicloxigenasa y lipoxigenasa) sin embargo independientemente de los requerimientos por un mismo sustrato, la vía de la lipoxigenasa no se inhibe por la acción de los antiinflamatorios no esteroideos.

Entre las células en las que se han encontrado la vía de la lipoxigenasa están las plaquetas y los leucotrienos. (10) La vía de la lipoxigenasa de varios leucocitos genera una serie de ácidos hidroperoxieicosatetránicos (HPTEs), incluyendo el 5-HPETE que sirve como precursor de los leucotrienos. (9)

4.-Metabolismo.

En el hombre, la síntesis de prostaglandinas se inicia a partir de ácidos grasos (hemolinoleico, araquidónico, eicosapentanoico) que derivan del ácido linoléico (de 18 carbonos), este ácido se -
 elonga para formar tres ácidos de 20 carbonos que difieren en su grado de insaturación.

Debido a que las prostaglandinas más importantes son la E_2 y -
 la F_2 alfa, al ácido araquidónico (AA) se considera el precursor graso más importante. El AA es enviado por la sangre ligado a -
 albúmina a todo el organismo y se incorpora a los componentes --
 fosfolípidos de membrana celular en donde puede liberarse por -
 acción enzimática específica. (24 , 25)

Las prostaglandinas no se almacenan, por lo que deben sintetizarse en el momento que se les requiera. Una vez liberado el ácido graso de la membrana celular, la síntesis de prostaglandinas empieza en forma automática, el sitio de regulación se localiza en la fosfolipasa específica que se activa en respuesta a -
 una gran variedad de estímulos físicos, químicos u hormonales .
 (20)

En los últimos años se ha encontrado que el compuesto conocido como sustancia de acción lenta de la anafilaxia (SRS-A) puede ser un producto del metabolismo del AA y de hecho parece corresponder al leucotrieno C. (20)

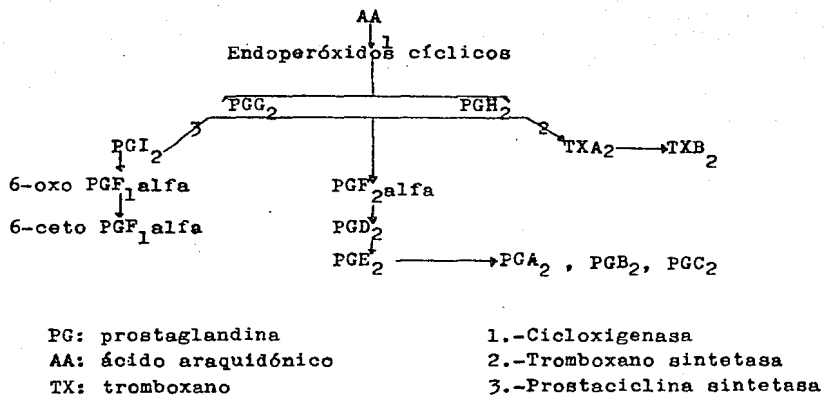


Fig. 2 Metabolismo del ácido araquidónico (20)

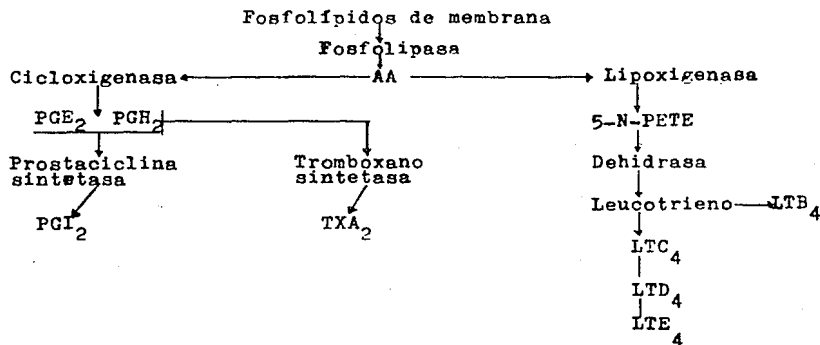


Fig. 3 Metabolismo del ácido araquidónico y su conexión con las dos vías enzimáticas más importantes (20)

Las prostaglandinas no sufren cambios en su estructura en la sangre, se degradan en un sólo paso en el hígado y los pulmones (80-90%). La depuración en el hígado de la prostaglandina A es del 50% y casi nula en los pulmones. (6,8) Así mismo la prostaciclina sólo se degrada en un 50 % en el pulmón . (fig. 4) (20)

La prostaciclina se degrada espontáneamente a 6-ceto-prostaglandina F_1 alfa que es un compuesto inactivo. (24) El tromboxano es un compuesto inestable que se hidroliza rápidamente para formar tromboxano B_2 fisiológicamente inerte. (6,25)

La inactivación de las prostaglandinas se inicia en el carbono 15 por oxidación catalizada de la enzima 15-hidroxi prostaglandina-deshidrogenasa, en este paso se forma una ceto prostaglandina que no tiene actividad biológica. (20)

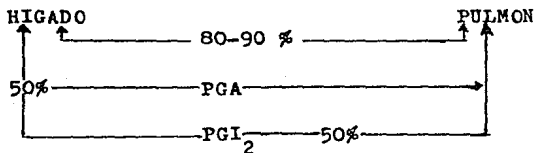


Fig. 4 Catabolismo de las prostaglandinas. (diagrama del autor)

5.-Prostaglandinas en procesos fisiopatológicos y citoprotección

Las propiedades citoprotectivas de las prostaglandinas han sido bien estudiadas en relación a la mucosa gástrica y yeyunal, cuando éstas se exponen a varios agentes nocivos (17, 21)

Reportes recientes sugieren que esta propiedad no se limita al tracto gastrointestinal sino que puede ser demostrada en riñon, páncreas, e hígado (5,13,21,27,28,29,30,31,36).

La investigación sobre los efectos prostaglandínicos en el tubo digestivo ha sido muy intensa: Coceani y Ascik (7), comunicaron la presencia de prostaglandina E₂ en el estómago de rata. En 1968 se reporta el hallazgo de esta sustancia en el estómago humano, en ese mismo año se descubre que la aplicación parenteral de prostaglandinas de la serie E inhiben el volúmen y la concentración ácida de la secreción gástrica en animales(20).

Estudios posteriores demostraron la eficacia de las prostaglandinas en la inhibición de la secreción gástrica basal o estimulada con alimentos o histamina (33).

Más tarde se sintetizaron análogos metilados más potentes que las prostaglandinas naturales, cuando estos se administraban por vía oral.

Anteriormente se sugería que la acción antisecretora ejercida por las prostaglandinas era debida de la disminución de la cantidad del AMPc en las células oxínticas, sin embargo es ahora conocido que las prostaglandinas también incrementan (al igual que la histamina) el AMPc intracelular (20).

Dousa (citado en 20), propuso el esquema del mecanismo regulador que se conoce como: sistema histamina-prostaglandina y que se considera viable hasta la actualidad (fig. 5). El estímulo secretor y el inhibidor no actúan en la misma región celular, sino que existen diferentes receptores dentro de la misma célula.(12)

Medina S. (20), describe en perros un efecto inhibitorio de la secreción gástrica por la hormona hipotalámica liberadora de tirotrópina, la cual ha sido identificada en mucosa gástrica donde podría jugar un papel regulador.

Además del efecto inhibitorio de la secreción ácida, las prostaglandinas tienen la propiedad de estimular la producción de moco tanto en el estómago como en el intestino delgado(4,10). Las prostaglandinas exógenas de la serie E tienen mayor potencia antisecretora que las prostaglandinas endógenas.

Los efectos de mucoprotección e inhibición ácida son independientes, lo cual ha sido comprobado por el hecho de que la prostaglandina E₂ alfa no posee efecto inhibitorio de la secreción gástrica pero sí efecto mucoprotector (20).

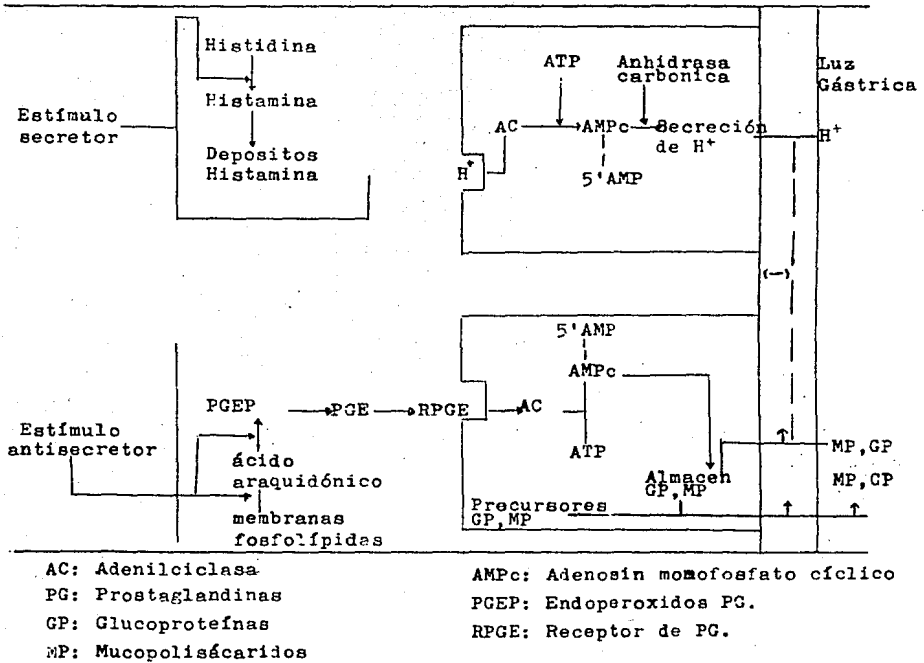


Fig. 5 Esquema del sistema Histamina-Prostaglandina propuesto por Doussa (20)

Para explicar los mecanismos de mucoprotección se han empleado agentes como el ácido acetil salicílico, indometacina, sales biliares, etanol y galactosemina tanto en la rata como en el perro; las hipótesis al respecto incluyen:

- 1.-El refuerzo de la integridad de la barrera mucosa de acuerdo a la cantidad de moco secretada. (1,3)
- 2.-Vasodilatación de la mucosa gástrica. (2)
- 3.-Estimulación alcalina. (2,20)
- 4.-Mucoprotección por células profundas. (20)
- 5.-Empleando prostaglandina E_2 ; activación del sistema de adenilciclasa a través del AMPc en células no parietales cuyo origen es el epitelio superficial. (1,6,21)
- 6.-Síntesis de novo de RNA y DNA de mucosa gastroduodenal y pancreática por prostaglandinas E y F. (20)
- 7.-Activación de la bomba de sodio y potasio por la prostaglandina E_2 (2)
- 8.-Activación de la circulación sanguínea de la mucosa gástrica. (2)

El efecto citoprotector de las prostaglandinas es importante en los epitelios que están expuestos a agresiones constantes como: la mucosa gastrointestinal, el aparato respiratorio y genitourinario, e inclusive piel e hígado.

Recientemente Stachura y Tarnawski (29), indujeron daño agudo al hígado de ratas administrando D-galactosamina con la finalidad de estudiar si la 16,16 dimetil prostaglandina E₂ y los productos comerciales Hepatofalk (HF) y Orotofalk (OF) pueden prevenir el daño agudo al hígado (fig 6).

Como se muestra en la figura 6 el daño inducido por D-galactosamina fue impresionantemente reducido debido al pre-tratamiento con dimetil prostaglandina E₂ y los fármacos HF y OF.

Otros estudios muestran que las prostaglandinas son capaces de proteger al hígado contra hepatotóxicos como CCl₄ este compuesto aumenta significativamente los niveles en suero de transaminasa glutámico pirúvica y fosfatasa alcalina a las 24,48 y 96 horas después de su administración, mientras que a las 96 y 120 horas los valores se normalizan en animales pre-tratados con dimetil prostaglandina E₂ (27,30).

	HEPATOCITO		CELULAS SINUSCIDALES		INFILTRACION CELULAR		
	NECROSIS	CAMBIOS AC. GRAS.	HIPERT.	HIPERPL.	LIN.	PMN.	ECS.
CONTROL	-	-	-	-	-	-	-
D-GALACTOSAMINA	++ / +++	+	+	+	+++ / +++	+	++
DMPGE ₂ Y D-GAL.	-	-	+	-	+ / -	-	+ / -
HE Y D-GAL.	+ / -	-	+	+ / -	+	-	+ / -
OF Y D-GAL.	-	-	+	- / +	++	-	+ / -

Fig. 6 Resultados de Stachura. (29)

DMPGE₂: dimetil prostaglandina E₂

D-GAL.: D-galactosamina

HE: Hepatofalk (medicamento)

OF: Crotofalk (medicamento)

AC. GRAS.: ácidos grasos

HIPERT.: hipertrofia

HIPERPL.: hiperplasia

LIN.: linfocitos

PMN.: polimorfonucleares

ECS.: eosinófilos

Estudios histológicos en hígados de ratas tratadas con CCl_4 (oral o subcutáneo) muestran severa necrosis centrolobular, - ácidos grasos anormales e infiltración celular. Otros cambios importantes son : dilatación del retículo endoplasmico, hipertrofia de los cuerpos de Golgi, mitocondrias dilatadas y acumulación de lípidos, mientras que las ratas pre-tratadas con - dimetil prostaglandina E_2 (10-300Ug/kg) 24 horas, 6 horas y - 30 minutos antes de la aplicación del hepatotóxico (CCl_4) muestran cambios histológicos marcadamente reducidos (mínima - necrosis celular y ácidos grasos anormales). (29)

La dimetil prostaglandina E_2 puede proteger al hígado de la rata contra la necrosis inducida por CCl_4 , cuando se administra 2 y 8 horas despues que el hepatotóxico. (27)

El mecanismo por el cual el CCl_4 induce necrosis es la activación enzimática del CCl_4 al radical libre CCl_3 dentro de la membrana del retículo endoplásmico, el proceso continua en - clorometilación, saturación, peroxidación y destrucción progresiva de ácidos grasos insaturados. Por lo anterior descrito el retículo endoplásmico se considera el blanco de acción del - tetracloruro de carbono. (30)

En otros estudios se reporta el efecto protector de la dimetil-prostaglandina E_2 sobre D-galactosamina, un hepatotóxico diferente que posee un mecanismo de acción nocivo diferente, este toma como blanco la membrana plasmática. De ahí la idea que la acción protectora de la dimetil prostaglandina E_2 se deba a la estabilización o fortalecimiento de las citomembranas. (29,31)

El tipo de acción anterior ha sido demostrado en membranas lisosomales de hígados de gato, tal efecto protector de la protaciclina sobre el daño producido al hígado por medio de hipoxia se atribuye a la estabilización de las membranas lisosomales. (30)

En otros estudios se ha observado el efecto estabilizante que proporciona la dimetil prostaglandina E_2 a membranas de eritrocitos con lo cual se previene su destrucción por efecto salino o etanol. (resultados obtenidos por Stachura no publicados)

Se ha postulado que la acumulación de triglicéridos, después de la administración de CCl_4 es consecuencia de la disminución en la producción de prostaglandinas. La intoxicación con CCl_4 produce un aumento del 34% de triglicéridos totales en el hígado en un tiempo estimado de una hora (30)

Se ha postulado que alrededor de las 4 primeras horas después de la intoxicación con CCl_4 , la cantidad de ácido araquidónico (sustrato para generar prostaglandinas endógenas. Por otra parte la administración de prostaglandinas exógenas puede invertir los cambios bioquímicos relacionados con la disminución de prostaglandinas endógenas (30).

Miyazaki y Makowka (21), evaluaron las propiedades hepatocitoprotectivas de la 16,16 dimetil prostaglandina E_2 , sobre las funciones del hígado y la regeneración del mismo en modelos in vivo de perfusión en ratas tratadas con altas concentraciones de fármacos citotóxicos (5-fluoruracilo) e hipertermia regional. La perfusión hipertermoquimoterapéutica manifestó una gran mortalidad de 90-100% en ratas control. El estudio histológico reveló manchas necróticas y niveles elevados de transaminasas (GOT y GTP). El pre-tratamiento con dimetil prostaglandina E_2 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 30 min. antes ó 6 ó 24 horas después de la perfusión hepática mejoró la supervivencia hasta en un 80%, los animales mostraron hepatocitos normales y bajos niveles de transaminasas.

6.-Consideraciones sobre el alcohol como hepatotóxico

El hígado es uno de los órganos más importantes del organismo y frecuentemente esta expuesto a una gran variedad de enfermedades tales como la hepatitis viral, la ictericia colestática, las -- enfermedades hepáticas del alcohólico y las enfermedades hepáticas causadas por medicamentos y drogas entre otras.

El alcohol es uno de los hepatotóxicos más comunes, por lo -- cual es importante tener presentes algunas consideraciones sobre el mismo. El etanol es fácilmente absorbido en el tracto gastro-intestinal, afecta a casi todos los aparatos y sistemas del orga -- nismo y si se consume en exceso puede amenazar la economía corporal especialmente a diversos tejidos como el hepático, nervioso, adiposo y gastrointestinal.

El etanol puede absorberse por difusión simple a través de -- todo el tracto gastrointestinal, su excreción renal y e. el aire expirado es mínima, de manera que el organismo solo puede desha -- cerse de él oxidándolo. El etanol se absorbe en el estómago, en -- el intestino delgado y el colon, muchos factores modifican su absorción en el estómago. Al principio la absorción es rápida pero luego decrece de manera importante, a pesar de que la -- concentración gástrica permanezca elevada.

Si el vaciamiento gástrico se retarda debido al volumen, -- caracter y difusión de la bebida, presencia de comida, período de tiempo durante el que se bebió y peculiaridades individuales, la absorción subsecuente en el intestino también se retardara. (23)

Dependiendo de estos factores la absorción completa puede requerir de 2 a 6 horas o más. A mayor concentración de etanol ingerido la absorción se facilita hasta alcanzar concentraciones que impiden su absorción por saturación. La mayoría de los alimentos en el estómago tienden a retardar la absorción, sin embargo la absorción en el intestino delgado es rápida, completa e independiente de la concentración de etanol.

El alcohol absorbido es distribuido más o menos uniformemente en el cuerpo. En el plasma y en el sistema nervioso central la concentración es mayor que en los eritrocitos, por ello debido a la gran irrigación cerebral, las concentraciones alcanzan rápidamente los niveles sanguíneos. Se ha observado que la concentración de etanol en cerebro de personas que mueren por intoxicación alcohólica varía de 270 a 510 mg/dl. (23)

Debido a que la excreción renal y pulmonar es solo 2-10% la mayor parte del alcohol necesita ser metabolizado en el organismo para que sus productos puedan ser excretados o metabolizados; 90-98% del alcohol que entra al organismo es oxidado completamente. El metabolismo del etanol difiere del de otras sustancias en que el índice de oxidación es una función lineal del tiempo.

La cantidad de etanol oxidado por unidad de tiempo es más o menos proporcional al peso corporal y probablemente al peso del hígado, en el adulto este índice es aproximadamente 10ml/hr (23)

El etanol es metabolizado unicamente en el hígado ya que sólo éste órgano posee el equipo enzimático necesario para su oxidación.

El primer paso para oxidar el etanol lo lleva a cabo la enzima deshidrogenasa alcohólica que cataliza la transferencia de dos átomos de hidrógeno del etanol al NAD (niacina adenina dinucleotido), así el etanol se convierte en acetaldehído y el NAD se reduce a NAD-H_2 . El acetaldehído es oxidado en acetato en las mitocondrias de la célula hepática, la reacción es catalizada por la enzima aldehído-deshidrogenasa que transfiere dos átomos de hidrógeno al NAD reduciendolo a NADH_2 . El acetato formado se convierte en acetil coenzima A mediante la enzima acetato CoA ligasa y en la reacción se utiliza un ATP (adenosin trifosfato), que se convierte en ADP (adenosin difosfato) mas fosfato inorgánico. (fig 7)

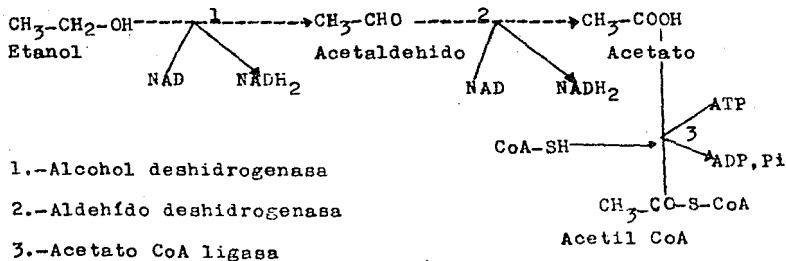


Fig 7 Metabolismo del etanol (23)

La acetil CoA puede seguir varias vías metabólicas como: ciclo de Krebs (generación de energía agua y oxígeno), la síntesis de ácidos grasos y la formación de cuerpos cetónicos entre otras. El aumento en el índice de $NADH_2/NAD$ favorece la conversión de piruvato a lactato cuya concentración sanguínea aumenta (lactoacidemia), lo que resulta en la alteración de la excreción del ácido úrico en el riñón y favorece la aparición de gota. (23)

El etanol favorece la producción de porfirilínógeno y puede tener un efecto inhibitorio sobre el ciclo de Krebs. (23) La ingestión crónica de alcohol puede producir alteraciones en los organelos de la célula hepática como son; la proliferación del retículo endoplásmico, donde se metabolizan diferentes drogas y hormonas, dando lugar a un catabolismo acelerado de éstas.

El aumento de los niveles séricos de acetaldéhidó secundario a la ingestión crónica de etanol, produce edema mitocondrial impidiendo las funciones de este organelo. Los alcohólicos a menudo presentan bajas concentraciones de magnesio y fosfato en sangre probablemente debido a un aumento en su pérdida a nivel renal. (23)

En el alcohólico crónico hay un aumento en el catabolismo de la norepinefrina, lo que tiende a disminuir la sensibilidad de los receptores B-adrenérgicos en el sistema nervioso central y en el hígado, también se asocia a un estado hipermetabólico y a un aumento en el consumo de oxígeno. (23)

La cetoncitosis alcohólica es más frecuente de lo que se piensa, junto con hipoglucemia y aumento de la concentración de cuerpos cetónicos en sangre. El alcohol afecta la estructura y el metabolismo de las células intestinales, disminuye la absorción de azúcares, aminoácidos, calcio, ácido fólico, vitamina B₁₂ y favorece la absorción de ácidos grasos y la formación de triglicéridos. (18,23)

Muchas de estas secuelas y alteraciones importantes en el consumo crónico de etanol se atribuyen a un aumento en la producción de NADH₂ que no se reoxida a NAD impidiendo así el funcionamiento adecuado de las enzimas hepáticas, las cuales pasan a circulación sanguínea, donde pueden ser evaluadas con la tecnología adecuada y disponible. Otros metabolitos que aumentan en la circulación sanguínea, contribuyendo al establecimiento de un diagnóstico temprano de esta patología, son la bilirrubina indirecta ya que el hígado pierde la capacidad de conjugarlas con el ácido glucorónico. (10, 23)

Concomitante a esta disminución en la función hepática es la utilización de la vitamina K que conduce a la deficiencia de factores de coagulación dependientes de ella (II Protrombina, VII Proconvertina, IX Christmas y X Power Stuart) reflejándose en un alargamiento del tiempo de protrombina (23).

7.-Enzimas hepáticas en la rata.

La actividad de diferentes enzimas puede ser afectada en algunos estados patológicos dependiendo del grado y de la localización dentro de la célula. Por ejemplo, observaciones empíricas establecen que las células parenquimales son responsables del aumento en suero de la actividad de aminotransferasas en la hepatitis tóxica infecciosa; por otra parte la alta actividad en suero de fosfatasa alcalina, 5'nucleotidasa y gama glutamil - transpeptidasa se asocian particularmente a colestasis. (34)

En el hígado de la rata estas enzimas se encuentran unidas a la membrana y se pueden encontrar principalmente en células parenquimales, de Kupffer y células del tracto biliar. (34)

Estudios histoquímicos han demostrado que la fosfatasa alcalina y la gama glutamil traspeptidasa no están uniformemente distribuidas entre los diferentes tipos celulares del hígado de rata. (14, 34)

En ratas normales se ha demostrado que la fosfatasa alcalina puede ser localizada en las paredes sinusoidales y el tejido conectivo que rodea a las arterias y a los conductos biliares; algunos autores reportan una actividad de 2 a 5 veces mayor en los canaliculos biliares que en los sinusoides de las membranas hepáticas. (3)

La fosfatasa alcalina es una enzima ligada a membrana celular cuya función biológica se desconoce, pero se ha detectado en el núcleo, mitocondrias, microsomas y las fracciones citosólicas. (35)

Estos autores sugieren que el aumento de fosfatasa alcalina en el suero, resultado del consumo crónico de etanol, se puede explicar (en mínima parte) a la alta labilidad que presenta la enzima en las membranas plasmáticas.

El mecanismo por el cual la fosfatasa alcalina aumenta en respuesta al consumo crónico de etanol no ha sido aclarado. Aunque se ha demostrado que los niveles de fosfatasa alcalina en suero aumentan en respuesta a una obstrucción biliar, no todos los pacientes alcohólicos con altos niveles de fosfatasa alcalina tienen evidencia de colestasis (18, 35).

Se ha reportado que pacientes con hígado graso alcohólico presentan altas concentraciones de fosfatasa alcalina pero no se observa un aumento similar en los hígados de ratas hembras tratadas con alcohol (35).

Lo anterior contrasta con los estudios realizados por Yamada y col (35) y Robinson y Morris (26) quienes mostraron que la administración de alcohol a ratas machos durante un periodo de 4 a 5 semanas provoca aumento de los niveles de fosfatasa alcalina, lo que resulta en un hígado graso sin evidencia morfológica de colestasis.

Finalmente cabe mencionar que Lieber (18), establece que no se modifica la concentración de la bilirrubina conjugada en el suero de la rata después del consumo crónico de etanol.

La actividad de la gama glutamil transpeptidasa es baja en el hígado de ratas normales, y según reportes el aumento brusco de dicha enzima en el suero, después de la oclusión del ducto biliar, puede ser debido a la liberación de la enzima desde las membranas celulares, especialmente de las células no parenquimales (34, 35).

Se ha reportado que la actividad de las diferentes enzimas (fosfatasa alcalina, gama glutamil transpeptidasa y 5'nucleotidasa) es mayor en células de Kupffer y del tracto biliar con respecto a otras células corporales (34).

Wooton y col. (34), reportan la actividad enzimática que presentan la fosfatasa alcalina, la gama glutamil transpeptidasa y la 5'nucleotidasa en las diferentes fracciones celulares del hígado de rata:

- a) En células de Kupffer, observaron alta concentración de enzimas y actividad enzimática elevada.
- b) En células del tracto biliar, una actividad enzimática regular
- c) En células parenquimales, una baja actividad enzimática

Las actividades de las enzimas en suero pueden modificarse debido a diferentes causas, una de éstas es el consumo crónico de etanol que altera las membranas plasmáticas del hígado y por lo tanto produce aumentos en la concentración de la fosfatasa alcalina y la gama glutamil transpeptidasa (34).

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Las propiedades citoprotectivas de las prostaglandinas han sido bien estudiadas en mucosa gástrica y yeyunal . Sin embargo aun no es claro si las prostaglandinas ofrecen protección al hígado. La citoprotección hepática es un concepto que ha sido reportado por varios autores siendo reproducible y eficaz en una gran variedad de modelos con diferentes mecanismos de acción.

Recientemente se reporto que en la rata la inhibición de la regeneración hepática inducida por la intoxicación aguda con etanol puede revertirse hasta en un 25% cuando se administra dimetil prostaglandina E_2 después de la intoxicación. Sin embargo la regeneración hepática aumenta (50-60%) cuando los animales son pretratados con una sola dosis de dimetil prostaglandina E_2 (21, 30, 32)

Diferentes resultados indican que la dimetil prostaglandina E_2 puede proteger al hígado de la rata contra una gran variedad de anormalidades como son la esteatosis, la necrosis y el aumento de los niveles enzimáticos provocados por la administración oral y subcutánea de CCl_4 y alfa naftil isotiocianato. (20, 27, 28, 30), necrosis, daño agudo al hígado y alteraciones enzimáticas inducidas por D-galactosamina, acetaminofen y aflotoxina. (28, 29, 30), anormalidades en la concentración de ácidos grasos hepáticos, disminución de glucógeno y severo daño mitocondrial como resultado de la administración oral de etanol. (8, 13, 29, 30)

Estos descubrimientos han tenido importancia en estudios recientes , en los cuales se ha demostrado que pacientes con daño hepático crónico, tienen niveles bajos de prostaglandinas en suero, por lo que se piensa que podría existir correlación entre el nivel de prostaglandinas en suero y la severidad del daño hepático .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades hepáticas causadas por el alcohol, tienen una gran incidencia a nivel mundial, por lo que se decidió estudiar si la prostaglandina sintética E_2 posee efecto protector de las células hepáticas en el estado alcohólico, ya que se han observado múltiples efectos de las prostaglandinas, entre ellos el de protección a otras células como las de mucosa gástrica. Si este efecto protector en hepatocito existe apoyaría el uso clínico de la prostaglandina E_2 como agente hepatocitoprotector.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Si el análogo sintético de la dimetil prostaglandina E_2 induce protección a los hepatocitos contra el consumo crónico de etanol, entonces las ratas que ingieren alcohol más prostaglandina E_2 sintética presentarán pruebas de funcionamiento hepático e histología dentro de los valores de referencia.

OBJETIVOS.

- 1.-Determinar los valores de referencia para un perfil hepático de ratas sanas.
- 2.-Determinar el efecto que produce el alcohol sobre las pruebas de funcionamiento hepático en los diferentes grupos de ratas
- 3.-Determinar los cambios histológicos que produce el alcohol en los diferentes grupos de ratas.
- 4.-Determinar el efecto protector de la dimetil prostaglandina E₂ (análogo sintético) sobre el daño hepático inducido con alcohol en la rata.

MATERIAL Y METODOS

1.-Material Biológico:

Se utilizaron 45 ratas adultas de la cepa CLIZ-V, de ambos sexos cuyo peso promedio fué de 400g.

2.-Equipo:

Espectrofotómetro Coleman Junior 11 Mod. 6/20

Centrífuga Solbat Mod. J-12 500-5000rpm.

Baño de agua a temperatura constante 37°C

Equipo de disección

3.-Materiales:

Tubos de ensayo de 13 por 75 cm.

Celdas para espectrofotómetro de 1 cm.

Gradillas

Pipetas: 1ml, 2ml, 5ml etc.

Jeringas desechables de 5 ml.

Frascos de vidrio

Tela adhesiva

4.-Reactivos:

Formol al 10%

Citrato de sodio al 5%

Metanol absoluto

Diazo blanco reactivo

Diazo reactivo de Ehrlich

reactivo A de Ehrlich

Reactivo B de Ehrlich

Sustrato amortiguador alélico

Hidróxido de sodio 0.02N

Acido Clorhídrico concentrado

Reactivos MERCK para la determinación de transaminasa glutámico
pirúvica

Reactivos Bioxon para determinar tiempo de protrombina

Reactivos MERCK para la determinación de gama glutamil transpep-
tidasa.

METODOS

1.-Bilirrubinas (método colorimétrico de Malloy-Evelin)

Fundamento:

La bilirrubina se conjuga con el sulfonato de p-benceno - diazonio para formar azobilirrubina, se determina directamente mediante medida fotométrica de color púrpura desarrollado a los 5 min. después de la diazotización con el ácido sulfanílico en solución acuosa, se agrega metanol para no precipitar proteínas pero si liberar la bilirrubina indirecta - permitiendo que sufra diazotización, el color así desarrollado representa la bilirrubina total.

Reactivos:

Alcohol metílico absoluto

Agua destilada

Diazo blanco

Diazo reactivo A

Diazo reactivo B

Procedimiento:

- 1.-Numerar 4 tubos de ensayo con los números 1,2,3,4
- 2.-A los tubos 1 y 2 adicionar 1ml de agua y a los tubos 3 y 4 1 ml de metanol
- 3.-Adicionar 0.2ml de diazo blanco a los tubos 1 y 3 y 0.2ml de reactivo de Ehrlich a los tubos 2 y 4.

- 4.-Adicionar 0.8ml del suero problema diluido 1:10 a todos -
los tubos.
- 5.-Dejar reposar 20min. a temperatura ambiente y después -
leer en el espectrofotómetro a 550nm. usando los tubos -
1 y 3 como blancos para leer 2 y 4.

Cálculos:

Factor: $\frac{\text{Concentración del suero anormal (control)}}{\text{Absorción del suero anormal}}$

Bilirrubina directa: absorción del tubo 2 X factor

Bilirrubina total : absorción del tubo 4 X factor

Bilirrubina indirecta: bilirrubina total- bilirrubina directa

Valores de referencia:

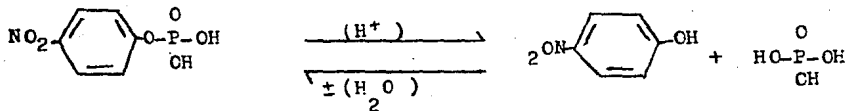
Directa : 0 mg. %

Total : 0 - 0.8 mg %

2.-Fosfatasa Alcalina. (método de Bessey-Brock)

Fundamento:

La fosfatasa libera el grupo fosfato del p-nitrofenilfosfato con formación de p-nitrofenil, que un medio alcalino se transforma en ion nitrofenolato con coloración amarillo intensa, proporcional a la cantidad de enzima presente, la reacción se efectúa durante 30min. y se detiene por la adición de hidróxido de sodio que inactiva la enzima.



La unidad enzimática de Bessey-Brock se define como el número de milimoles de p-nitrofenol formado en 60min. por litro de suero.

Reactivos:

Hidróxido de sodio 0.2N

Hidróxido de sodio 0.02N

Amortiguador alcalino

Stock sustrato en tabletas (p-nitrofenol fosfato disódico)

Solución estándar concentrada 10mM/litro de p-nitrofenol

Procedimiento:

- 1.--Marcar un tubo de ensayo como blanco y otro como problema
- 2.--Adicionar a los tubos 1 ml de sustrato amortiguador alcalino
- 3.--Adicionar 0.1ml de agua destilada al tubo marcado como blanco y 0.1ml de suero al tubo marcado como problema.
- 4.--Incubar los tubos a 37°C por 30 min.
- 5.--Adicionar a los tubos 10 ml de hidróxido de sodio 0.02N y agitarlos.
- 6.--Leer en el espectrofotómetro el tubo problema frente al blanco a una longitud de 415nm.
- 7.--Adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y mezclar.
- 8.--Leer otra vez el tubo problema frente al blanco usando la misma longitud de onda.

Cálculos:

Unidades de fosfatasa	=	Unidades de la 1a.	-	Unidades de la
Alcalina		lectura		2a lectura

Valores de referencia:

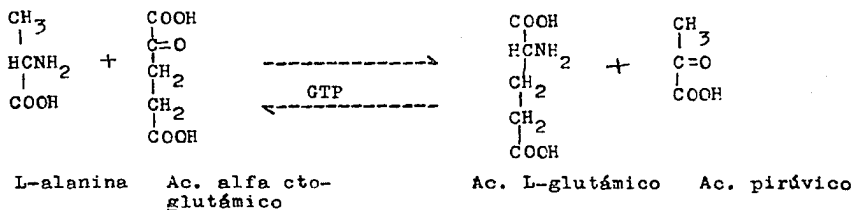
Adultos: 0.8-2.3 U/L

Niños : 2.8-6.7 U/L

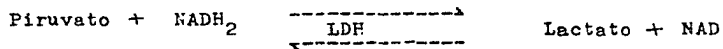
3.-Transaminasa Glutámico Pirúvica (método U. V. Merck).

Fundamento:

La glutamato piruvato transaminasa GTP, cataliza la -
transferencia del grupo amino desde el glutamato al piruvato
según la siguiente reacción.



Para la determinación cuantitativa de GTP se deja actuar
el suero problema en solución amortiguadora sobre cetoglutarato -
y L-alanina. El piruvato producido se transforma enzimáticamente
en lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NADH_2 .



La velocidad de utilización del NADH_2 puede medirse fotome-
tricamente por la disminución de la extinción en la región U.V.
cercano, sus valores son directamente proporcionales a la acti-
vidad de GTP.

Reactivos:

Solución de sustrato (1)

Mezcla de enzima y amortiguador (2)

Procedimiento:

- 1.-Adicionar a un frasco conteniendo enzima-amortiguador(2), 2ml de solución de sustrato(1)
- 2.-Esperar unos dos minutos hasta que este completamente disuelto.
- 3.-Adicionar 0.5ml de suero o plasma.
- 4.-Mezclar y pasarlo inmediatamente a la cubeta. Después de un minuto medir la extinción a temperatura ambiente y simultáneamente poner en marcha el cronometro, repetir la medición cada minuto durante 4 min. Longitud de onda 365nm U.V.

NOTA:

Medición efectuada a 365nm; $\Delta E/\text{min.}$ X 1471 U/L

Referencias:

Hodson, 9-371/1

9-371/1

4.-Gama Glutamil Transpeptidasa (método Persijn).

Fundamento:

La actividad de la enzima se mide siguiendo la reacción:

L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitranilida + glicilglicina $\xrightarrow{\gamma\text{GT}}$

L-gama-glutamilglicilglicina + 5-amino-2-nitrobenzoato

El aumento del 5-amino-2-nitrobenzoato es determinado fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de la gama glutamil transpeptidasa.

Reactivos:

Solución amortiguador(1)

Sustrato/glicilglicina(2)

Procedimiento:

- 1.-Adicionar a 2ml de la solución amortiguador(1) el contenido de un frasco de sustrato(2).
- 2.-Esperar unos minutos hasta que este completamente disuelto
- 3.-Adicionar 0.2ml del suero o plasma al frasco que contiene la mezcla 2.
- 4.-Mezclar y pasarlo inmediatamente a la cubeta. Medir el aumento en la extinción por lo menos durante 3min. tomando lecturas cada minuto.

Cálculos:

Actividad de la enzima a 405nm.: $\Delta E/\text{mín.}$ X1158 U/L

Valores de referencia:

Mujeres: 4-18 U/L

Hombres: 6-28 U/L

5.-Tiempo de Protrombina.

Fundamento:

El plasma obtenido de sangre a la que se le ha agregado anticoagulante que fija el calcio, se coagulará en pocos segundos en cuanto se recalcifique en presencia de trombo - plastina hística. El tiempo transcurrido entre la adición de calcio y la presencia de un coagulo es el tiempo de - protrombina.

Reactivos:

Suspensión de tromboplastina, adicionada con cloruro de - calcio 0.2N.

Procedimiento:

- 1.-Incubar a 37°C el volúmen necesario de la suspensión de tromboplastina (0.2 ml para cada determinación)
- 2.-Adicionar 0.1ml de plasma en estudio, y al momento poner en marcha el cronómetro.
- 3.-Correr al mismo tiempo que los problemas, plasmas controles normal y anormal.
- 4.-Cuando aparece el coágulo se detiene el cronómetro, y este es el tiempo de protrombina.

Valores de referencia:

10-17 segundos.

6.-Técnica Histológica.

La técnica histológica comprende la preparación de los tejidos para su estudio microscópico, lo cual se logra sometiendo a la totalidad o a una parte seleccionada del tejido por examinar a una serie de procesos: fijación, deshidratación, aclaramiento, inclusión y tinción.

En cuanto se extrae el tejido del organismo o se priva de su irrigación empieza a descomponerse lo cual es una consecuencia de la falta de oxígeno y metabolitos esenciales, de acumulación de bióxido de carbono y otros productos del metabolismo celular y de la acción de diversas enzimas (autólisis). Así pues, para preservar el estado natural de las células de los tejidos es indispensable detener cuanto antes estos procesos de descomposición, para este propósito debe colocarse el tejido en un volumen adecuado de una solución fijadora lo más pronto posible después de su extirpación

a)Fijación:

Es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de las células y por tanto de los tejidos, son fijados en cuanto a su estado físico y parcialmente también en su estado químico de manera que puedan resistir el tratamiento sucesivo con varios reactivos sin pérdida distorsión importante o descomposición.

La mayoría de los fijadores actúan desnaturalizando o precipitando las proteínas que forman entonces una esponja -----

o malla que tiende a englobar los otros componentes de la célula.

En este experimento se utilizó formol al 10% como solución fijadora, los hígados extraídos se colocaron inmediatamente en 150ml de formol al 10%.

b) Deshidratación:

Los tejidos contienen grandes cantidades de agua tanto intra - como extracelular, que debe ser eliminada por un proceso que se denomina deshidratación, naturalmente debe ser realizado mediante el uso de alguna sustancia que se mezcle con el agua y tenga - cierta afinidad con ella de manera que pueda penetrar fácilmente entre las células de los tejidos.

La deshidratación se realizó utilizando alcoholes (etílico) de diferente concentración empezando por alcohol del 70%, los - tejidos fijados en formol se pasan a recipientes que contienen alcohol de diferente concentración empezando por el de 70%.

c) Aclaramiento:

Este proceso permite que el alcohol de los tejidos sea reem - plazado por un líquido que disuelva la parafina con la cual va a ser impregnado. Los buenos agentes aclarantes deben eliminar pronto el alcohol y aclarar rápidamente sin endurecer -----

el tejido. Los tejidos una vez deshidratados se pasan inmediatamente a los recipientes que contienen solventes (xilol) con un volúmen 10 veces mayor al del tejido.

d)Inclusión:

Este proceso comprende la impregnación de los tejidos con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacios o intersticios tisulares y aún los espacios intracelulares y que proporcione la consistencia firme necesaria para hacer cortes bastante delgados sin provocar distorsión y sin alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares.

Para este proceso se utiliza parafina que se conserva en estado líquido en una pequeña vasija cuya temperatura se mantiene a 2°C por encima del punto de fusión de la parafina. Se escoge un molde adecuado que se rotula debidamente, este molde se llena de parafina hasta algunos milímetros de su parte superior se saca el tejido por medio de unas pinzas romas ligeramente calentadas en un mechero Bunsen y se pasa al molde de parafina derretida.

La cara del tejido de donde se quiere hacer cortes se pone hacia abajo y en general todos los tejidos deben orientarse cuidadosamente para que el plano del corte sea el deseado, a veces es necesario ejercer presión sobre la muestra del tejido durante algunos segundos hasta que el tejido quede adherido a la parafina que se esta enfriando.

Cuando la parafina se ha solidificado en parte, los moldes se ponen en un recipiente de agua fría en posición tal que no se rompa la superficie de la parafina, este método de enfriamiento reduce la tendencia de la parafina a cristalizarse y permite obtener bloques de consistencia firme y uniforme.

Una vez que los bloques endurecen se retiran del molde y se rotulan adecuadamente, el exceso de parafina se elimina mediante una espátula caliente.

e) Corte de tejidos:

Este proceso se lleva a cabo por medio de microtomos que son máquinas o instrumentos contruídos para obtener láminas muy delgadas (cortes) de tejidos, según el tipo de trabajo, la forma en que se hizo la preparación y la inclusión del tejido etc.

Se verifica que el microtomo este ajustado para el grosor del corte (4-6 μ) el bloque se seca y se ajusta firmemente en el sujetador del microtomo, con la orientación correcta el sujetador se mueve a mano hasta que la superficie de la parafina llegue a tocar el filo de la cuchilla, y se comienza entonces el corte con impulsos regulares.

Se utiliza una serie de portaobjetos que se limpian con un paño suave y la superficie de cada uno de ellos se cubre con una delgada capa de mezcla adherente que se extiende con la yema de los dedos, estos portaobjetos se rotulan según la clave del bloque y los cortes se disponen sobre los mismos.

f) Tinción (Hematoxilina-Eosina)

- 1.-Quitar la parafina en exceso y deshidratar con alcohol al 95% durante 1 o 2 min.
- 2.-Lavar los portaobjetos con agua de la llave durante 1 min. y luego brevemente con agua destilada.
- 3.-Teñir durante 4 a 8 min. con Hematoxilina.
- 4.-Sumergir 3 a 4 veces la preparación con alcohol-ácido al 1%.
- 5.-Enjuagar con agua de la llave.
- 6.-Teñir con eosina acuosa durante 15 seg.
- 7.-Decolorar con alcohol absoluto por 15 seg.
- 8.-Lavar con agua de la llave y dejar secar los portaobjetos.

DESARROLLO

Grupos experimentales de ratas:

I.-TESTIGO ABSOLUTO.

Animales sin tratamiento.

II.-CONTROL.

Animales sometidos a una dieta baja en proteínas a las que se les proporciono en lugar de agua una solución al 20% de etanol ad libitum .

III.-PROBLEMA.

Animales con dieta hipoprotéica, y solución de etanol al 20% ad libitum a los que se les administró por vía oral 8.75 μg /Kg de peso de prostaglandina E_2 sintética (disuelta en carbonato de propileno) cada 12 horas.

Los animales del grupo II y III fueron tratados diariamente durante 5 meses. La dosis promedio de etanol que consumió cada animal fué de 5ml/Kg/día.

El tipo de punción paracardiaca para la obtención de la muestra sanguínea fue intracardiaca, en estas muestras se determino el tiempo de protrombina, y la concentración en suero de bilirrubinas, fosfatasa alcalina, gama glutamil transpeptidasa y transaminasa glutámico pirúvica . Posterior a la obtención de la muestra sanguínea se diseccionó el hígado para su estudio histológico.

La determinación del tiempo de protrombina, los metabolitos en suero, así como el estudio histológico de los hígados fué realizado a los 20, 40, 70 y 120 días de tratamiento.

Para algunas muestras no se determinaron los parámetros anteriores debido a alguna de las siguientes causas: muestra insuficiente, muestra coagulada o muestra con elevada hemolisis.

El análisis de los resultados se realizó con el parámetro estadístico "t" de student, con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Tiempo de Protrombina (TP) seg.	Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) U/L	Fosfatasa Alcalina (FA) U/L	Gama Gluta- mil Trans- peptidasa (GGT) U/L	Bilirrubina mg/dl		
				Indirecta (BI)	Total (BT)	Directa (BD)
17	34	123	s/a	0	.03	.03
15	44	100	s/a	.03	.03	0
19	24	112	s/a	.03	.09	.06
17	24	98	s/a	.09	.09	0
19	32	98	s/a	0	0	0
16	28	50	s/a	.02	.05	.03
15	20	89	s/a	.01	.05	.04
16	17	130	s/a	.03	.09	.03
15	43	85	s/a	0	.02	.02
17	15	97	s/a	0	.03	.03
17	32	-	s/a	.04	.04	0
18	20	-	s/a	0	0	0
16	21	-	s/a	0	0	0
-	10	-	s/a	-	-	-
-	51	-	s/a	-	-	-
-	2.0	-	s/a	-	-	-
-	20	-	s/a	-	-	-
-	17	-	s/a	-	-	-
N:18						

Tabla 1 Valores de referencia (grupo testigo absoluto)

s/a : sin actividad

- : no se determino

N : número total de ratas

GRUPO CONTROL							GRUPO PROBLEMA						
TP	BI	BT	BD	TCP	FA	GGT	TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT
17	0	.09	.09	22	-	s/a	14	.07	.16	.09	34	-	s/a
15	.04	.10	.06	36	-	s/a	15	.06	.09	.03	38	-	s/a
15	.10	.16	.06	21	-	s/a	15	.03	.03	0	27	-	s/a

Tabla 2 Estudio bioquímico a los 20 días
N: 3 control y 3 problema

GRUPO CONTROL	GRUPO PROBLEMA
dilatación sinusoidal	sin alteración
hígado congestivo	sin alteración
sin alteración	sin alteración

Tabla 3 Estudio histológico a los 20 días

GRUPO CONTROL							GRUPO PROBLEMA						
TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT	TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT
17	.06	.03	.03	36	124	s/a	15	.13	.16	.03	12	93	s/a
20	.09	.09	0	23	120	s/a	15	.03	.03	0	34	97	s/a
22	.03	.06	.03	33	154	s/a	13	0	0	0	34	124	s/a

Tabla 4 Estudio bioquímico a los 40 días
N: 3 control y 3 problema

GRUPO CONTROL	GRUPO PROBLEMA
sin alteración	sin alteración
pericolangitis crónica	sin alteración
pericolangitis crónica	dilatación sinusoidal

Tabla 5 Estudio histológico a los 40 días

GRUPO CONTROL							GRUPO PROBLEMA						
TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT	TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15	.06	.15	.09	22	103	s/a	14	.09	.09	0	21	38	s/a
--	--	--	--	--	--	--	16	0	.03	.03	24	40	s/a

Tabla 6 Estudio bioquímico a los 70 días
N: 1 control y 2 problemas

GRUPO CONTROL	GRUPO PROBLEMA
-----	-----
hígado congestivo	infiltrado linfocitario
-----	infiltrado de polimorfo-nucleares, degeneración grasa, esteatosis.

Tabla 7 Estudio histológico a los 70 días

GRUPO CONTROL							GRUPO PROBLEMA						
TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT	TP	BI	BT	BD	TGP	FA	GGT
15	.13	.13	0	29	63	s/a	--	0	.13	.13	29	120	s/a
17	.03	.13	.09	26	32	s/a	--	.13	.19	.06	24	58	s/a
---	---	---	---	---	---	---	12	0	.03	.03	20	50	s/a

Tabla 8 Estudio bioquímico a los 120 días
N: 2 control y 3 problema

GRUPO CONTROL	GRUPO PROBLEMA
cuerpos hialinos, infiltrado inflamatorio, linfocitos infiltrados	células reticulares con núcleos hiper cromáticos
infiltrado de polimorfonucleares, degeneración grasa, cuerpos hialinos esteatosis	sin alteración
-----	sin alteración

Tabla 9 Estudio histológico a los 120 días

Tiempo de Protrombina (seg)	Transaminasa Glutámico Pirúvico (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)	Gama gluta- mil trans- peptidasa (U/L)	Bilirrubinas mg/dl		
				BI	BT	BD
17	22	--	s/a	0	.09	.09
15	21	--	s/a	.04	.10	.06
15	36	--	s/a	.10	.16	.06
17	36	124	s/a	.06	.09	.03
20	23	120	s/a	.09	.09	0
22	33	154	s/a	.03	.06	.03
15	22	103	s/a	.06	.15	.09
15	29	63	s/a	.13	.13	0
17	26	82	s/a	.03	.13	.09

Tabla 10 Resumen de datos bioquímicos para el grupo control
(etanol al 20%)

Tiempo de Protrombina (seg.)	Transaminasa Glutámico Pirúvico (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)	Gama Gluta- nil trans- peptidasa (U/L)	Bilirrubinas mc/dl		
				BI	BT	BT
14	34	---	s/a	.07	.16	.09
15	38	---	s/a	.06	.09	.03
15	27	---	s/a	.03	.03	0
15	12	93	s/a	.13	.16	.03
15	34	97	s/a	.03	.03	0
13	30	124	s/a	0	0	0
14	21	38	s/a	.07	.09	0
16	24	40	s/a	0	.03	.03
--	29	120	s/a	0	.13	.13
--	24	58	s/a	.13	.13	.06
12	20	50	s/a	0	.03	.03

Tabla 11 Resumen de datos bioquímicos para el grupo problema.
(etanol al 20% y dimetil prostaglandina E₂ sintética)

Media \pm e.e.m. del tiempo de protrombina, de las actividades de las enzimas transaminasa glutámico piruvica, gama glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina, y de la concentración de bilirrubinas en ratas adultas testigo, tratadas con etanol o con PGE₂ sin.

	TESTIGO ABSOLUTO	CONTROL (etanol al 20%)	PROBLEMA (etanol al 20% y - PGE ₂ sintetica)
Tiempo de Protrombina	16.6 \pm 1.3	17 \pm 2.5 ^ø	14.3 \pm 1.2 ^{**}
Transaminasa Glutámico Pirúvica	25.6 \pm 11.7	27.5 \pm 6.1	26.6 \pm 7.4
Fosfatasa Alcalina	98.2 \pm 22.1	107 \pm 32.3	77.5 \pm 35.2
Gama glutamil trans - peptidasa	sin actividad	sin actividad	sin actividad
Bilirrubina Indirecta	.02 \pm .01	.07 \pm .04 [*]	.05 \pm .04 [*]
Bilirrubina Total	.04 \pm .03	0.11 \pm .03 ^{**ø}	.08 \pm .06 ^{**}
Bilirrubina Directa	.018 \pm .01	.05 \pm .03 [*]	.04 \pm .03 [*]

Tabla 12

* p < 0.05 respecto al testigo absoluto

** p < 0.05 respecto al control

ø p < 0.05 respecto al problema

GRUPO DE RATAS	Necrosis	Cambios en ácidos grasos.	Pericardio	Hígado	Infiltrado Cel.			
					1801	1802	1803	Lin.
TESTIGO ABSOLUTO	-	-	-	-	-	-	-	-
CONTROL ETANCL AL 20%	-	+++	++	++	++	++	++	-
PROBLEMA ETANCL AL 20% Y DIMETIL PROS TAGLANDINA E ₂	-	+/-	-	+/-	+	+	-	-

Tabla 13 Hallazgos histológicos en los diferentes grupos de ratas. Debido a que no es posible cuantificar los resultados de los estudios histológicos, se presenta una tabla cualitativa tomada del modelo de Stachura (29)

DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio se trató de mostrar que las propiedades citoprotectivas de las prostaglandinas no se limitan sólo a la mucosa gastrointestinal, sino que esta propiedad puede ser aplicada a otros tejidos como el hepático.

Uno de los objetivos del experimento fue llegar a producir cirrosis hepática en las ratas que sólo tomaban etanol al 20%, y demostrar lo contrario en las ratas que adicionalmente ingerían una dosis de prostaglandina sintética. Sin embargo, cabe aclarar que no se produjo cirrosis en las ratas a pesar de que los animales tomaron durante 5 meses etanol al 20%, lograndose unicamente un daño hepático "crónico.

El tiempo de protrombina de los animales tratados con etanol fué semejante al grupo testigo. Sin embargo las ratas tratadas con prostaglandina E_2 sintética mostraron un menor tiempo de protrombina respecto a los grupos control (14.3 ± 1.2 vs 17.0 ± 2.5 , $p < 0.05$) y testigo (14.3 ± 1.2 vs 16.6 ± 1.3 , $p < 0.05$) (tabla 12).

Dado que la actividad de la enzima TGP no se modificó en ninguno de los grupos experimentales, podemos pensar que la concentración de alcohol no fue suficiente para obtener niveles elevados de la enzima.

En este estudio no fué posible medir la actividad de la -
 gama glutamil transpeptidasa, debido a la baja sensibilidad
 del aparato utilizado. Se piensa que la actividad de esta en-
 zima es muy baja aun en el caso que hubiese alteración por el
 alcohol en el grupo control.

Para fosfatasa alcalina, se observó una disminución en su
 actividad en las ratas que tomaron prostaglandina E₂ sintética
 a los 40 y 70 días de tratamiento (\bar{x} :132 vs \bar{x} :104 y \bar{x} :103 vs \bar{x} :78)
 con respecto al grupo control, pero no significativamente (tablas
 4 y 6).

Respecto a fosfatasa alcalina, se piensa que el aumento de -
 ésta en el suero de ratas control a los 40 y 70 días, se debe a
 la liberación de la enzima de las membranas plasmáticas del -
 hepatocito; hipotéticamente se piensa que la prostaglandina E₂
 sintética proporciona estabilidad a las membranas plasmáticas
 de las células hepáticas en el grupo problema, no se sabe porque
 a los 120 días de tratamiento los valores de fosfatasa alcalina
 en el grupo control y problema son aparentemente iguales (tabla 8).

La concentración de bilirrubinas total (0.11 ± 0.03 vs 0.4 ± 0.3
 $p < 0.05$), directa (0.05 ± 0.03 vs 0.018 ± 0.01 $p < 0.05$), indirecta
 (0.07 ± 0.04 vs 0.02 ± 0.01 $p < 0.05$) aumenta significativamente en -
 ratas que ingieren alcohol respecto al grupo testigo (tabla 12).

En los animales tratados con alcohol más prostaglandina E_2 sintética la concentración de bilirrubina total disminuye respecto al grupo control (0.08 ± 0.06 vs 0.11 ± 0.03 $p < 0.05$) (tabla 12).

Como se muestra en la tabla 13 los hígados de las ratas del grupo control mostraron acumulación de ácidos grasos con pericolangitis crónica, dilatación sinusoidal e infiltrados celulares de linfocitos y polimorfonucleares, por el contrario los hígados de las ratas tratadas con prostaglandina E_2 sintética presentaron un menor índice cualitativo en los diferentes parámetros histológicos evaluados, estos cambios solo constituyeron hígados congestivos, cuerpos hialinos, así como ocasional infiltración de linfocitos y polimorfonucleares.

El estudio realizado muestra que la prostaglandina E_2 sintética puede reducir el daño al hígado producido en ratas tratadas solamente con etanol, este puede ser importante desde el punto de vista clínico cuando la prostaglandina E_2 este disponible para la terapia de hígados humanos.

El mecanismo de citoprotección hepática de la prostaglandina E_2 contra el etanol aun es desconocido, sin embargo la citoprotección a la mucosa gástrica se ha atribuido a las propiedades de las prostaglandinas para liberar y estimular la síntesis de moco de las células de la superficie epitelial. (20)

Hipotéticamente se puede pensar que las prostaglandinas en el hígado actúan a nivel citoplasmático, dando fortaleza a las membranas plasmáticas de los hepatocitos, a nivel de cambios en la composición de la membrana (30).

Finalmente cabe mencionar que la citoprotección hepática ha tenido gran importancia puesto que estudios recientes - revelan que pacientes con daño crónico del hígado tienen niveles bajos de prostaglandinas en suero, por lo cual se piensa que puede existir correlación entre el nivel de las prostaglandinas en suero y la severidad del daño al hígado (30).

CONCLUSIONES

- 1.- El consumo de una solución de etanol al 20% por las ratas en la dieta diaria, no es suficiente para producirles cirrosis hepática, ya que solo se logró inducir daño hepático crónico.
- 2.- En el daño hepático crónico, el tiempo de protrombina se altera significativamente en las ratas que ingieren alcohol o en aquellas que además son tratadas con la prostaglandina E₂ sintética.
- 3.- Con respecto al análisis enzimático, se pudo observar que la transaminasa glutámico pirúvica no sufre alteración significativa.
- 4.- La actividad de la fosfatasa alcalina disminuye en las ratas tratadas con prostaglandina con respecto al grupo que sólo recibió etanol e al testigo, pero no significativamente.
- 5.- Es necesario un método más sensible para la determinación de la actividad de la gama glutamil transpeptidasa, pues con el método no fué posible observar su actividad.
- 6.- Las bilirrubinas pueden ser consideradas como un parámetro importante para la detección de un daño hepático crónico.
- 7.- El análogo sintético de la prostaglandina E₂ parece tener un papel citoprotector en el hígado, que puede ser evaluado a través de las bilirrubinas, la actividad de la fosfatasa alcalina, el tiempo de protrombina y los estudios histológicos.

PROPUESTAS Y/C RECOMENDACIONES

- a) Producción de cirrosis hepática completa en los hígados de rata ya sea aumentando la concentración de etanol o alargando el período de consumo de etanol por los animales
- b) Determinación periódica del nivel de prostaglandinas endógenas en suero así como de la concentración de etanol.
- c) Variar el método de extracción sanguínea que evite que los sueros se obtengan hemolizados.
- d) Emplear métodos para determinar metabolitos en suero por microensayo, ya que los volúmenes obtenidos de suero resultan insuficientes(debido al gran paquete celular de la sangre de rata).
- e) Realizar ensayos con otro tipo de animales.
- f) Determinar la concentración de nucleótidos cíclicos y DNA en células hepáticas, ya que existen estudios (20) que indican que las prostaglandinas estimulan la síntesis de esos compuestos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Andersen N. H. Biological aspects of prostaglandins. Arch. Inter. Med. 133:30-50(1974)
- 2.-André R. Efecto protector de las prostaglandinas. Anuario Mundo Medico. 13 (140):75-80(1985)
- 3.-André R. y Nezamas J.E. Inhibition of gastric secretion by prostaglandins. Am J. Dig. Dis. 12:1073-1076(1967)
- 4.-André R. Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrhogenic properties of prostaglandins. Adv. in Prostaglandins y Tromboxane research. vol 2, Ed. Samuelson B. y Paoletti R. New York 1976.
- 5.-Arief, A.I. y Chidsey, C.A. Renal function in cirrhosis and the effects of prostaglandins. A. Am. J. Med. 56(5):685-703(1974)
- 6.-Chiesa, J.A. y Petersen, A. C. El ABC de las prostaglandinas - Ed. Toray, Barcelona 1983.
- 7.-Coceani, F. y Ascik, C. Effect of nerve stimulation on prostaglandin formation and release from rat stomach. Amer. J. Physiol. 213:1056-1064(1967).
- 8.-Das, U.N. Possible role of prostaglandin in the pathogenesis of cirrhosis of the liver. Med. Hypotheses. 6(11):1117-22(1980)
- 9.-Goetz, E.J. Productos de oxigenación del ácido araquidónico - como mediadores de la hipersensibilidad e inflamación. Clin. Med. de Norteamérica. 4:812-819(1981)
- 10.-Goodman, A. y Gilman, Bases farmacológicas de la terapéutica Ed. Medica panamericana, México 1981.

- 11.-Hamberg, M.S. Tromboxane a new group of biologically active - compound derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. Nat. Acad. Sci. 72:2994-2998(1975).
- 12.-Hinojosa, J. y Ponce, J. Anatomofisiologia del tubo digestivo Medicine. 10:13-25(1982).
- 13.-Horrobin, D.E. A biochemical basis for alcoholism and alcohol induced damage including the fetal alcohol syndrome a cirrhosis. Med. Hypotheses. 9(7):1120-25(1980).
- 14.-Hustaert, C.E. Cytochemical demonstration of phosphatases in - the rat liver by a cerium-based method in combination with - osmium tetroxide and potassium ferrocyanide post fixation Hystochemistri. 78:71-79(1983).
- 15.-Karim, S.M. Induction of lagor with prostaglandin F₂alpha . J.Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 76:769-782(1961).
- 16.-Kurzrock, R. and Lieb, C. Biochemical studies of human semen - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28:268-272(1930)
- 17.-Lianos, E. Alavi, N. Angiotensin-induced sodium excretion - patters in cirrhosis role of renal prostaglandins. Kidney Int. 21(1):70-7(1982).
- 18.-Lieber, C.S. Sequential production of fatty liver hepatitis and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. Proc. Nat. Acad. Sci. 72(2):437-441(1975).
- 19.-Loginov, A.S. y Markova, M. Prostaglandins in the liver diseases Mater. Pol. 11(2):91-9(1979).

- 20.-Medina, S. R. Prostaglandines. Ed. Syntex. México (1985).
- 21.-Miyazaki, M. y Makowka, L. Protection of thermochemotherapeutic-induced lethal acute hepatic necrosis in the rat by 16,16 dimethyl prostaglandin E_2 . J. of Sur. Res. 34:415-26 (1983)
- 22.-Moncada, S. Gryglewski, R. Bunting, S y Vane, J. R. - An enzyme from arteries tranforms prostaglandins endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation - Nature. 263:663-665(1976)
- 23.-Perez Amor. Metabolismo del alcohol. Mundo Médico 56(7): 17-20 (1978).
- 24.-Pitt, B. Prostaglandins and prostaglandin inhibitors in ischemic heart disease. Ann. Int. Med. 99:83-92(1983)
- 25.-Ranwell, P.W., Leovey, E.M. y Sintetos, A.L. Regulation of the arachidonic acid cascade . Biol. Reprod. 16:70(1977)
- 26.-Robinson, J. M. y Morris, J.K. Ultrastructural Localization of several phosphatases with cerium. J.of Hist. and Cyt. 31(10):1197-1208(1983)
- 27.-Ruwart, M.J. Protection against CCl_4 -induced liver damage by 16,16 dimethyl prostaglandin E_2 . Gastroenterology. 80:1266(1981)
- 28.-Ruwart, M. J. , Kaloja, G. J. y Friedle, M.M. 16,16 dimethyl prostaglandin E_2 partially prevents necrosis due aflotoxin in rats. Gastroenterology. 82:1167(1982)

- 29.-Stachura, J. y Tarnawski, A. Citoprotective effect of 16, 16 dimethyl prostaglandin E_2 and some drugs on an acute D-galactosamine induced liver damage in rat. *Folia Histochem. Cytochem.* 18(4):311-7(1980)
- 30.-Stachura, J. y Andrzej, T. Prostaglandin protection of carbon tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology.* 81:211-7(1981)
- 31.-Stachura, J. Andrzej, T. y Ivey, J. K. 16,16 dimethyl prosta-
glandin E_2 protection of rat liver against acute injury by -
galactosamine, acetaminophen, ethanol and ANIT. *Gastroentero-
logy.* 80:1349(1981)
- 32.-Stokes, J.V. liver disease and the renal prostaglandin system
Gastroenterology. 77(2):391-3(1979)
- 33.-Wilson, D.E. Prostaglandins the actions on the gastrointestinal
tract. *Arch. Inter. Med.* 133:112-118(1974)
- 34.-Wootton, A.M., Neale, G. y Moss. D.W. Enzyme activities of cells
of different types isolated from livers of normal and choles-
tatic rats. *Clin. Sci. and Mol. Med.* 52:585-90(1977)
- 35.-Yamada, S., Mak, K. y lieber, C. Chronic ethanol consumption
alters rat liver plasma membranes and potentiates release of
alkaline phosphatase. *Gastroenterology.* 88:1799-1806(1985)
- 36.-Zypser, R.D. Prosta landins in modulators of renal funtion and
pressor resistance in chronic liver disease. *J. Clin. Endocri.
Metab.* 48(6):895-900(1979).