



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

ATN': Ing. Rafael Rodríguez Ceballos.
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"GAMMA GLUTAMIL TRANSPeptIDASA COMO UN MARCADOR DE REGENERACION
HEPATICA INDUCIDO POR INTOXICACION POR TETRACLORURO DE CARBONO "

que presenta _____ pasante: MARIA DEL ROSARIO LILIA RUIZ ZUNIGA,
con número de cuenta: 7229380-1 para obtener el TITULO de:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI PAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de JULIO de 199 0

PRESIDENTE QFL. GILDA FLORES ROSALES.

VOCAL QFB. MARICELA NOE MARTINEZ.

SECRETARIO QFL. LETICIA ZUNIGA RAMIREZ.

PRIMER SUPLENTE QFB. MA. ESTHER REVUELTA MIRANDA.

SEGUNDO SUPLENTE QFB. MARTHA P. ZUNIGA CRUZ.

[Handwritten signatures and initials over the list of names]



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.

CONTENIDO	PAG.
1.0.00 RESUMEN	1
2.0.00 INTRODUCCION	3
2.1.00 BASES ANATOMOFISIOLOGICAS DEL DAÑO HEPATICO 6	
2.1.01 ZONAS MICROCIRCULATORIAS Y SU HETEROGENEIDAD ENZIMATICA Y METABOLICA.....	8
2.1.02 ESTRUCTURA Y FUNCION NORMAL DE LA SUPERFICIE CELULAR HEPATOCITO. II.....	11
2.1.03 MECANISMO DE LIPOPEROXIDACION	15
2.1.04 MECANISMO DE ACCION DE LA COLCHICINA. III.....	16
2.1.05 MECANISMO CATALITICO DE LA ENZIMA GAMMA-GLUTAMIL TRANSEPTIDASA.....	21
3.0.00 OBJETIVO	24
4.0.00 MATERIALES Y METODOS	25
4.0.01 MATERIAL BIOLÓGICO	25
4.0.02 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	25
4.0.03 HEPATITIS TOXICA (INTOXICACION AGUDA CON CCl ₄).....	25
4.0.04 CIRROSIS HEPATICA	25
4.0.05 METODOS	27
4.0.06 PREPARACION DE LA FRACCION DE MEMBRANAS SEMIPURIFICADAS DE HEPATOCITOS DE RATA.....	27
4.0.07 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS.....	30
4.0.08 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE INCUBACION PARA EL ENSAYO DE LA GGTP.	32
4.0.09 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL TRANSEPTIDASA EN LAS MEMBRANAS DE LOS HEPATOCITOS	33

	PAG.
INTOXICADOS AGUDA Y CRONICAMENTE CON CCl ₄ Y TRATADAS CON COLCHICINA.....	4
5.0.00 RESULTADOS.....	36
5.0.01 HEPATITIS TOXICA.....	42
5.0.02 ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA EN LAS MEMBRANAS DE LOS HEPATOCITOS DE RATAS INTOXICADAS CON CCl ₄	43
5.0.03 CIRROSIS HEPATICA.....	46
5.0.04 ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.....	46
DETERMINADA EN LAS MEMBRANAS DE LOS HIGADOS DE LAS RATAS TRATADAS CON CCl ₄ EN FORMA CRONICA Y CON COLCHICINA.....	47
6.0.00 DISCUSION.....	48
6.1.00 HEPATITIS TOXICA.....	48
6.1.01 CIRROSIS HEPATICA.....	48
7.0.00 CONCLUSIONES.....	51
8.0.00 BIBLIOGRAFIA.....	52

1.0.00 RESUMEN

En el presente trabajo, se estudio la actividad del sistema de la gamma glutamil transpeptidasa (GGTF), en las membranas plasmaticas de hepatocitos provenientes de higados en regeneracion y de higados cirroticos.

Los animales tratados agudamente con CCl₄ recibieron una dosis unica de 0.5 ml/100 g de peso, de una mezcla de CCl₄ /Aceite de maiz 1:1 v/v, administrada por via oral. Los animales testigo recibieron unicamente la dosis equivalente de aceite de maiz 0.25 ml/100 g de peso por la misma via.

La intoxicacion cronica (cirrosis), se produjo mediante la administracion de CCl₄ tres veces por semana durante siete semanas, por via intraperitoneal. El CCl₄ se administro diluido en aceite mineral, la dilucion vario desde 1:7 a 1:4, de modo de compensar la dosis con la variacion del peso de los animales.

Otro grupo de animales recibio el mismo tratamiento con CCl₄ durante siete semanas; pero conjuntamente, recibieron una dosis de 10 microgramos de colchicina disuelta en 0.5 ml. de agua por via oral, cinco dias a la semana. Otro grupo de animales recibio solamente la colchicina en la misma forma antes señalada.

Nuestros resultados indican que la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa disminuye a las tres horas despues de la intoxicacion aguda y alcanza un minimo a

las once horas, posteriormente la actividad se recupera y sobrepasa el valor normal para llegar a un máximo a las setenta y dos horas después de la intoxicación, alcanzando los valores normales a las doscientas cuarenta horas después de haber administrado el CCl₄.

En los animales cirróticos, la actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa, no mostró variaciones significativas con respecto a los controles. Los grupos tratados con colchicina también se comportaron como los normales.

Nuestros resultados indican que después de una hepatitis tóxica, el hígado se regenera, pero que no existe evidencia de regeneración hepática en los hígados cirróticos tratados o no con colchicina.

2.0.00 INTRODUCCION

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados.

En el hombre, el hígado comprende del 2 al 3% del peso corporal (1), se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma. En el ser humano --- presenta cuatro lobullos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina capsula de tejido conjuntivo (capsula de Glisson). El hilo --- está bien definido y por él entran los vasos y salen los conductos hepáticos (2).

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea (Figura 1). La vena porta, que transporta sangre que ha pasado por los capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas, suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al hígado. Esta es rica en sus --- sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno.

Por otra parte, la arteria hepática transporta sangre bien oxigenada. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se --- mezclan al pasar por las sinusoides de los lobulillos.

La sangre de las sinusoides fluye hacia el centro --- de cada lobulillo donde es recogida por la vena central (3). La unidad estructural clásica del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliedrico de tejido, que --- contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneas. Las -

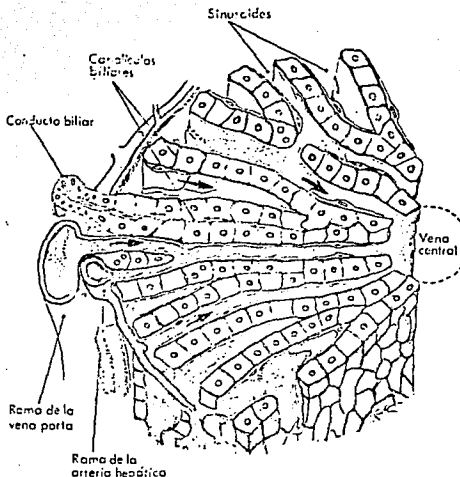


Fig. 1. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (venula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situadas en los canales portales, fluye a lo largo de las sinusoides y se vacía en la vena central. El dibujo está basado en una ilustración de A.W. Ham. *textbook of Histology*. I.B. Lippincott company, Filadelfia, 1965.

ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro y la vena central pasa por el centro de este (2).

La bilis producida por las células parenquimatosas, es secretada en el interior de diminutos capilares o canaliculos biliares que existen entre las células epiteliales glandulares. En la periferia del lobulillo, la bilis fluye hacia pequeños conductillos hepáticos y, posteriormente hacia conductos biliares más grandes. El hígado está formado por aproximadamente, un millón de unidades lobulillares. El hígado es esencial para la vida y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen extraordinaria capacidad de regeneración y la facultad de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas. Funciona como una glándula exócrina y como una glándula endócrina, secreta bilis, que fluye hacia el duodeno y que tiene, entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina que es el fosfolípido más importante y el colesterol son insolubles en agua, pero son capaces de formar micelas mixtas con las sales biliares, por lo cual, permiten que se lleve a cabo la emulsificación de las grasas antes de su digestión. La sangre portal lleva los alimentos digeridos y ahí se almacenan carbohidratos (glucógeno), proteínas, vitaminas y algunos lípidos. Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatócito, pue-

den ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa, o bien ligados a un transportador como los triglicéridos, que salen formando parte de una lipoproteína (2).

El hígado también sintetiza muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa, ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos.

Metaboliza compuestos exógenos, como drogas e insecticidas y compuestos endógenos, como esteroides.

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Durante la embriogénesis y en ciertas enfermedades del adulto, tiene actividad hematopoyética. Finalmente, la abundancia de macrófagos, hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (2).

2.1.00 BASES ANATOMOFISIOLÓGICAS DEL DADO HEPÁTICO.

La organización de las unidades microcirculatorias del hígado, influye en el mecanismo de muchos cambios patológicos (2).

Rappaport (5) menciona que el hepatocito no está organizado alrededor de la vena central, (lobulillo clásico) sino que la unidad estructural y funcional del hígado es el acino hepático, esta unidad es semejante al lobulillo portal y, a menudo se describe como la unidad funcional

más pequeña del hígado. El acino hepático simple, se define como una masa irregular de tejido parenquimatoso no encapsulado, que se encuentra entre dos o más venulas hepáticas terminales (venas centrales). El eje de esta unidad llamado espacio portal, contiene una raíz del canal portal principal, una vénula portal terminal, una arteriola hepática, un conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios. En los cortes histopatológicos, comprende solamente pequeños segmentos de los lobulillos clásicos adyacentes (5).

El concepto de zonas circulatorias acinosas, ha sido extendido por Rappaport, para explicar la apariencia histológica de muchas alteraciones patológicas en el hígado (6).

Rappaport y cols., encontraron que el tejido dentro de cada acino recibe sangre de los vasos de su propio espacio portal. Dentro de cada acino, las células parecen agruparse en zonas concéntricas alrededor de su eje. Las células más próximas del eje y los vasos aferentes terminales (zona 1) son las primeras que reciben sangre y sustancias nutritivas, las últimas que mueren y las primeras en regenerarse (6).

Las células en la Zona 3, están situadas en la periferia del acino y reciben sangre que ha intercambiado gases y metabolitos con las células en las Zonas 1 y 2. Este anillo parenquimal es más sensible al daño por disturbios

circulatorios (isquemia, anoxia o congestión) y deficiencias nutricionales.

La Zona 2 es una porción de tejido de transición entre las Zonas 1 y 3, que continuamente cambia la dimensión, con un incremento en el flujo de la microcirculación, la Zona 2 (5).

El concepto de zonas circulatorias acinosas, ha sido extendido por Rappaport, para explicar la apariencia histológica de muchas alteraciones patológicas en el hígado.

Los cambios en la microcirculación hepática que se observan in vivo después de una intoxicación, son debidas principalmente al daño de los hepatocitos, producido por una sustancia endógena o exógena.

Las sustancias tóxicas se empiezan a metabolizar en la Zona 1, dañando las microcavas aferentes, produciendo un incremento en la permeabilidad y, en ocasiones microhemorragia.

La distribución inicial del daño a partir del espacio portal a las Zonas 1, 2 y 3, parece confirmar la correlación funcional de la estructura acinar propuesta por Rappaport (6).

2.1.01 ZONAS MICROCIRCULATORIAS Y SU HETEROGENEIDAD ENZIMÁTICA Y METABOLICA.

La diferente irritación y presión de oxígeno en las Zonas 1 y 3, crean un microambiente específico para acti-

vidades enzimáticas.

La Zona 1, en el área periportal, tiene una presión de oxígeno no alta, mientras que la presión de oxígeno en la Zona 3, que se encuentra en la periferia del acino y en la vecindad de la vena central, es baja.

En la Figura (2) se observa la diferente organización metabólica en estrecha relación con la dirección del flujo sanguíneo en el acino hepático.

Las células en la Zona 1, presentan mayor síntesis de glucógeno que las de las otras zonas, como se indica por los altos niveles de VDP glucosa (uridin difosfato glucosa), L-4 glucosil transferasa, fosforilasa y glucosa -6- fosfatasa (7). Estas células contienen numerosas mitocondrias y los procesos oxidativos operan a un alto nivel por vía del ciclo de Krebs. también se ha encontrado actividad de enzimas respiratorias, como succinil deshidrogenasa, citocromo oxidasa y glucuronidasa, para la glucuronización de sustancias y drogas a ser excretadas.

Se ha demostrado que la Zona 1, es la principal área en la formación de proteínas plasmáticas. La Zona 1, también es más activa en la secreción de bilis.

En la Zona 3, se ha observado mayor cantidad de retículo endoplásmico y menos mitocondrias que la Zona 1, aquí hay más cantidad de NADH y NADPH (9). El glucógeno se almacena y hay formación de grasas y pigmentos (5).

Esta heterogeneidad enzimática de las células en las diferentes zonas, está relacionada con la lesión selectiva

de las células en diferentes partes del acino hepático en presencia de agentes hepatotóxicos (19,11).

Las drogas son metabolizadas en el hígado, ya sea por oxidación o reducción. Las enzimas oxidativas requieren oxígeno y NADPH o NADH, las enzimas reductoras requieren de NADPH y son estimuladas por flavinas en reacciones anaeróbicas (12).

Las células de la Zona 3, son ricas en estos cofactores y además en retículo endoplásmico y en el sistema oxidasa de función mixta, que consiste de NADPH Citocromo reductasa y Citocromo P450 (13), responsable de un gran número de reacciones en el metabolismo de drogas (12).

La toxicidad de una sustancia, muchas veces no está dada por ella misma, sino por alguno de sus metabolitos.

Como ya se ha dicho, las células hepáticas localizadas en diferentes zonas del lobulillo hepático, son heterogéneas, con respecto a su estructura y propiedades bioquímicas. Se ha señalado que el 80% de los hepatocitos normales de rata son estructuralmente homogéneos, pero que, las células que rodean a la vena central difieren del resto (tienen menos mitocondrias y más retículo endoplásmico). Estos descubrimientos son importantes para entender la patogenia de la toxicidad hepática (13).

2.1.02 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN NORMAL DE LA SUPERFICIE CELULAR DEL HEPATOCITO.

El hepatocito que normalmente presenta apariencia --

poliédrica, tiene cuatro caras: Dos caras adyacentes a otros hepatocitos, la sinuosidad y la pared del canaliculo biliar. Se ha estimado que representan el 37, 50 y 13%, respectivamente, del área membranal de los hepatocitos.

La superficie sinusoidal presenta numerosas microvellosidades y es el sitio a través del cual se lleva a cabo el intercambio metabólico entre el hepatocito y la sangre.

El canaliculo biliar está formado por la separación de dos o más hepatocitos adyacentes, aproximadamente 1-2 de diámetro y se ha observado que su pared tiene numerosas microvellosidades más regulares que las de la superficie sinusoidal (16).

De acuerdo a Wisner y Evans (17), hay una polarización en las características bioquímicas de las subfracciones aisladas de la membrana plasmática del hepatocito de rata, la subfracción derivada de la superficie sinusoidal se caracteriza por una alta actividad de adenilato ciclasa sensible a glucagon, las subfracciones de la membrana canalicular presentan alta actividad de diferentes enzimas, incluyendo Mg^{+2} -ATPasa, $5'$ -nucleotidasa, nucleotido pirafofosfatasa, fosfatasa alcalina, sin embargo, la subfracción derivada de la superficie adyacente a otro hepatocito presenta baja cantidad de todas estas enzimas. Por observaciones histoquímicas, se ha demostrado que hay varias enzimas que pueden usarse como marcadores de función

de la membrana plasmática, por ejemplo, fosfatasa y amino transferasas, aunque no se distribuyen uniformemente en la superficie del hepatocito están concentradas en la cara canalicular (17).

La membrana plasmática que envuelve a la célula, es una bicapa de lípidos, en la cual se encuentran insertadas proteínas lobulares. En este modelo de mosaico fluido, --- propuesto por Singer y Nicolson, la bicapa de lípidos provee la base estructural de la membrana y es responsable de la integridad, estabilidad y permeabilidad de la membrana.

Algunas proteínas de la membrana son estructurales, --- otras funcionan como enzimas; algunas están encargadas del transporte transmembranal; otras son receptores para hormonas o moléculas fisiológicamente activas; mientras que --- otras, principalmente glucoproteínas, están involucradas en la adhesión celular y en el reconocimiento de célula a célula (18).

En la cirrosis hepática, hepatocarcinoma y hepatitis, se han observado cambios en la superficie adyacente de un hepatocito con otro, consistentes en la presencia de microvellosidades. Se ha sugerido que tales cambios pueden servir a la compensación del reducido intercambio metabólico entre el hepatocito y la sangre (16).

Como se ha estudiado las respuestas del hígado frente a una intoxicación aguda con CCl_4 y se ha visto que un daño agudo produce necrosis que es seguida de una regeneración rápida.

Los complejos, eventos reparatorios que aparecen después de la administración de repetidas dosis de CCl_4 varían con la magnitud del intervalo existente entre las dosis.

Los intervalos cortos, no permiten una reparación histológica completa y aunque los hígados se vuelvan relativamente resistentes a la acción del CCl_4 , después de administraciones sucesivas se produce un gradual desarrollo de cirrosis (47).

Ahora bien se ha establecido que el hepatocito manifiesta lipoperoxidación a nivel de membrana y otros organelos cuando se dosifica tetracloruro de carbono.

2.1.03 MECANISMO DE LIPOPEROXIDACION.

En el caso de la intoxicación con tetracloruro de carbono, las alteraciones en la composición química de la membrana se deben a la peroxidación de lípidos de la membrana (21). La peroxidación es una de las formas de daño celular implicadas en la génesis de la necrosis de hígado. Los átomos de hidrógeno que se encuentran en metilenos separados por dobles enlaces de ácidos grasos poliénoicos, son altamente susceptibles de ser atacados por radiaciones libres, son inestables y están sujetos a una serie de transformaciones, reaccionan rápidamente con oxígeno molecular formando un peróxido orgánico, es en general un compuesto inestable y bajo una serie de reacciones complejas y poco entendidas da lugar a la ruptura de la cadena, con la formación de aldehídos y cetonas, malaldehídos y otros productos. La ruptura de los peróxidos orgánicos tiende a ser homolítica, dando dos nuevos radicales libres, las cuales pueden atacar puentes cercanos de metileno, este proceso una vez iniciado es autocatalítico (21).

Recknagel y Ghoshal, hacen las siguientes consideraciones para apoyar este mecanismo de lipoperoxidación: Los estudios de histopatología y patología bioquímica en la toxicidad del CCl_4 , indican claramente que el retículo endoplasmático de las células del parénquima hepático es uno de los orgánulos principalmente dañados, ya que los componentes membranales son delgados, delicados y ricos en lipoproteínas, las zonas lipídicas de este orgánulo están compuestas de grandes cadenas de

ácidos grasos de lípidos complejos, la mayoría fosfolípidos -- (21,22).

Si imaginamos que las propiedades funcionales del retículo endoplasmático dependen del ordenamiento de las estructuras lipoproteicas, una gran fracción del orden de 40% de los fosfolípidos totales del hígado son poliénoicos, con un alto contenido de ácido araquidónico (23) y si precisamente en los componentes lipídicos del retículo endoplasmático es donde hay alta densidad de puentes de metileno, donde prevalecen las insaturaciones, - el sitio donde principalmente ocurren las rupturas es el retículo endoplasmático (22). Aunque también existe la posibilidad de que estos productos migren y puedan causar daño en diferentes lugares, la alteración de electrolitos intracelulares, es un factor importante en la vesiculación del retículo endoplasmático. En el caso del CCl_4 , se ha visto que hay una acumulación intracelular de calcio. En el caso de la itionina, se ha notado que hay una disminución de ATP, que incrementa la concentración de Na^+ y disminuye la de K^+ en los hepatocitos.

Es posible que la entrada de Na^+ a la célula resulte en un aumento de este ion dentro de las cisternas del retículo endoplasmático. La disminución de K^+ también inhibe el transporte y la secreción de albumina y lipoproteínas en el hígado de rata (23).

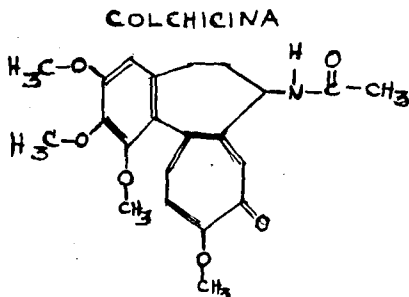
Se ha visto una importante correlación entre el grado de desarrollo del retículo endoplasmático liso (R.E.L.) y la inducción de enzimas microsomiales, lo cual ocurre después de la administración de agentes tales como el fenobarbital, DDT, dietil--

drin, 3,4-benzopireno, toxafeno, lindano, etc. Además de los --
agentes mencionados, una gran variedad de drogas, cancerígenas,
hormonas esteroidales, pesticidas y otros compuestos exógenos
y endógenos, pueden inducir las enzimas microsomiales hepáticas,
particularmente aquellas involucradas en las reacciones de bio-
transformación (24,25,26,27,28,29).

Diversas observaciones indican una posible correlación en-
tre la proliferación del R.E.L., y el incremento en la activi-
dad de las enzimas microsomiales, pero dicha relación parece ser
compleja. Por ejemplo: Con la proliferación del R.E.L., induci-
da por fenobarbital, se incrementa la actividad de enzimas oxi-
dativas y las involucradas en la transferencia de electrones, -
pero la actividad específica de glucosa 6-fosfatasa, ATPasa, --
NADH, Citocromo C-reductasa, disminuyen (30,31,32,33,34). Se ha
detectado que la colchicina provoca cambios en la permeabilidad
de la membrana del hepatocito, contrarestando los efectos del -
CCl (42).

2.1.04 MECANISMO DE ACCION DE COLCHICINA

La colchicina es un alcaloide aislado del colchico de otoño (*colchicum autumnale*) (Fig.3).



La colchicina puede aliviar el dolor espectacularmente y llevar a cabo una disminucion de los cambios inflamatorios. La colchicina incluye su accion en los (MT) microtubulos, son los organelos responsables del movimiento intracelular, por ejemplo, la separacion de los pares de cromosomas durante la mitosis, los microtubulos son ensamblados por la polimerizacion de la tubulina, una proteina semejante a la actina. La colchicina es capaz, en el organismo intacto en cultivos de parar la mitosis en la metafase.

Sabemos que la colchicina es un agente que inhibe la secrecion de procolagena e impide su conversion a colagena.

Las células expuestas a la colchicina revelan un incremento en el número de vacuolas y vesiculas asociadas al aparato de Golgi, algunas de las cuales contienen agregados

de estructuras filamentosas (37,38). Se cree que la disrupcion de los microtubulos puede interferir con el movimiento de las vesiculas derivadas del aparato de Golgi y que la acumulacion de los precursores de la sintesis de la colagena puede conducir en forma secundaria a la inhibicion de la sintesis (37). Esta droga tambien altera el transporte de ciertos nucleotidos en las celulas (39).

La colchicina impide o corrige la alteracion que se presenta en la gamma glutamil en los higados de las ratas cirroticas. Posiblemente elimina o revierte los factores responsables de las alteraciones provocadas por el CCl₄. En base al mecanismo de accion de esta droga antifibrotica, disminuye el contenido de la colagena el funcionamiento celular mejora (40). Ademias, Rojkind (56), reporto que cuando las ratas cirroticas se trataban con colchicina, los niveles de albumina serica mejoraban a consecuencia de la accion de la droga sobre los mecanismos de transporte celular.

Kersnenovich ha reportado que algunas de las anomalias que se presentan en los enfermos cirroticos, pueden ser mejoradas, tratando a los pacientes con colchicina (56). La colchicina es un agente antimicrotubular que inhibe la formacion y el transporte de la colagena.

Ademias, se sabe que esta droga es capaz de aumentar la produccion de colagenasa en diferentes tejidos (44,47,48).

Como se ha mencionado en la membrana plasmatica se encuentran areas metabolicas importantes en las cuales se

lleva a cabo diferentes actividades enzimáticas específicas ya que se encuentran enzimas como:

Gamma glutamil transferasa

Transaminasa pirúvica

LDH (deshidrogenasa láctica)

Succinato deshidrogenasa

Citocromo P-450

Glucosa 6-fosfato

Fosfatasa alcalina

Glucosa 6-deshidrogenasa

Alfa-4-glucosil transferasa

B-glucorinasa

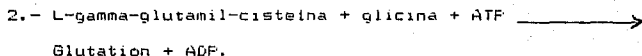
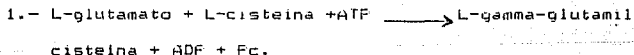
Alcohol deshidrogenasa

Como se puede ver en la figura (2).

2.1.05 MECANISMO CATALITICO DE LA ENZIMA

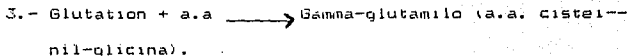
GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA.

El glutatión, es el tripeptido L-glutamil-L cisteinil-glicina. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y, difiere de los peptidos encontrados en las proteínas en que el carboxilo gamma del ácido glutámico está unido por medio de un enlace peptídico. El glutatión se encuentra en todos los tejidos de los animales e incluso en la sangre, siendo el compuesto sulhidrílico más abundante en las células y su función es la de mantener a muchas enzimas en su conformación activa. La oxidación espontánea de los grupos SH de muchas enzimas da lugar a la formación de puentes disulfuros. La reacción entre el glutatión y los grupos disulfuro, restaura las formas sulhidríticas activas. La síntesis del glutatión es intracelular y es catalizada por la acción sucesiva de la gamma-glutamil cisteína sintetasa y de la glutatión sintetasa, como se indica en las reacciones siguientes: (41).



Estas reacciones fueron las primeras que se demostraron en sistemas libres de células por Block y Snoke (1949). Estas enzimas fueron posteriormente estudiadas en algunas células y han sido obtenidas y purificadas por Meister (1974).

La gamma glutamil transpeptidasa (GGT) es una enzima unida a la membrana (enzima intrínseca) que cataliza la -- transferencia del grupo gamma-glutamico del glutatión a un aminoácido o a un peptido que actúa como aceptor, de ---- acuerdo a las siguientes reacciones:



Esta reacción es de gran importancia dentro del meta-- bolismo del glutatión, ya que las reacciones (1,2,3), están involucradas en el transporte de aminoácidos a través de la membrana por interacción entre los aminoácidos extracelula-- res y el glutatión intracelular (43,44).

La gamma-glutamyl-transpeptidasa muestra cierta especi-- ficidad con respecto al donador del gamma-glutamilo, por lo tanto, esto hace posible la determinación cuantitativa de la actividad de la enzima (2).

La gamma-glutamyl-transpeptidasa, tiene un sitio que -- interacciona con el glutatión intracelular, formándose así, un complejo gamma-glutamilo-enzima. Posteriormente, el átomo de N de un aminoácido ataca sobre el carboxilo del carbono - gamma, del complejo pasa a formar un aminoácido que puede -- entrar a la célula, tal vez por cambios conformacionales en la membrana, inducidos por la unión del sustrato o, posible-- mente por otro fenómeno (2).

Se ha demostrado que el hígado fetal, contiene una ---- actividad considerablemente alta de esta enzima y, que va --

disminuyendo durante el desarrollo. Esta enzima parece desempeñar tambien un papel importante en el transporte de los aminoácidos en el hígado fetal (17,18,45,46,47,48).

Por otra parte, esta enzima tambien se considera como un marcador de malignidad hepático durante la carcinogenesis causada por agentes químicos.

Shigeki, Tsuchida y colaboradores, observaron que, la actividad de la gamma-glutamyl-transpeptidasa se encuentra incrementada, no solo en los hepatomas, sino tambien en los nodulos hiperplásticos. Por lo tanto, esta enzima se ha considerado bioquímicamente como un marcador histoquímico de los hepatocitos preneoplásticos. Tambien se ha reportado que, en los hepatomas transplantados, la actividad se haya incrementado (42).

3.0.00 OBJETIVO

Se considera sumamente atractivo un estudio a nivel de la membrana plasmática, ya que esta estructura está íntimamente relacionada con procesos de proliferación, ya que en todas las etapas de enfermedad hepática, y particularmente en casos de obstrucción de vías biliares se observa una elevada actividad de GGT. La enzima es un indicador precoz y continuo de enfermedad hepática mucho más sensitivo que las aminotransferasas o la fosfatasa alcalina.

Con el objeto de profundizar más en el tema, se investigó en membrana aislada de hepatocitos de rata, la siguiente serie de alteraciones causadas por el tetracloruro de carbono (CCl₄).

4

- a) Determinar la importancia biológica del sistema Gamma Glutamil Transpeptidasa, y los cambios en la actividad de esta enzima, durante un período agudo y crónico de intoxicación por CCl₄ y el subsiguiente de regeneración.
- b) También, determinar si el tratamiento de las ratas cirróticas con colchicina, mejoran la funcionalidad del hígado cirrótico.

4.0.00 MATERIALES Y METODOS

4.0.01 MATERIAL BIOLÓGICO

4.0.02 Tratamiento de los Animales

4.0.03 Hepatitis Tóxica (Intoxicación Aguda con CCl_4).

Se utilizaron cincuenta ratas Wistar adultas (180-250 g), machos con libre acceso a la comida (Purina Chow) y agua.

Los animales tratados con CCl_4 recibieron una dosis única de 0.5 mg/100 g., de peso de una mezcla CCl_4 /aceite de maíz -- (1:1, v/v), que se administró por medio de una sonda intragástrica. Los animales control recibieron únicamente la dosis --- equivalente de aceite de maíz, por la misma vía. Los animales se mantuvieron en las jaulas en condiciones adecuadas hasta -- que se sacrificaron.

4.0.04 Cirrosis Hepática. (Intoxicación crónica con CCl_4).

Se utilizaron 120 ratas Wistar machos de 50-100 g. de peso, al inicio del tratamiento.

La intoxicación crónica con CCl_4 , se efectuó de la siguiente manera: Se prepararon las siguientes diluciones de CCl_4 en aceite mineral 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, v/v. Los animales se dividen en grupos de 30. A los animales del grupo utilizado para estudiar los efectos de la intoxicación crónica con CCl_4 se les inyectó 0.15 ml. de la mezcla CCl_4 :aceite por vía intraperitoneal tres veces por semana. El tratamiento duró 7 semanas y se inició con la dilución 1:7. En las semanas siguientes se utilizaron las otras diluciones sucesivamente 1:6, 1:5, 1:4, -

las tres últimas semanas de tratamiento se les inyectó la dilución 1:4. Esto se realiza con el objeto de mantener la dosis para compensar el aumento de pesos de los animales.

Los animales del grupo control solamente recibieron la dosis equivalente de aceite por la misma vía.

Un tercer grupo de animales idéntico al grupo 1, recibió el mismo tratamiento con CCl₄ durante 7 semanas pero conjuntamente estos animales recibieron una dosis de 10 mg de colchicina (Sigma) disuelta en 0.5 ml. de agua por vía oral, administrada por medio de una sonda intragástrica cinco días a la semana. El tratamiento con colchicina finalizó junto con el tratamiento con CCl₄.

El cuarto grupo de animales que se utilizó como control para la colchicina solamente recibió esta droga (10 g/0.5 ml) por vía oral, cinco días a la semana durante 7 semanas.

Finalizando el tratamiento se formaron las muestras de tejido hepático para el examen histopatológico.

4.0.05 METODOS

4.0.06 PREPARACION DE LA FRACCION DE MEMBRANAS SEMIPURIFICADAS DE HEFATOCITOS DE RATA.

Las membranas se obtuvieron usando la Tecnica de Neville con una descrita por Fohl (19). Todo el procedimiento debe realizarse a temperatura de 0^o a 4^o C, y consistio en lo siguiente:

Se sacrificaron las ratas y rapidamente se les extirpo el higado. Se les quito el tejido conectivo y se coloco cada higado en un vaso de plastico frio y el tejido se desmenuzo con tijeras. Los fragmentos se basaron a un homogenizador (Dounce) grande con embolo flojo (Blaessing Glass Spec. Co., Rochester, N.Y.), con 25 ml. de NaHCO₃ 1mM y se homogenizaron con ocho a diez choques del embolo. Operacion que se repitio para cada higado.

Por cada dos higados, se agregaron 450 ml. de NaHCO₃ 1mM frio y la mezcla se agito por tres minutos con varilla de vidrio, se filtro a traves de gasa doble y luego a traves de gasa cuadruple. El filtrado se distribuyo en botellas de centrifuga de 250 ml., y se centrifugaron a 2,500 rpm (1,500 x g) en una centrifuga Beckmann IJ-6 durante treinta minutos; el sobrenadante se desecha con mucho cuidado y se resuspendio la pastilla en un minimo de medio.

Todos los precipitados resuspendidos se colectaron en el mismo homogenizador Dounce y se homogenizaron con tres choques suaves del mismo embolo. Freviamente, se preparo una solucion

de sacarosa y se ajusto a una concentracion de $69 + 0.5\%$ (p/p), con la ayuda de un refractometro Abbe. En una probeta se mezclaron un volumen del homogenizado y 1.76 volúmenes de sacarosa al 69%.

La mezcla final debe quedar a una concentracion de sacarosa $44 + 0.1\%$. Si es necesario ajustar, se añade agua o sacarosa al 69%. Con esta suspension se llenaron 2/3 partes del volumen de los tubos. El tercio restante se llenó cuidadosamente con una solución de sacarosa ajustada previamente a una concentracion de $42.3 + 0.1\%$ (p/p)

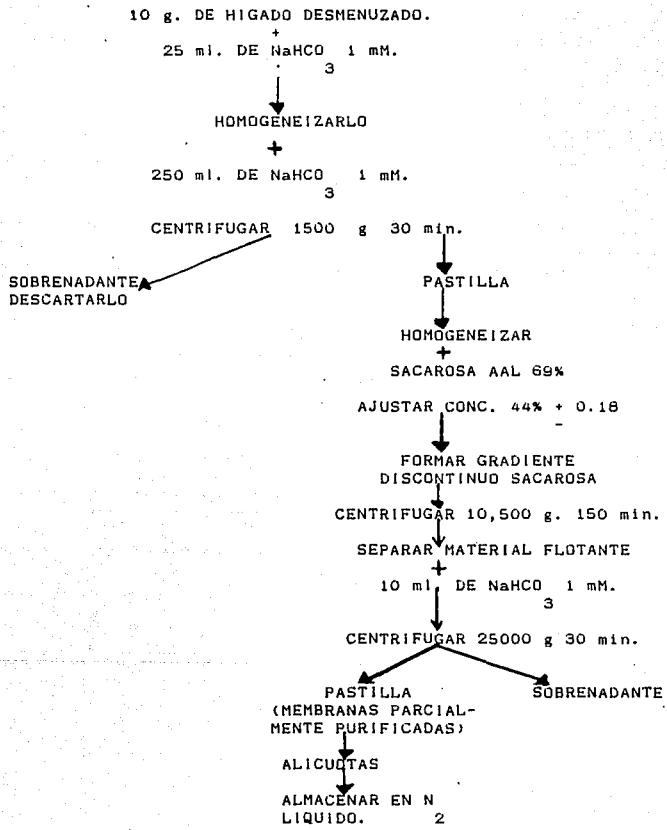
Los tubos se centrifugaron a $105,000 \times g.$, durante ciento cincuenta minutos. Se quitó la porcion flotante que corresponde a las membranas semipurificadas con una espátula tipo cuchara. Las membranas se colocaron en un avso con un pequeño volumen de NaHCO_3 1mM y se resuspendieron, haciéndolas pasar por una aguja No. 18 y luego por otra del No. 20.

Estas membranas se lavaron con NaHCO_3 1mM para quitar el exceso de sacarosa. Se mantuvo la proporcion de un volumen de suspension a cinco volúmenes de NaHCO_3 . Despues se centrifugó a $15,000 \times g.$, durante diez a quince minutos en una centrifuga Sorvall RC-5B, refrigerada a $4\text{ C}.$

Las membranas sedimentadas se resuspendieron en un minimo de sobrenadante y se tomaron alicuotas, que se almacenaron en nitrogeno líquido a $-180\text{ C}.$ (Diagrama 1)

DIAGRAMA 1

METODO DE OBTENCION DE
MEMBRANAS



4.0.07 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS.

La determinación de la concentración de las proteínas, se realizó siguiendo el método de Bradford (49), utilizando como estándar de proteínas, una solución que contiene albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/ml. (Sigma - Chemical Co., Fracción V, 96-99% de pureza).

Las lecturas de densidad óptica a 595 nm se efectuaron en un colorímetro Coleman Modelo 44. (Figura 4).

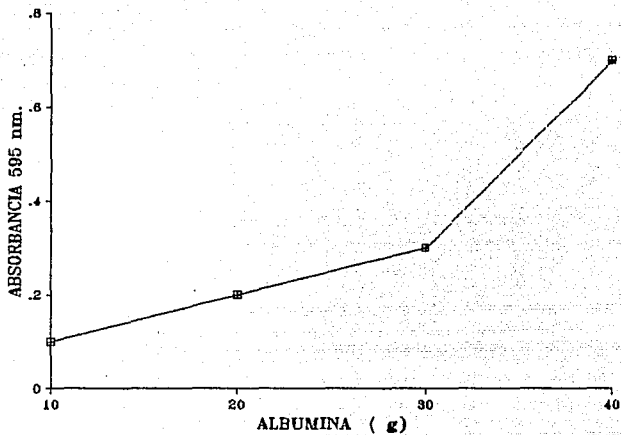
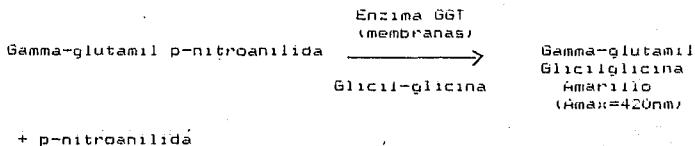


FIG. 4 CURVA STANDARD DE
PROTEINAS.

4.0.08 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE INCUBACIÓN PARA EL ENSAYO DE LA GGTP.

La determinación de la actividad de la GGTF se utilizo Gamma-Glutamil p-nitroanilida (GGFNA) como sustrato y, se basa en la siguiente reacción:



En la Figura 5 se muestra la curva STD de p-nitroanilida.

Se determinaron las condiciones óptimas de incubación para el ensayo de la actividad de la enzima y, se ensayaron las siguientes condiciones:

- Actividad Vs. Tiempo (Figura No. 6)
- Actividad Vs. Concentración de Sustrato (Figura No. 7).
- Actividad Vs. Concentración de Glicil-glicina (Figura No. 8).
- Actividad Vs. Concentración de Cloruro de Magnesio -- (Figura No. 9).

Después de determinar las concentraciones óptimas, se procedió a determinar la actividad de la enzima gamma-glu-tamil-transpeptidasa, las medidas se realizaron en las condiciones óptimas que a continuación se muestra el protocolo utilizado en el Cuadro (1).

4.0.09

CUADRO No. 1

COMPOSICION DE LA MEZCLA DE REACTIVOS.

Reactivos	Conc. (mM)	Vol. (ml)
Tris-HCl (Trihidroximetilamino- metano-Acido clorhi- drico) Amortiguador.	200 pH-8.2	.100
MgCl ₂	200	.100
Glicil-glicina	40	.300
Gamma-glutamil p-nitro- anilida (sustrato)	10	.400
Membrana	30-50 ug de (proteína)	.100

El volumen total de reacción es de 1.0 ml.

Las membranas congeladas se suspenden en Tris-HCl 200 mM pH=8.2. Previa incubacion de los reactivos por quince minutos a 37 C, se inicia la reaccion con 100 ul. de la suspension de las membranas conteniendo 30-50 ug de proteina. La mezcla se incuba a 37 C durante treinta minutos y, la reaccion se detiene con 2 ml. de acido acetico 1.5 M.

Se lee la absorbancia en celdillas de vidrio a 410 nm., en un colorimetro Coleman 44, ajustandolo al 100% de transmision con un blanco que contenga todos los reactivos, excepto las membranas.

La concentracion de p-nitroanilina producida, se determina por interpolacion en una curva estandar de p-nitroanilina que se construyo previamente y se muestra en la Figura 5.

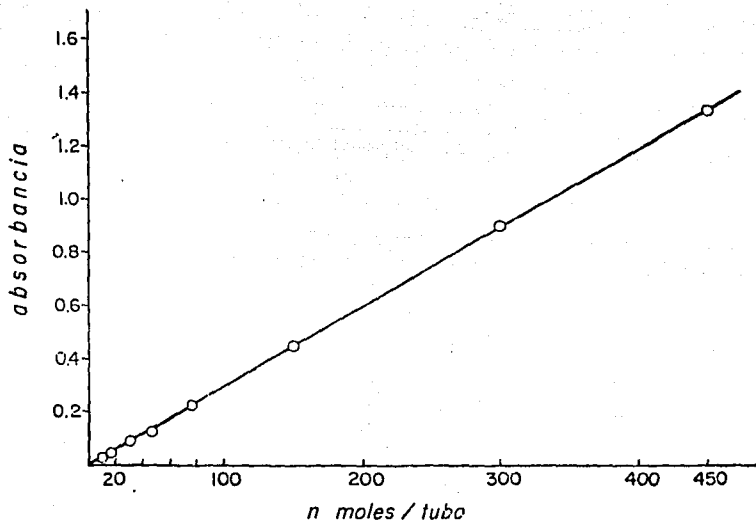


FIG. 4

FIG. 5 CURVA ESTANDAR DE P-NITROANILIDA.

5.0.00 RESULTADOS

5.0.01 CONDICIONES OPTIMAS DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERTASA.

Como se menciona en la sección de metodos, se determinaron las condiciones optimas de incubacion de la reaccion enzimatica de la cual se obtuvieron los siguientes comentarios.

A) ACTIVIDAD CONTRA TIEMPO.

Los datos de la Figura numero 6. muestran que la actividad es lineal con respecto al tiempo, por lo menos hasta una hora.

B) ACTIVIDAD CONTRA LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

Se midio la actividad de la enzima a los treinta minutos y a una temperatura de incubación de 37 C, en el medio descrito en el Cuadro No. 1. Salvo que se vario la concentracion de sustrato como se observa en la Figura numero 7 se puede observar que la actividad aumenta linealmente con el aumento de la concentracion de sustrato 4.0 mM.

C) ACTIVIDAD CONTRA LA CONCENTRACION DE GLICIL-GLICINA (ACEPTOR).

En la Figura número 8 se observa el efecto de la concentracion de Glicil-glicina sobre la actividad de la enzima. A medida que se aumenta la concentracion de Glicil-glicina aumenta la actividad enzimatica, alcanzando un maximo cuando la concentra-

cion de glicil-glicina es de 1.2 mM. ya que la glicil-glicina --
acelera la reaccion por encima de la proporcion obtenida en un --
medio simple amortiguado.

D) ACTIVIDAD CONTRA LA CONCENTRACION DE $MgCl$

2

En la Figura número 9 se puede observar que la actividad --
aumenta progresivamente a medida que aumenta la concentracion de
Cloruro de magnesio hasta que luego comienza a disminuir la con-
centracion de $MgCl$.

2

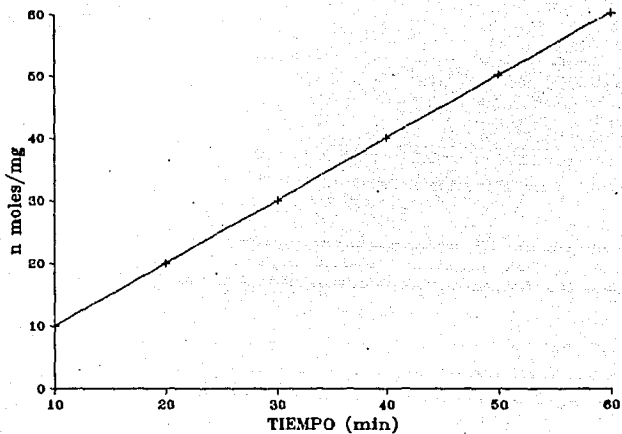


FIG. 6 CURVA DE LA ACTIVIDAD
DE LA GAMMA GLUTAMIL
TRANSFERTIDASA CONTRA
EL TIEMPO.

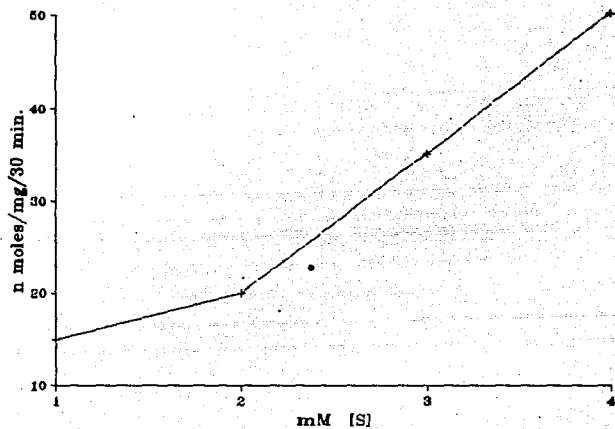


FIG. 7 CURVA DE LA ACTIVIDAD DE LA
GAMMA GLUTAMIL TRANSFERTIDASA CONTRA
CONCENTRACION DE SUSTRATO.

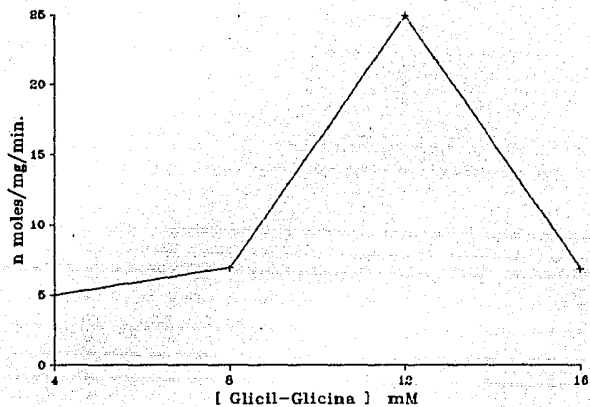


FIG. 8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA
GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA CONTRA
CONCENTRACION DE GLICIL-GLICINA.

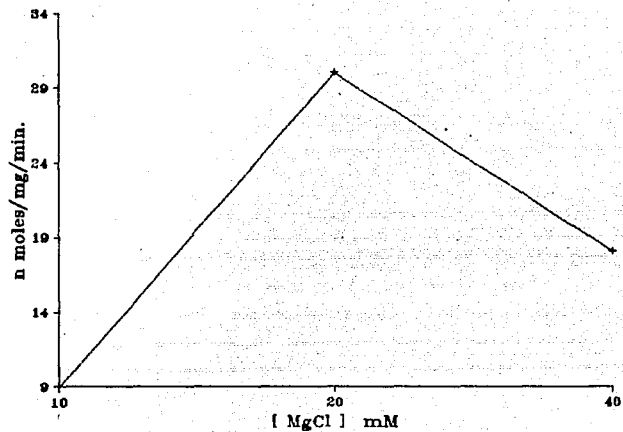


FIG. 7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA
GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA CONTRA
CONCENTRACION DE CLORURO DE MAGNESIO.

5.0.02 ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA
EN LAS MEMBRANAS DE LOS HEPATOCITOS DE RATAS
INTOXICADAS CON CCl₄ (HEPATITIS TOXICA).

4

En el Cuadro No. 2. y en las Figuras No. 10 y 11, se muestran los resultados de la actividad de la enzima Gamma-Glutamil-Transpeptidasa, determinada en las membranas plasmáticas de los hígados de las ratas intoxicadas en forma aguda con CCl₄. Como se puede observar, tres horas después de la intoxicación la actividad de la enzima Gamma-Glutamil-Transpeptidasa comienza a disminuir y alcanza un mínimo a las once horas, luego la actividad se recupera y se observa un aumento con un pico a las setenta y dos horas, que supera el valor normal en cuatro veces.

Los resultados se expresan como el promedio de diez determinaciones \pm 1 desviación estándar.

Los resultados se analizaron estadísticamente, mediante la prueba "t" de student.

CUADRO No. 2

ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA
EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE RATAS
INTOXICADAS AGUDAMENTE CON CCl₄.

4

Horas Posteriores a la

Administración de CCl₄

4

Act. Gamma-glutamyl-

transpeptidasa

0	27.1	+	5.3
		-	
3	22.0	+	4.3
		-	
6	15.7	+	6.0
		-	
11	5.69	+	.81
		-	
18	18.3	+	5.3
		-	
20	23.4	+	7.7
		-	
24	19.6	+	9.6
		-	
48	39.0	+	20.7
		-	
72	106.7	+	24.2
		-	
96	80.4	+	26.7
		-	
120	72.0	+	25.0
		-	
144	66.2	+	17.0
		-	
168	52.9	+	21.8
		-	
192	40.6	+	17.0
		-	
216	38.7	+	15.5
		-	
240	34.2	+	8.4
		-	

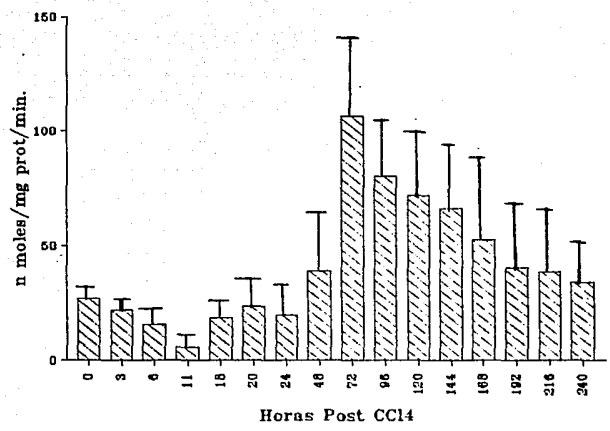


FIG.10. ACTIVIDAD DE GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA
EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE RATAS
INTOXICADAS AGUDAMENTE CON CCl₄.

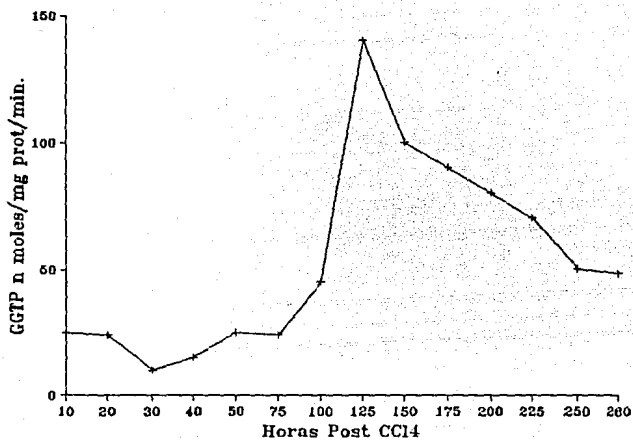


FIG.11. ACTIVIDAD DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERTIDASA
EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE RATAS
INTOXICADAS AGUDAMENTE CON CCl4 .

5.0.03 Cirrosis Hepática

5.0.04 ACTIVIDAD DE LA GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFEROASA
DETERMINADA EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE --
RATAS TRATADAS CRONICAMENTE CON CCl₄ .
(N MOLES/MG PROT/MIN).

En el Cuadro número 3, Figura 12 se aprecian los resultados de la actividad enzimática en los días posteriores a la administración de la última dosis de CCl₄ . El tratamiento estadístico indica que los cambios no fueron significativos.

CUADRO No.3

<u>Grupo</u>	<u>Actividad</u> (nmoles/mg prot/min)
Control	30 + 9
CCl ₄ (Cirrosis)	39 + 21
4	-
CCl ₄ + Colchicina	33 + 14
4	-
Colchicina	34 + 15
	-

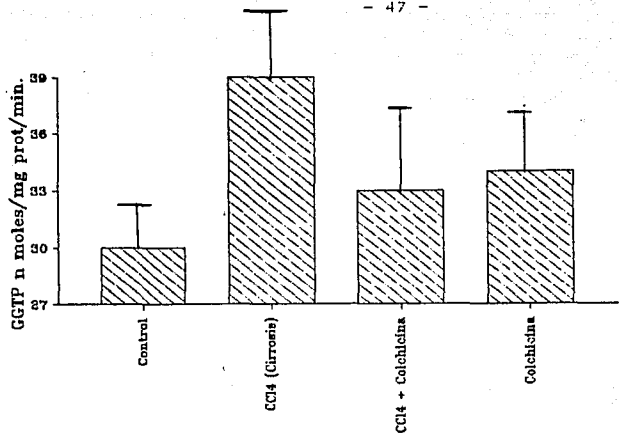


FIG. 12. ACTIVIDAD DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERTIDASA DETERMINADA EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS DE RATAS INTOXICADAS AGUDA Y CRONICAMENTE CON CCl₄ Y TRATADAS CON COLCHICINA.

6.0.00 DISCUSION

6.1.00 HEPATITIS TOXICA.

Los resultados de los experimentos realizados con ratas intoxicadas en forma aguda con una unica dosis de CCl_4 indicaron una caida inicial de la actividad de la enzima, probablemente debido a un efecto toxico directo del CCl_4 . Luego se observo un aumento con un maximo a las setenta y dos horas. Como ya se menciona, la enzima esta unida a la membrana y cataliza la transferencia del grupo gamma-glutamilo del glutation a un aminoacido o a un peptido que actua como aceptor. Este pico de maxima actividad coincide con el pico de maxima sintesis de DNA encontrado en ratas intoxicadas de igual forma por otros autores (38).

Estos datos apoyan el papel que se postula de la enzima en el transporte de aminoacidos y nos esta indicando que la actividad es elevada en el tiempo en que se requiere un mayor transporte de aminoacidos para la regeneracion del higado.

6.1.01 CIRROSIS HEPATICA

Ya se menciona que se produjo la cirrosis experimental tratando a las ratas con CCl_4 , y que otras ratas recibieron además tratamiento con colchicina. La actividad enzimatica se midió en la membrana de estos hígados.

La actividad de la gamma-glutamyl-transpeptidasa no sufrió cambios significativos en los diferentes grupos de animales.

De acuerdo a lo que se mencionó antes, para el caso de hepatitis tóxica, podríamos decir que, en la cirrosis no hay un aumento en la actividad de la enzima porque no hay regeneración hepática.

Por lo tanto, nuestros datos también apoyan la idea de que, en la cirrosis no hay regeneración, incluso, aún cuando se tratan los animales con colchicina que, como ya se mencionó es una droga que se emplea en el tratamiento, produciendo la cirrosis efectos benéficos en el sentido de mejorar la funcionalidad del órgano.

Otro grupo de animales recibió el mismo tratamiento con ⁴CCl₄, durante siete semanas, pero conjuntamente, recibieron una dosis de 10 microgramos de colchicina disuelta en 0.5 ml., de agua por vía oral, cinco días a la semana. Otro grupo de animales recibió solamente la colchicina en la misma forma antes señalada.

Nuestros resultados indican que la actividad de la Gamma-Glutamil-Transpeptidasa disminuye a las tres horas después de la intoxicación aguda y, alcanza un mínimo a las once horas, posteriormente, la actividad se recupera y sobrepasa el valor normal para llegar a un máximo a las setenta y dos horas después de la intoxicación, alcanzando los valores normales a las doscientas cuarenta horas después de haber administrado el CCl₄.

En los animales cirróticos, la actividad de la GGT no ⁴mostró variaciones significativas con respecto a los controles.

Los grupos tratados con colchicina, también se comportaron

como los normales.

Se considera que la actividad de la GGTP aumenta en los -- procesos de división celular, como lo son los anteriormente --- citados, nuestros resultados indican que después de una hepatis tóxica, el hígado se regenera, pero que no existen eviden-- cias de regeneración hepática en los hígados cirróticos trata-- dos o no con colchicina.

7.0.00 CONCLUSIONES

Durante la etapa regenerativa posterior a la intoxicación aguda con CCl₄ los cambios permanecen mientras las necesidades ⁴ del proceso lo imponen, cuando el organo ha completado su regeneración se recuperan las condiciones basales, por lo tanto hay regeneración hepática.

En los animales cirróticos, las alteraciones observadas no se parecen a las alteraciones típicas de un hígado en regeneración y aunque algunas de ellas son semejantes, están combinadas con otras que se deben al mal funcionamiento general del organismo.

Además hay que tener en cuenta que la cirrosis no es un estado patológico que solo incluye al hígado, sino que el cuadro clínico completo, también participan muchos otros factores, por esta razón fue que se estudió la cirrosis en la etapa temprana de la enfermedad para ver si por lo menos la regeneración se inicia aunque después las complicaciones impidan que el proceso correctivo llegue a su fin.

Los datos que aquí se reportan sobre la acción de la colchicina en la cirrosis hepática pueden ser útiles para conocer mejor el mecanismo por el cual, esta droga mejora a los enfermos.

B.O.OO BIBLIOGRAFIA

- 1.- Janes, A.L. and Mills, E.S.: Hígado y Vesícula Biliar. Greep, R.O. and Weiss, L. Histologia, Ed. El Ateneo. 3a. Edición. p.p. 509-559. 1978.
- 2.- Rappaport, A.M.: Physioanatomical Basis of Linea Enjures. Toxic Enjures of the Linea Part. A. Ed. by M. Farber and M. M. Fisher Marcel Dekker Inc. 1979.
- 3.- Rappaport, A.M. "Anatomic Considerationes en Leon Schiff "Disease of the Linea". I.B. Yippincalt Company, Philadelphia. 3d. p.p 149. 1969.
- 4.- Katz, N. y co. Heterogeneous Distribution of Glucose-6-phosphatase in Microdissected Perportal and Pervenous rat Linea Tissue. Tebbs Letters. 7:226. 1977
- 5.- Le Bouton Av. Heterogeneity of Fratum Metabolism Between Linear Cells as Studied by Radioautography. Cierr. Med. Biol. 2:111 1968.
- 6.- Farber, E. y col.: Histochemical Localization an Specific Oxidative Enzymes" 1.- Tetrazalin Strain for Depnospopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. 1. Histochem. Cytochem. 4:254. 1956.
- 7.- Stonen, H.B.: The Mechanism of toxic Necrosis. Br. J. Exp. Pachol. 37:116. 1956.

- 8.- Guillette, J.R.: Biochemistry of Long Oxidation and Reduction by Enzymes in Hepatic Endoplasmic. *Ada Pharmacol.* 4:219. 1966
- 9.- Seawright, A.A. y col.: The effect of Prior Dosing with Phenobarbitone and B-diethylaminoethyl Diphenylpropyl -- Acetato (SKF 525A) on the Toxicity Liver Lesion Caused by Ngalone in the disease. *Br. J. Exp. Pathol.* 53:241. 1972.
- 10.- Goldstein, B., Aronow, L. and Kaplan, S.M.: Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology. 2d. Ed. Wiley. New York, p.p. 242-251. 1974.
- 11.- Robertis De.: Methods for the study of the cell. Part -- Three. *Cell Biology. Sixth Edition.* W.B. Saunders Company p.p. 79-219. 1975.
- 12.- Jones, L. y col.: Morphometric Analysis of Rat Hepatocytes After Total Biliary Obstruction. *Gastroenterology.* 71:1050-1060. 1976.
- 13.- Loud, A.V.: A Quantitative Stereological Description of the Ultrastructure of Normal Rat Liver Parenchymal Cells. 1.
- 14.- Weibel, E.R.: Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology. *Int. Rev. Cytol.* 26:235-302 1969.

- 15.- Miyai-K.: Ultrastructural Basis for Liver Injury. Toxic -- Injury of the Liver Part. A. Ed. by M. Farber and M.M. --- Fisher Moral Dekker I.N.C. pp. 59-103. 1977.
- 16.- Wisner, M.N. and Evans, W.H.: Functional Polarity of the Rat Hepatocyte Surface Membrane: Isolation and Characterization of plasma membrane subfractions from the blood-sinusoidal, bill nanulecular and cochinous surfaces of the hepatocyt. Biochem. J. 146:375-388 1975.
- 17.- Singer, S.J. and Nickolson, G.L. Tharfluid Mosaic Model of the structures of cell membranes. Science. 175:720-731. 1972.
- 18.- Oudea, P.R. Anorexic Changes of liver celss. Electron Mi--- croscopic study after injection og colloidal mercury. Lab - Sciicest. 12:386-394. 1963.
- 19.- Hicks, S. y col. : Preferential syntesis of ferritin and -- albumin by diferent populations of linea polysonus. Science 164:584-585. 1969.
- 20.- Chedid, A., and Nair, V.: Diseaseal Rhythm in Endoplasmic reticulum of rat liver. Science. 175:176-179. 1972.
- 21.- Recknagel, R.O. y col.: New data in support of the lipopero- xidation theory for carbon tetrachloride liver injury. Israel J. Med. Sci. 4:301-311. 1974.

- 22.- Kinashita, F.K. y col. Quantitative Measurement of Induction of hepatic microsomal. Enzymes by Various Dietary Levels of DDT and Toxaphene in rats, Toxicol and applied Pharmacology 9;505-513. 1966
- 23.- Hart, L.G. y col.: Effects of acute and chronic DDT. Administration on hepatic microsomal Drug metabolism in the rat. P.S.E.B.M.V. 114:388-392. 1963.
- 24.- Lowy, R. Albrecht y col.: Determination of the "No-Effect Level" of two pesticides, Luedano and Enebo, on the microsomal enzyme activities of rat liver. Toxicology and Applied Pharmacology. 412:329-338. 1977.
- 25.- Couney, A.H., y col. : Metabolic Suteractions among environmental chemicals and drugs. Science 178:576-586. 1972.
- 26.- Ortega, F. y col.: Pathologic Changes in the liver of rats after feidug low levels of various sureclicides. Arch. Path. 54:614-622. 1973.
- 27.- Kilbrought, R.D., et.al. The Ultrastructure of lineas of rat fed DDT and Dieldrin. Arch. Environ. Healt. 22:460-467. 1971.
- 28.- Kilbourght, R.D., et. al. Combined effects of DDT Fypethrin and Piperonyl Butoxide on rat Linea. Arch. Environ. Health. 16:333-341. 1968.

- 29.- Orrenius, S., and Ericsson, J.L.: On the relationship of liver Glucosa-6-Phosphatase to the proliferation of endoplasmic reticulum in phenobarbital induction. *J. Cell. Biol.* 31:243-256. 1966.
- 30.- David, H.: On the problem of disease specific changes of cellular ultrastructure. *Biol. Cellulary.* 37:91-94. 1980.
- 31.- Reynolds, E., *Amer. J. Pathol.* 81:219-231.
- 32.- Henrik Anttinen, Lasse Rynhaunen, Ulla, Pivstola Arno Arranto and Arne Oikarinen Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride-injured and normal growing rats upon administration of zinc. *Gastroenterology.* 532-539. 1984-86.
- 33.- Hiroaki Kato and Yasou Nakasawa.: Carbon tetrachloride and trichloroethylene toxicities rat hepatocytes in primary monolayer culture: Its relationship to the level of cytochrome P-450. *Toxicology Letters.* 34:55-56. 1984.
- 34.- Martinez-Calva, I., Campos Apez, M.: Vitamin E improves membrane lipid alterations induced by CCl₄ intoxication. *Journal of Applied Toxicology.* Vol.4, No. 5: 270-272. 1984.
- 35.-Giuseppe Poli., Chiarpottto, E.: Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: Functional impairment of Golgi Apparatus in the early phases of such injury. *Life Sciences.* Vol. 36, pp 533-539.

- 36.- Dustin, P., Hobert, J-P., and Durant Flament.: Action of --- colchicine on axonal flow and pituicytes in the hypothalamic pituitary system of the rat. pp. 670-684. 1973-74.
- 37.- Ehrlich, P., Russel, R., Borsntein F.: Effect of anti-- microtubular agents on the secretion of collagen. J. Cell. - Biol. 62:390-405. 1974.
- 38.- Ehrlich, P.: Microtubules intracellular movement of proco- llagen. Nature New Biology, 238:257-260. 1972.
- 39.- Micel, S.B., and Wilson, L.: Nucleoside transport in mammalian cells inhibition by colchicine. Biochem 11:2573-2578. 1972.
- 40.- Rudolph, S., Greengar, F., and Malawista, S.E.: Effect of --- colchicine on cyclic AMP levels in Human Leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:3404-3408. 1977.
- 41.- Histochemical and Biochemical Investigations of Gamma-Glutamil Transpeptidase in the tissues of man and laboratory rodents. By Zygmunt Albert Jadwing, A. Orlowaka, Marian Orłowski and Apolli- nary. Szewczuk. Acta Histochem. Bd.8:78-79. 1964.
- 42.- Mourelle, M., and Rubalcava, B.: Changes in the regenerating -- liver following intoxication with carbon tetrachloride. Biochem Biophys. Res. Comm. 88:189-98. 1979.
- 43.- Borisy, G.G. and Taylor, E.W.: The mechanism of action of col- chicine bending to sea urchin eggs the mitotic apparatus. The Journal of Cell Biology. Vol. 34, pp.535-547. 1967.

- 44.- Borisy, G.G. and Taylor, E.W.: The mechanism of action of colchicine binding of colchicine 3H to cellular protein. The Journal of Cell Biology. Vol. 34. pp. 539-548. 1967.
- 45.- Edwin, W. Taylor, Ph. D.: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. The Journal of Cell Biology. Vol. 25. 1965.
- 46.- Mourelle, M., and Rubalcava, B.: Changes in the insulin and glucagon receptors in the regenerating liver following intoxication with carbon tetrachloride. Biochem. Biophys. Res. Comm. 88:189-198. 1979.
- 47.- Mourelle, M.: Tesis de Maestria en el Departamento de Farmacologia. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. 1978.
- 48.- Martinez-Calva, I., Campos-Apaez., Rosales, E., Mourelle, M.: Vitamina E improves membrane lipid alterations induced by CCl₄ intoxication. Journal of Applied Toxicology, Vol. 4. No. 5. pp. 270-72. 1984.
- 49.- Brandford, M.M. Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-54. 1976.
- 50.- Goldberg, J.A., Fineda, E.F., Smith, E.E., Friedman, O.M., Rutenberg, V.M. Gastroenterology, 44:127. 1963.
- 51.- Orłowski, M., Szewczuk, A.: Clin. Chem. Acta. 7:55. 1962.

- 52.- Szasz, G. Clin. Chem. 15:124. 1969.
- 53.- Witfield, J.B., Moss, G.W., Neale, G. y Breckenridge, H.
Brit. Med. J. 1:136. 1973.
- 54.- Rosalki, S.B. y Rau, D.: Clin. Chem. Acta. 39:41. 1972.
- 55.- Westgard, J.O. y Hunt, M.R. Clin. Chem. 19:49. 1973.
- 56.- Rodkind, M., and Kershenobich, D. : Effect of colchicine on --
collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic liver
slice. Biophys. Acta 378 pp. 415-423. 1975.
- 57.- Leninger: Bioquímica. Segunda Edición.
- 58.- Howard C. Hopps: Patología. Pág: 306-309.
- 59.- Frederick H. Meyers: Manual de Farmacología Clínica.
3a. Edición. pag: 487.