

22
2 a)



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"EFECTO DE LA LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR
COMUN SOBRE EL METABOLISMO DE LA
ASPIRINA EN RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA CARMEN FLORES RODRIGUEZ

ASESORES: M.C. LILIANA FAVARI PEROZZI

M.C. LUISA MARTINEZ AGUILAR

D.C. PABLO MURIEL DE LA TORRE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

I N D I C E

Página

0.- RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	3
I.1.0 El Hígado	3
I.1.1 Generalidades	3
I.1.2 Funciones	3
I.1.3 Los elementos celulares del Hígado	5
I.1.4 El sistema biliar intrahepático	9
I.1.5 El sistema vascular intrahepático	9
I.2.0 Enzimas De La Membrana Plasmática Del Hepatocito ...	11
I.2.1 Fosfatasa Alcalina (FA)	13
I.2.2 γ -Glutamil Transpeptidasa (γ -GTP)	14
I.2.3 Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)	15
I.3.0 Evaluación De La Lesión Experimental. Marcadores De Daño Hepático	16
I.4.0 Importancia Del Daño Hepático	20
I.5.0 Modelos De Daño Hepático	21
I.5.1 La obstrucción biliar extrahepática en el humano	24
I.6.0 Metabolismo Hepático De Fármacos	25
1.6.1 La aspirina (ácido acetilsalicílico, AAS)	29

II.- OBJETIVOS	38
II.1.0 Objetivos Generales	38
II.2.0 Objetivos Específicos	38
III.- HIPOTESIS	39
IV.- MATERIAL Y METODOS	40
IV.1.0 Procedimiento Para La Ligadura Del Conducto Biliar Común	42
IV.2.0 Procedimiento Para El Sacrificio De Las Ratas	44
IV.3.0 Diagrama Del Trabajo Experimental	45
IV.4.0 Determinaciones Bioquímicas	47
IV.4.1 Determinación de la actividad de la FA	47
IV.4.2 Determinación de la actividad de la TGP	49
IV.4.3 Determinación de la actividad de la γ -GTP	51
IV.4.4 Determinación de bilirrubina total, directa e indirecta	53
IV.4.5 Determinación del contenido de glucógeno hepático	56
IV.5.0 Metabolismo De La Aspirina (Acido Acetilsalicílico)	58
IV.5.1 Cuantificación del porcentaje de recuperación del AAS en orina de ratas a las 24 horas	59
IV.5.2 Evaluación del perfil metabólico del AAS en orina	60
IV.6.0 Análisis Estadístico	62

V.- RESULTADOS	63
V.1.0 Evaluación Del Daño Hepático Inducido Por La Ligadura Del Conducto Biliar Común	63
V.2.0 Determinación Del Perfil Metabólico De La Aspirina En Ratas Ligadas Del Conducto Biliar Común	70
VI.- DISCUSION	75
VI.1.0 Actividad De Las Enzimas Séricas En Daño Hepático	76
VI.2.0 Bilirrubinas En Suero	82
VI.3.0 Glucógeno	84
VI.4.0 Metabolismo De La Aspirina	85
VII.- CONCLUSIONES	92
VIII.- BIBLIOGRAFIA	93

0. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de conocer el metabolismo del Acido Acetilsalicílico (AAS) en ratas con ligadura del conducto biliar común. Los experimentos se realizaron tres días después de haberse practicado la ligadura.

En este estudio se utilizaron 30 ratas wistar macho (200 - 250 g de peso), las cuales se dividieron en tres grupos: El grupo I estaba constituido por ratas normales (grupo control), a los animales del grupo II se les realizó operación simulada (O.S.) y al grupo III se le practicó la ligadura del conducto biliar común (LCB). Todos los animales recibieron una dosis oral única de 20 mg/kg de peso de AAS, se colocaron en jaulas metabólicas, se colectó la orina y se midieron los salicilatos totales excretados en las siguientes 24 hrs después de la administración del AAS. Los metabolitos se separaron por cromatografía en capa fina y se visualizaron con luz ultravioleta, se extrajeron de la sílica con agua y se cuantificaron espectrofotométricamente con el reactivo de Trinder. Los resultados mostraron que el porcentaje de recuperación del AAS en orina fue similar en los tres grupos (84 - 90%).

En la excreción urinaria de cada uno de los metabolitos se encontró que no hay diferencia significativa entre el grupo control y el de O.S. sin embargo, en el grupo de LCB se encontró elevada la

cantidad de Acido Salicílico (AS) y Acido Gentísico (AG) y no se encontró AAS en la orina. La cantidad de Acido Salicilúrico no varió en ninguno de los grupos estudiados.

Los resultados obtenidos indicaron que el daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común en la rata, modificó el metabolismo de la Aspirina.

I. I N T R O D U C C I O N

I.1.0 El Hígado

I.1.1 Generalidades

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados, en el hombre comprende del 2 al 3% del peso corporal (1). Se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma, presenta cuatro lóbulos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (Cápsula de Glisson) (2).

El hígado es esencial para la vida y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen una extraordinaria capacidad de regeneración y de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas (2).

I.1.2 Funciones

El hígado funciona como una glándula de secreción exócrina. Produce y 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 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 al hígado y ahí se almacenan carbohidratos (Glucógeno), proteínas, vitaminas y algunos lípidos. Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatocito pueden ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa, o bien, ligadas a un transportador como los triglicéridos que salen formando parte de una lipoproteína (3). Asimismo, este órgano funciona como una glándula de secreción endócrina: Más del 80% de todas las proteínas que se sintetizan en el hepatocito son exportadas hacia el plasma. Dentro de estas proteínas resaltan por su importancia la albúmina, el Fibrinógeno (Factor I) y la Protrombina (Factor II) (4).

El hígado realiza múltiples funciones metabólicas. Más de 100 pruebas de función hepática se han derivado de los centenares de reacciones que ocurren en él. Las células hepáticas también sintetizan muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: Albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa (Gluconeogénesis), ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. El hígado es por excelencia el órgano encargado del metabolismo de fármacos. Esto se basa en que este órgano tiene un alto contenido de enzimas metabolizantes de fármacos, comparado con otros órganos. Biotransforma compuestos exógenos como fármacos e insecticidas y compuestos endógenos como esteroides (4).

El hígado cumple una función primordial en la regulación de los niveles séricos de los sustratos que: el encéfalo, el corazón y otros órganos necesitan para funcionar debidamente (Fig. 1). Esta función reguladora se cumple extrayendo sustratos de la sangre a través de la vena porta y la arteria hepática. Además, tiene una función excretora regulando el contenido biliar y aportando al intestino las sustancias que este necesita para absorber los nutrientes (4).

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Finalmente, la abundancia de macrófagos (representados por las células de Kupffer), hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (3).

El hígado es objeto favorito de investigaciones bioquímicas, debido a sus múltiples funciones y a su rica ordenación de enzimas, coenzimas, sustratos, etc. (5).

I.1.3 Los elementos celulares del hígado

La unidad estructural clásica del hígado es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido que contiene placas anastomadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico

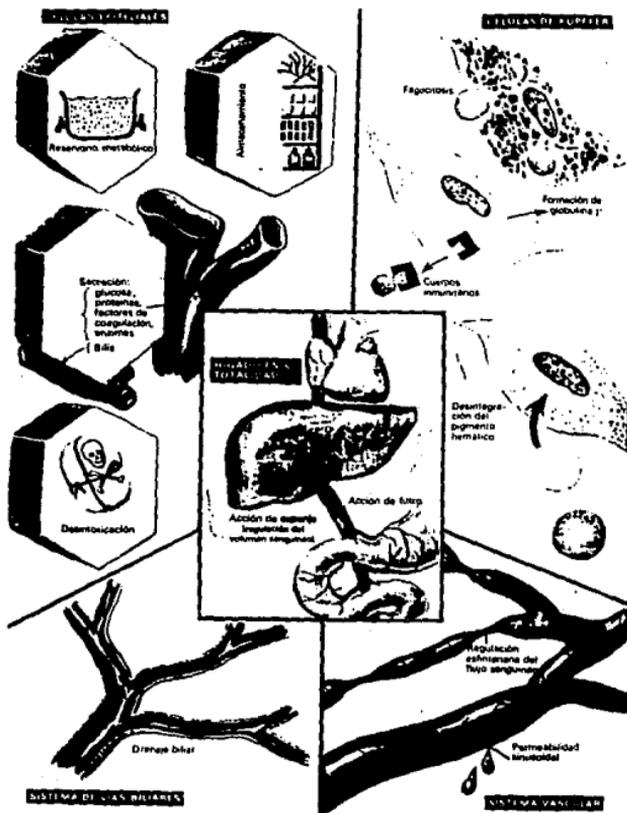


FIG. 1. Representación esquemática de las funciones del hígado, de sus componentes celulares y estructurales. Netter F. H. Colección Ciba De Ilustraciones Médicas. Ed. Salvat Tomo III/3, 1983.

de sinusoides sanguíneos (3). Este órgano está formado por diferentes clases de células que cumplen funciones específicas. Las células parenquimatosas del hígado o hepatocitos forman la masa celular más grande (Fig. 2); sus límites celulares monoestratificados están delimitados por células endoteliales de los vasos capilares especiales del hígado, llamados sinusoides (6). Las células endoteliales están cubiertas por macrófagos (células de Kupffer), los que a su vez están localizados dentro de los sinusoides, y por medio de sus proyecciones se extienden y se unen a las células endoteliales que forman los sinusoides (7).

Las células parenquimatosas predominan en términos de cantidad y aún más de volumen, pues alrededor del 80% de las células hepáticas humanas son parenquimatosas; el 20% restante lo constituyen las células endoteliales y de Kupffer (5).

El hepatocito que normalmente presenta apariencia poliédrica, tiene cuatro caras. Dos caras adyacentes a otros hepatocitos, la sinusoidal y la pared del canalículo biliar.

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 canalículo biliar está formado por la separación de dos o más hepatocitos adyacentes. Se ha observado que su pared tiene

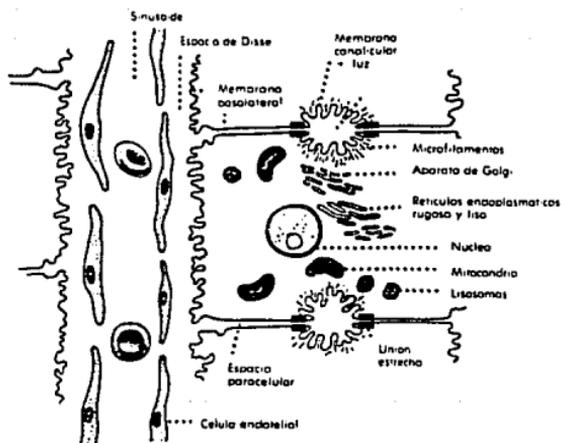


FIG. 2. Principales características estructurales del hepatocito.

Kelley W. N. Medicina Interna I. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 1990.

numerosas microvellosidades más regulares que las de la superficie sinusoidal (8).

I.1.4 El sistema biliar intrahepático

Las vías biliares se inician con los finos capilares o canaliculos bilíferos entre las células hepáticas (Fig. 3). Los capilares biliares forman una especie de red de alambre que constituye un sistema de intercomunicación dentro del centro de las placas de las células hepáticas. Están rodeados por los hepatocitos y parecen estar situados dentro de surcos o hendiduras formadas por las propias células, aunque en realidad constituyen una parte de ellas. La bilis producida por las células parenquimatosas, es secretada en el interior de diminutos capilares o canaliculos biliares que se forman entre las células epiteliales glandulares (9).

I.1.5 El sistema vascular intrahepático

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea (Fig.4). La vena porta, que lleva sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas, suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo; esta es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en

oxígeno. La vena porta se divide en ramas principales y consecutivamente, en otras más pequeñas para finalmente formar las ramas terminales que penetran al parénquima. Las vénulas de entrada se extienden a través de la placa limitante en los sinusoides periféricos dentro de los lóbulos hepáticos y suministran el volumen necesario de sangre portal al parénquima. La arteria hepática, es otra parte del sistema vascular del hígado, que se ramifica paralelamente con la vena porta y proporciona sangre rica en oxígeno. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos. La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central (10). La vena hepática constituye también parte del sistema vascular intrahepático, esta resulta de la unión de las venas lobulillares que están formadas por las venas centrales, las cuales están unidas a los sinusoides (9).

I.2.0 Enzimas De La Membrana Plasmática Del Hepatocito

La membrana plasmática que envuelve a la célula es una bicapa de fosfolípidos en la cual se encuentran insertadas proteínas globulares. En este modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (11) (Fig. 5), la bicapa de fosfolípidos provee la base estructural de la membrana y es responsable de la integridad, estabilidad y permeabilidad de la membrana.

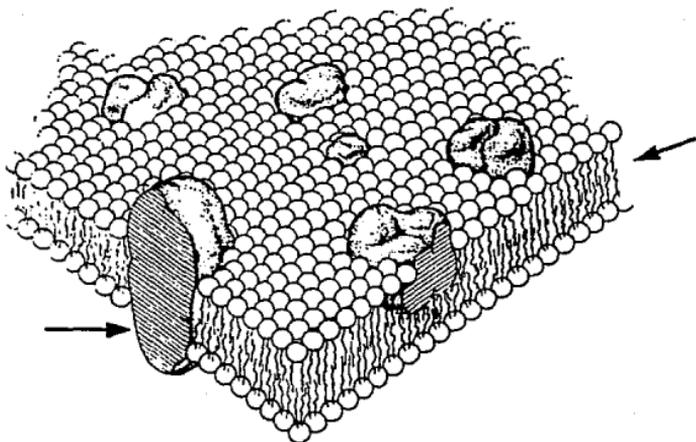


FIG. 5. Modelo del mosaico fluido: Postula que la membrana celular está constituida por una bicapa de fosfolípidos en la cual se encuentran insertadas proteínas globulares. Singer S. J. and Nicolson G. L. Science. 175:720, 1972.

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. Aunque hasta el momento no se conoce con certeza el número de las muchas enzimas membranales, las nuevas técnicas de aislamiento de membranas así como los métodos histoquímicos han permitido aclarar cada vez más estos aspectos membranales (12, 13).

I.2.1 - Fosfatasa Alcalina (FA).

La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, ya que puede ser encontrada en bacterias, algas, hongos, protozoarios, plantas y animales. En los animales vertebrados se ha visto que está distribuida en diferentes tejidos. El hígado contiene relativamente poca fosfatasa alcalina en comparación con órganos tales como el intestino delgado y el riñón (14).

Muchos compuestos de fósforo son sustratos para las fosfatasas alcalinas. Por definición la fosfatasa alcalina es una enzima inespecífica que hidroliza muchos compuestos de fósforo, aunque puede haber mayor especificidad para algunos compuestos como los ésteres fenólicos. En muchos de los ensayos bioquímicos se usa como sustrato el p-nitrofenol fosfato.



La función de la fosfatasa alcalina no está bien entendida. En general se considera que se encarga de la hidrólisis de ésteres de fosfato. Los ésteres de fosfato están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son extremadamente estables. Se ha sugerido que la fosfatasa alcalina ayuda a mantener el estado intracelular estacionario de los metabolitos fosforilados (15).

En relación a la actividad de esta enzima, se ha visto que se encuentra aumentada en suero cuando existe daño hepático de tipo obstructivo o una lesión hepática que conduzca a colestasis (16, 17). Es decir, sus valores en suero reflejan más fielmente lesiones del tipo obstructivo que lesiones del parénquima.

I.2.2 - γ -Glutamil Transpeptidasa (γ -GTP).

La γ -glutamil transpeptidasa está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos y se ha encontrado en un gran número de estructuras epiteliales, generalmente involucradas en procesos de absorción o secreción, tales, como el epitelio del túbulo proximal renal, las vellosidades del yeyuno, plexos coroideos, conducto biliar, vesículas seminales, etc.

En lo que se refiere a esta enzima, al igual que la F.A., su actividad sérica puede utilizarse para determinar el daño hepático de tipo obstructivo. La razón de su especificidad radica en el hecho de que ambas enzimas, F.A. y γ -GTP, están localizadas en la

membrana del canalículo biliar (18). No obstante, en la necrosis hepática también hay una ligera elevación en los niveles séricos de esta enzima, los cuales son paralelos a los de la F.A., observados en estas condiciones (16).

I.2.3 - Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP).

La transaminasa glutámico pirúvica, es una enzima intracelular. Es un marcador de daño hepático muy sensible a la necrosis celular, se han encontrado valores elevados de esta enzima al inicio del daño agudo causado por la obstrucción biliar extrahepática.

Estudios previos (19, 20), muestran que la especificidad de la enzima transaminasa glutámico oxalacética (TGO), es variable ya que se ha encontrado en el miocardio, músculo esquelético, hígado, cerebro, páncreas y riñón. Por lo tanto, el daño en cualquiera de estos tejidos trae como consecuencia un aumento en la actividad de esta enzima. La transaminasa glutámico pirúvica (TGP), se encuentra también en varios órganos, pero su mayor actividad ocurre en el hígado, esto hace de la TGP un marcador muy específico del daño hepatocelular (17, 21). Estudios realizados con el inhibidor de la síntesis de proteínas, Cicloheximida, han demostrado que este agente no afecta la actividad de esta enzima ya que mientras inhibe la síntesis de la fosfatasa alcalina disminuyendo su concentración en suero, los niveles de TGP aumentan en la circulación sistémica,

esto también sugiere que la elevación en la actividad de la TGP es debida a la liberación de la misma a causa de la necrosis celular y no a un aumento en la síntesis de novo de esta enzima (19, 20).

I.3.0 Evaluación De La Lesión Experimental. Marcadores De Daño Hepático.

La actividad funcional del hígado y su variedad de respuestas al daño dificulta la selección de los procedimientos apropiados para prevenirlo. La determinación de la actividad de las enzimas hepáticas, liberadas a la sangre durante el daño hepático constituye un método muy útil en los estudios de hepatotoxicidad. La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para la determinación del daño hepático fue introducida en 1930 y 1940 con la demostración de la actividad sérica anormal de la fosfatasa alcalina (22) y colinesterasa (23) en el daño hepático.

Sin embargo, el descubrimiento en 1950 de que la actividad de las diferentes transaminasas séricas estaban aumentadas por destrucción de los tejidos, representó un verdadero avance en los métodos enzimáticos séricos. Subsecuentemente se han identificado en la sangre otras enzimas que se elevan en casos de daño hepático.

Zimmerman (24) ha identificado cuatro categorías principales de enzimas séricas basadas en su especificidad y sensibilidad a los diferentes tipos de daño hepático:

1) Enzimas cuya elevada actividad sérica refleja daño colestático más sensiblemente que daño parenquimatoso, como la FA, la 5-nucleotidasa y la γ -glutamil transpeptidasa. (γ -GTP).

2) Enzimas que indican daño en el parénquima hepático producido por un agente citotóxico. Este grupo se ha dividido en:

a) Enzimas inespecíficas que pueden reflejar daño a tejidos extrahepáticos, como la transaminasa glutámico oxalacética y la lactato deshidrogenasa.

b) Enzimas localizadas principalmente en el hígado, como la transaminasa glutámico pirúvica (TGP).

c) Enzimas que están localizadas casi exclusivamente en el hígado como la ornitín carbamil transferasa y la sorbitol deshidrogenasa. Estas enzimas pueden ser usadas particularmente en el estudio de agentes con potencial hepatotóxico desconocido.

3) Enzimas que son insensibles al daño hepático, pero que se elevan cuando hay daño en tejidos extrahepáticos, como la creatinina fosfocinasa.

4) Enzimas que disminuyen su actividad sérica cuando existe daño hepático, como la colinesterasa.

Ninguna de las pruebas de función hepática es contundente para el análisis clínico de la mayoría de los problemas hepáticos. Una enfermedad leve, aunque difusa, tal como la hepatitis viral o la cirrosis hepática inicial, causa cambios en varias pruebas de función del órgano. Las pruebas de funcionamiento hepático, y especialmente las alteraciones de las actividades enzimáticas en suero, proporcionan en gran número de casos, la primera sospecha de algún trastorno del hígado. Nadie niega el valor de las determinaciones enzimáticas como métodos de "Monitoreo" para los trastornos del hígado, el único desacuerdo parece estar en cuáles enzimas son las más adecuadas para este propósito (25).

Dentro de los marcadores de daño hepático destacan los siguientes:

- La determinación de bilirrubinas (Total y Directa), en suero.
- La actividad de la Fosfatasa Alcalina, en suero.
- La actividad de la Transaminasa Glutámico Pirúvica, en suero.
- La actividad de la γ -Glutamil Transpeptidasa, en suero.
- La determinación del contenido de Glucógeno hepático.

Estos marcadores de daño hepático son muy útiles debido a las siguientes razones:

- 1) La primera razón, se basa en que cada una de las enzimas apunta a distintos tipos de daño hepático. Por ejemplo, un aumento en la

actividad de la TGP en suero es indicativo de perturbación en la permeabilidad celular. El aumento en la actividad sérica de la γ -GTP se presenta en casos de colestasis u otros daños hepáticos predominantemente tóxicos, que estimulan la síntesis de la enzima unida a la membrana. La elevación en suero de la fosfatasa alcalina, puede indicar una colestasis mínima en lesiones ocupantes hepáticas y en enfermedades biliares (26).

2) La segunda razón, se fundamenta en la mayor sensibilidad de las enzimas FA, TGP, y γ -GTP en el caso de alguna alteración hepática. En presencia de una notable enfermedad hepática, la actividad de estas enzimas se encuentra elevada en más del 98% de los individuos. Entre las condiciones ictericas con actividades enzimáticas basales en suero, únicamente se encuentran las hiperbilirrubinemias funcionales sin colestasis (26).

El incremento en la actividad sérica de algunas enzimas específicas del hígado, es un indicativo de una enfermedad hepática que resulta de la liberación o producción excesiva de las enzimas (27).

3) Por otra parte, la glucosa aporta la energía necesaria para los procesos metabólicos que ocurren en el organismo. La glucosa se almacena en forma de glucógeno en el hígado de tal forma que cuando es requerida por el organismo se lleva a cabo la glucogenólisis y de esta manera se tiene la glucosa necesaria en circulación para

los procesos metabólicos. Cuando el almacenamiento del glucógeno se ve afectado, trae como consecuencia alteraciones a nivel del metabolismo debido a la falta del aporte necesario de energía.

I.4.0 Importancia Del Daño Hepático

El hígado es un órgano que muy frecuentemente se ve afectado por una gran variedad de patologías directas o indirectas, entre las que pueden citarse los trastornos vasculares, metabólicos, tóxicos, obstructivos y neoplásicos. En algunos países como el nuestro por las parasitosis y las micosis (28).

El hígado juega un papel principal en el control de la homeostasis metabólica y consecuentemente cualquier lesión hepática alterará los procesos celulares normales y conducirá a varios grados de disfunción hepatocelular (28). De ahí que las enfermedades hepáticas constituyen un problema de salud pública en México desde el punto de vista socioeconómico ya que son afecciones que inutilizan a un gran número de individuos en edad productiva. Desde el punto de vista terapéutico también constituyen un problema de gran importancia ya que el número de fármacos efectivos para el tratamiento es reducido.

I.5.0 Modelos De Daño Hepático

Actualmente, en la investigación hepatológica es común el empleo de animales de laboratorio, ya que pueden provocarse experimentalmente alteraciones hepáticas reproducibles de las enfermedades humanas (27). Además la reproducción experimental de dichas alteraciones es económica. Existen varios modelos de daño hepático, dentro de los cuales destacan los siguientes:

- El modelo de daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono (CCL₄).
- El modelo de daño hepático inducido por la D-galactosamina.
- El modelo de daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCB).

El daño hepático inducido por el CCL₄ es principalmente a nivel de los organelos del hepatocito, con lo cual el hígado se ve preponderantemente afectado, presentándose infiltración grasa, necrosis hepatocelular y por lo tanto alteraciones en los marcadores de daño hepático (29-35).

Kepler y col. en 1968, reportaron que la administración repetida de dosis grandes de D-Galactosamina induce daño celular hepático severo en animales de laboratorio. Las lesiones observadas fueron necrosis de las células hepáticas e infiltración

periportal de células inflamatorias características que asemejan a la hepatitis viral humana (36).

El modelo de daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata, es una obstrucción mecánica extrahepática que se asemeja a la colestasis extrahepática desarrollada de manera natural en algunas patologías del humano (Fig. 6). Debido a que se impide el flujo de bilis hacia el duodeno, se propicia la regurgitación del flujo biliar hacia el hígado y de esta manera se provoca el daño (37).

La utilidad de este modelo radica en que a corto plazo se pueden evidenciar los efectos devastadores sobre varios tipos de células del hígado. Por último, es conveniente puntualizar que este modelo experimental reproduce la mayoría de las alteraciones bioquímicas e histológicas observadas en las diversas formas de colestasis. Además, ofrece la posibilidad de evaluar la acción de agentes con actividad farmacológica sobre un proceso particular y observar la forma en que se traduce su acción sobre otras respuestas celulares.

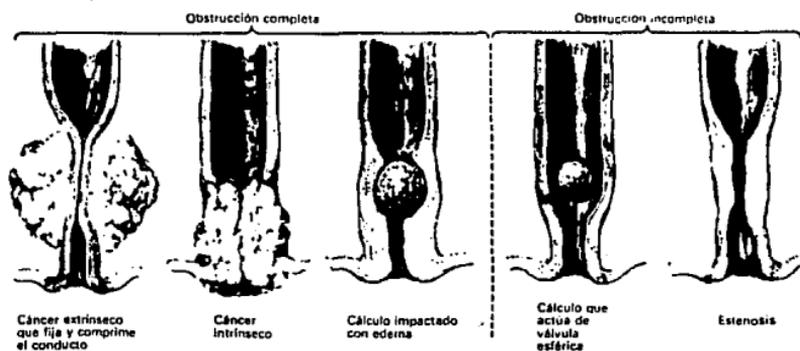


FIG. 6. Representación esquemática de algunos procesos patológicos que pueden dar lugar a la obstrucción del conducto biliar común. Netter F. H. Colección Ciba De Ilustraciones Médicas. Tomo III/3. Ed. Salvat, 1983.

I.5.1 La obstrucción biliar extrahepática en el humano.

Los efectos de la obstrucción biliar sobre el hígado se observan mejor en las muestras de biopsia y se desarrollan más rápidamente en la obstrucción completa que en la incompleta. La alteración que aparece en primer lugar es la acumulación del pigmento biliar en las células hepáticas y en las de Kupffer, en la zona central del lobulillo. El citoplasma de algunas células hepáticas adyacentes a los capilares biliares está modificado y puede observarse picnosis, mientras que las células hepáticas de las zonas intermedia y periférica permanecen todavía normales. En esta fase, aparecen hiperbilirrubinemia y bilirrubinuria. Después, tiene lugar una infiltración celular de las tríadas portales, con proliferación de los colangioloos y conductos periportales. Con la obstrucción prolongada, la proliferación de los colangioloos se hace más acentuada, y se forman cilindros biliares incluso en los capilares biliares periféricos. Los colangioloos dilatados contienen espesos tapones de bilis, microcálculos, especialmente en el límite entre el parénquima lobulillar y el tejido conectivo aumentado en las tríadas portales. La extravasación de bilis y los infartos biliares aparecen sólo después de una obstrucción muy prolongada y cuando esta es completa. La necrosis del revestimiento epitelial de las vías biliares interlobulillares permite el escape de bilis en sus paredes, y se observa tejido de granulación alrededor de la bilis, mientras que sus núcleos permanecen sin teñir. En las fases finales de obstrucción, las lesiones hepatocelulares secundarias

pueden ser graves y terminar en anomalías que indican degeneración de la célula hepática (9).

I.6.0 Metabolismo Hepático De Fármacos.

El hígado tiene a su cargo, como una de sus funciones primordiales, biotransformar una gran cantidad de compuestos que llegan a él. Para realizar tal función, el hepatocito contiene una serie de complejos enzimáticos que se encuentran inmersos en las membranas del retículo endoplásmico liso y en el citosol. En el proceso de biotransformación los compuestos liposolubles son convertidos en productos metabólicos más polares que permiten una excreción más rápida en la orina o en la bilis previniendo así los efectos tóxicos por la retención de agentes nocivos (38, 39).

Las reacciones de biotransformación se clasifican en reacciones de fase I y de fase II:

- **Reacciones De Fase I. (Reacciones no sintéticas):** Estas reacciones consisten en oxidaciones, reducciones e hidrólisis, que tienen la finalidad de introducir grupos químicos adecuados para que se lleven a cabo las reacciones de fase II.

De estas reacciones las de oxidación son las más importantes y son realizadas por un complejo enzimático llamado sistema de "oxidasa de función mixta" (OFM), o Monooxigenasas (38). En el

proceso uno de los átomos del oxígeno molecular se reduce y forma una molécula de agua y el otro oxida la molécula orgánica, según la siguiente reacción:



DH= Fármaco

DOH= Metabolito oxidado

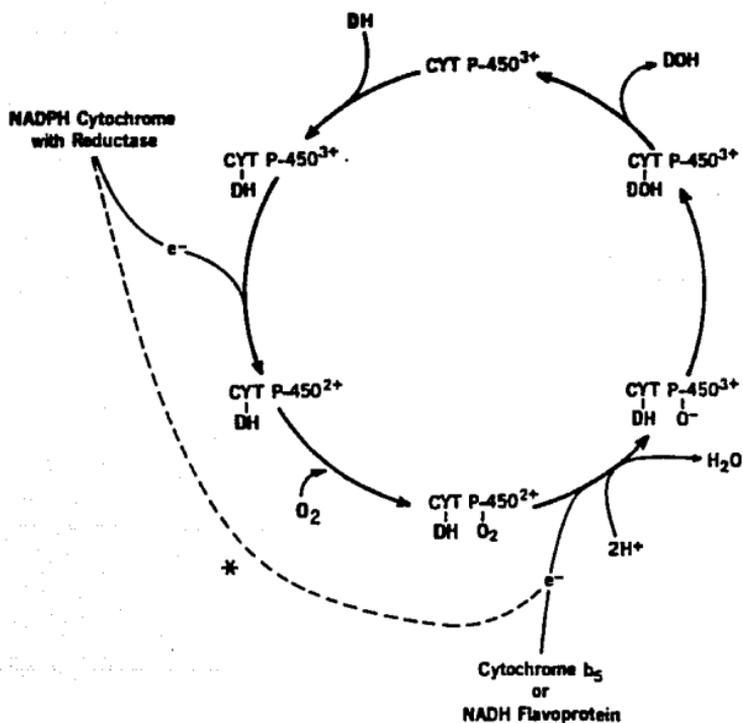
Las reacciones de oxidación incluyen: Hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, desalquilación oxidativa, desulfuraciones y desaminaciones, entre otras (39).

El sistema enzimático OFM consta de los siguientes componentes: El citocromo P-450 (Cit. P₄₅₀), la enzima NADPH-citocromo C reductasa, y el lípido fosfatidil colina. El componente más importante es el Cit. P-450, que es una hemoproteína (o grupo de hemoproteínas), que está involucrado en el metabolismo de una gran variedad de sustancias endógenas y exógenas. Este componente actúa como un aceptor terminal de electrones en diversas reacciones de oxidación. Su nombre se debe a que el complejo formado con CO tiene una absorbancia máxima a 450 nm. El NADPH actúa como una fuente primaria de electrones para este sistema enzimático. Estos electrones son transferidos al complejo Citocromo P-450-Fármaco por la flavoproteína NADPH-citocromo C reductasa. El componente

lipídico del sistema es esencial para la actividad enzimática. La secuencia molecular de los eventos, se muestra en la FIG. 7. (39).

Según el esquema, el fármaco se une con la forma oxidada del Cit. P-450 para formar un complejo, el cual se reduce por un electrón aportado por el NADPH-Citocromo C reductasa. El complejo Cit.P-450-fármaco reducido reacciona con oxígeno, y ya oxidado acepta un segundo electrón del NADPH o NADH, formándose un complejo "Oxígeno activado". El complejo resultante se descompone dando la forma oxidada del fármaco, el Cit.P-450, y el agua (39). Los productos de las reacciones de fase I incluyen la formación de epóxidos, radicales libres, azoalcanos y N-óxidos. Estos metabolitos pueden estar implicados en el desarrollo del daño hepático (40).

-Reacciones De Fase II. (Reacciones Sintéticas): Estas reacciones son esencialmente detoxificantes y se realizan en el citosol destruyendo las propiedades biológicas del compuesto original y sus productos, permitiendo su excreción como glucurónidos, derivados del ácido mercaptúrico y otros conjugados. Las reacciones de esta fase consisten en la conjugación de moléculas que contienen grupos polares con algún grupo endógeno (GSH, UDP del ácido glucurónico, glicina, etc.). Las principales reacciones de conjugación incluyen glucuronidación, metilación, acetilación, síntesis de ácido mercaptúrico, síntesis de tiocianato y conjugación con glicina, sulfato, y glutamina. La naturaleza detoxificante de las



* Denota contribución de un segundo electrón y dos iones hidrógeno de NADH-Flavoproteína-Citocromo b₅ o de NADPH-flavoproteína.

FIG. 7. Secuencia de reacciones del sistema enzimático metabolizador de drogas de los microsomas hepáticos. El esquema está basado en una figura de Zimmerman H. J. Hepato-toxicity. Ed. Appleton-Century-Crofts, New York, 1978.

reacciones de fase II es importante, pues como ha sido mencionado, los productos de la fase I pueden ser compuestos tóxicos, activos o carcinogénicos que cuando no son capturados por alguna de las reacciones de la fase II manifiestan su efecto tóxico (36, 41).

I.6.1 La aspirina (ácido acetilsalicílico. AAS).

La aspirina (Acido Acetilsalicílico), sigue siendo probablemente el agente analgésico, antipirético y antiinflamatorio más empleado en la clínica (42). Es un fármaco con propiedades farmacológicas y farmacocinéticas bien descritas en la actualidad (43, 44). Estas situaciones nos ofrecen, por lo tanto, ventajas para utilizarla como herramienta de exploración del daño hepático, si evaluamos las posibles alteraciones que pudiera sufrir su metabolismo.

PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

- ANALGESIA:

Los tipos de dolor susceptibles de alivio por los salicilatos son los de intensidad baja a moderada, de origen difuso, en particular cefaleas, mialgias, artralgiyas y otros dolores que surgen de estructuras tegumentarias. Es utilizada para dolores no viscerales.

Los salicilatos se utilizan más que ninguna otra clase de fármacos para aliviar el dolor. El uso crónico no produce tolerancia ni adicción y su toxicidad es menor que la de los analgésicos más potentes. Los salicilatos alivian el dolor en virtud de un efecto periférico y otro sobre el SNC.

Los efectos directos de los salicilatos sobre el SNC se han descrito y se sugiere un sitio hipotalámico de acción para algunos de los efectos analgésicos y antipiréticos (42).

La aspirina actúa principalmente a nivel periférico impidiendo la síntesis y liberación de las prostaglandinas en la inflamación, la aspirina puede evitar la sensibilización de los receptores dolorosos a la estimulación mecánica o a otros mediadores (42). Esta hipótesis explica por qué la aspirina es ineficaz como analgésico en los tejidos no inflamados.

La aspirina sólo es efectiva como analgésico en los estados patológicos en los que las prostaglandinas se sintetizan localmente (42).

Los fármacos tipo aspirina no afectan la hiperalgesia ni el dolor debidos a la acción directa de las prostaglandinas, lo que concuerda con la idea de que lo que se inhibe es su síntesis (42).

- ANTIPIRESIS:

Los salicilatos disminuyen la temperatura corporal elevada. El efecto antipirético es generalmente rápido y efectivo (42).

La regulación de la temperatura corporal requiere de un delicado equilibrio entre la producción y la pérdida de calor, el hipotálamo regula el punto fijo en el que se mantiene la temperatura corporal. En la fiebre este punto fijo está evidentemente elevado y los fármacos tipo aspirina promueven su retorno a la normalidad. La producción de calor no se inhibe, pero su disipación aumenta por el incremento del flujo sanguíneo a través de la piel y por la sudoración. La fiebre se asocia frecuentemente con un proceso inflamatorio y casi todas las prostaglandinas son pirógenas (42). Por lo tanto la generación de una prostaglandina en algunas áreas del SNC, o su presencia en la circulación general puede inducir fiebre.

FARMACOCINETICA Y METABOLISMO

a) Absorción:

Los salicilatos ingeridos por vía oral se absorben rápidamente en estómago e intestino. La absorción se produce por difusión pasiva y está determinada por muchos factores, particularmente la desintegración y disolución si se toman tabletas, el pH en las superficies mucosas (si aumenta el pH, el salicilato está más

ionizado y esto tiende a disminuir la absorción) y el tiempo de vaciamiento gástrico (la presencia de alimentos retarda la absorción) (42). La absorción de salicilatos puede también ser afectada por algunas enfermedades (45).

b) Distribución:

Después de su absorción, el salicilato se distribuye en casi todos los tejidos del organismo, principalmente por procesos pasivos dependientes del pH (42).

La distribución de salicilatos en el cuerpo es un reflejo de la manera con la cual el fármaco está unido a la albúmina y equilibrado con los tejidos. En las concentraciones terapéuticas, del 80 al 90% del salicilato se une a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina (42). La molécula de proteína unida al salicilato es farmacológicamente inactiva y no puede alcanzar los sitios de acción o biotransformación y excreción. Únicamente el fármaco libre, no unido, puede difundirse en los tejidos. Sin embargo la unión a proteínas es reversible y el fármaco unido sirve como reservorio, el cual es gradualmente liberado como fármaco no unido, es metabolizado y posteriormente excretado (45).

c) Biotransformación:

La biotransformación del salicilato tiene lugar en muchos

tejidos, pero particularmente en el retículo endoplásmico hepático y en las mitocondrias (42).

El plasma, en adición con el hígado, es el mayor sitio de hidrólisis de la aspirina. Luego de una administración oral de aspirina, esta experimenta hidrólisis por el metabolismo presistémico en el hígado y en el intestino. La aspirina llega a la circulación sistémica y es entonces hidrolizada por el plasma, células sanguíneas y el hígado. Las enzimas involucradas en la hidrólisis de aspirina son esterasas dentro de las cuales se incluyen a las carboxilesterasas hepáticas, a la colinesterasa plasmática y a las arilesterasas (46, 47).

Ha sido bien establecido que el suero y el plasma del hombre y de animales de laboratorio contienen esterasas con habilidad para hidrolizar el ácido acetilsalicílico. La actividad para hidrolizar a este fármaco ha sido comparada en varias especies de animales. En la rata, el hígado es el órgano que presenta mayor capacidad para hidrolizar al AAS (48).

Es importante mencionar que la aspirina como tal es farmacológicamente activa, sin embargo su mayor efecto lo ejerce como fármaco hidrolizado (42). Una vez que el AAS fue hidrolizado a ácido Salicílico (AS) por la acción de las esterasas plasmáticas y tisulares, una parte del AS puede ser eliminado como tal por excreción renal o sufrir transformaciones posteriores en el hígado

tejidos, pero particularmente en el retículo endoplásmico hepático y en las mitocondrias (42).

El plasma, en adición con el hígado, es el mayor sitio de hidrólisis de la aspirina. Luego de una administración oral de aspirina, esta experimenta hidrólisis por el metabolismo presistémico en el hígado y en el intestino. La aspirina llega a la circulación sistémica y es entonces hidrolizada por el plasma, células sanguíneas y el hígado. Las enzimas involucradas en la hidrólisis de aspirina son esterases dentro de las cuales se incluyen a las carboxilesterasas hepáticas, a la colinesterasa plasmática y a las arilesterasas (46, 47).

Ha sido bien establecido que el suero y el plasma del hombre y de animales de laboratorio contienen esterases con habilidad para hidrolizar el ácido acetilsalicílico. La actividad para hidrolizar a este fármaco ha sido comparada en varias especies de animales. En la rata, el hígado es el órgano que presenta mayor capacidad para hidrolizar al AAS (48).

Es importante mencionar que la aspirina como tal es farmacológicamente activa, sin embargo su mayor efecto lo ejerce como fármaco hidrolizado (42). Una vez que el AAS fue hidrolizado a ácido Salicílico (AS) por la acción de las esterases plasmáticas y tisulares, una parte del AS puede ser eliminado como tal por excreción renal o sufrir transformaciones posteriores en el hígado

(FIG. 8). En este órgano, el AS se biotransforma a ácido salicílico (ASU), ácido gentísico (AG) y salicil glucurónidos (SG) (46, 49, 50).

d) Excreción:

De las vías metabólicas del AAS, la conjugación con glicina es la ruta primaria de eliminación de los salicilatos. Los salicilatos se excretan principalmente por el riñón. Los estudios en el hombre indican que el salicilato se excreta por la orina como ácido salicílico libre (10%), ácido salicílico (75%), salicil glucurónidos (15%) y ácido gentísico (<1%) (42).

La eliminación del ácido salicílico en el hombre es compleja. Después de una dosis pequeña la eliminación corresponde a un proceso de primer orden, el ácido salicílico es el metabolito que se encuentra en mayor cantidad (51).

El metabolismo del AAS en animales puede ser muy diferente al del humano. Sin embargo, hay mucha analogía en los aspectos farmacocinéticos de eliminación de salicilatos en el hombre y la rata. La eliminación de salicilatos en ratas sigue una cinética de primer orden (52). También se ha reportado que a dosis a las cuales el 50% de aspirina es convertida a ácido salicílico en el hombre, en especies como la rata, el conejo y el perro, se excretan sólo pequeñas cantidades de este metabolito (53).

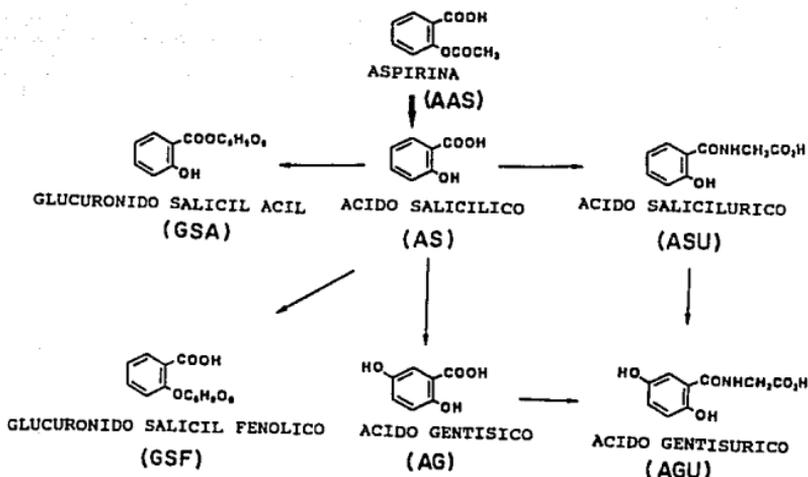


FIG. 8. Biotransformación de la aspirina. El esquema está basado en la figura de Bridges J. W. and Chasseaud L.F. Progress in drug metabolism. Vol. 5. London and Philadelphia, 1980.

En la rata los principales metabolitos del AAS son el AS, el ASU, el AG y los SG (55). Por lo tanto, el estudio del metabolismo del AAS en este animal es de gran utilidad para evaluar tal proceso en condiciones patológicas en el humano.

MECANISMO DE ACCION DE LA ASPIRINA

En cuanto al mecanismo de acción de la aspirina se han establecido los siguientes puntos:

- 1) Todos los tipos de células de los mamíferos estudiados (Con la posible excepción del eritrocito), tienen enzimas microsomales para la síntesis de prostaglandinas.
- 2) Las prostaglandinas siempre se liberan cuando las células sufren daño, y se han detectado en mayores concentraciones en los exudados inflamatorios. Todas las pruebas conocidas indican que las células no almacenan prostaglandinas, y por ello su liberación depende de la biosíntesis de novo.
- 3) Todos los fármacos tipo aspirina inhiben la biosíntesis y la liberación de las prostaglandinas en todas las células estudiadas.

Con los postulados anteriores, se ha establecido: "La aspirina actúa impidiendo la síntesis y liberación de las

prostaglandinas". Existen actualmente numerosos sistemas *in vitro* e *in vivo* (42), en los que se ha demostrado la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas por la aspirina, esto depende únicamente de que el fármaco inhiba a la enzima prostaglandina sintetasa (Ciclooxigenasa).

II. OBJETIVOS

II.1.0 Objetivos Generales.

Evaluar el daño hepático agudo inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata.

Evaluar el efecto de la obstrucción biliar (LCB) sobre el perfil metabólico de la Aspirina (Acido acetilsalicílico).

II.2.0 Objetivos Específicos.

Evaluar el daño hepático, 72 horas después de la obstrucción mecánica extrahepática, mediante marcadores específicos:

- a) Determinación de bilirrubinas y enzimas séricas.
- b) Cuantificación del contenido de glucógeno hepático.

Evaluar el efecto de la obstrucción biliar sobre el perfil metabólico de la Aspirina, utilizando la técnica de cromatografía en capa fina.

III. HIPOTESIS

1.- Si al ligar el conducto biliar común se evita la circulación biliar y las sales biliares que se acumulan son tóxicas, entonces se producirá daño al hígado y como consecuencia alteración en los marcadores de daño hepático.

2.- Si el hígado se encuentra dañado por el efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB), entonces, se espera una alteración en el perfil de los metabolitos urinarios del Acido Acetilsalicílico (AAS).

IV. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron ratas wistar macho (200-250g), con libre acceso a comida y agua.

GRUPOS EXPERIMENTALES: Se formaron 6 grupos experimentales, cada uno con siete ratas:

I.- GRUPOS DE EVALUACION DEL DAÑO HEPATICO INDUCIDO POR LA LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR COMUN (LCB).

En esta fase inicial de experimentación se efectuaron los ensayos para la evaluación de la función hepática, es decir, la cuantificación de las actividades séricas de las enzimas F.A., γ -GTP y TGP. En esta fase también se determinó el contenido de bilirrubinas séricas y glucógeno hepático.

-GRUPO CONTROL: Este grupo no recibió tratamiento quirúrgico. Se utilizó para determinar los valores basales de los marcadores de daño hepático.

-GRUPO DE OPERACION SIMULADA (O.S.): En este grupo se realizó la operación simulada, la cual consiste en la manipulación de tejidos y órganos sin ligar el conducto biliar común. Esto se hace para

determinar si el proceso quirúrgico ejerce influencia en los marcadores de daño hepático.

-GRUPO DE LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR COMUN (LCB): En este grupo se realizó la ligadura del conducto biliar común. Este grupo así como el grupo de O.S. fueron sacrificados 72 horas después del proceso quirúrgico.

II.- GRUPOS DE EVALUACION DEL PERFIL METABOLICO DE LA ASPIRINA (AAS).

Esta fase experimental comprende el análisis del perfil de los metabolitos urinarios del AAS (Orina recolectada durante 24 horas).

-GRUPO CONTROL: Se utilizó para determinar los valores basales de los metabolitos del AAS.

-GRUPO DE OPERACION SIMULADA (O.S.): La operación simulada se realizó como se describe en el apartado anterior. Esta operación determina si el proceso quirúrgico ejerce influencia en los metabolitos del AAS.

-GRUPO DE LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR COMUN (LCB): En este grupo se realizó la ligadura del conducto biliar común. Setenta y dos horas después del proceso quirúrgico, este grupo así como el grupo de O.S., fueron colocados en jaulas metabólicas para la recolección

de orina.

OBTENCION DE ORINA

Después de 72 horas de haberse practicado la LCB a los grupos de ratas para la determinación del perfil metabólico del AAS, se les administró una dosis de 20 mg/Kg de AAS por vía oral. Hecho esto, se colocaron en jaulas metabólicas y se inició la colecta de orina por un tiempo de 24 horas; una vez transcurrido este tiempo se midió el volumen de orina de cada rata. Posteriormente se inició la evaluación del perfil de los metabolitos del AAS, excretados por vía renal.

IV.1.0 Procedimiento Para La Ligadura Del Conducto Biliar Común

- Las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital Sódico a una dosis de 25.2 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal.
- Una vez anestesiadas las ratas, se procedió a rasurar el pelo de la región abdominal para facilitar el manipuleo de los tejidos.
- Posteriormente se realizó la asepsia de la región quirúrgica con torundas de gasa impregnadas con benzalconio.
- Limpiada la zona, se procedió a incidir los tejidos de la región abdominal, iniciando con la piel y continuando con el peritoneo. Esta incisión se realizó de una longitud aproximada de 2-3 cm.
- Cuando se visualizó la cavidad abdominal, se procedió a sacar cuidadosamente el hígado, puesto que el conducto biliar común se

encuentra por debajo de este.

- Localizado el conducto biliar común, se desprendió de las membranas que lo unen a la vena porta y al intestino delgado.

- Con la ayuda de las pinzas y procurando no causar ningún daño a la vena porta, se ligó el conducto biliar común en dos diferentes partes, con hilo de seda (Material no absorbible).

- Una vez ligado el conducto biliar común, el hígado se introdujo nuevamente a la cavidad abdominal y se procedió a unir los tejidos incididos por medio de suturas, las cuales se realizaron de la siguiente manera:

a) El peritoneo se unió por medio de suturas continuas por el procedimiento llamado Surgete anclado o entrelazado utilizando hilo absorbible (Catgut crómico).

b) Para unir la piel se utilizaron suturas aisladas por medio del procedimiento llamado puntos separados, para lo cual se utilizó material no absorbible como lo es el nylon monofilamento.

- Una vez unidos los tejidos incididos se realizó nuevamente la asepsia de la región quirúrgica. Posteriormente, se permitió que las ratas se recuperaran del efecto de la anestesia.

- Una vez recuperadas, se colocaron en condominios de jaulas de acero inoxidable con el fin de evitar infecciones.

- A las 72 horas fueron utilizadas para el experimento.

Cada grupo de ratas fue operado y sacrificado en conjunto.

IV.2.0 Procedimiento Para El Sacrificio De Las Ratas

Una vez transcurridas las 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común, se procedió al sacrificio de ratas, lo cual se realizó de la siguiente manera:

- Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico.
- Con la ayuda de material quirúrgico se procedió a abrir las cavidades abdominal y torácica para obtener de esta forma las muestras de sangre y de hígado, las cuales siempre fueron colocadas en hielo.

a) La muestra de sangre se obtuvo por punción cardíaca, colocando la sangre en tubos de plástico de 85 x 15 mm los cuales se colocaron en un rotor JA-21 para su posterior centrifugación (Centrifuga Beckman Modelo J2-21 o Modelo J-6M), a 4000 x g y temperatura de 4°C. De esta manera se obtuvo el suero, el cual fue separado en tubos de ensayo que se colocaron en hielo para posteriormente realizar las determinaciones bioquímicas.

b) El hígado se introdujo en solución salina fisiológica con el fin de eliminar la sangre, se colocó en un recipiente con hielo y posteriormente se pesó la cantidad necesaria para la determinación del contenido de glucógeno (0.5 g de hígado).

IV.3.0 DIAGRAMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL.

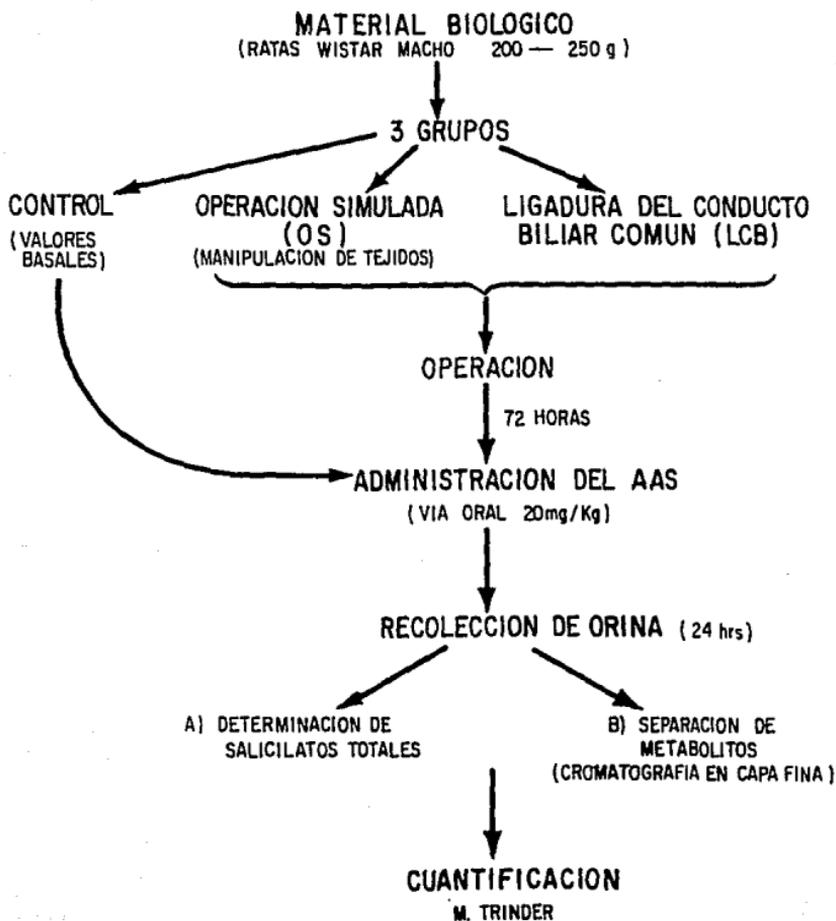
45

A) DETERMINACIONES ENZIMATICAS



B) DETERMINACION DEL PERFIL METABOLICO DEL ACIDO ACETILSALICILICO (AAS)

46



IV.4.0 Determinaciones Bioquímicas

IV.4.1 Determinación de la actividad de la FA.

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cual se lee a 410 nm, en un espectrofotómetro (56).

Se preparó una curva estándar de p-nitrofenol para determinar la actividad de la Fosfatasa Alcalina.

REACTIVOS:

- 1.- Solución estándar de p-nitrofenol de 10 μ moles/ml.
- 2.- NaOH 0.02 N.
- 3.- 0.5 ml de la solución (1) se aforan a 100 ml con NaOH 0.02 N.

CURVA ESTANDAR

TUBO	ml de sol.(2)	ml de sol.(3)	μ moles de sustrato hidrolizado
1	0.5	5.0	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.100
4	3.0	2.5	0.150
5	4.0	1.5	0.200
6	5.0	0.5	0.250

Se midió la absorbancia de los tubos a 410 nm.

La curva estándar se construyó graficando la concentración en μ moles de sustrato hidrolizado vs. absorbancia.

TECNICA PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE LA F.A.

1.- En un tubo de ensayo se agregaron los siguientes reactivos:

- 0.25 ml de buffer de glicina 0.1 M y $MgCl_2$ 1 mM, pH= 10.5
- 0.25 ml de sustrato de p-nitrofenilfosfato el cual se preparó disolviendo 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 ml de agua destilada.

2.- Esta mezcla se incubó a baño María a 37 °C por 5 min.

3.- Posteriormente se añadieron 50 μ l de suero, se agitó suavemente y se incubó a 37°C por 30 min.

4.- La reacción se detuvo adicionando 5 ml de NaOH 0.02 N.

5.- Se determinó la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro.

La lectura se interpoló en la curva estándar de p-nitrofenol. La actividad enzimática se reportó en μ moles de p-nitrofenol/litro de suero por minuto (μ moles/l.min.).

IV.4.2 Determinación de la actividad de la alanina amino transferasa sérica (Transaminasa Glutámico Pirúvica).

La actividad de la TGP se determinó por el método de Reitman-Frankel (57), en el cual se mide el complejo formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la alanina y el alfa-ceto-glutarato, complejo colorido que absorbe a 515 nm.

Método de Reitman - Frankel (57):

Reactivos:

- 1.- Buffer de fosfatos 0.1 M, pH=7.4: Se preparó mezclando 840 ml de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.
- 2.- Solución de sustrato: Se disolvieron 1.78 g de D-L-alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añadieron 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completó hasta 100 ml con la solución buffer. Se conservó a 4°C.
- 3.- Reactivo cromógeno (2,4-dinitrofenilhidrazina): Se disolvieron 200 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCL 1 N caliente y se llevó a volumen de un litro con HCL 1 N. La solución que se preparó es 1 mM.

4.- Solución estándar de piruvato ($1\mu\text{moles/ml}$): Se disolvieron 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer.

CURVA ESTANDAR

Se preparó una curva estándar de piruvato para determinar la actividad de la Transaminasa Glutámico Pirúvica, de la siguiente manera:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7
----------	---	---	---	---	---	---	---

Solución:

Sustrato (μl)	250	225	200	175	150	125	100
Solución estándar de piruvato (μl)	---	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μl)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4N (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

La curva se construyó graficando la concentración en μmoles de piruvato vs. absorbancia.

TECNICA PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE LA TGP

<u>Reactivos:</u>	Blanco	Problema
Solución sustrato D-L-alanina	250 μ l	250 μ l
Suero problema	-----	50 μ l
Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 60 min.		
Reactivo cromógeno	250 μ l	250 μ l
Incubar 5 min. a 37°C		
Suero problema	50 μ l	-----
Incubar 15 min. a 37°C.		
Agregar NaOH 0.4 N.	2.5 ml	2.5 ml

Se lee a 515 nm calibrando con un blanco de agua. Se resta la absorbancia del blanco de muestra a la respectiva absorbancia del suero problema, posteriormente, interpolando en la curva estándar de piruvato se determina la actividad de la enzima. Se reportó como μ moles de piruvato/litro de suero por minuto (μ moles/l.min.).

IV.4.3 Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP).

En este método se utilizó como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima (γ -GTP), y de un receptor del grupo γ -l-glutamil (Como es la glicil glicina), produce γ -l-glutamilglicil glicina y p-nitroanilina que puede ser cuantificada espectrofotométricamente a 410 nm (58).

CURVA ESTANDAR

Se preparó una curva estándar de p-nitroanilina de la siguiente manera:

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se aforó a 250 ml con ácido acético 1.5 M. Se preparó una serie de tubos de la siguiente manera:

TUBO	μ l de Solución p-Nitroanilina	μ l de H ₂ O
1	50	1950
2	100	1900
3	150	1850
4	250	1750
5	375	1625
6	500	1500
7	750	1250
8	1000	1000

La curva estándar se construyó graficando concentración de p-nitroanilina en μ moles de cada una de las diluciones vs. absorbancia.

TECNICA PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE LA γ -GTP.

1.- En un tubo de ensayo se agregaron los siguientes reactivos:

- 400 μ l de tris-HCL 200 mM (pH=8.2)
- 100 μ l de MgCl₂ 200mM

- 100 μ l de glicil-glicina 40 mM pH=8.2
- 200 μ l de γ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM.

- 2.- Previa incubación de 10 min. a 37°C se inició la reacción agregando 200 μ l de suero. Se agitó bien la mezcla y se introdujo en el baño María a 37°C.
- 3.- La reacción enzimática se detuvo a los 30 min. después de haberse iniciado, agregando 2 ml de ácido acético 1.5 M.
- 4.- La absorbancia de cada tubo se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro. El resultado se interpoló en la curva estándar de p-nitroanilina, y la actividad enzimática se reportó en μ moles de p-nitroanilina/litro de suero por minuto (μ mol/l.min.).

IV.4.4 Determinación de bilirrubina total, directa e indirecta.

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado un colorante azoico que en solución neutra es rojo y en solución alcalina, azul. El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona "Directamente", mientras que la bilirrubina "Indirecta" libre reacciona tan sólo en presencia de un acelerador. Para realizar estas pruebas se utilizó un "kit" comercial Merck.

BILIRRUBINA TOTAL

La bilirrubina total en suero o plasma se determina por copulación con el ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución de Fehling se forma azobilirrubina azul, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (Coloración mixta verde), de manera selectiva por fotometría a 578 nm (59).

REACTIVOS :

Acido Sulfanílico ($C_6H_7NO_2S$ 29 mmol/l en HCl 0.17 N).

Nitrito de sodio ($NaNO_2$, 29 mmol/l).

Acelerador (Cafeína 130 mmol/l, benzoato de sodio 156 mmol/l, acetato de sodio 460 mmol/l).

Solución II de Fehling (Tartrato de potasio y sodio 930 mmol/l, hidróxido de sodio 1.9 mol/l).

TECNICA:

	Problema	Blanco
Acido Sulfanílico	0.2 ml	0.2 ml
Nitrito de sodio	1 gota	-----
Acelerador	1.0 ml	1.0 ml
Suero	0.2 ml	0.2 ml

Se mezcla y se deja reposar de 10 a 60 minutos a temperatura entre 15°C y 25°C.

Solución, II de Fehling	1.0 ml	1.0 ml
-------------------------	--------	--------

Se mezcla y se mide la absorbancia de los problemas contra el blanco, a una longitud de onda de 578 nm al cabo de 5 a 30 minutos.

CALCULO:

Medición frente a un blanco:

$$\text{Concentración de bilirrubina total} = \text{Abs.} \times 180 \mu\text{mol/L.}$$

BILIRRUBINA DIRECTA

La bilirrubina directa se mide sin añadir álcali como colorante azoico rojo a 546 nm (60). La bilirrubina indirecta se obtiene de la diferencia entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa.

TECNICA:

	Problema	Blanco
Acido Sulfanílico	0.2 ml	0.2 ml
Nitrito de sodio	1 gota	-----
Solución salina fisiológica	2.0 ml	2.0 ml
Suero	0.2 ml	0.2 ml

Se mezcla inmediatamente, se deja reposar a temperatura entre 15°C y 25 °C. A los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, se miden las absorbancias de los problemas contra el blanco a 546 nm.

CALCULO:

Concentración de bilirrubina directa = Abs. x 240 μ mol/L.

IV.4.5 Determinación del contenido de glucógeno hepático.

Este procedimiento consiste en la digestión en caliente de una muestra de hígado, que es hidrolizada con KOH al 30% dando como resultado glucosa, la cual se cuantifica colorimétricamente con el reactivo de antrona (61).

TECNICA:

- 1.- Se pesan 0.5 g de muestra de hígado y se colocan en tubos de ensayo, se añaden 1.5 ml de una solución de KOH al 30% a cada uno de ellos y se hierve en baño María durante 30 minutos.
- 2.- Después de enfriar los tubos, la muestra digerida se coloca en un matraz volumétrico de 25 ml diluyéndose la muestra a ese volumen con agua tridestilada.
- 3.- Del matraz anterior se toma 1 ml de la dilución y se coloca en otro matraz volumétrico de 25 ml, posteriormente se lleva al volumen con agua tridestilada. Esto se realiza con el objeto de que la glucosa en esta dilución, se encuentre en un rango de concentración de 3 a 30 μ g/ml.
- 4.- De la última dilución se coloca 1 ml en tubos de ensayo, se prepara además un blanco que contenga 1 ml de agua y un estándar que contenga glucosa a la concentración de 20 μ g/ml.

5.- Se prepara la solución de antrona al 0.2 % en H₂SO₄ concentrado.

Los tubos de muestras problema, así como el estándar y el blanco se colocan en hielo, se les añade 2 ml de reactivo de antrona y se agitan suavemente.

6.- Los tubos se tapan con canicas y masking-tape y se colocan en un baño María durante 15 min.

7.- Se enfrían sobre hielo y se leen a 620 nm.

CALCULOS:

La concentración de glucógeno se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de glucógeno} = \frac{20\mu\text{g} \times U}{1.11 \times S}$$

en donde:

U = Es la absorbancia de la muestra problema.

S = Es la absorbancia del estándar de glucosa.

1.11 = Es un factor de conversión determinado por Morris (62), para convertir la glucosa a glucógeno.

Los resultados se expresaron en gramos de glucógeno/100 g de hígado.

IV.5.0 Metabolismo De La Aspirina (Acido AcetilSalicílico).

CURVA ESTANDAR

Para conocer el perfil metabólico de la aspirina (AAS) se realizó una curva estándar de Acido Salicílico de la siguiente manera:

Reactivos:

1.- Solución estándar de Acido Salicílico [1 mg/ml]

2.- Reactivo de Trinder (63):

4g de Nitrato Férrico. $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$.

4g de Cloruro Mercuríco. $HgCl_2$.

12 ml de HCL 1N.

Aforar a 100 ml con agua tridestilada.

3.- Se preparó una serie de tubos de la siguiente manera:

TUBO	SOLUCION ESTANDAR (ml)	AGUA (ml)
Blanco	----	1.0
1	0.1	0.9
2	0.2	0.8
3	0.3	0.7
4	0.4	0.6
5	0.5	0.5

- Se ajustó cada tubo a pH = 7 con HCL 1 N y/o NH₄OH 1 N.
- Se adicionó a cada tubo 5 ml de reactivo de Trinder.
- Se ajustó el volumen a 7.5 ml con agua tridestilada.
- Se centrifugó 5 min. a 3000 rpm.
- Se midió la absorbancia de cada uno de los tubos a 540 nm en el espectrofotómetro. La curva estándar se construyó graficando la concentración de Acido Salicílico vs absorbancia.

IV.5.1 Cuantificación del porcentaje de recuperación del AAS en orina de ratas a las 24 horas.

La cuantificación del total del AAS eliminado en orina a las 24 horas se determinó según la técnica de Trinder (63). Según este método se hidrolizan las muestras con NH₄OH 1N a ebullición, por 30 min. Con este proceso de hidrólisis se obtiene la conversión de todos los metabolitos a ácido salicílico (con excepción del ácido gentísico, AG), el cual es capaz de reaccionar con nitrato férrico y formar un complejo de color púrpura, que puede ser leído a 540 nm. El color de la reacción es sensible al pH.

TECNICA:

- 1.- Se colocaron en un tubo de ensayo 0.5 ml de orina, 0.5 ml de agua tridestilada y 0.5 ml de NH₄OH 1 N.
- 2.- Se taparon los tubos con canicas y Masking-Tape y se colocaron en baño María durante 30 min., para que se efectuara la hidrólisis.

- 3.- Se enfriaron a temperatura ambiente.
- 4.- Se ajustó cada tubo a pH=7 con HCL 1 N o NH₄OH 1 N.
- 5.- Se adicionó 5 ml de reactivo de Trinder.
- 6.- Se ajustó cada uno de los tubos a un volumen de 7.5 ml con agua tridestilada.
- 7.- Se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm.
- 8.- Se midió la absorbancia a 540 nm.

Las reacciones de color obtenidas en estas condiciones fueron leídas en un espectrofotómetro e interpoladas en la curva estándar de ácido salicílico.

IV.5.2 Evaluación del perfil metabólico del AAS en orina.

Este ensayo se realizó separando los metabolitos del Acido Acetilsalicílico (AAS), que son el ácido salicílico (AS), el ácido genticónico (AG), y el ácido salicilúrico (ASU), por cromatografía en capa fina.

Preparación De Las Placas Para Cromatografía En Capa Fina.

- Se pesaron 30 g de sílica gel HF-254 y se adicionaron 60 ml de agua tridestilada. Se agitó hasta obtener una mezcla homogénea.
- La suspensión anterior se colocó sobre placas de vidrio de 20 cm. x 20 cm. con el aparato formador de placas. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente 24 horas antes de usarse. La capa que se utilizó es del tipo capa compacta (64).

Cromatografía En Capa Fina.

Para separar los metabolitos urinarios del AAS se utilizó el siguiente sistema de solventes:

Benceno:Eter etílico:Acido acético glacial:Metanol (72:36:4.8:1.2)

La cámara se dejó saturar durante 2 horas.

Todos los solventes utilizados fueron de grado reactivo analítico.

Cromatografía Del AAS.

Se aplicaron sobre las placas previamente activadas (Se colocaron a temperatura de 90-100 °C durante 5 minutos con el fin de eliminar la humedad existente), 200 µl de orina. Una vez secas las manchas, las placas se activaron nuevamente, se dejaron enfriar y se introdujeron en las cámaras saturadas (con el sistema de solventes anteriormente descrito).

Identificación De Los Metabolitos Del AAS

Para la identificación de los metabolitos del AAS se utilizaron estándares de ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, ácido genticónico y ácido salicílico, los cuales se desarrollaron en paralelo a las muestras.

Determinación Cuantitativa De Los Diferentes Metabolitos Separados

Una vez separados los metabolitos por cromatografía en capa fina e identificados con los estándares, las manchas se rasparon y se extrajeron en forma individual con agua y posteriormente se realizó la hidrólisis siguiendo el método de Trinder descrito anteriormente (63).

IV.6.0 Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo de ratas fueron promediados, obteniéndose la media o promedio aritmético y el error estándar de la media (ESM). Las diferencias entre el grupo control y el tratado con LCB se compararon estadísticamente utilizando la prueba de "t" de Student (65). Se consideró significativa la diferencia cuando $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio, representan los promedios de ensayos por duplicado, de muestras obtenidas de al menos seis ratas por grupo experimental.

V.1.0 Evaluación Del Daño Hepático Inducido Por La Ligadura Del Conducto Biliar Común.

Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB) sobre los marcadores enzimáticos de daño hepático, en suero.

Al evaluar los marcadores enzimáticos séricos de daño hepático, 72 horas después de la obstrucción biliar, la actividad de las enzimas fosfatasa alcalina, gamma glutamil transpeptidasa y transaminasa glutámico pirúvica, se encontró elevada en los grupos de LCB con respecto a los grupos control (Figs. 9, 10 y 11, respectivamente).

Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB) sobre el nivel de bilirrubinas en suero.

Después de la ligadura del conducto biliar común en la rata (Evaluada a las 72 horas), se encontró un incremento en el nivel de bilirrubina total (FIG. 12), bilirrubina directa (FIG. 13) y bilirrubina indirecta (FIG. 14). Dicho incremento fue significativo con respecto a los grupos control.

FOSFATASA ALCALINA

64

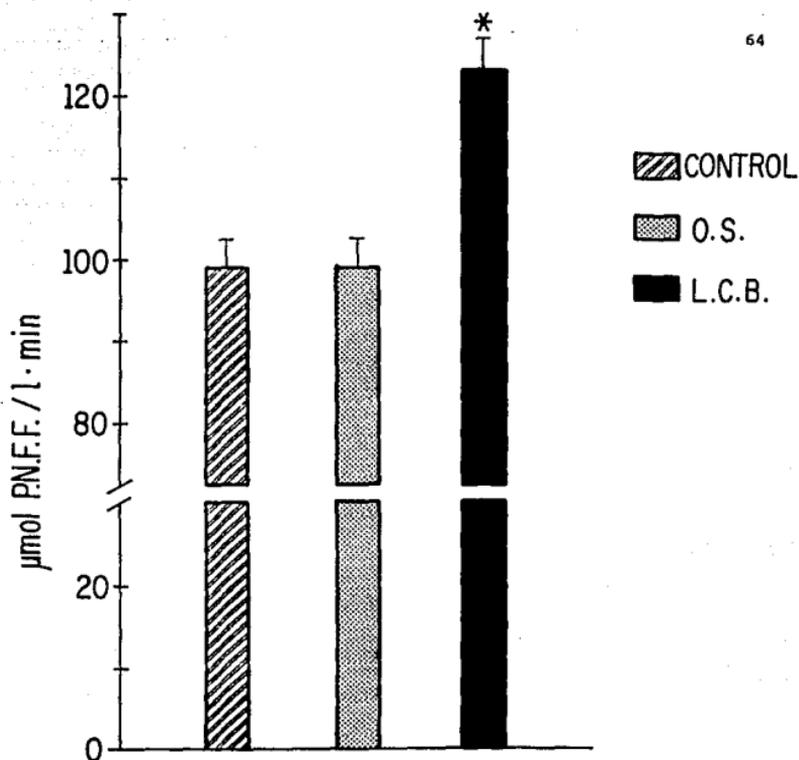


FIG. 9. Actividad de la fosfatasa alcalina sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA SERICA (γ -GTP)

65

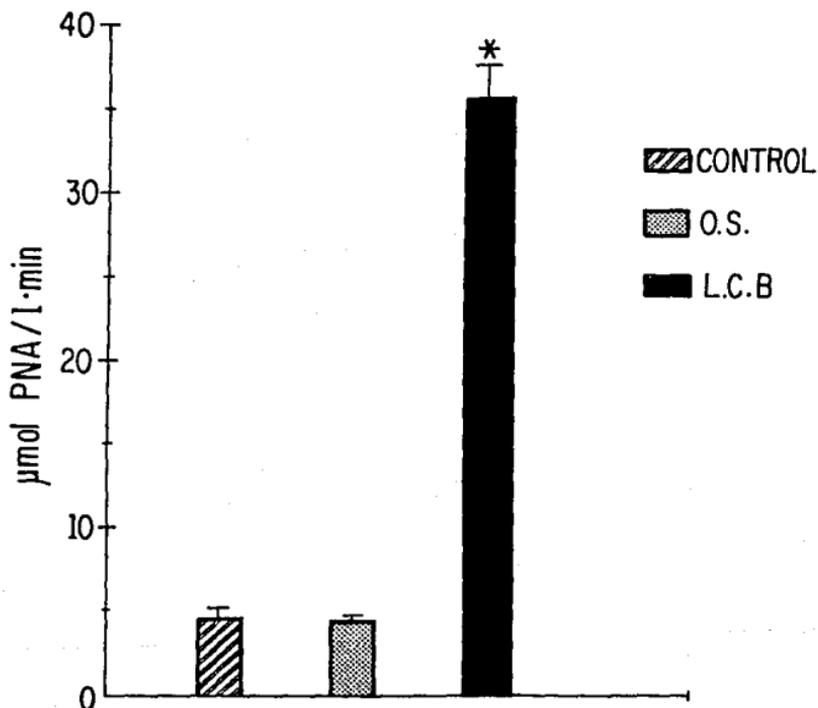


FIG. 10. Actividad de la gamma glutamil transpeptidasa sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM. * Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA SERICA

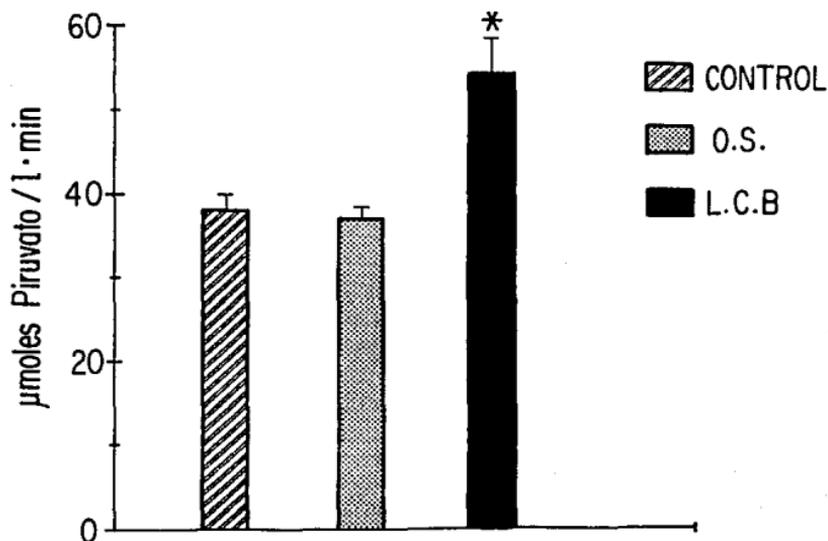


FIG. 11. Actividad de la transaminasa glutámico pirúvica sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM. * Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

BILIRRUBINA TOTAL

67

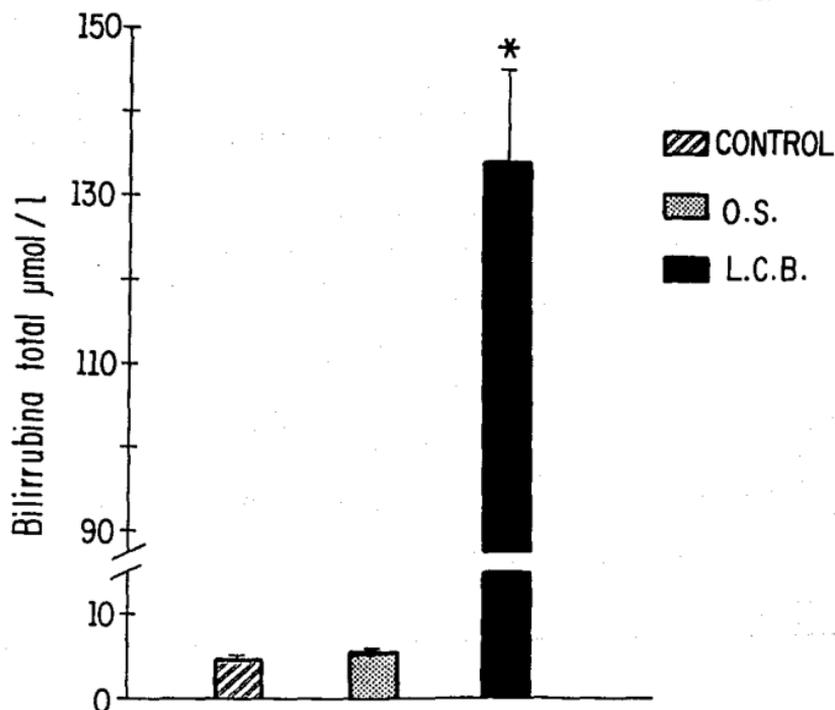


FIG. 12. Nivel de bilirrubina total sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

BILIRRUBINA DIRECTA

68

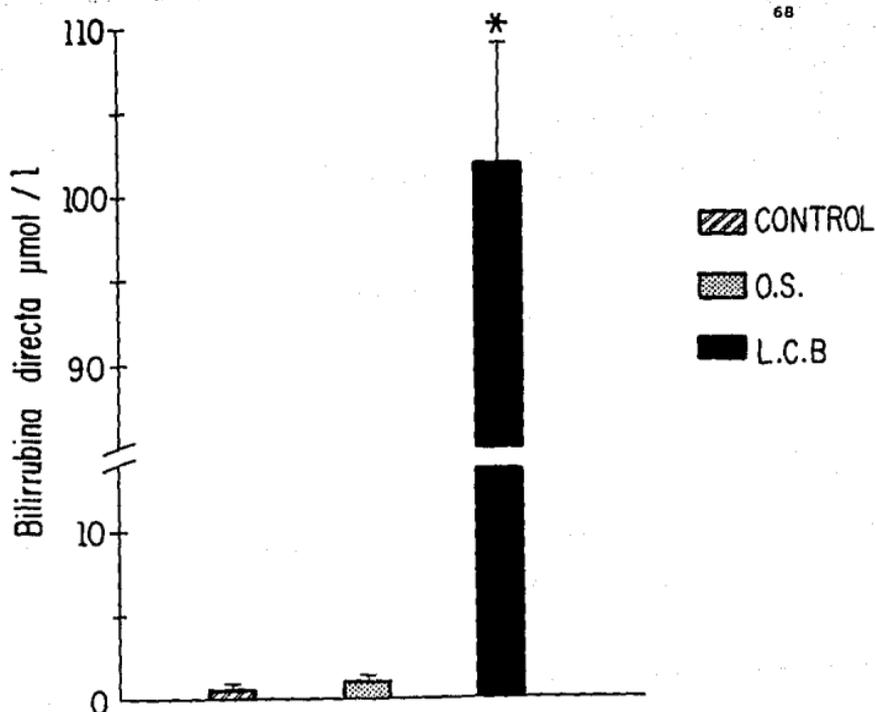


FIG. 13. Nivel de bilirrubina directa sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

BILIRRUBINA INDIRECTA

69

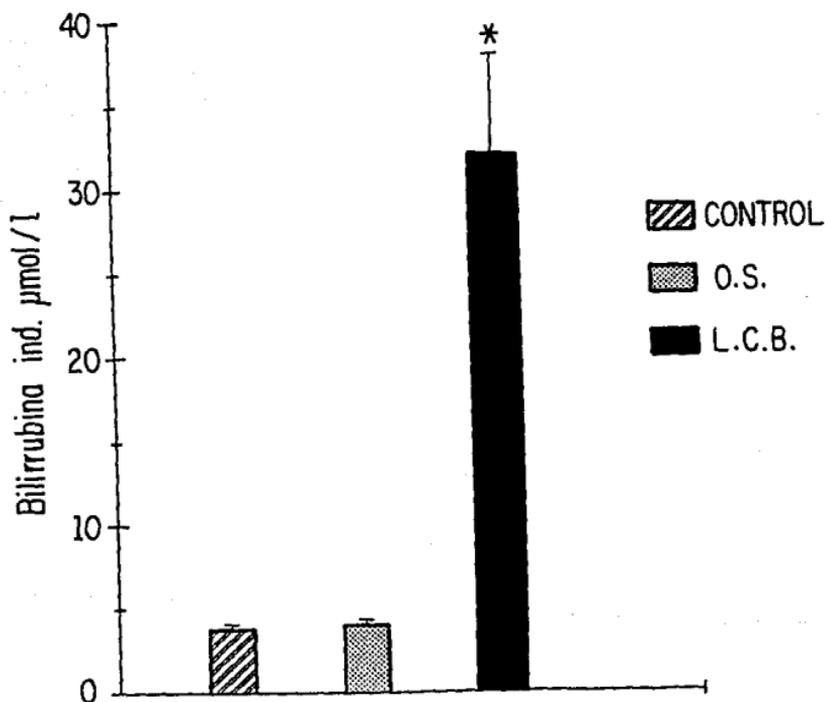


FIG. 14. Nivel de bilirrubina indirecta sérica 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en la rata. Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB) sobre el glucógeno hepático.

El glucógeno se presenta almacenado como sustancia de reserva energética en el hígado. En el grupo de LCB el nivel de glucógeno se encontró disminuído significativamente con respecto al grupo control (FIG. 15).

V.2.0 Determinación Del Perfil Metabólico De La Aspirina En Ratas Ligadas Del Conducto Biliar Común.

Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB) sobre el porcentaje de recuperación del AAS en orina de ratas a las 24 horas.

La FIG. 16 muestra el porcentaje del ácido acetilsalicílico (AAS) eliminado por vía renal 24 horas después de la administración de una dosis oral única de 20 mg/kg de AAS. Estos valores describen el porcentaje de la dosis del AAS, eliminado en la orina como tal o en forma de sus metabolitos.

En esta figura se observa que la dosis administrada de AAS es recuperada en un 84-90%.

GLUCOGENO HEPATICO

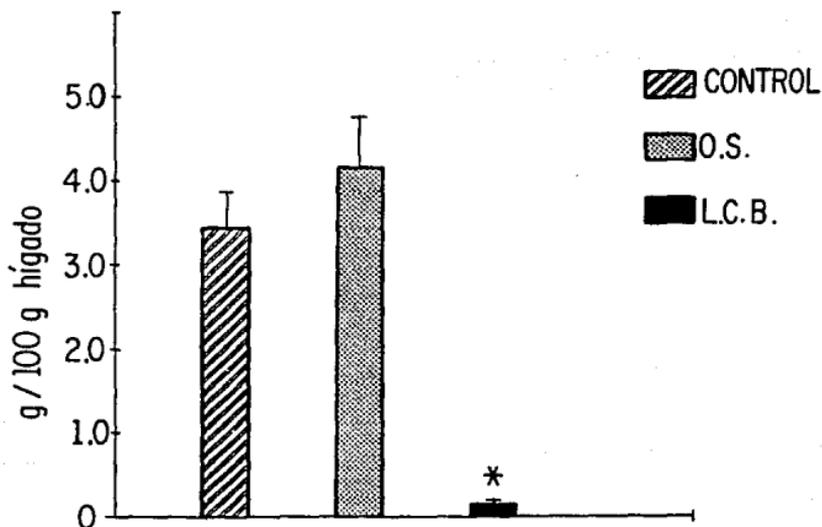


FIG. 15. Contenido de glucógeno en hígado de ratas 72 horas después de la ligadura del conducto biliar común (LCB). Cada barra representa la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

PORCENTAJE DE RECUPERACION DE AAS

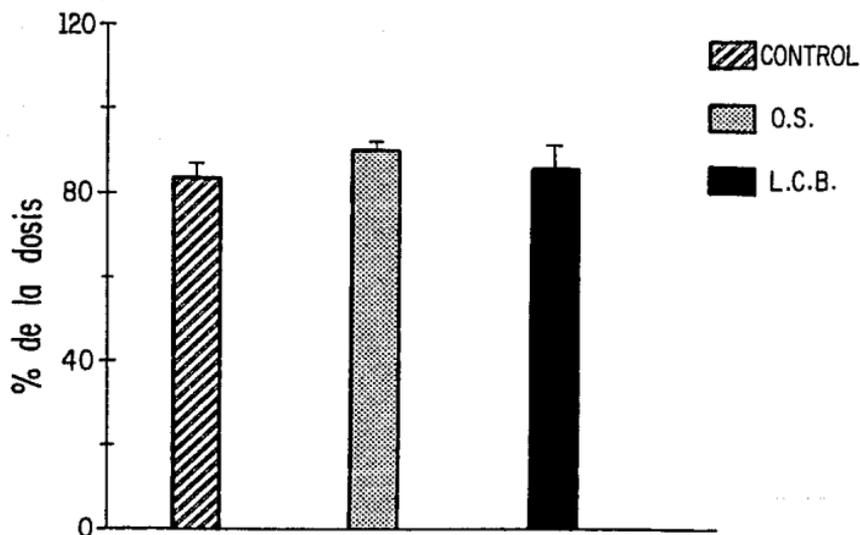


FIG. 16 Porcentaje de recuperación del AAS en orina de rata 24 horas después de la administración de 20 mg/kg de aspirina. Las barras representan la media de por lo menos 6 datos \pm ESM. No hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$).

Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCB) en rata sobre el perfil metabólico del AAS.

En la FIG. 17 se muestran los porcentajes de los metabolitos del AAS excretados en la orina. Las ratas con LCB muestran una reducción del porcentaje de AAS urinario excretado, compensado por un incremento en el porcentaje eliminado de ácido salicílico y ácido gentísico. No se observaron cambios en la excreción de ácido salicilúrico.

Es importante señalar que en los resultados presentados en este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y operación falsa (O.S.), en ninguno de los parámetros medidos.

PERFIL METABOLICO DEL AAS

74

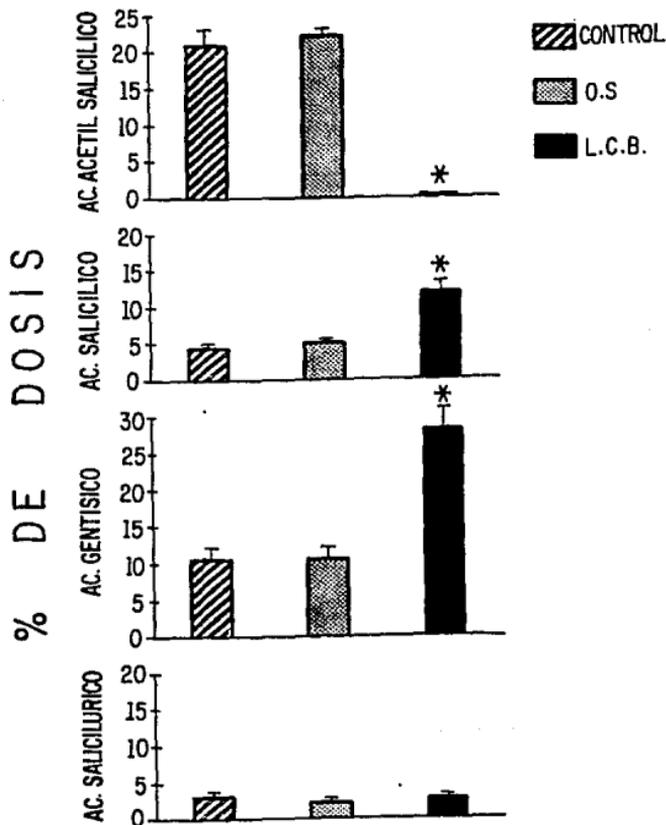


FIG. 17 Metabolitos del ácido acetilsalicílico (AAS) en orina de rata, 24 horas después de una dosis oral única de 20 mg/kg de AAS. Los resultados se expresan como el porcentaje de la dosis administrada. Las barras representan la media de por lo menos 6 ratas \pm ESM.

* Indica que es significativamente diferente comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

VI. D I S C U S I O N

Cualquiera que sea la causa que provoca el síndrome de colestasis, sea una obstrucción de las vías biliares o una lesión celular infecciosa o tóxica, siempre se producen alteraciones bioquímicas uniformes (5).

La colestasis puede ser inducida por agentes químicos tales como Clorpromazina y Tauritocolato (66), sin embargo el modelo de colestasis inducido por la ligadura del conducto biliar común en la rata es un modelo simple y apropiado para estudiar las alteraciones bioquímicas que ocurren durante este tipo de daño (5).

Las importantes funciones metabólicas, sintéticas, secretoras y excretoras del hígado y la abundante maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo estas funciones conducen a un gran número de parámetros bioquímicos que pueden estar alterados en los estados patológicos. Por otro lado, la gran reserva hepática permite que ocurra una pérdida importante de tejido hepático sin que se detecten cambios en las pruebas rutinarias de función hepática que se utilizan actualmente en la clínica. La determinación cualitativa y cuantitativa de las enfermedades hepáticas está directamente relacionada a un aumento en la cantidad de parámetros bioquímicos, hematológicos y urinarios disponibles. El patrón de una batería de resultados anormales puede indicar la severidad de una lesión hepática, sin embargo, difícilmente es

posible hacer un diagnóstico específico sin la ayuda de una biopsia. Es por esta razón que la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico hepático es cada vez más importante, dentro de estas técnicas las alteraciones en el metabolismo o en el efecto terapéutico de fármacos pueden ser usados para evidenciar una disfunción hepática (67).

VI.1.0 Actividad De Las Enzimas Séricas En Daño Hepático.

El incremento en la actividad sérica de las enzimas del hígado es un signo común de las enfermedades hepáticas ya sea debido a un aumento en su liberación o a un aumento en su síntesis o bien a ambos factores (5, 27, 33).

El incremento en la liberación de las enzimas.

Las causas de liberación de las enzimas son el incremento en la permeabilidad de la membrana y la necrosis celular. En general, toda lesión celular lleva a un deterioro de las membranas plasmáticas y aumento de su permeabilidad, esto se hace manifiesto en el suero, con el aumento de las enzimas hepáticas (5). El incremento de la actividad de las enzimas séricas es proporcional al número de hepatocitos dañados. Tres factores afectan la liberación de las enzimas hacia el suero: Primero, la localización intracelular de las enzimas determina la facilidad de liberación. Por ejemplo las enzimas del citoplasma son liberadas mucho más

rápido que las enzimas localizadas en las mitocondrias. El segundo factor que afecta la liberación de las enzimas es el tamaño molecular de estas. Aquellas con bajo peso molecular usualmente se liberan más rápido debido a que fácilmente atraviesan los poros de la membrana plasmática. Finalmente, el tercer factor que afecta la liberación de las enzimas es el gradiente de concentración de la membrana del hepatocito (27).

La duración del incremento en la actividad de las enzimas séricas no depende únicamente de la liberación por parte de los hepatocitos, sino también de la inactivación de las mismas. La inactivación en el plasma de las enzimas incluye desnaturalización estereoquímica y subsecuentemente la pérdida de la actividad catalítica. La vida media en plasma de la mayoría de las enzimas es de 2-4 días (27).

El incremento en la síntesis de las enzimas.

En presencia de daño hepático (Colestasis extrahepática), existen algunas enzimas en el hepatocito que aumentan en la circulación; esto se debe a un aumento en su síntesis. Dentro de estas enzimas se encuentran la Fosfatasa alcalina y la γ -Glutamyl Transpeptidasa. Estas dos enzimas se encuentran embebidas en la membrana plasmática del hepatocito (27, 68). El mecanismo por el cual su síntesis se ve aumentada no es bien conocido, sin embargo se sabe que los ácidos biliares son responsables de la estimulación

de su síntesis (27). La liberación de estas enzimas aumenta por la acción detergente de las sales biliares sobre la membrana del canalículo biliar (69).

Fosfatasa alcalina:

La fosfatasa alcalina es una glicoproteína y un marcador enzimático de la membrana plasmática del hígado que desfosforila selectivamente proteínas fosforiladas a residuos de tirosina (68, 70). La FA sérica en ratas normales tiene un origen diferente de la que se encuentra en suero humano normal. En la rata, la enzima presente en suero se origina principalmente en el intestino, mientras que la del suero humano se origina principalmente en el hígado (69). Kaplan and Righetti (71), empleando electroforesis con gel de poliacrilamida han demostrado que en ratas con LCB la FA elevada en suero se origina en el hígado y no proviene de otros tejidos. Esto nos indica que la medición de FA es una prueba específica que nos permite evaluar el daño hepático de tipo obstructivo (14, 72 - 76). Se ha demostrado que esta enzima además de elevarse en colestasis por daño obstructivo, también se incrementa en ratas con hepatectomía parcial o en animales no operados, por infusión endovenosa de glicina, heparina, fosforilcolina, fosfatidilcolina, o una solución conteniendo 3,3,5 triyodotironina, aminoácidos, glucagón y heparina (solución TAGH), cortisol y glucocorticoides (27). Sin embargo estos mecanismos de inducción no han sido claramente establecidos (68, 70). En el

trabajo realizado por Kaplan y Righetti (71), se consideran dos teorías por las cuales se eleva la FA en suero:

- a) El aumento es debido a la regurgitación de la bilis (que contiene fosfatasa alcalina), normalmente excretada hacia el intestino.
- b) El incremento de esta enzima depende del aumento en la síntesis de novo de la misma en el hígado.

Estudios posteriores (69, 77) han demostrado que la FA que se encuentra en la región canalicular es responsable del aumento en la circulación, ya que es solubilizada por la acción detergente de los ácidos biliares, y por lo tanto la bilis que contiene una concentración elevada de la fosfatasa alcalina entra a la sangre sinusoidal como consecuencia de la obstrucción del flujo biliar al duodeno, de esta manera la FA de la bilis se suma a la fosfatasa alcalina ya existente en suero. Kaplan y Righetti (71) concluyen que la regurgitación influye en la elevación de la concentración de FA en suero, aunque esta influencia no es la única responsable, debido a que las determinaciones de esta enzima en la bilis después de la obstrucción biliar demuestran que su contenido es bajo y sugieren que el aumento en suero es debido en su mayor parte a la síntesis de novo de una isoenzima en el hígado con las mismas propiedades de la fosfatasa alcalina. Esto lo comprobaron administrando un inhibidor de la síntesis de proteínas, la "Cicloheximida", que inhibe la incorporación de leucina en las proteínas. La cicloheximida inhibe el incremento de la FA sérica

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

en un 80% (14, 66, 76). Nuestros resultados muestran un aumento de aproximadamente 24 % en la actividad sérica de esta enzima.

γ -glutamil transpeptidasa

La γ -GTP es una enzima de membrana que está distribuida principalmente en el hígado a nivel del tracto biliar en donde su actividad es del 80 al 90 %, aunque también se encuentra en varios órganos del cuerpo como páncreas y cerebro. Los valores elevados de esta enzima son asociados a daño hepático por colestasis (17, 67).

Las enzimas originadas en los hepatocitos y en las células epiteliales biliares incrementan su concentración en suero como resultado de una colestasis intrahepática o extrahepática. A este tipo de enzimas pertenece la γ -GTP y la FA. El mecanismo por el cual su producción es inducida, durante colestasis, no se conoce con certeza. Se propone la teoría que los ácidos biliares son los responsables de estimular la síntesis de la enzima, contribuyendo en menor proporción a este incremento la acción detergente de las sales biliares sobre la membrana canalicular en la cual se encuentran estas enzimas (78, 79).

Estudios previos (80), han demostrado que la actividad de la γ -GTP en hígado y suero de rata se incrementa por exposición aguda con numerosos xenobióticos, tales como DDT o toxafeno.

En el presente trabajo encontramos un aumento en la actividad sérica de esta enzima lo cual concuerda con trabajos reportados anteriormente (79). El incremento en la actividad de la γ -GTP en suero es un marcador muy sensible de daño hepático (79 - 81).

Transaminasa glutámico pirúvica

La alanino aminotransferasa es una proteína que se localiza en el citoplasma de los hepatocitos. Debido a esto, la actividad de esta enzima se considera como un indicador sensible y específico de necrosis hepatocelular, ya que sólo en estas condiciones esta enzima es liberada por los hepatocitos a la circulación; por lo que permite determinar daño en el parénquima. Valores elevados de esta enzima en suero son observados en colestasis extrahepática, e indican perturbación en la permeabilidad celular (17, 76, 78). La TGP se encuentra en varios órganos, sin embargo su mayor actividad ocurre en el hígado (78).

Los corticosteroides y los anticonvulsivos pueden inducir la producción hepática de la TGP debido a que causan cambios en la liberación de esta enzima (78).

Puede considerarse una enfermedad hepática cuando dos o tres enzimas del hígado cambian patológicamente en forma leve, o cuando el cambio aislado de una persiste (5).

VI.2.0 Bilirrubinas En Suero

Aproximadamente el 85% de la bilirrubina se origina de la destrucción de los eritrocitos viejos por el sistema retículo endotelial. La hemoglobina es metabolizada dando como resultado el grupo Hemo y Globina. Después, el grupo Hemo es transformado a biliverdina y hierro; la biliverdina subsiguientemente es reducida a bilirrubina y de este modo sale a la circulación unida a la albumina. A este tipo de bilirrubina se le denomina bilirrubina libre, no conjugada o indirecta. Esta bilirrubina llega al hepatocito en donde por medio de una serie de reacciones es conjugada dando como resultado la bilirrubina directa o conjugada que es eliminada en la bilis, de ahí pasa al intestino en donde es transformada a urobilinógeno por acción de las bacterias intestinales, el urobilinógeno da la coloración a las heces (78).

La obstrucción extrahepática completa se asocia con gran dilatación de los canalículos biliares y vías biliares intrahepáticas (hidrohepatosis), las vías biliares contienen cilindros o tapones de bilis. El aumento de la presión biliar dificulta la secreción de bilirrubina conjugada en la bilis, ella se acumula dentro de las células hepáticas y en grados variables en las células de Kupffer. Penetra en los espacios sinusoidales y luego en la corriente sanguínea, directamente o por vía linfática. El estancamiento de la bilis en las células hepáticas dificulta la concentración y conjugación de bilirrubina no conjugada, la cual,

a su vez, aumenta también en la sangre. Además, la bilirrubina conjugada puede fluir en sentido retrógrado a través de los conductillos y vías biliares, a la linfa y sangre a causa del aumento de presión en el sistema biliar. El aumento en el nivel de bilirrubina total se refleja en una intensa ictericia de color verdoso por la biliverdina. Al no alcanzar los pigmentos biliares el intestino, no se forma urobilinógeno, y las heces son acólicas o de color claro. No se observa urobilinógeno en la orina (5, 9).

Tradicionalmente las bilirrubinas han sido utilizadas como marcadores de daño hepático. En el hombre un incremento en las bilirrubinas plasmáticas manifiestan daño (82). El incremento de bilirrubina conjugada es un indicador sensible de daño hepático, en particular de colestasis intra o extrahepática (17, 27, 78). La hiperbilirrubinemia puede ser debida a un incremento en la bilirrubina conjugada o no conjugada provocada por un daño hemolítico como causa de disfunción hepática (78).

Los factores que afectan el proceso de regurgitación de la bilis están bajo especulación. Durante la colestasis extrahepática, se considera que los constituyentes de la bilis regurgitan en la circulación linfática provocando daño (73). En nuestro experimento la colestasis extrahepática fue producida por LCB en ratas. La regurgitación de los componentes de la bilis fue confirmada por un incremento en el contenido de bilirrubinas en suero. Estos resultados concuerdan con los reportados (73).

VI.3.0 Glucógeno.

El glucógeno hepático es la forma principal de almacenamiento de los carbohidratos (83). En el hígado de los mamíferos, el glucógeno está presente en forma de rosetas con diámetro aproximadamente de $0.1 \mu\text{m}$ (84).

En nuestro trabajo, en el grupo con ligadura del conducto biliar común observamos una disminución en el contenido de glucógeno hepático. Esto concuerda con lo reportado (9), ya que se ha visto que en enfermedades hepáticas graves de cualquier tipo, el contenido de glucógeno se reduce notablemente. El contenido de este en las células hepáticas es un índice de su estado funcional (9). El metabolismo energético es anormal en animales de experimentación con daño hepático; la disminución en el contenido de glucógeno hepático y la disminución de la gluconeogénesis también se han observado en ratas con cirrosis biliar secundaria. El mecanismo que conduce a estos cambios metabólicos es desconocido. La disminución del contenido de glucógeno durante el daño hepático podría ser debido a un incremento en los niveles de hormonas glucogenolíticas como el glucagón (85).

Se sabe que en situaciones de stress la secreción de catecolaminas, incluyendo a la adrenalina, estimula la glucogenólisis (95). En nuestro trabajo la disminución del glucógeno que se observa en el grupo con LCB no se debe al stress

al cual se sometieron las ratas durante la operación, ya que el grupo de Operación simulada fue tratado en las mismas condiciones y este no presentó ningún decremento en el contenido del glucógeno.

Se ha observado que en otros modelos de daño hepático que alteran la membrana plasmática (como el modelo de daño hepático inducido con CCl_4), la disminución del glucógeno hepático puede deberse a un aumento anormal en la actividad de la enzima adenilato ciclasa, la cual es otra enzima de la membrana plasmática del hepatocito, importante para el correcto funcionamiento del hígado. Esta enzima cataliza la reacción que da lugar al AMPc, el cual regula varias funciones celulares. Los niveles elevados de AMPc promueven, entre otras cosas, la glucogenólisis, por lo tanto el contenido de glucógeno hepático disminuye (86).

VI.4.0 Metabolismo De La Aspirina.

Escogimos evaluar el metabolismo de la Aspirina por ser esta un antiinflamatorio comúnmente usado, incluso en los pacientes con enfermedades hepáticas; por su amplio margen de seguridad y por que su metabolismo ocurre principalmente en el hígado (47).

El metabolismo hepático de fármacos está influenciado por numerosos factores tales como la actividad de las enzimas responsables del metabolismo, la disponibilidad de sustratos, así

como de la masa funcional del parénquima. Las enfermedades hepáticas pueden afectar uno o más de estos factores (45, 87).

La Aspirina se metaboliza principalmente en el retículo endoplásmico de las células hepáticas. En la rata los principales metabolitos formados en el hígado son: ácido salicílico, ácido genticónico, ácido salicilúrico y glucuronidos salicilacético y salicilfenólico (88-90). En el metabolismo hepático de la aspirina están involucrados numerosos sistemas enzimáticos: La hidrólisis del ácido acetilsalicílico a salicílico se realiza mediante la acción de esterasas séricas y tisulares, la conjugación con el ácido glucurónico requiere de una enzima no relacionada con las oxidasas de función mixta (OFM), en cambio, la oxidación a ácido genticónico es una reacción típica de las OFM relacionadas con el Cit. P₄₅₀ y la formación del ácido salicilúrico es una conjugación no microsomal (48, 87).

Metabólicamente, la hidrólisis del Acido acetilsalicílico (AAS) a ácido salicílico (AS) es cuantitativa (43, 91, 92). En la rata la hidrólisis es mucho más rápida que en el humano (92). Eyring y Ford (48) en un estudio realizado con nueve especies de animales, incluyendo la rata y el hombre, encontraron que la mayor actividad de hidrólisis de la Aspirina ocurre en el hígado; excepto en el cobayo. Por otra parte ha sido reportado (47) que la administración de Fenobarbital o Fenilbutazona en la rata, disminuye la capacidad del hepatocito para hidrolizar la Aspirina.

La conjugación con glicina es la ruta primaria de eliminación del ácido salicílico en el hombre. En la rata, así como en el hombre a dosis de 300 mg o menores la eliminación corresponde a un proceso de primer orden, el ASU es el metabolito que se encuentra en mayor concentración. Con un incremento de la dosis, la eliminación de salicilatos ya no corresponde a un proceso de primer orden y la proporción de ASU disminuye rápidamente en orina; esto puede ser como resultado de la saturación progresiva de la enzima involucrada en la síntesis de este metabolito, de esta manera, la formación de ASU puede ser limitada por la cantidad de enzima presente o disponible en el sitio metabólico, bajo estas condiciones la excreción de este metabolito sigue un proceso de orden cero aparente (43, 52, 89, 93, 94). Similarmente la formación de glucurónido fenólico también es saturable con altos niveles de salicilato (44, 51).

En la rata, la aspirina también puede ser secretada en la bilis. La excreción biliar de aspirina en el hombre no es bien conocida, sin embargo en aspectos farmacocinéticos el hombre y la rata son muy similares (43).

Los salicilatos son absorbidos rápidamente a nivel de estómago e intestino, se distribuyen por todo el cuerpo; el 80% aproximadamente de una dosis de Aspirina es eliminada en orina. La excreción es moderadamente rápida y se incrementa cuando el pH urinario se eleva (91). La orina contiene aspirina sin cambio,

ácido salicílico, ácido gentísico y conjugados de ácido salicílico con glicina y ácido glucurónico (44, 95).

Se ha sugerido que el sistema de biotransformación (sistema captador de fármacos), del retículo endoplásmico liso del hígado es el primer sitio afectado en la colestasis (99, 100). En nuestro estudio encontramos un aumento en la eliminación urinaria del ácido salicílico y ácido gentísico. Nuestros resultados concuerdan con estudios previamente reportados (87, 96), en donde se ha observado que en ratas cirróticas con CCL, la eliminación de ácido gentísico y ácido salicílico se incrementan, asimismo, aumenta la actividad de la ASA-esterasa en hígado y en suero. Por lo que el aumento en la excreción del ácido salicílico en la orina de ratas con LCB podría explicarse por el incremento en la actividad de la ASA-esterasa en suero e hígado; la actividad sérica de esta enzima ha sido usada como marcador de función hepática (92).

Hutterer y Ahmad (99, 100) encontraron que la colestasis inducida por la ligadura del conducto biliar común afecta los microsomas hepáticos e inhibe la función microsomal, esto es debido en parte a la inhibición competitiva por los ácidos biliares y a la disminución en la síntesis del Citocromo P-450 hepático; asimismo disminuye la actividad de la desmetilasa de la aminopirina, de la hidroxilasa de la anilina y del NADPH-citocromo c reductasa (101, 102). Esto indica que en la colestasis, el contenido de ácido gentísico debería disminuir, sin embargo, en

nuestro trabajo experimental la concentración de este metabolito se incrementó; lo cual puede deberse a que el tiempo de ligadura del conducto biliar común al que se sometieron los animales en este estudio no fue suficiente para que la vía oxidativa se dañara. Por otra parte, el aumento en el contenido de ácido genticónico podría deberse además a un aumento en el ácido salicílico excretado ya que hay mayor cantidad de este ácido disponible para ser oxidado.

La disminución en el contenido de Citocromo P-450 no ha sido explicada (99, 100). Sin embargo estos hechos han sido también reportados (103) en ratas con daño hepático agudo inducido con CCL₄ y acetaminofén.

Es ampliamente conocido que el hígado es el órgano más importante para llevar a cabo el metabolismo de fármacos (103, 104), de tal manera que en las enfermedades hepáticas, la capacidad del órgano para metabolizar xenobióticos puede servir como indicador cuantitativo del daño, si se establecen patrones de alteraciones en el metabolismo de alguna sustancia en diferentes estadios del daño hepático. En este trabajo, encontramos alteraciones en el metabolismo de la aspirina, sin embargo es necesario realizar más estudios en otros modelos experimentales de daño hepático para evaluar si el metabolismo de algún fármaco puede servir para valorar el daño en etapas tempranas y establecer los parámetros de referencia para poder cuantificarlo.

Se han desarrollado muchas pruebas para la evaluación de los

desórdenes hepáticos y muchas más se encuentran bajo estudio. Lo importante es encontrar una prueba o un grupo de pruebas que permitan diagnósticos específicos no invasivos.

El estudio del metabolismo como marcador de daño hepático tiene a priori dos ventajas sobre los métodos tradicionales: 1) No es un procedimiento invasivo y 2) Está basado en una de las funciones más importantes del hígado, el metabolismo.

Los métodos de diagnóstico clásicos de las hepatopatías, como las enzimas séricas (TGP, FA, γ -GTP), la cuantificación de bilirrubinas, glucógeno, colesterol, etc., se pueden encontrar dentro de los valores normales, a pesar de que el hígado se encuentre muy dañado (105). Además, en las etapas tempranas de la enfermedad (cuando el tratamiento tiene más posibilidad de éxito), en algunos casos, estos marcadores no se elevan por encima de los valores normales (105); el resultado final es que un gran número de pacientes con enfermedades hepáticas pasan inadvertidos. Sin embargo es probable que los estudios del metabolismo hepático indiquen con mayor certeza el estado funcional del hígado y así, en un futuro, pueda disminuir el número de este tipo de pacientes.

El incremento en el contenido de enzimas séricas (fosfatasa alcalina, γ -glutamil transpeptidasa y transaminasa glutámico pirúvica) y bilirrubinas séricas, así como el decremento en el contenido de glucógeno hepático, son pruebas que han sido

consideradas como respuestas comunes de daño hepático (97, 98). El modelo experimental de LCB en la rata a las 72 horas, permite demostrar que el hígado dañado por colestasis altera el metabolismo de medicamentos de uso común, tales como la aspirina.

El modelo de LCB que se utilizó en este trabajo es adecuado para inducir colestasis en la rata. En nuestros experimentos se determinó el perfil metabólico de la Aspirina utilizando el método descrito por Trinder (63). Este método es simple, rápido y reproducible. Es importante señalar que todos los parámetros medidos entre el grupo control y el de LCB son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Finalmente, el análisis de los resultados de este estudio nos permite sugerir que la evaluación del metabolismo de un fármaco de propiedades farmacológicas bien descritas como el AAS, en la colestasis experimental, es una herramienta útil para explorar el daño hepático.

VII. CONCLUSIONES

1.- El uso de marcadores específicos: enzimas y bilirrubinas séricas y el contenido de glucógeno hepático son pruebas adecuadas que permiten evaluar el daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCB).

2.- El daño hepático inducido por la obstrucción biliar en la rata, altera la excreción urinaria de la Aspirina.

2a.- El Acido Acetilsalicílico (AAS) no es eliminado como tal por las ratas con obstrucción biliar.

2b.- La eliminación del Acido Salicílico (AS) y del Acido Gentísico (AG) se incrementa en el grupo de LCB, con respecto al control.

3.- La evaluación del perfil metabólico de la Aspirina, representa una herramienta de utilidad potencial para evidenciar el grado de disfunción hepática en el daño inducido por la LCB.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hans, E. and Sherrick, J. C. Morphology Of The Liver. Academic Press, New York, 1969.
- 2.- Bucher, N.L.R. and Swaffield, M.N. The Rate Of Incorporation Of Labeled Thymidine Into The Deoxyribonucleic Acid Of Regenerating Rat Liver In Relation To The Amount Of Liver Excised. Cancer Res. 24:1611, 1964.
- 3.- Jones A.L. and Mills E.S. Hígado Y Vesícula Biliar. Greep R. D. and Weiss J. En: Histología. Ed. El Ateneo, Tercera edición, 1978.
- 4.- Kelley W. N. Metabolismo Hepático en: Medicina Interna I. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1990.
- 5.- Schmidt F. W. Recientes Aspectos Bioquímicos De Las Enfermedades Hepáticas. Acta Bioquim. Clín. Lat. 13:329, 1979.
- 6.- Wisse E., De Zanger R.B., Jacobs R., et al. Scanning Electron Microscope Observations On The Structure Of Portal Veins, Sinusoids and Central Veins in Rat Liver. Scan. Electron. Micros. 3:1441, 1983.
- 7.- Jones E.A. and Summerfield J.A. Kupffer Cells. In: The Liver Biology and Pathobiology. Arias I. M., Popper H., Schachter D., et al. Raven Press, New York, 1982.
- 8.- Migai K. Ultraestructural Basis For Liver Injury Toxic Injury Of The Liver. Part A. Ed. by M. Farber and M.M. Fischer, Marcel Dekker, I.N.C. pp 59-163, 1979.

- 9.- Netter F. H. Sistema Digestivo. Hígado, Vías Biliares Y Páncreas. Colección Ciba De Ilustraciones Médicas. Tomo III/3. Ed. Salvat, 1983.
- 10.- Ganong W. F. Manual De Fisiología Médica. Quinta edición. Ed. El Manual Moderno, 1976.
- 11.- Singer S. J. and Nicolson G. L. The Fluid Mosaic Model Of The Structure Of Cell Membranes. Science 175:720, 1972.
- 12.- Lansing A. I., Belkhole M. L., et al. Enzymes Of Plasma Membranes Of Liver. J. Biol. Chem. 242:1772, 1967.
- 13.- Benedetti E. L. and Emmelot P. Structure and Function Of Plasma Membranes Isolated From Liver. In: The Membranes Ultrastructure in Biological Systems. Academic Press, New York and London, pp. 33-93, 1968.
- 14.- McComb R.B. and Bowers G. N. Alkaline Phosphatase. Plenum Press, New York, 1979.
- 15.- Sela B. A. and Sachs L. Alkaline Phosphatase Activity and the Regulation of Growth in Transformed Mammalian Cells. J. Cell. Physiol. 83:27, 73.
- 16.- Zimmerman H.J. and Seeff L. B. Enzymes in Hepatic Disease. In: Diagnostic Enzimology. Lea and Febiger. Philadelphia, Part I, 1970.
- 17.- Poley J. R., M. D. Practical Approaches to Assessing Liver Function. Pediatric Annals 14:423, 1985.
- 18.- Whitfield J.B., Pounder R. E., et al. Serum Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activity in Liver Disease. Gut 13:702, 1972.
- 19.- Bengmark S., Ekholm R. and Olsson R. Transaminase Activity in

- Subcellular Fractions of Normal and Regenerating Rat Liver. Acta Hepato-Splenol. 14:80, 1967.
- 20.- Linde S. A. Comparison Between The Enzyme Patterns (GOT, GPT, LD) In Serum And Tissue Extracts In Cardiac And Hepatic Diseases. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10:303, 1958.
- 21.- Dienstag J. L. Non-A, Non-B Hepatitis. I. Recognition, Epidemiology, and Clinical Features. Gastroenterology 85:439, 1983.
- 22.- Roberts W. M. Blood Phosphatase and the Van Den Bergh Reaction in the Differentiation of the Several Types of Jaundice. Br. Med. J. 1:734, 1933.
- 23.- Brauer R. W. and Root M. A. The Effect of CCl₄ Induced Liver Injury Upon the Acetylcholine Hidrolyzing Activity of Blood Plasma of the Rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 88:109, 1946.
- 24.- Zimmerman H. J. Hepatic Injury Caused by Therapeutic Agents. The Liver Normal and Abnormal Functions. Part. A. Marcel Dekker. I.N.C., New York, 1974.
- 25.- Davidsohn T.S Diagnóstico y Tratamiento Clínicos Por El Laboratorio. Tomo I, Octava edición, Ed. Salvat, 1988.
- 26.- Schmidt E. Diagnósticos Enzimáticos De Las Enfermedades Del Hígado. Acta Bioquim. Clin. Lat. 13:351, 1979.
- 27.- Cornelius L. M., DVM. Laboratory Evaluation of Liver Disease in Small Animals-Part 1. Based on a presentation at the Modern Veterinary Practice Seminar on Small Animal Internal Medicine., 1984.

- 28.- Harrison T.R. Principles of Internal Medicine. Sexta edición. Mc Graw Hill Book Company, 1978.
- 29.- Calbert D. N. and Brody T. M. Role of The Sympathetic Nervous System in CCl₄ Hepatotoxicity. Amer. J. Physiol. 198:669, 1960.
- 30.- Dianza M. U., Baccino F. M., and Comporti M. The Direct Effect of Carbon Tetrachloride on Subcellular Particles. Lab. Invest. Part. 1. 15:149, 1966.
- 31.- Witschi H. and Plaa G. L. Chemicals, drugs and Lipid peroxidation. Am. Rev. Toxicol Pharmacol. 16:125, 1976.
- 32.- Mourelle M., Muriel P., Favari L. and Franco T. Prevention Of CCl₄-Induced Liver Cirrhosis By Silymarin. Fundam. Clin. Pharmacol. 3:183, 1989.
- 33.- Mourelle M., Villalón C. and Amezcua J.L. Protective Effect of Colchicine on Acute Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride. J. Hepatol. 6:337, 1988.
- 34.- Muriel P. and Mourelle M. Prevention by Silymarin of Membrane Alterations in Acute CCl₄ Liver Damage. J. Appl. Toxicol. 10:275, 1990.
- 35.- Yahuaca P. Amaya A., et al. Cryptic Adenosine Triphosphatase Activities in Plasma Membranes Of CCl₄-Cirrhotic Rats. Lab. Invest. 53:541, 1985.
- 36.- Keppler D., Lesch R., et al. Experimental Hepatitis Induced by D-Galactosamine. Expt. Mol. Pathol. 9:279, 1968.
- 37.- Kountouras J., Billing H., et al. Prologed Bile Duct Obstruction: A New Experimental Model for Cirrhosis in The

- Rat. Departments of Medicine and Histopathology. Royal Free Hospital and School of Medicine, London 65:305, 1984.
- 38.- Jenner P. and Testa B. Concepts in Drug Metabolism. Part. A. Vol. 10. Marcel Dekker Inc., New York, 1980.
- 39.- Zimmerman H. J. Hepatic Metabolism Of Foreign compounds in: Hepato-toxicity. Appleton-Century-Crofts, New York, 1978.
- 40.- Jenner P. and Testa B. Concepts in Drug Metabolism. Part. B. Vol. 10. Marcel Dekker Inc., New York, 1980.
- 41.- La Du M. D., and Mandel H. G. Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. Williams and Wilkins C., 1971.
- 42.- Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica. Sexta edición. Ed. Médica Panamericana, 1981.
- 43.- Bridges J. W. and Chasseaud L. F. Progress In Drug Metabolism. Taylor & Francis, London and Philadelphia. Vol.5, pp. 168-181, 1980.
- 44.- Levy Gerhard. Pharmacokinetics of Salicylate Elimination in Man. J. of Pharm. Sci. 54:959, 1965.
- 45.- Sydney H. D., and Furst D. E. Salicylates. In: Applied Pharmacokinetics, Principles of Therapeutic Drug Monitoring. Evans W. E., and Schentog J. J., et al. (Ed.) Applied Therapeutics Inc. Spokane, W. A., 1980.
- 46.- Williams F. M., Mutch E. M., et al. Human Liver and Plasma Aspirin Esterase. J. Pharm. Pharmacol. 41:407, 1989.
- 47.- Howes J. F., and Hunter W. H. The Hydrolysis of Acetylsalicylic Acid by Liver Microsomes. J. Pharm. Pharmac. 20:107, 1968.

- 48.- Eyring E. J. and Ford P. C. Comparison of Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Hydrolase Activities in Various Tissues of Several Species. Comp. Biochem. Physiol. 43B:333, 1972.
- 49.- Mourelle M., Amezcua J. L., and Favari L. Heterogeneity of Changes on The Disposition of Aspirin in Rats With CCl₄-Induced Chronic Liver Damage. Biochem. Pharmacol. 36:3021, 1987.
- 50.- Favari L., Mourelle M., and Amezcua J. L. Aspirin Disposition in Rats Acutely Intoxicated With CCl₄. J. Appl. Toxicol. 7(6):361, 1987.
- 51.- Boreham D. R. and Martin B. K. The Kinetics of Elimination of Salicylic Acid and the Formation of Gentisic Acid. Br. J. Pharmac. 37:294, 1969.
- 52.- Nelson E., Hanano M., and Levy G. Comparative Pharmacokinetics Of Salicylate Elimination in Man and Rats. J. Pharmacol. Exp. Therap. 153:159, 1966.
- 53.- Forman W. B., Davidson E. D., and Webster L. T. Enzymatic Conversion of Salicylate to Salicylurate. Mol. Pharmacol. 7:247, 1971.
- 54.- Yesair D. W., Remington L., Callahan M., and Kensler C. J. Comparative Effects Of Salicylic Acid, Phenylbutazone, Probenecid and Other Anions On The Metabolism, Distribution And Excretion Of Indomethacin By Rats. Biochem. Pharmacol. 19:1591, 1970.
- 55.- Schayer R. W. The Metabolism of Radioactive Salicylic Acid. Arch. Biochem. 28:371, 1950.

- 56.- Mahler H. R. and Cordes E. H. Biological Chemistry. Segunda edición. Harper, 1971.
- 57.- Reitman S. and Frankel S. A Colorimetric Method For determination of Serum Oxalacetic and Glutamic Piruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28:56, 1957.
- 58.- Dragosici B., Ferenci P., Pesendorfer F. and Wewalka F. G. Gamma-glutamyl Transpeptidase (GGTP): Relationship to Other Enzymes for Diagnosis of Liver Disease. Progress in Liver Diseases 5:536, 1976.
- 59.- Jendrassik L. and Gróf P. Vereinfachte Photometrische Methoden Zur Bestimmung Des Blutbilirubins. Biochemistry Z. 297:81, 1938.
- 60.- Schellong G. and Wendem U., Arch. Kinderheilk, 1960.
- 61.- Hassid W. Z. and Abraham S. Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharides. Methods in enzymology 3:34, 1957.
- 62.- Morris D. Quantitative Determination of Carbohydrates With Drey Wood's anthrone reagent. Science 107:254, 1948.
- 63.- Trinder P. Rapid Determination of Salicylate in Biological Fluids. Biochem. J. 57:301, 1954.
- 64.- Abbott David y Andrews R. S. Introducción A La Cromatografía. Ed. Alhambra, Méx., 1983.
- 65.- Daniel W. W. Biostatística. Base Para El Análisis De Las Ciencias De La Salud. Ed. Limusa, México, 1977.
- 66.- Reichen J. and Simon F. R. Cholestasis. Arias, Jakoby, et al. in The Liver Biology and pathobiology Ed. Raven Press, Second Edition, New York, 1988.

- 67.- Plaa L. G. and Hewitt W. R. Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. Principles and Methods of Toxicology. Raven Pres. New York, 1982.
- 68.- Bachs O., Enrich C., et al. Induction of Plasma Membrane Alkaline Phosphatase in Rat Liver. Cell Biochem. Funct. 3:95, 1985.
- 69.- Toda G., Ikeda Y., et al. Mechanism Of Elevation Of Serum Alkaline Phosphatase Activity in Biliary Obstruction: An Experimental Study. Clin. Chim. Acta 107:85, 1980.
- 70.- Pekarthy J. M., Short John, et al. Function and Control of Liver Alkaline Phosphatase. J. Biol. Chem. 247:1767, 1972.
- 71.- Kaplan M. M. and Righetti A. Induction of Rat Liver Alkaline Phosphatase: The Mechanism of the Serum Elevation in Bile Duct Obstruction. J. Clin. Invest. 49:508, 1970.
- 72.- Kaplan M. M. Serum Alkaline Phosphatase-Another Piece is Added to the Puzzle. Hepatology 6:526, 1986.
- 73.- Metz J., Aoki A., et al. Morphological Alterations and Functional Changes of Interhepatocellular Junctions Induced by Bile Duct Ligation. Cell Tiss. Res. 182:299, 1977.
- 74.- Koyama K. Ito K., et al. Mitochondrial Function of Rat Liver in Biliary Obstruction. Tohoku J. exp. Med. 131:59, 1980.
- 75.- Cameron G. R. and Hasan S. M. Disturbances Of Structure And Function In The Liver As The Result Of Biliary Obstruction. J. Path. Bact. 75:333, 1958.
- 76.- Hutterer F. Recent Progress in Clinical Enzimology for the Diagnosis of Liver Diseases. in The Liver and Its Diseases.

- Schaffner F. et al. Intercontinental Medical Book Corporation. New York, 1974.
- 77.- Ogata S., Hayashi Y., et al. Chemical Identification of Lipid Components in the Membranous Form of Rat Liver Alkaline Phosphatase. J. Biochem. 102:1609, 1987.
- 78.- Hall L. Robert. Laboratory Evaluation of Liver Disease. Vet. Clin. N. Am. S. Animal Prac. 15:3, 1985.
- 79.- Bulle F., Mavier P., et al. Mechanism of γ -Glutamyl Transpeptidase Release in Serum During Intrahepatic and Extrahepatic Cholestasis in the Rat: A Histochemical, Biochemical and Molecular Approach. Hepatology 11:545, 1990.
- 80.- Garcia B. M. and Mourelle M. Gamma-Glutamyl Transpeptidase: A Sensitive Marker In DDT and Toxaphene Exposure. J. Appl. Toxicol. 4:246, 1984.
- 81.- Omer B., Eryurek F., et al. Liver γ -Glutamyl Transpeptidase Activity Following Chronic Treatment With Acetylsalicylic Acid in Rats. Enzyme 42:185, 1989.
- 82.- Woodman D.D. Assessment of Hepatic Function and Damage in Animal Species. J. Of Appl. Toxicol. 8:249, 1988.
- 83.- Nishihata T., Ikawa C., et al. Glycogenolysis in the Rat Isolated Perfused Liver as a Measure of Chemically Induced Liver Toxicity. J. Pharm. Pharmacol. 40:333, 1988.
- 84.- Devos P. and Hers H. A Molecular Order in the Synthesis and Degradation of Glycogen in the Liver. Eur. J. Biochem. 99:161, 1979.
- 85.- Krahenbuhl S., Weber F.L., et al. Decreased Hepatic Glycogen

- Content and Accelerated Response to Starvation in Rats with Carbon Tetrachloride-induced Cirrhosis. Hepatology 14:1189, 1991.
- 86.- Muriel P. and Mourelle M. Characterization of Membrane Fraction Lipid Composition and Function of Cirrhotic Rat Liver. Role of S-Adenosyl-L-Methionine. J. Hepatol. 14:16, 1992.
- 87.- Favari L., Soto C. y Muriel P. Efecto De La Hipertensión Portal Sobre El Metabolismo De la Aspirina En Ratas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 23:20, Febrero-Marzo 1993.
- 88.- Bowman y Rand. FARMACOLOGIA. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. Capítulo 16. Edit. Interamericana, Segunda edición, México D.F., 1984.
- 89.- Patel D. K., Notarianni L. J., et al. Comparative Metabolism of High Doses of Aspirin in Man and Rat. Xenobiotica 20:847, 1990.
- 90.- Tsuchiya T. and Levy G. Biotransformation of Salicylic Acid to Its Acyl and Phenolic Glucuronides in Man. J. Pharm. Sci. 61:800, 1972.
- 91.- Smith P. K. Certain Aspects Of The Pharmacology Of The Salicylates. Raven Press, Second Edition, New York, 353-376.
- 92.- Morgan A. M. and Truitt E. B. Evaluation of Acetylsalicylic Acid Esterase in Aspirin Metabolism. J. Pharm. Sci. 54:1640, 1965.

- 93.- Cummings A. J. The Elimination of Salicylic Acid In Man: Serum Concentrations and Urinary Excretion Rates. Brit. J. Pharmacol. 26:461, 1966.
- 94.- Bedford C., Cummings A. J., et al. A Kinetic Study Of The Elimination Of Salicylate In Man. Brit. J. Pharmacol. 24:418, 1965.
- 95.- Murray R. K., Mayes P. A., et al. Bioquímica De Harper. Edit. El Manual Moderno, S. A. de C. V. Undécima edición, Méx. D.F. 1988.
- 96.- Mourelle M. and Favari L. Silymarin Improves Metabolism and Disposition of Aspirin In Cirrhotic Rats. Life Sciences 43:201, 1988.
- 97.- Sánchez M. J. and Mourelle M. M. Esteatosis En El Hígado De Ratas Durante La Intoxicación Aguda Con Colchicina. Bioquímica 9:9, 1987.
- 98.- Belforte G., Bona B., et al. Selection and Assessment of Laboratory Tests for the Evaluation of Liver Functional Impairment. Meth. Inform. Med. 24:39, 1985.
- 99.- Hutterer F., Bacchin G. P., et al. Alteration of Microsomal Biotransformation in the Liver in Cholestasis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:702, 1970.
100. Ahmad N. and Black M. The Hepatic Microsomal Mixed-Function Oxidase System In Man: Cofactor Effects And The Influence Of Cholestasis. J. Pharmacol. Expt. Ther. 203:397, 1977.
101. Gross B. J., Reichen J., et al. The Evolution of Changes in Quantitative Liver Function Tests in a Rat Model of Biliary

- Cirrhosis: Correlation with Morphometric Measurement of Hepatocyte Mass. Hepatology 7:457, 1987.
102. McLuen F. E. and Fouts R. J. The Effect of Obstructive Jaundice on Drug Metabolism in Rabbits. J. Pharmacol Exp. Ther. 131:7, 1961.
103. Willson A. R., Hart F. E., et al. Comparison of In Vivo and In Vitro Drug Metabolism in Experimental Hepatic Injury in the Rat. Gastroenterology 76:697, 1979.
104. Remmer H. The Role of the Liver in Drug Metabolism. Am. J. Med. 49:617, 1970.
105. Cozzolino G., Francica G., et al. Lack of Correlation Between The Laboratory Findings and Series of Steps in The Clinical Severity of Chronic Liver Disease. La Ricerca Clin. Lab. 14:641, 1984.