

003817
24 ✓



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFECTO COMPARATIVO DE LA COLCHICINA Y DEL
ÁCIDO TRIMETILCOLCHICÍNICO SOBRE EL DAÑO
HEPÁTICO CRÓNICO PRODUCIDO POR
TETRACLORURO DE CARBONO Y POR LA
OBSTRUCCIÓN BILIAR EXTRAHEPÁTICA EN LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

LUZ VIRGINIA CASTRO MAYA

DIRECTOR DE TESIS: DR. PABLO MUREIL DE LA TORRE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

250138

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Comparative Study of Colchicine and Trimethylcolchicinic Acid on Chronic Liver Damage induced by Carbon Tetrachloride or Prolonged Bile Duct Obstruction in the Rat

Colchicine has been employed for several decades as a "hepatoprotective" drug, but with undesirable side effects. The aim of this work was to compare the effects of colchicine and trimethylcolchicinic acid (TMCA) on liver cirrhosis in the rat. TMCA and colchicine were probed to prevent bile duct ligation induced-cholestasis (BDL) and reverse CCl₄-induced experimental liver cirrhosis. The indices used to determine liver dysfunction were the conventional markers of liver damage. In addition, it was quantified hydroxyproline content, the degree of lipid peroxidation, liver glycogen content, and erythrocyte and hepatocyte plasma membrane Na⁺/K⁺ and Ca⁺⁺-ATPases activities and cholesterol/phospholipids (CH/PL) ratio. Colchicine was evaluated at a dose of 10 μg rat⁻¹ day⁻¹ and TMCA at 10, 50 and 100 μg rat⁻¹ day⁻¹. Biliary obstruction decreased hepatic glycogen content and the ATPases activities; hydroxyproline content increased 6-fold. BDL resulted in a 67% mortality; TMCA decreased it to 33% and preserved almost normal serum markers of liver damage. Carbon tetrachloride liver damage increased 6-fold hydroxyproline amount and fibrosis remained constant after discontinuation of the toxin, but TMCA treatment decreased it significantly. It is concluded that TMCA is as effective as colchicine to prevent and to reverse BDL and carbon tetrachloride induced cirrhosis, and due to its lower toxicity it can be used at higher doses without the common side-effects of colchicine.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Pablo Muriel de la Torre del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

“Sin las observaciones, los conceptos están vacíos; sin los conceptos, las observaciones están ciegas”

KANT

“It cannot be promised that scientific research will solve the diseases
but it can be firmly predicted that without research there is no
hope at all of preventing or getting rid of them”

LEWIS THOMAS

INDICE

	RESUMEN	i
I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	Generalidades del hígado.....	3
I.1.1.	Unidades hepáticas.....	3
I.1.1.1.	Heterogeneidad celular.....	5
I.1.1.2.	La membrana plasmática y la polaridad celular.....	9
I.2.	La matriz extracelular.....	11
I.3.	La fibrosis hepática.....	14
I.4.	Modelos animales.....	21
I.4.1.	El modelo experimental de CCl ₄	21
I.4.2.	Modelo experimental de colestasis.....	23
I.5.	Marcadores de daño hepático.....	26
I.5.1.	Marcadores que detectan transporte de aniones orgánicos.....	27
I.5.2.	Marcadores que detectan el daño al hepatocito.....	28
I.5.3.	Marcadores que detectan la capacidad de síntesis del hígado.....	34
I.5.4.	Marcadores que detectan el grado de fibrosis.....	35
I.5.5.	Marcadores de daño a la membrana plasmática: Actividad de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ y de Ca ²⁺ y cociente colesterol/fosfolípidos	36
I.5.6.	El eritrocito como marcador de daño al hepatocito.....	38
I.6.	Farmacología de la fibrosis.....	39
I.6.1.	La colchicina.....	42
I.6.2.	El ácido trimetilcolchicínico.....	43
II.	OBJETIVOS	45
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	46

III.1	Diseño experimental para comparar el efecto hepatoprotector entre la colchicina y el ácido trimetilcolchicínico en la prevención de la cirrosis experimental por ligadura del conducto biliar común.....	46
III.2.	Diseño experimental para evaluar la capacidad del ácido trimetilcolchicínico para revertir la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	47
III.3.	Procedimiento quirúrgico para ligar el conducto biliar común...	50
III.4.	Procedimiento experimental de intoxicación crónica con tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	51
III.5.	T ÉCNICAS	52
III.5.1.	Determinación sérica de bilirrubina total y bilirrubina directa....	52
III.5.2.	Determinación sérica de la actividad de la fosfatasa alcalina.....	52
III.5.3.	Determinación sérica de la actividad de la γ -glutamil transferasa.....	53
III.5.4.	Determinación sérica de la actividad de la alanino amino transferasa.....	53
III.5.5.	Determinación del contenido del glucógeno hepático.....	54
III.5.6.	Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	54
III.5.7.	Determinación de proteínas.....	55
III.5.8.	Determinación de colágena.....	56
III.5.9.	Obtención de membranas plasmáticas de hepatocitos.....	57
III.5.10.	Obtención de membranas plasmáticas de eritrocitos.....	58
III.5.11.	Extracción de los lípidos de las membranas plasmáticas de los hepatocitos y de los eritrocitos.....	59
III.5.12.	Determinación de los fosfolípidos totales en los extractos lipídicos de membranas.....	59
III.5.13.	Determinación de colesterol en los extractos lipídicos de membranas.....	60

III.5.14.	Medición de la actividad de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ en la membrana plasmática del hepatocito.....	61
III.5.15.	Medición de la actividad de la ATPasa de Ca ⁺⁺ de alta afinidad de las membranas plasmáticas de los hepatocitos.....	61
III.5.16.	Medición de la actividad de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ de las membranas de los eritrocitos.....	62
III.5.17	Medición de la actividad de la ATPasa de Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺ de las membranas de los eritrocitos.....	62
III.6.	Tratamiento estadístico.....	62
IV.	RESULTADOS	64
IV.1	Efecto de la administración crónica de la colchicina y del ácido trimetilcolchicínico en ratas sanas.....	64
IV.2.	Efecto de los fármacos sobre la mortalidad inducida por 2 meses de obstrucción del flujo biliar.....	64
IV.3.	Efecto de la colchicina y del ácido trimetilcolchicínico sobre los marcadores de daño hepático en la cirrosis experimental producida por la ligadura del conducto biliar común (LCBC).....	65
IV.3.1.	Efecto sobre los marcadores del transporte de los aniones orgánicos.....	66
IV.3.2.	Efecto sobre los marcadores que detectan daño al hepatocito.....	66
IV.3.3.	Efecto sobre el grado de peroxidación lipídica en hígado.....	66
IV.3.4.	Efecto sobre los marcadores que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado.....	74
IV.3.5.	Efecto sobre los marcadores que evalúan el grado de fibrosis....	74
IV.3.6.	Efecto sobre las alteraciones de las membranas plasmáticas de hepatocitos y eritrocitos.....	74
IV.4.	Efecto del ácido trimetilcolchicínico para revertir la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	79
IV.4.1.	Efecto sobre los marcadores del transporte de los aniones orgá-	

	nicos.....	81
IV.4.2.	Efecto sobre los marcadores que detectan daño al hepatocito.....	86
IV.4.3.	Efecto sobre los marcadores que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado.....	86
IV.4.4	Efecto sobre el grado de fibrosis hepática.....	86
V.	DISCUSIÓN	94
VI.	CONCLUSIONES	107
VII	BIBLIOGRAFÍA	108

RESUMEN

Las enfermedades hepáticas representan uno de los problemas de salud pública más importantes en México, ya que impactan de manera negativa la productividad del individuo y del país. Además de la hepatopatía alcohólica, otras hepatopatías de diferente etiología, ya sean obstructivas, virales o parasitarias pueden evolucionar y manifestarse como un síndrome cirrótico. La enfermedad terminal tiene un alto costo por atención médica y estancia hospitalaria. Estas razones son suficientes para la búsqueda y el empleo de posibles fármacos que modifiquen la fibrosis hepática y sus complicaciones, y que permitan elevar la calidad de vida de tales pacientes. Preferentemente se espera que entre las características de un fármaco, su margen de seguridad sea amplio y sus efectos colaterales sean mínimos.

La colchicina es un fármaco que durante muchos años se ha empleado como antigotoso, y por varias décadas se ha empleado también como hepatoprotector, precisamente en síndromes cirróticos, aunque con efectos secundarios indeseables. Una manera de modificar los efectos colaterales es la síntesis de análogos, en los que se intenta disminuir su toxicidad preservando las características farmacológicas del compuesto original. El ácido trimetilcolchicínico (TMCA), es uno de los análogos de la colchicina, y objeto del presente estudio.

Este trabajo consistió en establecer las posibles acciones terapéuticas del TMCA sobre la cirrosis hepática experimental, y sus efectos colaterales. Como modelo, se utilizó la cirrosis experimental inducida por ligadura del conducto biliar común (LCBC) en ratas, o por la administración crónica con tetracloruro de carbono (CCl_4). Su efectividad se comparó con la de la colchicina en 2 esquemas de tratamiento diferentes: en uno se evaluó su capacidad para prevenir

la cirrosis hepática, en tanto que en el segundo caso, se evaluó su capacidad para revertir el mismo cuadro. En el tratamiento preventivo la colchicina y el TMCA se administraron a partir del primer día de efectuada la obstrucción biliar; en el tratamiento de reversión, el TMCA se administró después de la intoxicación crónica con CCl_4 durante dos meses. Como parámetros para determinar las lesiones, se utilizaron los marcadores de daño hepático convencionales, que evidencian la disfunción hepática. Además se cuantificó el contenido de hidroxiprolina para determinar el grado de fibrosis hepática; el daño hepático se determinó también por el grado de peroxidación lipídica. La reserva energética del hígado se estimó midiendo el contenido de glucógeno hepático. La función hepática también se evaluó midiendo la actividad de importantes sistemas enzimáticos de las membranas plasmáticas de hepatocitos y eritrocitos, las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} , y la composición lipídica en la que se encuentran embebidas.

La dosis de colchicina empleada fue de $10 \mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ durante dos meses, ya que las dosis mayores causaron diarrea y/o muerte de los animales; las dosis de TMCA empleadas fueron de 10, 50 y hasta $100 \mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$, durante el mismo tiempo, sin presentar ningún efecto secundario indeseable. El TMCA disminuyó la mortalidad de los animales y preservó el valor de todos los marcadores de daño hepático empleados. Los marcadores de daño hepático empleados se afectaron severamente en los animales sometidos a la LCBC, si se comparan con los obtenidos para los animales con operación falsa. Los valores de las bilirrubinas se vieron incrementados hasta 20 veces o más; los marcadores de colestasis aumentaron más de 5 veces, y más de 3 veces la peroxidación lipídica. El contenido de glucógeno para las ratas control de $4.04 \text{ g}/100$ descendió hasta $1.07 \text{ g}/100$ en los animales con obstrucción hepática. El contenido de hidroxiprolina usado como marcador de la acumulación de colágena, se incrementó 6 veces en su valor. Las actividades de las ATPasas de

Na^+/K^+ y de Ca^{++} en las membranas plasmáticas tanto de hepatocitos como de eritrocitos disminuyeron significativamente. La administración de TMCA conservó a los marcadores mencionados en sus valores normales. En el tratamiento de reversión (en el cual el daño se produjo por la intoxicación crónica con CCl_4) la colágena aumentó 6 veces su valor normal indicando un grado de fibrosis importante que no fue reversible al suspenderse el tóxico, pero que disminuyó de manera significativa al administrarse el TMCA. Es posible suponer que por lo menos uno de los efectos benéficos del TMCA esté asociado a su capacidad para estimular la degradación de la colágena tipo IV (de acuerdo a estudios recientes), por lo que pudiera evitar la capilarización de los sinusoides, la necrosis y la subsecuente acumulación de otros tipos de colágena que se producen como respuesta al daño (necrosis). Además es bien sabido que la toxicidad de la colchicina ha sido atribuida a su capacidad para unirse a los microtúbulos; a diferencia de la colchicina, el TMCA no se une a los microtúbulos, por lo que los efectos tóxicos de la colchicina atribuibles a su interacción con los microtúbulos no se presentan con la administración del TMCA. En conclusión el TMCA tiene la misma efectividad terapéutica que la colchicina (antifibrótica y anticoléstatica), en la cirrosis experimental en rata, pero con efectos indeseables menores, lo que permite utilizar dosis más elevadas que las de la colchicina.

I. INTRODUCCIÓN

Prefacio

Uno de los problemas médicos de proporciones mundiales son las enfermedades hepáticas. La causa principal en África y Asia, son infecciones virales y parasitarias; se considera que más de 200 millones de personas están infectadas con virus de la hepatitis B. Un número similar de pacientes cursan con esquistosomiasis, infección parasitaria que conduce a la cirrosis. En Estados Unidos, el abuso de alcohol es la causa más importante de enfermedad hepática, y se calcula que alrededor de 200 millones de individuos cursan con secuelas postalcóholicas. En América Latina la situación no es menos alarmante.

Esta desproporcionada situación requiere de prevención y tratamiento, por lo que en ciudades de Europa y Japón han sido prescritos numerosos compuestos denominados "hepatoprotectores". Sin embargo pocos son los fármacos cuya utilidad esté basada en ensayos clínicos cuidadosamente controlados, y que tengan reconocimiento mundial. Lo anterior contrasta con la gran cantidad de antibacterianos y neurofármacos que se consumen en los países desarrollados. Actualmente, entre los hepatólogos existe consenso general respecto a que el número de fármacos hepáticos útiles disponibles está muy lejos de ser suficiente, y que se requieren agentes terapéuticos más seguros y eficaces. Es imprescindible la creación de nuevos agentes terapéuticos para las enfermedades del hígado, ya que si se comparan la farmacología renal ó cardiovascular con la hepática, esta última presenta un claro rezago en su desarrollo. Esta situación resulta del insuficiente conocimiento prevaleciente de los eventos celulares y moleculares subyacentes en las enfermedades hepáticas: bajo estas circunstancias, los avances terapéuticos se basan en el empirismo o en la medicina folclórica. Sin embargo, las últimas décadas han sido testigos de progresos considerables en

biología fundamental, lo que significa una mejor comprensión de las enfermedades hepáticas que conduce a una terapia racional de las mismas. Los nuevos conceptos permitirán el surgimiento de nuevos fármacos que actúen selectivamente en estados bien definidos de la enfermedad; los primeros pasos se han dado, pero se requiere tiempo.

El conocimiento de la respuesta de la célula hepática a un daño sufrido, debe ser la base para desarrollar una farmacología hepática racional. Independientemente de la causa del insulto (virus, parásitos o toxinas), la reacción conlleva una secuencia común de eventos, que pueden analizarse a nivel molecular, celular y tisular. Las respuestas que siguen al insulto son: la necrosis, colestasis, inflamación y fibrosis que son las responsables del daño provocado a la función hepática. De aquí que el propósito de la terapia hepática sea modular la respuesta fisiológica para mejorar la función del órgano, y al mismo tiempo sentar las bases para futuras estrategias terapéuticas. Por otro lado también se requieren modelos biológicos para la evaluación y el desarrollo de fármacos potenciales, ya que no debe dejarse pasar por alto la importancia de la disponibilidad de tales modelos por ser un factor crítico en cualquier investigación que pretenda el éxito. En hepatología, los ensayos clínicos son particularmente complejos por la variabilidad de las enfermedades hepáticas, su lenta y prologada evolución, así como la carencia de marcadores biológicos confiables, por lo que tales ensayos deben ser restringidos a un número limitado de probables fármacos, los que deben ser estudiados antes, haciendo una cuidadosa evaluación en los modelos experimentales disponibles.

I. I. GENERALIDADES DEL HÍGADO.

I. 1. 1. Unidades hepáticas.

Aún es vigente, la polémica iniciada hace 150 años acerca de la unidad estructural y funcional del hígado. Kiernan (1833) basado en sus estudios del hígado de cerdo describió al lóbulo hepático "clásico", como la unidad básica, en donde la triada portal se encuentra en la periferia y una vena tributaria de la hepática se halla en el centro (vena centrolobular). Sin embargo, este lóbulo típico limitado por septos de tejido conectivo sólo se encuentra en el hígado de cerdos adultos, osos polares, focas y en menor grado en los camellos. En 1888 de Brissaud y Sabourin establecieron que los cordones celulares y sinusoides iniciaban en la triada portal, por lo que Mall (1906) propuso su lóbulo "portal" como la unidad básica estructural del hígado, en la que el centro era la triada portal que drenaba en una tributaria de la vena hepática que se hallaba en la periferia (Mall, 1906). Posteriormente, Rappaport al inyectar el sistema vascular del hígado obtuvo modelos con los que formuló el concepto de "acino hepático", jerarquizando el orden de acino simple, complejo y aglomerado (Rappaport y cols, 1954). El acino simple se define como la sección de parénquima hepático vascularizado por una rama terminal de la vena porta.

El mérito del concepto de Rappaport recae en el hecho de que fija su atención en la distribución de los vasos aferentes que provienen de los vasos de la triada hepática. El acino hepático tiene sus vasos aferentes en el centro y los sinusoides drenan en terminales de las vénulas hepáticas vecinas. Por esta razón el parénquima acinar, de acuerdo a la proximidad con los vasos aferentes, se divide arbitrariamente en tres zonas: zona acinar 1 circunvecina a los vasos aferentes, rica en oxígeno y nutrientes, que es rodeada por la zona 2, que a su vez es rodeada por la zona 3 que

está en la periferia (Rappaport y cols, 1954). El complejo acinar es una modificación del lóbulo portal propuesto por Mall. Aunque el concepto de acino ha ganado popularidad y ha sido ampliamente difundido, aún se considera al "lóbulo hepático" como la unidad básica. El lóbulo primario, otra unidad estructural y funcional, fue propuesta por Matsumoto y Kawakami (1982) quienes basados en estudios angiales hicieron modificaciones al concepto de lóbulo hepático de Kiernan. El concepto de lóbulo primario recibió apoyo de estudios histoquímicos y dio lugar al "lóbulo metabólico" (Lamers y cols, 1989). Este concepto se aplica específicamente a estados fisiológicos, mientras que en ciertos estados patológicos el concepto de acino parece delinear mejor los límites de las unidades hepáticas (Lamers y cols, 1989).

Uno de los conceptos más recientes de unidad hepática se propuso considerando la función excretoria biliar, ya que comprende a canalículos y conductos biliares, de manera similar al nefrón que está formado por glomérulos y túbulos en el riñón.

Puesto que todos los conceptos que tratan de definir las unidades estructurales y funcionales hepáticas ya sean lobulares o acinares, no tienen límites bien definidos, al hígado humano se le considera un "*continuum indivisible*" (Elias, 1969; Lamers y cols, 1989).

Por otro lado, como ya ha sido mencionado antes, aún cuando el concepto de acino ha sido ampliamente difundido y aceptado, no considera aquellas especies de mamíferos en las que el tejido conectivo circunscribe al lóbulo hepático, y que se suman a otras inconsistencias adicionales que se han identificado en estudios tridimensionales de Heterogeneidad metabólica y estructura microvascular. Lo que es más, ninguno de los conceptos antes mencionados, en realidad identifica a la unidad funcional que define la cantidad mínima de tejido que lleva a cabo las funciones del hígado. Como resultado Bloch (1970) propuso un área hepática más restringida como la unidad

funcional, y que comprende a un sólo sinusoides, el tejido hepático contiguo, vasos aferente y eferente, canalículo biliar, vaso linfático y conexiones nerviosas. Sin embargo, esta unidad es muy restringida ya que no todos los sinusoides reciben ramas directas de la arteria hepática y en la periferia de dicha unidad en los mamíferos, el parénquima se bisecta por lo que los sinusoides contiguos están separados por placas cuyo grosor es de una célula. Este concepto tampoco logra considerar la interacción entre unidades de tejido que tengan conexiones aferentes (entrada o vénula portal terminal) y eferentes (vénula central) comunes. El hecho anterior se ha resuelto al conceptualizar a la subunidad hepática microvascular (SHM) (Ekataksin y cols, 1993a, 1993b) que es una ampliación del concepto arriba mencionado.

Ekataksin y colaboradores (1993a;1993b) emplearon construcciones tridimensionales de secciones de hígado y microscopía *in vivo* de varias especies, que apoyan el concepto de Matsumoto y Kawakami (1982), de que la unidad funcional sea una subunidad microvascular cónica del lóbulo clásico, al que se le rebautizó como subunidad microvascular hepática (SHM). Se demostró que esta unidad consiste en un grupo de sinusoides irrigados por una sola vénula de entrada y su asociación a una sola rama de una arteriola hepática del espacio portal adyacente (Ekataksin, 1993a). Este concepto se confirmó al estudiar su desarrollo en hígados neonatales (Ekataksin, 1993b). Todos los conceptos anteriormente mencionados se ilustran en la Fig. 1.

I. 111. Heterogeneidad celular.

El hígado se compone de cinco diferentes tipos celulares que abarcan cerca del 80% de su volumen. (Rojkind, 1994) el 20% restante lo ocupan los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. Los hepatocitos son las células más grandes y las más abundantes ya que

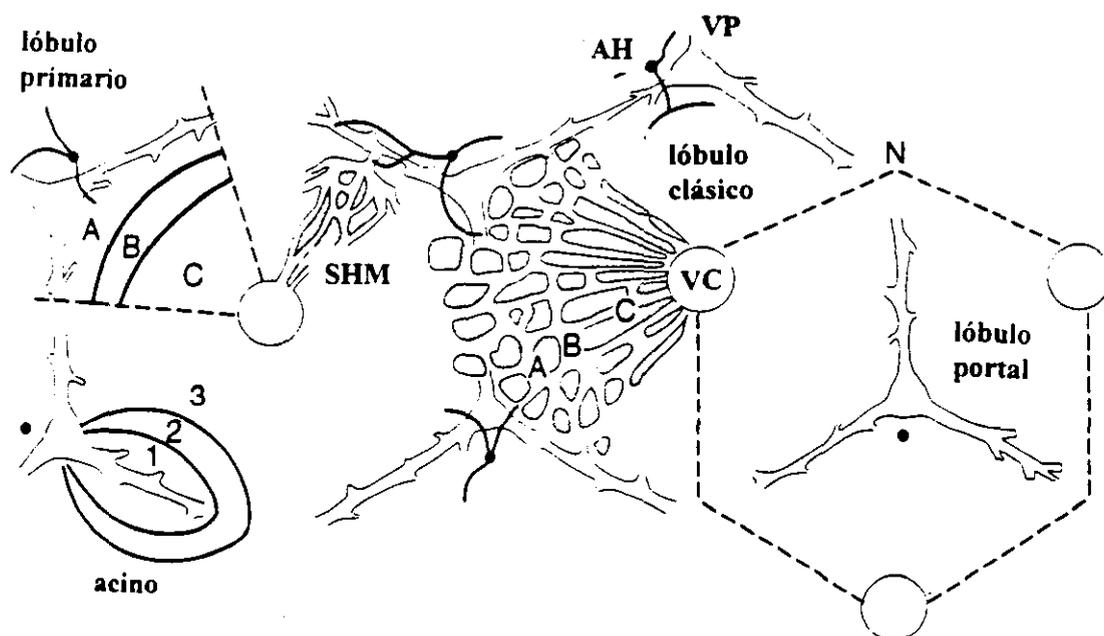


Fig. 1. Esquema que ilustra la evolución de los diferentes conceptos que se han tenido de las relaciones entre las células hepáticas y el resto de los elementos anatómicos circunvecinos. Los conceptos se refieren a aspectos morfológicos, funcionales y bioquímicos (ver texto). VP, vena portal; VC, vena central; AH, arteriola hepática; SHM, subunidad hepática microvascular. Tomada de: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition, ed. por I M Arias, J L Boyer, N Fausto, W B Jakoby, D A Schachter y D A Shafritz. Raven Press, Ltd, New York, 1994.

constituyen el 50 ó 60% del volumen hepático, es decir, casi alrededor de dos terceras partes del mismo: los otros cuatro tipos celulares se conocen como no parenquimatosas o sinusoidales y son menores en tamaño y número, a saber: células de Kupffer, de pit, de Ito o estelares (ó almacenadoras de grasa) y endoteliales, todas parte del sinusoides. Las células endoteliales tienen un citoplasma fenestrado, y el número y tamaño de ellas depende de su localización en el sinusoides y de la composición de la matriz; así mismo dichas fenestraciones son estructuras dinámicas cuyo diámetro se ve afectado por la presión sanguínea luminal, sustancias vasoactivas, fármacos y toxinas (McCuskey y cols, 1983; Wisse y cols, 1985). Las células de Kupffer son miembros del sistema retículo endotelial, y se adhieren fuertemente a las células endoteliales; no sólo tienen características fagocíticas sino que también son fuente de sustancias vasoactivas que (prostaglandinas, leucotrienos, interleucina 1, óxido nítrico, etc) participan en la respuesta de defensa no específica cuando el hígado sufre alguna lesión (Decker, 1990). La fagocitosis y la liberación de estas sustancias modulan los efectos causados por las endotoxinas derivadas del intestino, puesto que son las células responsables de la eliminación de productos bacterianos (McCuskey y cols, 1987) que se encuentran normalmente en la sangre porta. Por ello se ha pensado que la disfunción de las células de Kupffer y la presencia de endotoxinas son parte de la explicación de la fisiopatología de la enfermedad hepática (McCuskey y cols, 1987). Las células de pit son las únicas células asesinas en el hígado, se encuentran también en el sinusoides pero se adhieren laxamente al mismo. Las células almacenadoras de grasa (FSC) son perisinusoidales, contienen gotas de grasa y son el sitio de almacén de la vitamina A.

Cabe recordar que en todos los metazoarios los diferentes tejidos cuentan con interacciones célula-célula (Nogawa y cols, 1981). La relación epitelio-mesénquima es evolutivamente la más

antigua y universal de las interacciones célula-célula. Las capas de células epiteliales conectadas por uniones intercelulares están unidas por una delgada capa de matriz extracelular o células mesenquimatosas, generalmente fibroblastos (Mecham, 1986; Damsky y Bernfield, 1989; Hynes, 1992). Pero en aquellos tejidos en los que se exige un intercambio rápido de productos a través del epitelio, las células epiteliales se encuentran directamente unidas a las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos; tales son los casos del pulmón y del hepatocito que están en contacto con las células endoteliales del sinusoides.

Las células parenquimatosas hepáticas, responsables del metabolismo, parecen homogéneas al microscopio de luz. Estudios posteriores histoquímicos, ultraestructurales e inclusive morfométricos revelan una importante heterogeneidad que, aunque inicialmente fue meramente descriptiva (Chiquoine, 1953; Schumacher, 1957) años más tarde recibió una interpretación funcional (Gebhardt, 1992).

De acuerdo a la descripción hecha con anterioridad, los hepatocitos forman placas de células con dos puntos de referencia importantes, la triada portal y la vena hepática, por lo que las placas se dividen en tres zonas: la zona 1 o periportal, la zona 2 que se encuentra al centro y la zona 3 o pericentral (Gebhardt, 1992; Traber y cols, 1988; Jungermann, 1986). Los criterios para esta subdivisión se basan en su morfología, tamaño, poliploidía y función de las células a lo largo de las placas. Las células diploides se encuentran en la zona 1, mientras que el resto de las células son poliploides (Gebhardt, 1992); las células aumentan su tamaño y contenido citoplásmico de la zona 1 a la 3. Se sabe que su potencial proliferativo es inversamente proporcional a su posición zonal (Gebhardt, 1988), mientras que también la expresión de la mayoría de los genes tisulares específicos depende de su posición dentro de dicha placa (Gebhardt, 1992; Guzman y Castro, 1989; Thurman

y Kauffman, 1985). Por ejemplo, la conexina 26 o la α -fetoproteína (Gebhardt, 1992 ; Traber y cols. 1988; Jungermann, 1986; Poliar y cols. 1986) se expresan dentro de un número pequeño de las células periportales. Aunque a nivel reducido la expresión de la albúmina lo efectúan todas las células parenquimatosas, alcanza su máximo en las células de la zona 2 (Gebhardt, 1992; Traber y cols. 1988).

Las enzimas de las vías metabólicas también se encuentran distribuidas de la misma manera (Gebhardt, 1992; Traber y cols, 1988). Así los hepatocitos periportales llevan a cabo la glucogenólisis y la gluconeogénesis, en tanto que la glicólisis y síntesis de glucógeno lo hacen los hepatocitos cercanos a la vena central (Gebhardt, 1992; Traber y cols, 1988; Thurman y Kauffman, 1985). El mismo criterio es válido para las enzimas del ciclo de la urea: la carbamil sintetasa se encuentra en la zona 1, mientras que la glutamina sintetasa se encuentra sólo en la capa de células que toca la vena central. Hay patrones de distribución paralela en varios genes para el citocromo P450, glutatión transferasa y para enzimas del metabolismo de la bilis y lípidos (Gebhardt, 1992; Jungermann, 1986; Guzman y Castro, 1989; Katz y cols, 1989).

Este fenómeno emergió a partir del trabajo de Thurman y Kauffman (1985), quienes demostraron que algunas de las diferencias de la expresión genética de los hepatocitos periportales y pericentrales se invertían, cuando se invertía la dirección de la corriente sanguínea.

I. 11. 2. La membrana plasmática y la polaridad celular.

Es característico de las células epiteliales que su superficie sea polarizada. El hepatocito, la célula epitelial más abundante del hígado, tiene funciones cruciales muy disímiles debido a su posición entre dos medios también distintos, el plasma y la bilis; lo que da lugar a pensar que su

superficie sea asimétrica o polarizada. La membrana plasmática de tales células se halla dividida en distintos dominios estructurales y funcionales que difieren en su composición molecular (Simon y Fueller, 1985; Hubbard y Stieger, 1989).

La membrana plasmática del hepatocito presenta tres áreas morfológica y funcionalmente diferentes: i) el dominio sinusoidal o basal, en contacto con el espacio de Disse y a través de éste con la corriente sanguínea (alrededor del 37 % del área parenquimatosa); ii) el dominio intercelular o área de contacto entre hepatocitos (50% de la superficie); y iii) el dominio biliocanalicular también llamado polo apical (13% del área) (Weibel y cols, 1969).

El dominio sinusoidal se caracteriza por la irregularidad de sus microvellosidades que aumentan la superficie disponible para el intercambio de la célula; dichas microvellosidades están en contacto con el líquido y los componentes de la matriz del espacio de Disse. Al mismo tiempo representa la frontera celular donde se efectúa un intenso intercambio de moléculas desde y hacia la sangre del sinusoides, dado que es el sitio donde asientan los procesos de transporte (Nathanson y Boyer, 1991) mediados por la bomba de sodio o acarreadores específicos. También aquí se localizan receptores para glicoproteínas, inmunoglobulina A, péptidos, hormonas y factores de crecimiento, así como las proteínas transmembranales (integrinas) que reconocen los componentes específicos para la laminina, la colágena y la fibronectina (Volpes y cols, 1991).

El dominio intercelular como su nombre lo indica es una región especializada para la adhesión y comunicación intercelular en donde se encuentran las uniones estrechas, uniones intermedias y desmosomas. La comunicación intercelular ocurre a través de las uniones comunicantes o de hendidura (Desmet, 1987). Este tipo de uniones parenquimatosas son de particular interés en la secreción biliar, puesto que constituyen la barrera canalículo-sinusoidal y

parte de la vía paracelular durante la secreción biliar, funcionando como una barrera bioeléctrica con permeabilidad selectiva para cationes (Desmet, 1987).

El dominio canalicular de la membrana plasmática del hepatocito tiene características morfológicas y funciones especializadas propias (Nathanson y Boyer, 1991; Desmet, 1987; Meier-Abt, 1990). De particular interés son tres acarreadores dependientes de ATP, para leucotrienos, sales biliares y diferentes fármacos.

La polaridad del parénquima se refleja en la alta especificidad funcional de los dominios presentes en la membrana plasmática, y que se ve alterada en la colestasis por el cambio del acarreador de las sales biliares a la membrana basolateral (Landmann y cols, 1990; Fricker y cols, 1989), o bien disminuye en casos de obstrucción biliar crónica (Baumgartner y cols, 1991).

I. 2. La matriz extracelular.

El concepto clásico de la matriz extracelular a la que se le consideraba como una "goma" inerte que servía como plataforma para el descanso de las células se ha modificado, y actualmente se ha demostrado que está "viva" (Rojkind, 1994). Se compone de grupos de macromoléculas divididas en tres diferentes clases: las colágenas cuya lista actual ha crecido hasta 17, las glicoproteínas no colagénicas, y los glicosaminoglicanos y proteoglicanos (tabla I). Las diferentes moléculas de la matriz son polivalentes, tienen múltiples dominios y permiten su interacción con una o más superficies celulares o componentes de la matriz, de manera que este conjunto juega un papel importante en la organización y función de cada tejido, y actúa a manera de radar que mantiene a las células informadas de eventos ocurridos en el microambiente (Rojkind, 1994). Los componentes de la matriz de los diferentes tejidos son producidos por una gran variedad de células

epiteliales o mesenquimatosas; no todas las células pueden producir todos los componentes, pero sí un conjunto de ellos. Los tipos, cantidades y proporciones producidos son altamente dependientes de las interacciones célula-célula y célula-matriz, y varían importantemente durante el desarrollo o proliferación celulares. De ahí la gran heterogeneidad de la composición dentro de las diferentes regiones de un mismo tejido, por lo que la composición y organización de la matriz extracelular es única para cada tejido (Rojkind, 1994).

Los componentes de la matriz o algunos de sus productos de degradación permiten la comunicación con las células, a través de los receptores específicos de membrana (Mecham, 1991; Hynes 1992), aunque la célula también modula la respuesta, cuando regula la expresión de los receptores unidos a la matriz. Varios componentes de la matriz extracelular se unen ó exponen a la célula a factores de crecimiento y citocinas, lo que facilita su actividad; o al unirse los protegen contra su degradación, aumentando su vida media (Bernfield y cols 1992; Roberts y cols, 1988; Ruoshti y Yamaguchi, 1991).

Las citocinas y factores de crecimiento unidos a la matriz pueden liberarse cuando compiten con los componentes solubles de la matriz o cuando la matriz es degradada enzimáticamente (Saksela y Rifkin, 1990). Así en situaciones de emergencia, como ocurre durante el daño celular, las citocinas y los factores de crecimiento que se hallan unidos a la matriz son liberados, y pueden ser las señales de inicio para la proliferación celular y reparación del tejido, aún antes de la producción activa de citocinas y factores de crecimiento por las células inflamatorias que llegan al sitio del daño.

El tejido conectivo en el hígado ocupa un volumen relativamente pequeño: la concentración de los componentes de la matriz varía de acuerdo a la especie animal. Mientras que en la rata la

Tabla I. Las tres diferentes tipos de moléculas que constituyen la matriz extracelular del hígado.

Colágenas

Tipo I

Tipo III

Tipo IV

Tipo V

Tipo VI

Glicoproteínas no colagénicas

Fibronectina

Laminina

Entactina

Tenascina

Trombospondina

Osteonectina (SPARC)

Undulina

Proteínglicos

asociados a la membrana

Syndecan

Trombomodulina

Betaglican

asociados con la matriz extracelular

Versican

Biglican

Decorina

Fibromodulina

Perlecan

Tomada de: The Liver: Biology and Pathobiology. Third Edition, ed by I M Arias, J L Boyer, N Fausto, W B Jakoby, D A Schachter y D A Shafritz. Raven Press, Ltd, New York, 1994.

cantidad de colágena es alrededor de 1 mg/g de tejido húmedo, en el hombre se calcula de 5 mg/g de tejido. Este tejido se localiza principalmente en los espacios vasculares, como triadas portales y áreas perivenulares; también se localiza en la cápsula de Glisson, y una pequeña pero significativa cantidad en el espacio sinusoidal y particularmente en el espacio de Disse (Martínez-Hernández, cols. 1991). Aún un espacio mayor que la matriz, lo ocupa el espacio hepático, que juega un importante papel fisiológico, puesto que representa el sistema para la obtención de nutrientes, el desecho de los productos metabólicos y la comunicación con otras células o tejidos. La llegada o salida de sustancias, su volumen de distribución y la presión portal se ve modificada cuando este espacio se estrecha o desaparece, como ocurre durante el aumento de tamaño de los hepatocitos o la capilarización del espacio de Disse.

Se ha demostrado que varios de los proteínglicanos pueden ser componentes integrales de la membrana plasmática, que se pueden asociar a la superficie celular o formar parte de la matriz extracelular; también se ha demostrado su capacidad para unirse a las citocinas y factores de crecimiento. Se ha establecido que mientras algunos componentes de la matriz son moléculas que permiten la adhesión celular y facilitan su unión en cultivo, otros inhiben tal adhesión; algunas proteínas localizadas en la superficie de algunas células pueden expresar secuencias de dominios que se caracterizan por tener propiedades antiadhesivas

I.3. La fibrosis hepática.

La fibrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades crónicas que afectan al hígado. Desde un punto de vista anatómico, la alteración se caracteriza por daño celular generalizado, aumento del tejido conectivo con formación de septos que rodean a los nódulos de

hepatocitos en "regeneración," y distorsión de la arquitectura hepática. Como consecuencia del daño generalizado, el aumento del tejido conectivo y la contracción de la cicatriz, se dan modificaciones estructurales, cambios hemodinámicos y alteraciones funcionales; por lo que se ha sugerido que se mejoraría la función hepática, si se lograra la inhibición en la síntesis y el depósito de la colágena en el hígado.

Por lo anterior es indispensable conocer algunos aspectos de la composición del hígado, la matriz extracelular y la fibrosis hepática, tomando en consideración que las células participantes tienen la capacidad de sintetizar las moléculas que producen (tabla II) o degradan (tabla III) las proteínas de la matriz extracelular. Los mecanismos regulatorios más finos para mantener la homeostasis hepática, se producen dentro del propio hígado, y resultan de las múltiples interacciones que se establecen entre las diferentes células del hígado, y de éstas con los componentes de la matriz extracelular. Cuando estos mecanismos se ven alterados, el organismo trata de restablecer la homeostasis y produce factores de crecimiento y citocinas, ya sea los que normalmente producen, o un nuevo conjunto de mediadores que se sintetizan sólo en respuesta a una lesión y cuya actividad biológica facilita el proceso de reparación. La respuesta para la reparación del daño depende del número, de la intensidad y duración del insulto sufrido, así la respuesta será local si el evento es único, de pequeña intensidad y corta duración. Si la lesión persiste o es de mediana intensidad, la respuesta puede generalizarse lo que da lugar a una respuesta inflamatoria inespecífica con producción de citocinas por los monocitos circulantes; a su vez las citocinas circulantes pueden inducir la producción de citocinas y factores de crecimiento a partir de las propias células hepáticas o por las células inflamatorias que llegan al sitio de la lesión. La respuesta general es transitoria, y al terminar, los eventos locales pueden persistir hasta que el

Tabla II. Componentes de la matriz extracelular que son sintetizados por las células hepáticas

Hepatocitos	Colágenas tipos I y III
	Fibronectina (plasmática y celular)
	Laminina
Lipocitos	Colágenas tipo I (sólo miofibroblastos), III y IV
	Laminina
	Tenascina (sólo miofibroblastos)
	Fibronectina (sólo miofibroblastos)
	Entactina
	Undulina
Células endoteliales	Colágena tipo IV
	Entactina
	Trombospondina

Tabla III. Enzimas proteolíticas sintetizadas por las células hepáticas y que pueden degradar a la matriz extracelular.

Hepatocitos	Estromelisina (MMP-3)
	Colagenasa I intersticial (MMP-1)
Lipocitos	Colagenasa I
	Colagenasa IV (72 kDa) ó gelatinasa A (MMP-2)
	Colagenasa IV (95 kDa) ó gelatinasa B (MMP-9)
	Estromelisina
Células de Kupffer	Colagenasa I
	Colagenasa IV (95 kDa)

Tomada y adaptada de: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition, ed by I M Arias, J L Boyer, N Fausto, W B Jakoby, D A Schachter y D A Shafritz. Raven Press, Ltd, New York, 1994.

daño sea reparado; bajo estas condiciones no suele haber formación de cicatriz. Sin embargo si el evento de baja intensidad se repite intermitentemente por períodos prolongados, el proceso de reparación conduce a la formación de cicatriz y evoluciona de manera que la cantidad de tejido conectivo (principalmente colágena) depositado alcanza valores de 5 a 10 veces más altos que el valor normal. Por razones no bien entendidas la cantidad de colágena no sobrepasa nunca los 30 ó 35 mg/g en el humano (Rojkind y cols, 1979). Es posible que cuando el estímulo es pequeño pero se repite, también el estímulo para la regeneración sea pequeño o no haya el suficiente tiempo para la remodelación de la cicatriz, por lo que un segundo o tercer estímulo favorecen la fibrogénesis. Tampoco se puede descartar que el daño crónico disminuya o elimine los mecanismos involucrados para la remodelación del tejido, tal como la producción de colagenasas y otras metaloproteínas (Montfort y cols, 1990), por lo que cada nuevo episodio contribuye a la acumulación de tejido cicatricial.

Quando la intensidad del daño es suficiente para comprometer la función significativamente, los mecanismos que predominan son aquellos que se necesitan para aumentar la masa funcional del hígado (Mourelle y Rubalcava, 1981); estos cambios pueden ir seguidos por depósito excesivo de colágena (Rojkind y cols, 1983), pero debe ser el requerido para restablecer la arquitectura hepática. La cantidad correcta de los componentes de la matriz extracelular deben ser depositados en los lugares necesarios, en el orden correcto y en las cantidades apropiadas; cualquier exceso debe ser eliminado por la acción coordinada de las varias metaloproteinasas existentes. Estos estadios de regeneración no ocurren necesariamente aislados, sino que pueden ocurrir simultáneamente con igual intensidad o predominando la formación de cicatriz sobre la regeneración; la respuesta predominante depende de muchos factores incluido el acervo genético y la naturaleza e intensidad

del estímulo.

Es importante enfatizar que existen al menos dos diferentes estadios de la cirrosis. Uno corresponde a un proceso activo cuando las células inflamatorias están presentes en el sitio y también indica producción de los componentes de la matriz extracelular. El segundo corresponde a un estadio terminal en el que el tejido fibroso es acelular y existen pocas ó ninguna células inflamatorias en el lugar de la cicatriz (fig. 2). En el primero los productos derivados de la síntesis y/o degradación de la matriz extracelular se encuentran elevados en el suero, e indican la actividad del proceso (fig. 3); en tanto que en el segundo estadio los marcadores séricos vuelven a los valores normales, de ahí que se considere que el proceso sea inactivo. La fibrogénesis no se presenta si no existe fibrólisis. Es decir la matriz extracelular se remodela constantemente, aunque durante la cirrosis la biosíntesis sobrepasa a la degradación, lo que conduce a un depósito excesivo de la misma (Montfort y cols, 1990). Aunque también se ha observado una aparente falta de actividad de las colagenasas, durante las etapas terminales de la enfermedad cuando existen bandas acelulares, y por lo tanto las células que degradan la matriz han desaparecido (Montfort y Pérez-Tamayo, 1978; Maruyama y cols, 1982). Por ello el aumento sérico de los niveles de los productos de la matriz son el resultado de complejos mecanismos que incluyen síntesis, degradación y eliminación disminuida.

La composición de la matriz extracelular en el hígado con fibrogénesis activa es diferente del observado en los estadios terminales de la enfermedad; el hígado humano con menos de 15mg/g de colágena contiene menos colágena tipo I, y su relación de colágenas tipo I/III es menor de 1, igual que en el hígado sano (Rojkind y cols, 1979). Cuando el contenido de colágena se eleva por encima de 15mg/g entonces el tipo de colágena predominante es I, y la relación I/III es mayor a 1

REPRESENTACIÓN DIAGRAMÁTICA DE LOS PASOS QUE LLEVAN A LA FIBROSIS HEPÁTICA

RESPUESTA MUY TEMPRANA

Activación de las células de Kupffer y migración quimiotáctica de células inflamatorias.

MUERTE CELULAR Y DEGRADACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR, LIBERACION DE CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO UNIDOS A LA MATRIZ

RESPUESTA TEMPRANA

Transformación de las células almacenadoras de grasa en miofibroblastos.

PRODUCCIÓN ACTIVA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOCINAS POR LAS CÉLULAS DE KUPFFER Y PRESENCIA DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS.

RESPUESTA INTERMEDIA

DEPÓSITO DE MATRIZ EXTRACELULAR Y PRODUCCIÓN ACTIVA DE CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO POR LOS MIOFIBROBLASTOS.

FORMACIÓN DE CICATRIZ

REMODELACIÓN ????

RESPUESTA TARDÍA

CICATRIZ ANTIGUA, FIBROSA, ACELULAR

Fig. 2

Tomada de: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition, ed by I M Arias, J L Boyer, N Fausto, W B Jakoby, D A Schachter y D A Shafritz. Raven Press, Ltd, New York, 1994.

REPRESENTACION ESQUEMÁTICA DE LOS EVENTOS INICIALES, DE LA LESIÓN HEPÁTICA DURANTE LA RESPUESTA MUY TEMPRANA

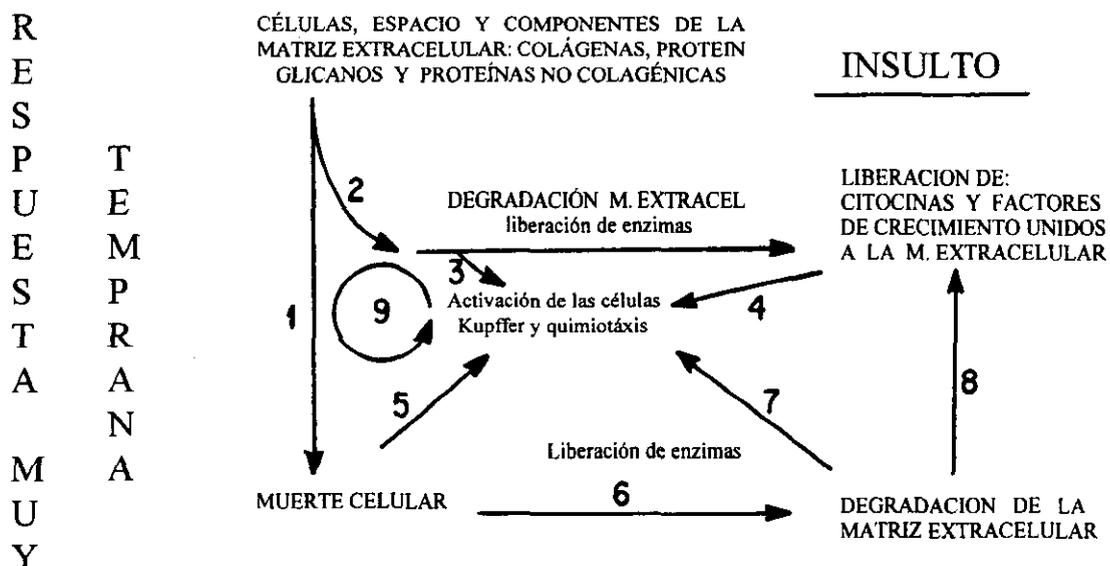


Fig 3.

Tomada de: The Liver: Biology and Pathobiology, Third Edition, ed by I M Arias, J L Boyer, N Fausto, W B Jakoby, D A Schachter y D A Shafritz. Raven Press, Ltd, New York, 1994.

(Rojkind y cols,1979).

I.4 Modelos animales de daño hepático.

La disponibilidad de un modelo animal apropiado es indispensable en el estudio de cualquier entidad patológica, y uno de sus requisitos es que semeje a dicha entidad en el hombre. En el caso de las hepatopatías existe una gran variedad de modelos animales con desórdenes ya sean genéticos, adquiridos o experimentalmente inducidos. Entre los modelos más frecuentemente usados para inducir cirrosis hepática en la rata, se cuentan la administración de CCl_4 y la ligadura del conducto biliar común.

I. 4.1 Modelo experimental CCl_4 . La mayoría de los estudios se basan en aceptar que la cirrosis inducida por la administración de CCl_4 es un modelo experimental adecuado comparable a la cirrosis humana; obviamente tal aceptación no incluye el agente etiológico, pero muestra similitudes al comparar los cambios histológicos y bioquímicos que se desarrollan al tratar crónicamente a los animales (Popper, 1977; Pérez-Tamayo, 1983).

La producción de cirrosis por administración de CCl_4 se ha efectuado con una gran variedad de técnicas en su administración, ya sea empleando las vías subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, con sonda gástrica o nebulizaciones en cámara cerrada. La administración de una sola dosis causa daño agudo y se ha usado para establecer los cambios morfológicos y bioquímicos en la esteatosis o necrosis. Para producir cirrosis hepática es necesario repetir las dosis, y el intervalo de tiempo no debe ser muy prolongado ya que se permitiría que el efecto no fuera acumulativo (Cameron y Karunaratne, 1936). La cirrosis se suele desarrollar después de dos o más meses de su administración, dependiendo del esquema empleado. El CCl_4 se suele administrar

emulsificado con aceite vegetal o mineral en igual o diferente proporción, dos o tres inyecciones a la semana y por vía intraperitoneal. Se ha establecido que después de 10 inyecciones, muchos animales presentan cirrosis aunque los septa de tejido conectivo son delgados y la regeneración nodular de los cordones hepáticos no es importante (Pérez-Tamayo, 1983). Si se suspende la administración del tóxico, el proceso tiende a desaparecer en 5 a 10 semanas (Pérez-Tamayo, 1979), pero si se continúa la administración hasta 20 inyecciones entonces la cirrosis suele ser un cuadro avanzado. El tejido conectivo de los septa es grueso, existen nódulos pequeños y las células hepáticas muestran signos de regeneración como binucleación, poliploidía y placas celulares de dos o más células de grosor. En esta etapa la cirrosis inducida es estable y permanece inalterada por semanas o meses aún después de discontinuar el tratamiento (Pérez-Tamayo, 1983). Cuando el cuadro es completamente florido se ven involucrados varios órganos abdominales: el hígado suele ser más pequeño, color amarillo-naranja, con nodulaciones finas o gruesas, los lóbulos pequeños suelen estar más afectados, y su consistencia y fragilidad se ven aumentadas, existe esplenomegalia y puede presentarse ascitis. También existe aumento de la grasa de las lobulaciones mesentéricas y frecuentemente se puede observar hiperplasia de los nódulos linfáticos. En cuanto a la topografía de las lesiones producidas por la cirrosis experimental inducida por CCl_4 , existen similitudes, pero también diferencias. La lesión de necrosis inicial es centrolobular y los septa de tejido conectivo progresivamente se radian y unen (Rubin y cols, 1963; Aterman, 1954), por lo que los lóbulos hepáticos terminan subdivididos (Rappaport y Hiraki, 1958). Por regla general en la enfermedad hepática congestiva (Pérez Tamayo, 1981) existe lesión centrolobular, pero raras veces conduce a la cirrosis. La cirrosis alcohólica frecuentemente es precedida y/o acompañada de necrosis esclerosante hialina centrolobular (Baptista, 1981), y posteriormente la fibrosis se

extiende en forma pericelular e interlaminar, una característica que no se presenta en la cirrosis experimental. Aunque la cirrosis alcohólica puede ser micronodular, con frecuencia es macronodular con septa de tejido conectivo gruesos (Rubin y cols, 1962). El aspecto histológico micronodular de la cirrosis humana es semejante al de la cirrosis experimental avanzada.

I. 4. 2 Modelo experimental de colestasis por ligadura del conducto biliar común.

El término de colestasis (éstasis de bilis) es un término impreciso y confuso. Los clínicos consideran que la colestasis significa ictericia causada por obstrucción del flujo biliar o enfermedad hepática que mimetiza la enfermedad causada por la obstrucción anatómica del árbol biliar. Algunos autores consideran que la mejor definición está dada desde un punto de vista fisiológico, donde el flujo biliar este disminuido. Esta definición implica la importancia de comprender los pasos que involucran la elaboración de la bilis en la que se excretan sales biliares, electrolitos y agua. Además en la excreción se ve implicado el movimiento paracelular y transcelular de agua, electrolitos y pequeñas moléculas orgánicas. De manera que la disminución del flujo biliar puede resultar de las anomalías en el flujo de agua y los constituyentes biliares a diferentes niveles. Así el énfasis en la patogenia de la colestasis ha cambiado de un proceso puramente mecánico en el árbol biliar, a alteraciones a nivel del hepatocito, en el que el flujo biliar depende de la capacidad del hepatocito para llevar a cabo un transporte vectorial, que a su vez depende de la organización estructural y funcional de sus diferentes dominios fisiológicos y bioquímicos, por lo que la colestasis se puede originar a diferentes niveles incluidos las superficies perisinusoidal, sinusoidal, dominios intracelular, canalicular o postcanalicular.

En los modelos de colestasis en animales se han visto alteraciones de los diferentes

organelos intracelulares, como el retículo endoplásmico, membrana plasmática, mitocondrias, citoesqueleto y permeabilidad alterada de las uniones estrechas. Hay degranulación del retículo endoplásmico rugoso e hipertrofia del endoplásmico liso. Las mitocondrias en la obstrucción prolongada pueden proliferar, alargarse o bien presentar crestas alargadas (Kraehenbueh y cols, 1992; Witzleben, 1972); en tanto los peroxisomas pueden proliferar (Jones y cols, 1976; Carruthers y Steiner, 1962). Las alteraciones de las uniones estrechas se han encontrado en algunos de los modelos de colestasis, pero no en todos (De Vos y Desmet, 1978).

Al microscopio de luz, es característico a la colestasis no sólo la acumulación de pigmento biliar en los canaliculos dilatados, sino también en el citoplasma de los hepatocitos, condición que se conoce como bilirrubinostasis. Esta última suele iniciarse en el área centrolobulillar, y si la éstasis se prolonga pueden encontrarse también tapones de bilis en el área periportal. Si la bilirrubinostasis se localiza también en las células de Kupffer, indica una larga duración del proceso. Los procesos de larga duración conducen a alteraciones fenotípicas de los hepatocitos y colangiocitos. Los hepatocitos forman rosetas colestáticas descritos como arreglos tubulares de los hepatocitos (Desmet, 1986), en donde estos últimos expresan citokeratinas que normalmente se encuentran sólo en las células epiteliales de los conductos biliares (Van Eyken y cols, 1989); este fenómeno se conoce como metaplasia ductular (Van Eyken y cols, 1989; Oguey y cols 1991). Otras anomalías estructurales además de la dilatación de los canaliculos (Schaffner y Popper, 1959) es la pérdida de las microvellosidades (Vital y cols, 1982); la tortuosidad e incremento de los canaliculos se atribuyen a la obstrucción biliar extrahepática (Vital y cols, 1982; De Vos y cols, 1975).

En la obstrucción del conducto biliar común en la rata, se observan los siguientes cambios

de acuerdo al modelo de Kountouras (1984): a los cinco días se observa proliferación de los conductos biliares con ligera infiltración de neutrófilos a su alrededor, y raramente dentro de ellos; edema y reacción inflamatoria aguda en el área portal, el patrón arquitectónico lobular básico aún está completo, en tanto los hepatocitos contienen mucha mitosis y áreas de necrosis focales esparcidas en el parénquima. Después de 10 días de obstrucción: las áreas portales están engrosadas por fibrosis y proliferación de los conductos biliares, uniéndose entre sí para formar una malla; la proliferación ductular se extiende más allá de los límites de las triadas portales e invade el parénquima hepático; hay escasos cuerpos de Mallory e infartos biliares en las áreas periportales. También existe necrosis de los hepatocitos y acumulación de fibrina, y ocasionalmente se observan pequeñas cantidades de bilis dentro de los conductos biliares. A los 15 días de obstrucción hay septa de tejido "conectivo fibroso" en las áreas portales y frecuentemente se extienden a los lóbulos, y el patrón lobular normal se ha desorganizado. Después de 28 días, existen zonas estrechas de edema y proliferación de los conductos en las uniones entre parénquima y septa. Con frecuencia se observa fibrosis concéntrica alrededor de los conductos biliares interlobulares y septales; también se observan algunos trombos organizados en las ramas de la vena porta. A los 30 días todos los animales presentan hipertensión portal manifestada por cirrosis, ascitis y esplenomegalia. Los cambios morfológicos de este modelo semejan a aquellos que se presentan en la cirrosis biliar humana, la técnica es sencilla de efectuar, y los animales sobreviven en buenas condiciones por varias semanas. La obstrucción del conducto biliar común en ratas, se efectúa por doble ligadura del conducto biliar común, o bien al ligar y canular el conducto, lo que permite conocer las características de la bilis a diferentes tiempos; al parecer, no existen diferencias entre los dos tipos de obstrucción.

I. 5. Marcadores de daño hepático.

Las pruebas de funcionamiento hepático son útiles en la evaluación y el manejo de los pacientes con disfunción, ya que cumplen varios objetivos (Kaplan, 1993); son métodos sensibles y no invasivos para la detección de disfunción hepática, particularmente importantes en aquellos pacientes anictéricos. Además una vez establecida la disfunción, permiten reconocer el tipo de daño hepático, las pruebas pueden establecer la severidad de la disfunción y conocer el pronóstico de la enfermedad, y a su vez permiten la evaluación de la respuesta al tratamiento, y la posible evolución de la enfermedad. Estas pruebas se suelen agrupar en varias categorías generales (Kaplan, 1993) como: i) aquellas que detectan la capacidad del hígado para transportar diferentes aniones orgánicos y metabolizar diferentes compuestos, por ejemplo, bilirrubinas séricas, bromosulfaleína (BSP), verde de indocianina (ICG), ácidos biliares y cafeína sérica entre otras. ii) Pruebas que detectan daño al hepatocito, que incluyen a todas las pruebas enzimáticas, entre las que están incluidas aminotransferasas, γ -glutamyl transferasa y fosfatasa alcalina en suero; dentro de estas pruebas también se determina la peroxidación lipídica, aunque no se trate de una determinación enzimática. iii) Pruebas que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado: albúmina sérica, glucógeno, ceruloplasmina, ferritina- α , antitripsina, lipoproteínas y factores de coagulación. iv) Pruebas que detectan inflamación crónica del hígado, como las inmunoglobulinas y auto-anticuerpos específicos, que aunque son proteínas sintetizadas por los linfocitos y no por los hepatocitos, se considera que son bastante específicas para ciertas enfermedades hepáticas. v) Pruebas que permiten evaluar el grado de fibrosis, y vi) Marcadores de daño a la membrana plasmática: a) cociente colesterol/fosfolípidos; b) actividad de la ATPasa Na^+/K^+ y c) actividad de la ATPasa de Ca^{++} .

I.5.1. Marcadores que detectan transporte de aniones orgánicos. La bilirrubina es uno de los pigmentos biliares producto de la ruptura del grupo hemo de varias metaloproteínas; de los 250-300 mg de la bilirrubina que se producen diariamente, entre el 70 y 80% provienen de la destrucción de los eritrocitos viejos que son eliminados, el resto de los eritrocitos prematuramente destruidos en la médula ósea o del recambio de otras hemoproteínas como el citocromo P- 450, cuyo principal origen es el hígado. Los pasos iniciales que llevan a la formación de bilirrubina se efectúan en las células reticuloendoteliales del bazo e hígado; después de una oxidación y una reducción, ésta se une de manera reversible y no covalente a la albúmina, y de esta forma es transportada al hígado, en donde es captada por el hepatocito y conjugada con una o dos moléculas de ácido glucurónico. A esta bilirrubina se le conoce como bilirrubina directa o conjugada y es transportada posteriormente al canalículo biliar, y luego drenada al duodeno a través del conducto biliar y al resto del intestino delgado. En el íleo distal y colon, pierde el glucurónico y se transforma en bilirrubina indirecta, por acción de las β - glucuronidasas bacterianas; posteriormente, también por acción bacteriana es reducida y eliminada como urobilinógeno, o bien en su forma oxidada (urobilina). De esta manera se elimina en las heces, entre el 80 y 90%. El restante 10 o 20% de los urobilinógenos se absorben pasivamente a través del sistema porta y son reexcretados por el hígado.

Determinación de la bilirrubina sérica. Aún se continúan usando los términos bilirrubina directa e indirecta, para determinar los niveles de bilirrubinas sérica (Zieve y cols, 1951), del método original de van den Bergh, en el que la bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado. La fracción directa reacciona con el ácido sulfanílico en ausencia de alcohol en el término de un minuto, y se considera corresponde a la bilirrubina conjugada (o directa) presente en el suero. La bilirrubina sérica total es la cantidad que reacciona en 30 minutos después de la adición de alcohol.

La fracción no conjugada o indirecta, es la diferencia de las dos anteriores. La bilirrubina sérica total varía entre 0.2-0.9 mg/dL, y alrededor del 30% (0.3m/dL) corresponde al valor de la bilirrubina directa (Zieve y cols, 1951). Aunque existen técnicas nuevas para su determinación, en la mayoría de las situaciones clínicas no se obtienen mayores ventajas para reemplazar a los métodos tradicionales. La bilirrubina presente en suero corresponde al balance entre la producción y la remoción del pigmento, por lo que la hiperbilirrubinemia puede ser el resultado de: 1) sobreproducción; 2) alteraciones en su captación, conjugación o excreción; o 3) regurgitación por daño en los hepatocitos o conductos biliares. Así un aumento en la bilirrubina no conjugada en el suero, indica sobreproducción o alteraciones de su captación o conjugación; en tanto un incremento en la bilirrubina conjugada es causada por disminución de su excreción o regurgitación del pigmento. Hay que considerar que la hiperbilirrubinemia se manifiesta sólo cuando los valores alcanzan al menos dos veces la producción diaria del pigmento (250 a 300 mg) (Raymond y Galambos, 1971).

I.5.2. Marcadores que detectan daño al hepatocito. La elevación en la actividad de una enzima dada en el suero, se considera que es el reflejo del incremento de su salida a partir de las células dañadas. Las determinaciones se agrupan en dos categorías: i) enzimas cuyo incremento en suero, refleja daño generalizado del hepatocito; y ii) enzimas cuyo incremento en suero, refleja colestasis.

Enzimas que detectan necrosis hepatocelular. Se considera que las aminotransferasas (o transaminasas) son indicadores sensibles del daño hepático (Debroe y cols, 1975; Ellis, 1978) y permiten el reconocimiento de enfermedades agudas hepatocelulares, como la hepatitis. Las

determinaciones de las actividades enzimáticas más frecuentemente empleadas son: alanino aminotransferasa (ALT), y la aspartato aminotransferasa (AST). Estas enzimas catalizan la transferencia de los grupo α -amino de la alanina y aspártico, al ácido α -cetoglutarico, generándose los ácidos pirúvico y oxaloacético, respectivamente. La AST se encuentra en hígado, corazón, músculo esquelético, y en menor concentración en riñones, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos; en tanto la ALT está presente en grandes concentraciones en hígado (Boyde y Latner, 1961; Rej, 1978). El aumento de los valores séricos de ambas enzimas se relaciona con daño o destrucción del tejido rico en aminotransferasas, o bien a cambios en la permeabilidad de la membrana que permiten su salida. Normalmente ambas transferasas se encuentran en suero, y sus valores son menores a 30 o 40 UI/l.

Las aminotransferasas suelen elevarse en todos los desórdenes hepáticos, como hepatitis crónica, cirrosis, mononucleosis infecciosa, insuficiencia cardíaca aguda y crónica, carcinoma metastásico y alcoholismo (Zimmerman y West, 1963; Ellis y cols, 1978). Las elevaciones ocho veces por encima de los límites normales son inespecíficas, y pueden hallarse en cualquiera de los padecimientos antes mencionados. Las elevaciones más altas se encuentran asociadas a lesión hepatocelular extensa, como en el uso de drogas, hepatitis viral, insuficiencia cardíaca aguda o en la exposición a hepatotóxicos como el CCl_4 (Dreyfus y cols, 1959; Clermort y Chalmers, 1967). Los valores de AST y ALT pueden elevarse hasta el orden de los miles dentro de las primeras 24 o 48 horas después de una obstrucción aguda, pero rápidamente declinan a sus valores normales; igualmente se elevan en la mayoría de las entidades hepatobiliares, aunque la ALT parece ser más sensible y específica en el daño agudo hepatocelular que la AST, por lo que suele emplearse para conocer la incidencia de la hepatitis viral en estudios epidemiológicos (De Ritis y cols, 1965; 1972)

Hay que señalar que se considera existe pobre correlación entre la extensión de la necrosis del tejido hepático y la elevación de las aminotransferasas, puesto que puede tener poco valor diagnóstico la disminución de valores séricos en la hepatitis fulminante, ya que sólo reflejaría la destrucción masiva y pérdida de hepatocitos viables.

Enzimas que detectan colestasis. Entre estas se cuentan a la fosfatasa alcalina y a la γ -glutamyl transferasa.

Fosfatasa alcalina. Este es el nombre que reciben un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de un gran número de ésteres fosfato a pH alcalino, generando un radical orgánico y fósforo inorgánico. Las fosfatasas alcalinas de diferentes tejidos son isoenzimas porque catalizan la misma reacción, pero tiene diferentes propiedades fisicoquímicas. Las fosfatasas se encuentra en diversas partes de la economía, como osteoblastos, membrana canalicular de los hepatocitos. el borde en cepillo de las células mucosas del intestino delgado, los túbulos proximales del riñón, la placenta y los leucocitos (Kaplan, 1972). Al parecer en hueso se le relaciona con los procesos de calcificación, y en otros sitios con procesos de transporte. aunque su función fisiológica es desconocida (Crofton, 1982). En suero es demostrable la actividad de la fosfatasa alcalina; hay evidencia que en el adulto normal proviene de tres diferentes fuentes: hígado, hueso e intestino, las dos primeras son las más importantes (Kaplan, 1972). Su vida media es de 7 días y su eliminación es independiente de la capacidad funcional del hígado; se desconocen sus sitios de eliminación. El método más ampliamente usado para determinar su actividad, emplea como sustrato al p -nitrofenilfosfato, y se mide la liberación del p -nitrofenol o del fosfato en condiciones específicas de incubación; sus valores se expresan en UI/l. La actividad de la fosfatasa alcalina en los niños es bastante elevada en ambos sexos, y se correlaciona con el crecimiento óseo; en los adolescentes

hombres su valor puede ser tres veces más alto que en los adultos normales, sin que ello implique la presencia de enfermedad hepatobiliar (Clarke y Beck, 1950; Salz y cols, 1973). También se eleva a más del doble al final del embarazo normal.

Se observa elevación de la actividad de la fosfatasa alcalina en varias enfermedades hepatobiliares, por lo que sólo se considera con valor diagnóstico siempre y cuando se encuentre dentro de una batería de marcadores de daño hepático. En los pacientes con daño hepático se cuentan dos posibles mecanismos para su incremento en suero: i) el daño al hígado permite la regurgitación de la enzima al suero y ii) el hígado dañado, particularmente en el caso de la obstrucción hepática, en el que no puede excretar la enzima hacia la bilis que se ha producido en hueso, intestino y el propio hígado (Gutman, 1959). Al parecer, la primera es la más aceptada (Kaplan y Righetti, 1970); la mayoría de las evidencias sugieren que su elevación inicial es debida a su síntesis *de novo* (Kaplan 1970; 1983, 1986) por inducción de los ácidos biliares, y más tarde liberada a la circulación, tal vez por la ruptura de los organelos hepáticos. Bien a bien, no se conoce el mecanismo por el cual la enzima alcanza la circulación. Se le concede el mayor valor diagnóstico en los pacientes que sufren colestasis, en los que los valores se incrementan 4 veces o más, no importando si la obstrucción es intra o extrahepática. Su incremento *per se* no puede distinguir ninguna de las entidades (colédocolitiasis, cáncer, colangitis, hepatitis inducida por fármacos, cirrosis biliar primaria o cirrosis inducida por alcohol); por lo que su valor, como en el caso de las transaminasas debe darse, como ya se mencionó, dentro de una batería de marcadores de daño hepático.

γ -Glutamyl transferasa. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo γ -glutamyl de los péptidos γ -glutamyl, tal como el glutation a otros péptidos y L-aminoácidos. Dentro de los métodos más empleados para su determinación, se usa a la γ -L-glutamyl- ρ -nitroanilida como sustrato y a la

glicilglicina como aceptor (Szasz, 1976), liberándose el grupo cromógeno p-nitroanilida que puede ser medido espectrofotométricamente. La enzima está presente en muchos tejidos incluidos riñones, páncreas, hígado, bazo, corazón, cerebro y vesículas seminales; se considera que participa en el transporte de los aminoácidos, a través de las membranas como parte del ciclo γ -glutamil (Meister y Tatte, 1976). Algunos datos sugieren que la hidrólisis del glutation es su papel fisiológico, más que la transpeptidación (Shaw y Neuman, 1979). Los valores en suero varían entre 0 y 30 UI/l; los valores en niños mayores de 4 años, mujeres y hombres adultos son similares (Lum y Gambino, 1972; Zein y Discombe, 1970), y no suele elevarse durante el embarazo (Lum y Gambino, 1972). La actividad sérica se encuentra elevada en enfermedades hepáticas, de vías biliares y de páncreas, de la misma manera como se ve alterada la fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa y 5'-nucleotidasa, aunque algunos autores consideran más sensible a la γ -glutamil transferasa que a las otras (Lum y Gambino, 1972). El mayor valor clínico recae en el hecho de su especificidad orgánica, ya que no aumenta en enfermedades óseas, como la fosfatasa alcalina (Betro, 1973; Lum y Gambino, 1972). También se halla elevada en individuos que ingieren barbituratos, phenitoina o cantidades excesivas de alcohol (Whitefield y cols. 1973; Whitehead y cols, 1978).

Peroxidación lipídica. De todos es conocido el papel que el oxígeno desempeña en las células vivas, sin embargo también se ha demostrado que puede ser una de las causas de la muerte celular. Durante el metabolismo normal del oxígeno en plantas y animales superiores, la mitocondria produce constantemente una pequeña cantidad de radicales libres. Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones sin aparear en sus orbitales más externos, por lo que son muy reactivos. Suelen reaccionar con proteínas y lípidos alterando las funciones membranales, como en algunas condiciones patológicas y provocar la muerte

celular. Los organismos son casi siempre capaces de atrapar a estos radicales libres, ya que han desarrollado efectivos sistemas antioxidantes, pero no si son producidos en exceso.

Los lípidos poliinsaturados son parte estructural de las membranas, incluidas las membranas plasmáticas, del retículo endoplásmico y de la mitocondria; las alteraciones a sus propiedades estructurales tienen serias consecuencias sobre la función celular. Se ha considerado que el mayor impacto de los radicales libres es sobre los lípidos, ya que causa peroxidación de ellos, por lo que los métodos para medir el daño causado, generalmente se hace midiendo sus productos de reacción con los lípidos. Los radicales libres tienen gran apetencia por los enlaces covalentes ricos en electrones, tales como los de los ácidos grasos poliinsaturados; el resultado es la generación de un radical libre de los ácidos grasos poliinsaturados. Una vez formado el radical libre, éste tiene varias posibilidades (Muriel, 1997): puede tomar una configuración más estable que puede dar lugar una reacción en cascada de peroxidación lipídica; otra posibilidad, es unirse a otro radical libre lipídico o bien a un antioxidante (atrapador de radicales libres) y formar un complejo no reactivo, y finalmente unirse a lípidos de la membrana, provocando disminución de la fluidez membranal. A causa de la reactividad de los radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados, el proceso suele auto-propagarse, por lo que el resultado final, es la ruptura de los componentes integrales celulares, lo que puede facilitar la unión adicional de otros radicales libres o bien de otros productos tóxicos.

En el modelo experimental de daño hepático por CCl_4 , se ha encontrado que en el metabolismo del compuesto existe ruptura de los enlaces C-Cl, lo que da lugar a la formación de radicales libres en el retículo endoplásmico a través del sistema enzimático del transporte de electrones de NADPH al oxígeno; los radicales libres formados ($\text{CCl}_3 \bullet$) se unen precisamente a los lípidos del propio retículo. En la intoxicación aguda, los cambios en las propiedades del retículo

endoplásmico se caracterizan por disminución de varias enzimas microsomales como la ATPasa de Ca^{++} , glucosa 6 fosfatasa, aminopiridin demetilasa y citocromo P-450, además bloqueo para la salida de los triglicéridos hepáticos y alteraciones en la síntesis proteica. Al propagarse el daño dentro de la célula, los daños se hacen evidentes como necrosis central a las 12 horas, y en las siguientes 24 a 48 horas la necrosis es máxima. Se ha propuesto que la rápida peroxidación lipídica de los lípidos estructurales de la membrana, sea la causa de la toxicidad hepatocelular del CCl_4 (Recknagel y cols, 1966; 1973), ya que existe una fuerte evidencia que apoya la correlación entre el metabolismo del CCl_4 , la peroxidación lipídica y el daño al hepatocito (Muriel, 1977).

En el caso del modelo por obstrucción del conducto biliar común en rata, se tienen evidencias contradictorias. Sokol y colaboradores (1991) reportaron peroxidación lipídica en mitocontria en ratas ligadas del conducto biliar, a los 17 días, es decir cuando el daño ya se ha establecido. En tanto, Muriel y Suárez (1994), encontraron que la peroxidación lipídica se incrementaba sólo después de 3 días de haberse producido la ligadura, a pesar de que otros marcadores de daño hepático se incrementaban significativamente 24 horas después de que se producía el daño, por lo que la peroxidación debe ser independiente de la obstrucción biliar y se le puede considerar que sea consecuencia y no causa de la muerte celular. Además establecieron que la colchicina y la vitamina E prevenían el aumento de la peroxidación lipídica en las ratas ligadas, pero no las protegía del daño hepático, por lo que se confirma que la peroxidación lipídica no es el mecanismo central en el daño hepático por obstrucción experimental (Muriel y Suárez, 1994).

I.5.3. Marcadores que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado.

Glucógeno. De todos es bien conocido el importante papel que juega el hígado en el

metabolismo de la glucosa, ya que la circulación de la vena porta le permite ser el primer órgano en recibir no sólo los nutrientes absorbidos, sino las hormonas reguladoras del intestino y páncreas. Una de las funciones metabólicas del hígado es regular los niveles de la glucemia. Los carbohidratos se almacenan a manera de glucógeno en hígado y músculo esquelético; de los 345 g de esta reserva, entre 100 y 110 se hallan en el hígado, el resto distribuido en los músculos.

En el paciente cirrótico se tienen ciertos hallazgos consistentes en: i) hiperinsulinemia crónica, a causa del catabolismo disminuido de la insulina por disfunción hepática y anastomosis portosistémicas, que conducen a alteraciones en la acción de la insulina intracelular en los tejidos periféricos (músculos); pero a pesar de la hiperinsulinemia, no se logra corregir las alteraciones del metabolismo de los carbohidratos; ii) después de la administración oral o intravenosa de una carga de glucosa, la inhibición de la producción de glucosa hepática es normal; iii) la oxidación de la glucosa es normal (Petrídes y cols, 1991); iv) la captación de la glucosa e incorporación en el músculo (captación insulino-dependiente) como glucógeno están seriamente alteradas (Thornburn, 1991), aunque también la captación insulino-independiente se encuentra disminuida (Marchesini, 1990); v) la síntesis de glucógeno (metabolismo no-oxidativo de la glucosa) se encuentra reducida, y al mismo tiempo es responsable de los estados insulino-resistentes periféricos (Krahenbul y cols, 1991; Krusynska y cols, 1988; Mayer-Alber y cols, 1992). En la cirrosis experimental, es posible tomar muestras de hígado en las que se hacen diferentes determinaciones, entre ellas, la concentración de glucógeno.

1.5.4. Marcadores que evalúan el grado de fibrosis. En los casos de daño crónico al hígado existe incremento en la concentración de la colágena. Si se trata de posthepatectomía la

restitución es *at integrum*, y no se pierde la relación normal entre el tejido conectivo y los elementos celulares. Si la restitución es después de la administración crónica de CCl_4 , entonces hay pérdida de la homeostasis y tiene lugar un incremento absoluto del tejido conectivo. La fibrosis hepática refleja cambios cuantitativos y cualitativos de la matriz extracelular, puesto que ésta además de proveer un soporte mecánico, modula el crecimiento, migración, expresión genética y otras importantes funciones celulares, directamente a través de la interacción con los receptores membranales como las integrinas, o indirectamente al atrapar biomoléculas en sus formas activas o inactivas. La arquitectura hepática normal se mantiene por la coordinación en la síntesis, depósito y degradación de la matriz extracelular, y es regulada por complejas interacciones entre los diferentes tipos celulares a través de contactos célula-célula, o por cambios en la expresión de la matriz, o por secreción de mediadores como factores de crecimiento y citocinas. La inflamación, agentes tóxicos o crecimiento tumoral son causa de la pérdida del balance establecido, por lo que las células hepáticas pueden producir y depositar tejido conectivo anormal. Numerosos estudios han demostrado que el hígado fibrótico humano o en el de rata, puede producir cantidades importantes de colágena (Rojkind y Pérez-Tamayo, 1983), y suele acompañarse de cambios en las vías biosintéticas, como incremento en el pool de la prolina libre, en la concentración de RNA_1 , en la concentración del RNA_m para colágena tipo I (Rojkind y Pérez-Tamayo, 1983), de otros tipos de colágena (Ala-Kokko y cols, 1987), y en las actividades de la mayoría de las enzimas post-traduccionales. En la cirrosis experimental en la rata es posible cuantificar directamente el contenido de colágena, midiendo el contenido de hidroxiprolina.

1.5.5. Membrana plasmática: ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} y la relación

colesterol/fosfolípidos. Las ATPasas que se localizan en la membrana plasmática de todas las células animales permiten que se mantengan las concentraciones intracelulares de iones, y el gradiente electroquímico transmembranal (Skou, 1988). Se acepta que el gradiente electroquímico de sodio en el hepatocito provee la fuerza directriz para el transporte acoplado del Na^+ a varios solutos, entre los que se encuentran aminoácidos (Erlinger, 1993) y ácidos biliares (Iga y Klaasen, 1982). Además, el Ca^{++} intracelular es esencial en la regulación de la actividad de varias de las enzimas hepáticas que participan en la gluconeogénesis y glucogenólisis (Hems y Whitton, 1980). También es bien conocido que los eritrocitos son capaces de extruir iones de Ca^{++} a través de la membrana plasmática contra un gradiente de concentración y cuyo mecanismo requiere ATP. Se ha demostrado que las propiedades mecánicas y de permeabilidad de la membrana del eritrocito dependen de los niveles intracelulares de Ca^{++} y ATP (Chau-Wong y Seeman, 1971). La ATPasa de Na^+/K^+ es parte integral de la membrana eritrocítica y media procesos de transporte uabaino-sensibles con requerimientos característicos de cationes y sustratos.

Los principales componentes lipídicos en la membrana plasmática son el colesterol libre y fosfolípidos; las diferencias en la composición de los lípidos en los dominios canalicular y sinusoidal son responsables de las diferencias de fluidez en estas fracciones membranales (Inoue y cols, 1984).

En la membrana canalicular cuya principal secreción son las sales biliares, el contenido de colesterol y fosfolípidos es alto y variable. Los cambios en el contenido de colesterol libre en membranas plasmáticas no hepáticas, se sabe influyen la fluidez de los lípidos, permeabilidad al agua, función enzimática y procesos de transporte (Spector y Yorek, 1985). En la fluidez de la membrana, radica la regulación de las funciones de los transportadores y bombas que se hallan inmersos o atraviesan la capa lipídica (Schachter, 1984). Aunque la fluidez no tiene una definición

precisa, suele entenderse como la relativa libertad de movimientos de los constituyentes membranales, particularmente los lípidos. Las funciones de las proteínas transmembranales requieren cambios conformacionales (Sandermann, 1978), que dependen a su vez de las fuerzas ejercidas por los cambios conformacionales o movilidad lateral de las subunidades de los lípidos membranales. La fluidez de la membrana está determinada por la relación colesterol/fosfolípidos (Schachter, 1984); otros determinantes son las cabezas polares de los fosfolípidos, específicamente la relación esfingomielina/fosfatidilcolina, y la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos (Muriel y Mourelle, 1992).

I.5.6. El eritrocito como marcador de daño hepático. En los embriones de mamíferos, el hígado es el principal sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis, y en ciertos casos de anemia puede retomar dicha función (Erslev, 1993). Al nacimiento, las células progenitoras hematopoyéticas abandonan al hígado y migran a la médula ósea. Al parecer existen profundos paralelismos histológicos y ultraestructurales. Las células progenitoras hepáticas y hematopoyéticas comparten marcadores fenotípicos y hay estudios que señalan la existencia de señales parácrinas (Fu, 1988) entre ambos tipos celulares, por ejemplo, el hígado fetal es el sitio de mayor producción de eritropoyetina, en tanto las interleucinas producidas por las células hematopoyéticas regulan la expresión genética hepática (Fukumoto, 1992; Zsebo y cols, 1990). La organización celular de la médula ósea y del hígado, en ambos es acinar, y al parecer existen sinusoides fenestrados entre las placas celulares (Erslev, 1993). También los tipos celulares son similares, ya que los dos cuentan con fibroblastos, células endoteliales fenestradas, macrófagos y lipocitos; y la química de la matriz extracelular es semejante, ya que es crítica en la regulación del

crecimiento y diferenciación celular (Hasthorpe y cols, 1992; Mayani y cols, 1992). Además se ha demostrado que los cambios que ocurren en las membranas de los eritrocitos en la cirrosis, se asemejan mucho ($p \leq 0.05$) a las alteraciones presentes en las de los hepatocitos, tanto en daño inducido por CCl_4 como por obstrucción biliar (Muriel y cols, 1993).

I.6. Farmacología de la fibrosis.

Síntesis de colágena. Las moléculas de la mayoría de los diferentes tipos de colágena son sintetizadas como precursores que difieren de las moléculas finales, en que tienen segmentos de cadenas peptídicas en los extremos amino y carboxilo terminales. Los precursores se conocen como cadenas pro- α . La biosíntesis de las colágenas recuerda a las de otras proteínas que se secretan, pero se diferencia por la presencia de muchas reacciones inusuales. La característica más importante es que las cadenas polipeptídicas iniciales son modificadas por varios eventos pre y post-traduccionales. Los procesos post-traduccionales se dividen en dos etapas: modificaciones intracelulares, que junto con la síntesis de la cadena da como resultado la formación de la tripe-hélice de procolágena, y las modificaciones extracelulares que llevan a la formación de estructuras supramoleculares. Las cadenas extras de las procolágenas deben ser eliminadas antes de la formación de la estructura supramolecular final; aunque la biosíntesis de la colágena tipo IV se ensambla sin eliminar parte alguna de la molécula original. Los procesos post-traduccionales requieren al menos nueve enzimas específicas y muchas otras más no-específicas (Kivirikko y Myllylä, 1985). Las modificaciones que ocurren dentro del retículo endoplásmico requieren tres hidroxilasas y dos glicosiltransferasas específicas, y también varias enzimas no-específicas que catalizan la hidrólisis del péptido de señal, la glicosilación de los residuos de asparagina y la

formación de los enlaces disulfuro intra e intercatenarios. Las modificaciones extracelulares requieren peptidasas, que rompen los péptidos de los extremos amino y carboxilo terminales; además una lisil-oxidasa que inicia la formación de los enlaces cruzados cuando oxida algunos de los residuos de la lisina e hidroxilisina para formar los derivados aldehídicos. Estas enzimas requieren varios cofactores o cosustratos, por ejemplo las tres hidroxilasas requieren ascorbato.

Degradación de colágena. Las fibras de colágenas y otra estructuras supramoleculares son hidrolizadas fuera de la célula. Las enzimas responsables son las colagenasas, algunas proteinasas neutras como la elastasa de los granulocitos, y algunas catepsinas lisosomales (Pérez-Tamayo, 1982; Harris y cols, 1984). Las colágenas intersticiales I, II y III son hidrolizadas por una sola colagenasa, que rompe la triple-hélice lejos del extremo amino; los dos péptidos producidos se desnaturalizan a la temperatura corporal y son susceptibles de nuevas hidrólisis por otras proteinasas neutras y enzimas lisosomales ácidas. Las fibras de colágena que carecen de enlaces cruzados son hidrolizadas más fácilmente que aquellas que los poseen. Las colagenasas intersticiales de diferentes orígenes, son metaloproteínas que actúan a pH neutro y requieren Ca^{++} y Zn^{++} . Las colágenas tipo IV y V son resistentes a las colagenasas intersticiales, no así a la colagenasa tipo IV. Varios tipos celulares como fibroblastos, macrófagos y neutrófilos, sintetizan y secretan colagenasas (Pérez-Tamayo, 1982; Harris, 1984). Los fibroblastos sintetizan su colagenasa en forma de proenzima, que es activada por varias proteínas extracelulares como la calicreina, plasmina y proteinasas de los mastocitos. Al parecer el control de la actividad de las colagenasas extracelulares está dada por inhibidores de dos orígenes principales. la plasmática y la del propio tejido. De los inhibidores plasmáticos, uno no es específico, la α -2 macroglobulina, y otro sí lo es. la β -1 anticolagenasa; se les conoce como inhibidores de las metaloproteinasas de

los tejidos (TIMP) (Pérez-Tamayo, 1982; Haréis, 1984). De esta manera, la degradación de la colágena, depende de las concentraciones locales de las colagenasas y de sus inhibidores.

La síntesis de colágena es un proceso multifásico que consiste de al menos: i) transcripción de los genes de colágena y traducción de los respectivos RNA_m, y un número de modificaciones postraduccionales ii) intracelulares y iii) extracelulares. Por lo que parece evidente que la biosíntesis puede modularse en diferentes etapas (Fuller, 1981; Uitto y cols, 1984). La inhibición de algunos de los eventos post-traduccionales podría reducir la formación de fibras de colágena y de otras estructuras supramoleculares, mientras que la inhibición de otros conduciría a la acumulación de fibras con propiedades alteradas. Las modificaciones post-traduccionales que parecen más accesibles a la modulación farmacológica son la formación de la triple hélice, la ruptura de las moléculas de procolágena y la formación de los enlaces cruzados de lisina e hidroxilisina. La inhibición de la formación de la triple hélice, puede efectuarse interfiriendo la hidroxilación de la prolina, o administrando ciertos análogos de la misma que conducen a proteínas no-funcionales cuya secreción está retardada y pueden ser rápidamente degradadas. La inhibición de la ruptura del carboxilo terminal de los propéptidos puede prevenir la formación de fibras; en tanto la inhibición de la ruptura de los amino terminales conducen a la formación de fibras delgadas con propiedades mecánicas disminuidas. Si la inhibición es de la formación de los enlaces cruzados, entonces las fibras formadas tienen propiedades funcionales reducidas y un índice de degradación mayor.

I.6.1. La Colchicina.

La colchicina es un alcaloide que se extrae de *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba*.

Es ampliamente conocida su capacidad para detener la división celular en la metafase, ya que tiene gran afinidad por la tubulina. La colchicina se ha empleado de mucho tiempo atrás dada su reconocida efectividad como antiinflamatorio y antigotoso (Wallace, 1975) y mucho más recientemente como hepatoprotector (Rojkind y Kershenobich, 1975; Kershenobich y cols, 1979 y 1988; Mourelle y cols, 1981; Yahuaca y cols. 1985; Mansour, 1988; Mourelle y cols, 1988; Mourelle y Meza, 1989; Muriel y Mourelle, 1992; Muriel y cols, 1993; Martínez y cols, 1995).

Se ha postulado que el efecto antiinflamatorio de la colchicina se debe a la inhibición de la citotoxicidad mediada por polimorfonucleares (PMN), la que se halla asociada a fenómenos como la fagocitosis, quimiotaxis, motilidad, vacuolización lisosomal y degranulación, eventos todos que contribuyen a la respuesta inflamatoria (Malawista, 1968). También se ha sugerido que los estímulos sobre linfocitos y monocitos en la respuesta inflamatoria crónica, son determinantes en la fibrosis hepática ya que se estimula la producción de interleucina 1 que puede jugar un papel modulador en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular; al parecer la colchicina es capaz de modular la producción de interleucina 1 (Kershenobich y cols, 1990; Greenwel y cols, 1995).

La colchicina inhibe la síntesis de colágena (Mansour y cols, 1988; Greenwel y cols, 1995). También se ha demostrado que la colchicina induce la producción de colagenasa (Haréis y Krane, 1971; Mansour y cols, 1988). Otras acciones de la colchicina suponen que es capaz de disminuir los niveles de colesterol en las membranas plasmáticas de los hepatocitos de animales cirróticos (Yahuaca y cols, 1985).

La colchicina protege al glutatión reducido de la oxidación por oxígeno atmosférico, e impide la inactivación de las enzimas cuyo centro catalítico contiene grupos sulfhidrilo (Schnell y

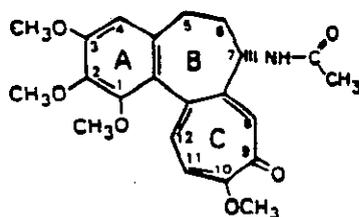
cols. 1976). Además se considera que la colchicina es un atrapador de radicales libres (Muriel y Suárez. 1994).

Entre los efectos colaterales de la colchicina se cuentan la náusea, el vómito y la diarrea, estos efectos se deben a que la colchicina (por su efecto antimitótico) interfiere con la rápida división de las células del tubo digestivo; otras manifestaciones menos frecuentes, pero más serias son agranulocitosis, depresión de la médula ósea, pérdida de cabello, daño neurológico y muerte (Brown y Seed, 1945; McLeod y Phillips, 1947; Sánchez y Mourelle, 1987).

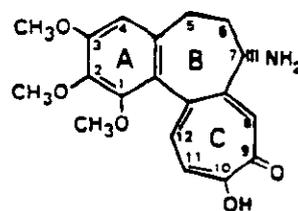
Se han preparado una gran cantidad de análogos de la colchicina, los que de acuerdo a su estructura se dividen en dos categorías, aquellos que se consideran derivados del ácido trimetilcolchicínico (TMCA) y aquellos relacionados con el colchinol.

1.6.2. El ácido trimetilcolchicínico (TMCA)

El TMCA tiene la estructura básica de la colchicina, la diferencia estriba en que en el caso de la molécula del TMCA, el anillo B no posee el grupo acetilo, y en el anillo C el grupo metoxilo está sustituido por un grupo hidroxilo, como se puede apreciar en las siguientes fórmulas:



Colchicina



Acido Trimetilcolchicínico

La toxicidad de la colchicina ha sido atribuida a su capacidad para unirse a los microtúbulos (Marchand y Singh, 1973; Stein y Stein, 1973). A diferencia de la colchicina, el TMCA no se une a los microtúbulos. Ya desde 1936, Brues y Cohen reportaron que el TMCA no tiene efecto antimitótico en el hígado de ratas en regeneración si se administran hasta 200 mg/kg; Lettre (1943) encontró que tampoco se une a los microtúbulos de los fibroblastos de pollo en cultivo en concentraciones de dos a diez mil veces más elevadas que las concentraciones de la colchicina; tampoco se une a microtúbulos en el sarcoma 180 de ratón, aún si las concentraciones de TMCA son mil veces más elevadas que las de la colchicina (Goldberg y cols, 1950). La carencia de efecto antimicrotubular del TMCA garantiza que los efectos tóxicos de la colchicina atribuibles a su interacción con los microtúbulos no se presentaran con la administración del TMCA. Es importante averiguar ahora si el TMCA conserva las propiedades hepatoprotectoras de la colchicina.

II. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto farmacológico del ácido trimetilcolchicínico en la cirrosis hepática inducida en dos diferentes modelos de daño experimental.

Particulares

1. Comparar y evaluar la capacidad de la colchicina y del ácido trimetilcolchicínico para prevenir la cirrosis experimental inducida por la ligadura del conducto biliar común en la rata.
2. Evaluar la capacidad del ácido trimetilcolchicínico para revertir la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono en la rata.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

La colchicina y el ácido trimetilcolchicínico (TMCA) utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. ST. Luis, MO USA. El resto de los reactivos fueron grado analítico y de la mejor calidad comercial disponible. En todos los casos se utilizaron ratas macho Wistar del bioterio del CINVESTAV.

III.1. Diseño experimental para comparar el efecto hepatoprotector entre la colchicina y el ácido trimetilcolchicínico en la prevención de la cirrosis experimental por ligadura del conducto biliar común.

Para comparar el efecto entre la colchicina y el ácido trimetilcolchicínico (TMCA), los animales se dividieron en 6 grupos; cada uno formado por 15 animales. El grupo 1 fue sometido a operación falsa (grupo control); el grupo 2 fue sometido a la ligadura del conducto biliar común (LCBC); al grupo 3 con LCBC se le administró colchicina a razón de 10 μ g/rata/día por vía intragástrica; a los grupos 4, 5 y 6 con LCBC, se les administró el TMCA a dosis de 10, 50 y 100 μ g/rata/día respectivamente, por vía intragástrica (ver esquema de tratamiento). Los tratamientos se iniciaron después de la cirugía y se prolongaron durante dos meses; después de ese tiempo los animales fueron sacrificados bajo anestesia superficial con éter, se les extrajo de 10 a 12 ml de sangre por punción cardíaca, y se tomaron muestras de tejido hepático. Para obtener el suero, la sangre se centrifugó a 3000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6, a 4°C durante 10 min; el paquete se empleó para la obtención de las membranas de los eritrocitos. En el suero se hicieron las

siguientes determinaciones bioquímicas: cuantificación de bilirrubinas y determinación de las actividades enzimáticas de la fosfatasa alcalina, la γ -glutamyl transferasa, y de la alanino amino transferasa; en tanto que en las muestras hepáticas se cuantificó el contenido de glucógeno, de colágena, y se aislaron las membranas plasmáticas de los hepatocitos (ver esquema experimental).

Esquema de Tratamiento

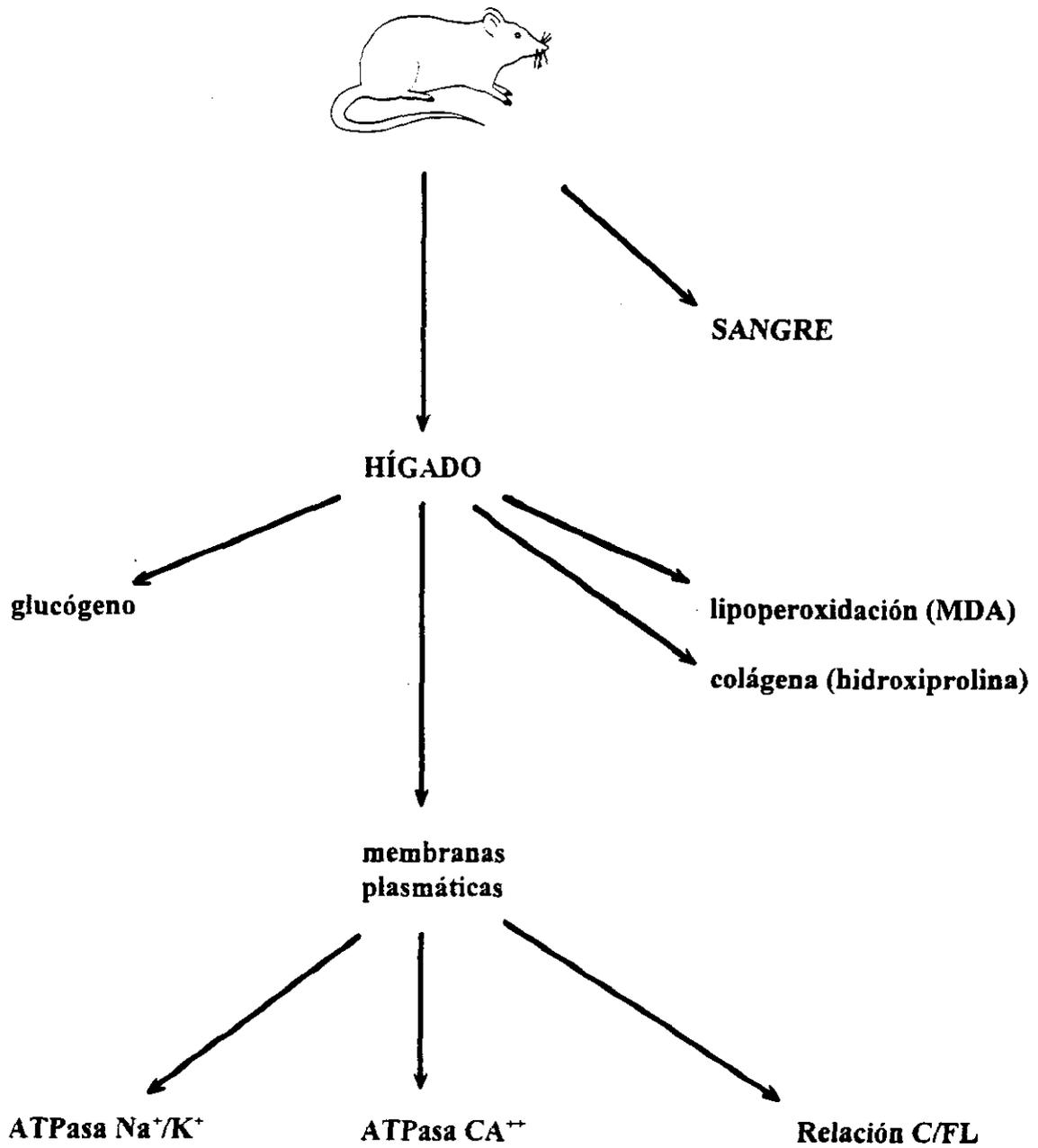
Operación Falsa							
LCBC							
LCBC + COLCHICINA (10 μ g/rata/día)							
LCBC + TMCA (10 μ g/rata/día)							
LCBC + TMCA (50 μ g/rata/día)							
LCBC + TMCA (100 μ g/rata/día)							
1	2	3	4	5	6	7	8

SEMANAS

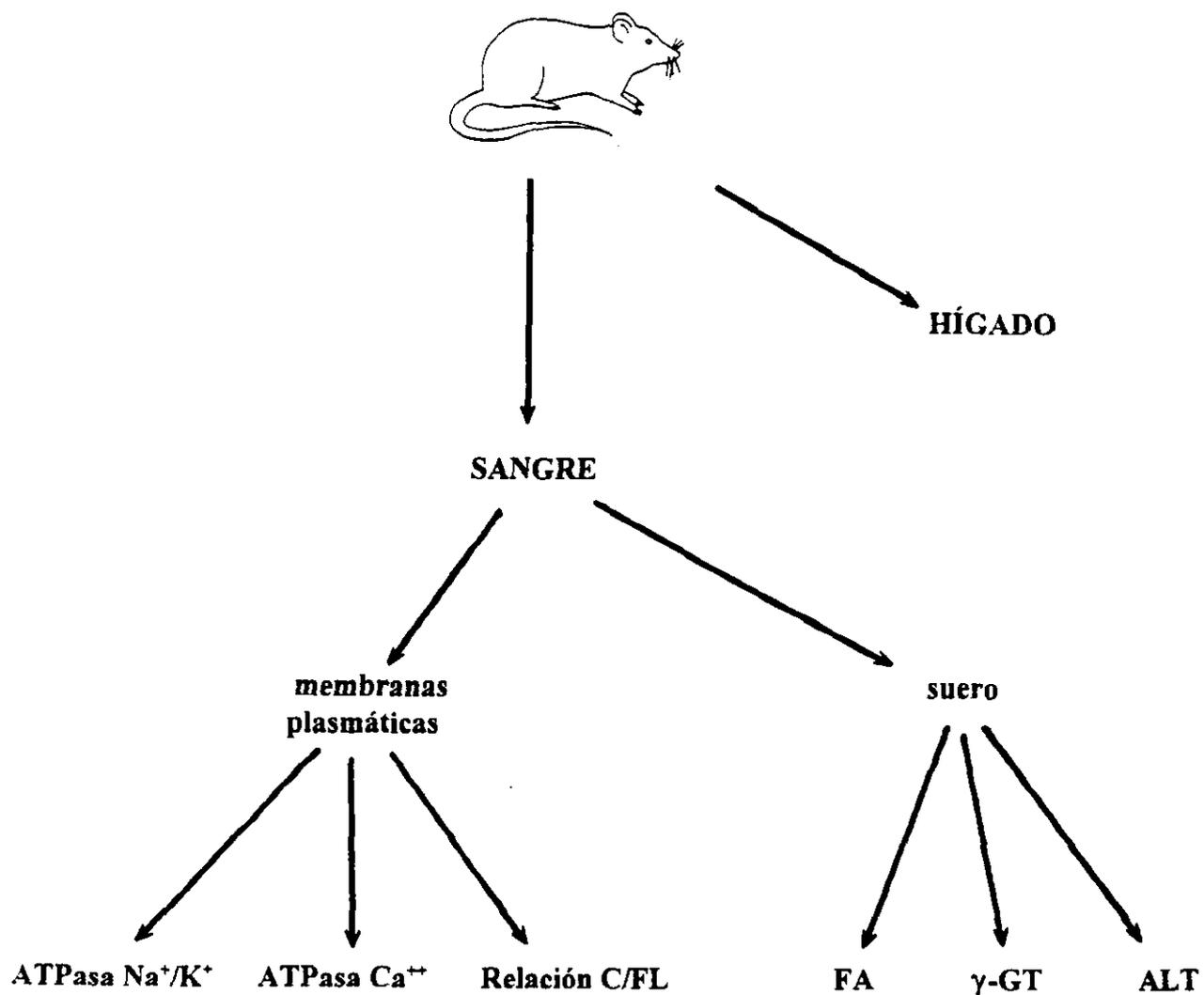
III.2. Diseño experimental para evaluar la capacidad del ácido trimetilcolchicínico para revertir la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono.

Los animales se dividieron en 4 grupos de 10 ratas cada uno. Al grupo uno o control se le administró aceite mineral (vehículo); el grupo 2 recibió CCl_4 durante 8 semanas; a los grupos 3 y 4 se les administró CCl_4 por 8 semanas (ver modelo experimental de intoxicación crónica con CCl_4), y una vez establecido el daño, un grupo recibió solución salina y el otro TMCA durante otras 6 semanas (ver esquema de tratamiento). La dosis de TMCA fue de 100 μ g/rata/día por vía

ESQUEMA EXPERIMENTAL I



ESQUEMA EXPERIMENTAL II



intragástrica. Una vez terminado el tratamiento, el sacrificio de los animales y la toma de muestras se realizaron de la misma manera que en el caso anterior.

Esquema de Tratamiento

Control (aceite)													
Tetracloruro de Carbono													
Tetracloruro de Carbono								Solución Salina					
Tetracloruro de Carbono								TMCA (100 µg/rata/día)					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

S E M A N A S

III.3. Procedimiento quirúrgico para ligar del conducto biliar común.

Para ligar el conducto biliar común (LCBC), se utilizó el modelo de Kountouras (1984). Se emplean ratas macho Wistar de 200g. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (0.315 g/kg) y previa asepsia, se efectúa incisión media en la región abdominal 1 cm por debajo de la apéndice xifoideas; la incisión es de aproximadamente de 0.5 cm y abarca hasta el peritoneo. Una vez localizado el duodeno, se extrae de la cavidad, donde fácilmente se visualiza al conducto biliar común que se obstruye con doble ligadura con hilo seda 2-0, y luego se secciona. Posteriormente se afrontan planos; el músculo se sutura con catgut crómico 4-0, y la piel con nylon monofilamento 4-0. Cuando los animales se recuperan de la anestesia, se les mantiene entre 21 y 27°C de temperatura. Al grupo control (operación falsa) se le somete al mismo procedimiento, pero no se liga el conducto.

III.4. Procedimiento experimental de intoxicación crónica con tetracloruro de carbono (CCl₄).

Se utilizó el modelo de Ehrinpreis (1980). Se emplean ratas macho Wistar de peso entre los 60 y 100 g. El CCl₄ se disuelve en aceite mineral (Sigma), y se les administra 0.15 ml por vía intraperitoneal, 3 veces a la semana, durante 2 meses. La solución CCl₄-aceite (v/v) se modifica cada semana para compensar la dosis con el crecimiento del animal. Durante la primera semana se utiliza una solución 1:7; en la segunda semana 1:6; en la tercer semana 1:5, y de la cuarta a la octava semanas 1:4. La modificación de la concentración del CCl₄ también compensa la reducción de la sensibilidad al CCl₄, ya que el daño hepático progresivo provoca disminución del citocromo P₄₅₀ necesario para su metabolismo (Proctor y Chatamra, 1982). Los animales se mantienen entre 21 y 27°C de temperatura.

III. 5. Técnicas.

III.5.1. Determinación sérica de bilirrubina total y bilirrubina directa.

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado, un colorante azoico, que en solución neutra es rojo y azul en solución alcalina. La bilirrubina directa hidrosoluble reacciona directamente, mientras que la bilirrubina indirecta reacciona sólo en presencia de un acelerador. 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 (acelerador). Con la solución alcalina de Fehling, se forma azobilirrubina azul cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (coloración mixta verde) de manera selectiva por espectrofotometría a 578 nm. La bilirrubina directa se mide como colorante azoico rojo, sin añadir álcali a 546 nm. La bilirrubina indirecta se obtiene de la diferencia entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa. Todas las determinaciones se hicieron con el kit Merck.

III.5.2. Determinación sérica de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Este método se basa en la hidrólisis por la fosfatasa alcalina del ρ -nitrofenilfosfato, para producir fosfato inorgánico y ρ -nitrofenol, el que se lee a 410nm (Bergmeyer y cols, 1983).

En los tubos de ensayo la mezcla de reacción se compone de: 0.25 ml de amortiguador de glicina 0.1M con $MgCl_2$ 1mM a pH 10, y 0.25 ml de sustrato de ρ -nitrofenilfosfato (100mg en 25 ml de agua). La mezcla se incuba en baño maría a 37° C por 5 minutos; la reacción se dispara al agregar 50 μ l de suero, se agita y se incuba nuevamente a 37°C por 30 minutos. La reacción se detiene al adicionar 5 ml de NaOH 0.02N. En el blanco se sustituyen los 50 μ l de suero por 50 μ l de agua. La actividad enzimática se determina al interpolar el valor en una curva estándar de ρ -

nitrofenol, y se reporta en μ moles de sustrato hidrolizado por litro de suero por minuto.

III.5.3. Determinación sérica de la actividad de la γ -glutamyl transferasa.

En este método se utiliza como sustrato a la γ -glutamyl- ρ -nitroanilida que en presencia de la enzima γ -glutamyl transferasa y de un receptor del grupo γ -glutamyl (glicil-glicina), produce γ -glutamylglicil-glicina y ρ -nitroanilina que puede ser cuantificada por espectrofotometría a 410 nm (Glossmann y Neville, 1972).

La mezcla de reacción contiene: 400 μ l de Tris-HCl 200 mM a pH 8.2; 100 μ l de $MgCl_2$ 200 mM; 100 μ l de glicil-glicina 40 mM pH 8.2 y 200 μ l de γ -glutamyl- ρ -nitroanilida 10 mM. La mezcla de reacción se incuba en baño maría a 37°C durante 10 minutos, y se inicia la reacción al agregar 200 μ l de suero. Después de 30 minutos la reacción se detiene agregando 2 ml de ácido acético 1.5 M. En el blanco se sustituyen los 200 μ l de suero por agua. La actividad enzimática se determina interpolando el valor de la muestra en una curva estándar de ρ -nitroanilina, y se reporta en μ moles de sustrato hidrolizado por litro de suero por minuto.

III.5.4 Determinación sérica de la actividad de la alanino amino transferasa.

La actividad de la alanino amino transferasa se determina por el método de Reitman-Frankel (1957), en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que absorbe a 515 nm. La solución sustrato contiene 1.78 g de L-alanina y 30 mg de α -oxoglutarico en 100 ml de solución buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4. El reactivo cromógeno es una solución 1 mM de 2-4 dinitrofenilhidrazina en HCl. La mezcla de reacción contiene 250 μ l de solución sustrato y 50 μ l de suero problema que se incuban durante 60 min a

37°C; al término de la incubación se agregan 250 μ l de reactivo cromógeno, y se incuba nuevamente 5 minutos más. La reacción se detiene con 2.5 ml de NaOH 0.4N. Cada muestra se acompaña de su propio blanco, en el que el suero es sustituido por un volumen igual de agua. La actividad de la enzima se determina interpolando el valor de las muestras en una curva estándar de piruvato; se reporta en μ moles por litro por minuto.

III.5.5. Determinación del contenido de glucógeno hepático.

El procedimiento consiste en hidrolizar a ebullición el tejido hepático con KOH al 30%. La glucosa resultante se cuantifica colorimétricamente con antrona (Seifter y cols, 1950).

Las muestras de 0.5 g de hígado se hidrolizan con 1.5 ml de KOH al 30%, calentando a ebullición durante 30 minutos. La solución resultante se afora a 25 ml con agua; a partir de esta dilución se obtiene una segunda, con 2 ml de la primera y aforando nuevamente a 25 ml, para que la concentración final oscile entre 3 a 300 μ g/ml de glucosa. A un ml de esta segunda dilución se agregan 2 ml del reactivo de antrona al 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se hace un estándar que contenga 20 μ g/ml de glucosa. Los tubos se sellan y colocan en baño a ebullición durante 15 minutos. En el blanco se sustituye el homogenado por un volumen igual de agua. Las muestras se leen a 620 nm.

III.5.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

El método se fundamenta en que uno de los productos terminales de la peroxidación de los lípidos es el malodialdehído (MDA), de tal manera que la cuantificación de MDA es un índice del grado de peroxidación lipídica. Dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una

molécula de MDA, formando un pigmento rojo que absorbe a 535 nm (Ohkawa y cols, 1979).

Se homogeneizan 0.5 g de hígado con 5 ml de agua tridestilada, por lo que su concentración final es del 10% (P/V). La mezcla de reacción contiene: 300 µl del homogenado y 700 µl de Tris-HCl 150 mM pH 7.4, que se incuba durante 30 minutos a 37°C. Al término, se le adicionan 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético al 15%. Los tubos se sellan y colocan en baño a ebullición durante 60 minutos. Después se centrifugan a 3000 rpm en una centrifuga Beckman TJ-6 durante 10 minutos; el sobrenadante se lee a 532 nm. En el blanco se sustituye el homogenado por un volumen igual de agua. El resultado se expresa como nmoles de MDA por mg de proteína.

III.5.7. Determinación de proteínas.

La determinación se efectúa por el método de Bradford (1976), en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomassie G-250. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. La formación del complejo colorante-proteína es virtualmente completo, rápido y permanece en solución por un tiempo relativamente largo (una hora). Se lee a 595 nm.

La mezcla de reacción se compone de 100 µl de homogenado de hígado al 10% P/V (ó membranas) se agregan 900 µl de agua tridestilada. De esta dilución se toman 20 µl y se agregan 80 µl más de agua; a continuación a cada tubo se añaden 2.5 ml del reactivo de Bradford. Las muestras se leen a 595 nm. El valor de la muestra se determina interpolándolo en una curva estándar de albúmina sérica bovina.

III.5.8. Determinación de colágena.

La determinación se basa en la cuantificación del contenido de hidroxiprolina en muestras de tejido de hígado fresco, después de la digestión con ácido. Se efectúan dos oxidaciones subsecuentes, la primera oxidación es de la prolina con Cloramina T, en tanto la segunda oxida a la hidroxiprolina al someter a ebullición la muestra. En ambas oxidaciones, los productos se extraen con tolueno. Una alícuota de la segunda extracción se hace reaccionar con el reactivo de Ehrlich, y la absorbancia se lee a 560 nm (Peterkofsky y cols, 1962; Rojkind y González, 1974).

Para la hidrólisis del tejido se emplean ampollitas de vidrio, en las que se depositan 0.1g de hígado y 2 ml de HCl 6N; luego se sellan con calor. La hidrólisis dura 24 hs a 100° C. Al término se rompen las ampollitas y se seca su contenido a la misma temperatura por otras 24 hs. Posteriormente se resuspende el contenido, y se lava la ampollita con un volumen total de 3 ml de solución buffer de acetato de sodio-ácido cítrico a pH 6; las muestras se centrifugan a 3000 rpm en una centrífuga Beckman JA-6 durante 15 minutos. Al sobrenadante se le agrega una pequeña porción de anorita, se agita durante 1 minuto, y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones. Si el sobrenadante no es completamente transparente, se repite la operación una vez más.

Para llevar a cabo la primera oxidación se emplean tubos de rosca en los que se colocan 1 ml del sobrenadante anterior, 1 ml de agua y 1 ml de solución de Cloramina T 0.06M; después de 20 minutos de reposo a temperatura ambiente, la reacción se detiene con 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1 ml de NaOH 1N y con aproximadamente 2 g de NaCl. La mezcla se agita inmediatamente. Se agregan 6 ml de tolueno a cada muestra y se agitan durante 1 minuto; de la bifase se elimina la capa de tolueno, y la fase acuosa se somete a ebullición durante 20 minutos.

Durante este paso se efectúa la segunda oxidación ya antes mencionada. Se añaden 6 ml más de tolueno y se agita también durante 1 minuto. Finalmente a una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno, se le hace reaccionar con 4 ml del reactivo de Ehrlich, y se agita vigorosamente. La muestra se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente, y se lee a 560 nm.

III.5.9. Obtención de las membranas plasmáticas de hepatocitos.

El procedimiento empleado es el método descrito por Neville (1960) y modificado por Pohl y cols. (1969). El método consiste en romper todas las células y la mayoría de los núcleos al homogeneizar el hígado con NaHCO_3 1 mM; al filtrarlo se eliminan las nucleoproteínas precipitadas. Finalmente se eliminan los fragmentos celulares restantes, al formar un gradiente de concentración de sacarosa, en el que flotan las membranas.

Una vez extraído el hígado y colocado en recipientes sobre hielo, se quita el tejido conectivo adyacente y se desmenuza con tijeras lo más finamente posible. Los fragmentos de hígado se pasan a un homogenizador (Dounce), se agregan 25 ml de NaHCO_3 1 mM, y se homogeneizan con 8 golpes usando el émbolo flojo. El homogenado se lleva a 250 ml, se agita y se filtra primero a través de gasa doble y luego cuádruple. El filtrado se vierte en botellas de 250 ml y se centrifugan a 4000 rpm en rotor JA-14 centrífuga Beckman J-6M, durante 30 minutos; el sobrenadante se desecha y se resuspende el paquete en un volumen mínimo. Las pastillas resuspendidas, se homogeneizan con 3 golpes con el émbolo flojo. El homogenado se lleva a una concentración final del 44%, con una solución de sacarosa al 69%, mezclando un volumen del homogenado y 1.76 volúmenes de la sacarosa. El ajuste se hace con un refractómetro Abbe. La suspensión formada se vacía a tubos de ultracentrífuga de 38.5 ml, y se les agrega sacarosa al 42% en el volumen necesario para llenar el

tubo con el objeto de formar un gradiente. Se centrifugan a 4°C durante 150 minutos, a 25 000 rpm en un rotor SW.28 en una ultracentrífuga Beckman L8-70. El material que flota después de la centrifugación, corresponde a la fracción de las membranas plasmáticas. Éstas se recogen con una espátula y con 2 ml de NaHCO₃ 1mM, se pasan a través de jeringas con agujas del no. 18 primero, y luego del no. 20. Para eliminar el exceso de sacarosa, se agregan 8 ml más de NaHCO₃ 1mM, y vuelve a centrifugarse a 4°C, a 15 000 rpm en un rotor JA-20 en una centrífuga J2-21, durante 15 minutos. El sobrenadante se elimina y las pastillas se resuspenden en un volumen mínimo de NaHCO₃ 1 mM, y se almacenan a -70°C hasta su utilización.

III.5.10. Obtención de las membranas plasmáticas de los eritrocitos.

Se aíslan según el método de Reinols (1982). Se obtiene la sangre por punción cardíaca y se centrifuga a 4°C, a 4 000 rpm en un rotor JA-20 en una centrífuga Beckman J2-21, durante 15 minutos. Se elimina el suero y los eritrocitos se resuspenden con 5-10 volúmenes de solución salina (NaCl 0.9%); se vuelven a centrifugar durante 15 minutos, bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se elimina y se agregan 30 ml de una solución Tris HCl 10 mM pH 7.4 y EGTA 0.1 mM; se agita fuertemente y se centrifuga a 4°C, a 15 000 rpm en un rotor JA-20 en una centrífuga Beckman J2-21, durante 20 minutos. El lavado se repite 2 veces más. Las pastillas se resuspenden en 1 ml de la misma solución Tris HCl, se congelan en nitrógeno líquido, y se llevan a baño maría de 37°C. Este procedimiento se repite 3 veces más. Se almacenan a -70°C.

III.5.11. Extracción de los lípidos de las membranas plasmáticas de los hepatocitos y de los eritrocitos.

El procedimiento es el de Folch y colaboradores (1957). Este método consiste de dos pasos. En el primero los lípidos son extraídos homogeneizando las membranas con cloroformo y metanol; en el segundo paso, el filtrado, que contiene los lípidos de las membranas pero que se acompañan de otras sustancias no-lipídicas, se lava con soluciones polares para eliminarlas.

A N ml de muestra se añaden lentamente 5 X N ml de metanol en matraz con agitación suave durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se agrega 5 X N ml de cloroformo agitando vigorosamente. Después de 15 minutos se filtra la solución con papel Whatman No 1. Al residuo se le hacen 2 extracciones más de la misma manera. Los filtrados se combinan y se evaporan a sequedad en corriente de nitrógeno. El residuo se extrae con cloroformo, metanol y KCl 0.1M en la proporción 5:3:2 x N; la fase orgánica se evapora en atmósfera de nitrógeno. La resuspensión se hace en 1.0 x N ml de benceno.

III.5.12. Determinación de los fosfolípidos totales en los extractos lipídicos de membranas.

Los extractos lipídicos proveniente de las membranas plasmáticas de los hepatocitos o de los eritrocitos (correspondientes a 40µg de proteína), se calcinan con 60 µl de $Mg(NO_3)_2$ al 10% en etanol, para que todo el fósforo procedente de los fosfolípidos se transforme a fósforo inorgánico y efectuar la reacción de Ames (1966), en la que el ácido ascórbico reduce al complejo de fosfomolibdato. Se puede detectar fácilmente 0.01 µm de fosfato. En las muestras el contenido de fósforo inorgánico es equivalente a la cantidad molar total de los fosfolípidos presentes. Los

valores de las muestras se interpolan en una curva estándar de fósforo inorgánico que se lee a 820 nm.

Para la reacción de Ames se requieren KH_2PO_4 10 mM en H_2SO_4 0.1N y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7$ al 0.42% en H_2SO_4 1N. A las muestras calcinadas se les agregan 0.3 ml de HCl 0.1N y se hierven durante 15 minutos. Luego se agregan a cada una de ellas 0.3 ml de H_2O bidestilada, 0.2 ml de ácido ascórbico al 10% y 1.2 ml del molibdato de amonio. Se incuban a 37° C durante 30 minutos. Se leen a 820 nm.

III.5.13. Determinación de colesterol en los extractos lipídicos de membranas.

El procedimiento empleado es el de Abell y colaboradores (1952). Para la determinación de colesterol se requieren: una solución de KOH que se prepara al momento tomando 6 ml de KOH al 33% en agua y agregando 94 ml de etanol, y el reactivo de Liebermann-Buchard que contiene una relación 20:1:10 de anhídrido acético, H_2SO_4 concentrado y ácido acético glacial.

A una muestra de 300 a 700 μl del extracto lipídico se le agregan 2.5 ml de solución de KOH alcohólica, y se incuba a 37° C durante 55 minutos. Después de enfriar se agregan 5 ml de éter de petróleo frío, y se mezcla y adicionan 2.5 ml de agua. Se agita durante un minuto y se permite que se rompa la emulsión. Dos alícuotas de 2 ml se evaporan a sequedad a 60°C. Cuando la muestra está fría se agrega 1 ml del reactivo de Liebermann-Buchard. Después de reposar a temperatura ambiente de 30 a 35 minutos se lee a 620 nm.

III.5.14. Medición de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ en la membrana plasmática del hepatocito.

Este método mide la cantidad de P_i desprendido del ATPasa de Na^+/K^+ mediante la formación de un complejo colorido con molibdato de amonio en presencia de ácido ascórbico (Ames, 1966).

El medio estándar para cuantificar la actividad total de ATPasa de Na^+/K^+ , contiene en 0.5 ml: 150 mM NaCl , 5 mM KCl , 2.5 mM MgCl_2 , 2.5 mM ATP de 60 a 80 μg de proteína membranal, y 20 mM de imidazol, como amortiguador. El pH de la solución se ajusta a 7.8 a 37°C . La ATPasa activada por Mg^{++} se mide en un medio idéntico, que incluye 1 mM de ouabaína. La diferencia entre las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ . Las incubaciones se llevan a cabo a 37°C durante 30 minutos. Para detener la reacción se agregan 100 μl de ácido tricloroacético al 35% (p/v). Se toman alícuotas de 0.02 ml para determinar el fósforo inorgánico.

III.5.15. Medición de la actividad de la ATPasa de Ca^{++} de alta afinidad de la membrana plasmática del hepatocito.

El medio de incubación contiene en 0.5 ml: 0.4 mM CaCl_2 , 0.4 mM EGTA, 0.25 mM ATP, 50 mM Tris-HCl a pH 7.4, y de 60 a 80 μg de proteína membranal. El otro medio de incubación es idéntico pero sin Ca^{++} . La diferencia entre las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Ca^{++} de alta afinidad (Lotersztajn y Pecker, 1982). Las incubaciones se llevan a cabo a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene agregando 100 μl de ácido tricloroacético al 35%. El fósforo inorgánico se determina con la reacción de Ames (1966).

III.5.16. Medición de la actividad de la ATPasa de Na⁺/ K⁺ de la membrana de eritrocito.

La actividad de ATPasa de Na⁺/K⁺ de los eritrocitos se mide de manera similar que la de la membrana plasmática de los hepatocitos, pero utiliza diferentes concentraciones de reactivos en la mezcla: 100 mM NaCl; 10 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 2.5 mM ATP, 30 mM de Imidazol ajustando el pH a 7.4, y membranas de eritrocitos (40 µg de proteína) con o sin 1 mM de Ouabaína (Lee y Au, 1983). El volumen final del medio es de 0.5 ml. La reacción se detiene agregando 100 µl de ácido tricloroacético al 35%. El fósforo inorgánico liberado se determina por el método de Ames (1966). La resta de las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺.

III.5.17. Medición de la actividad de la ATPasa de Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺ de las membranas de los eritrocitos.

El medio de ensayo en 0.5 ml contiene: 80 mM NaCl, 28 mM KCl, 3.6 mM MgCl₂, con o sin CaCl₂, 0.1 mM EGTA, 2.5 mM ATP, 0.1 mM ouabaina, 20 mM imidazol ajustado a pH 8.0 y 40 µg de proteína. La reacción se detiene agregando 100 µl de ácido tricloroacético al 35%. El fósforo inorgánico se mide con la técnica de Ames (1966). La actividad de la ATPasa de Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺ se calcula restando la reacción en ausencia de calcio de la reacción en presencia del mismo.

III.6. Tratamiento Estadístico.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se obtuvo la media, la desviación

estándar y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable con el fin de estimar diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Las medias de cada grupo se compararon por el método de Tukey, que permite hacer comparaciones estrictas de más de dos grupos diferentes. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $P \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Efecto de la administración crónica de colchicina y ácido trimetilcolchicínico en ratas sanas.

Estos estudios se llevaron a cabo con el objeto de asegurarnos que las dosis a utilizar en ratas con hepatopatía no fueran tóxicas. Los 2 fármacos usados, la colchicina y el ácido trimetilcolchicínico, se disolvieron en agua y se administraron durante 2 meses a ratas sanas. La administración de colchicina a dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ no causó diarrea a las ratas normales; cuando se administraron 50 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$, todos los animales presentaron diarrea, pero cuando la dosis se elevó a 200 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$, además de la diarrea, la mortalidad alcanzada fue del 40% al término del tratamiento. Por esta razón la dosis de colchicina usada en los siguientes experimentos fue de 10 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$. Las ratas tratadas con las dosis de 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ de ácido trimetilcolchicínico (TMCA), no cursaron con diarrea, ni hubo otro signo de toxicidad, por lo que se decidió emplear las tres dosis, en los siguientes experimentos.

IV. 2. Efecto de los fármacos sobre la mortalidad inducida por 2 meses de obstrucción del flujo biliar.

La ligadura del conducto biliar común causó una mortalidad del 67%, la colchicina la disminuyó hasta el 46%; cuando se administró TMCA, la mortalidad varió de manera dependiente de la dosis, hasta sólo un 20% en el caso de la dosis de 100 μg (ver tabla IV).

Tabla IV. Efectos de la colchicina y del ácido trimetilcolchicínico, sobre la mortalidad en la cirrosis inducida por la LCBC en la rata.

Grupo	Ni ^a	mortalidad %	Nf ^b
Control	15	6.7	14
LCBC	15	66.7 ^c	5
LCBC + 10 µg COL	15	46.7 ^c	8
LCBC + 10 µg TMCA	15	33.3 ^{c,d}	10
LCBC + 50 µg TMCA	15	26.7 ^d	11
LCBC +100 µg TMCA	15	20.0 ^d	12

^a Ni: Número inicial de ratas

^b Nf: Número de ratas al final del tratamiento, después de 2 meses de la obstrucción biliar.

^c Media diferente del grupo con operación falsa, $p \leq 0.05$

^d Media diferente del grupo con LCBC, $p \leq 0.05$.

LCBC: ligadura del conducto biliar común

COL: colchicina

TMCA: ácido trimetilcolchicínico

IV.3. Efecto de la colchicina y del ácido trimetilcolchicínico sobre los marcadores de daño hepático en la cirrosis experimental producida por la ligadura del conducto biliar común (LCBC).

Todos los marcadores de daño hepático empleados se afectaron de manera importante en los animales sometidos a la LCBC, y su diferencia fue significativa, si se comparan con los obtenidos para los animales con operación falsa, con excepción de la actividad de la alanino amino transferasa, razón por la cual no se utilizó a esta enzima para evaluar el efecto de los fármacos en este modelo de daño hepático. Los datos se muestran de manera resumida en la gráfica 1. Nótese que el contenido de hidroxiprolina se elevó aproximadamente 6 veces, indicando que se trata de un excelente modelo de fibrosis experimental.

IV.3.1. Efecto sobre los marcadores del transporte de los aniones orgánicos.

Los valores de la bilirrubina total, directa e indirecta se incrementaron varias veces su valor normal, así la bilirrubina directa se incrementó más de 20 veces y la indirecta más de 50, como lo muestra la gráfica 1. La administración de los dos fármacos disminuyó los valores de estos tres parámetros ($p \leq 0.05$); la administración de TMCA permitió alcanzar valores cercanos a los normales para la bilirrubina directa e indirecta de acuerdo a las gráficas 2,3 y 4. Las dosis más efectivas fueron las de 50 y 100 μ g de TMCA.

IV.3.2. Efecto sobre los marcadores que detectan daño al hepatocito.

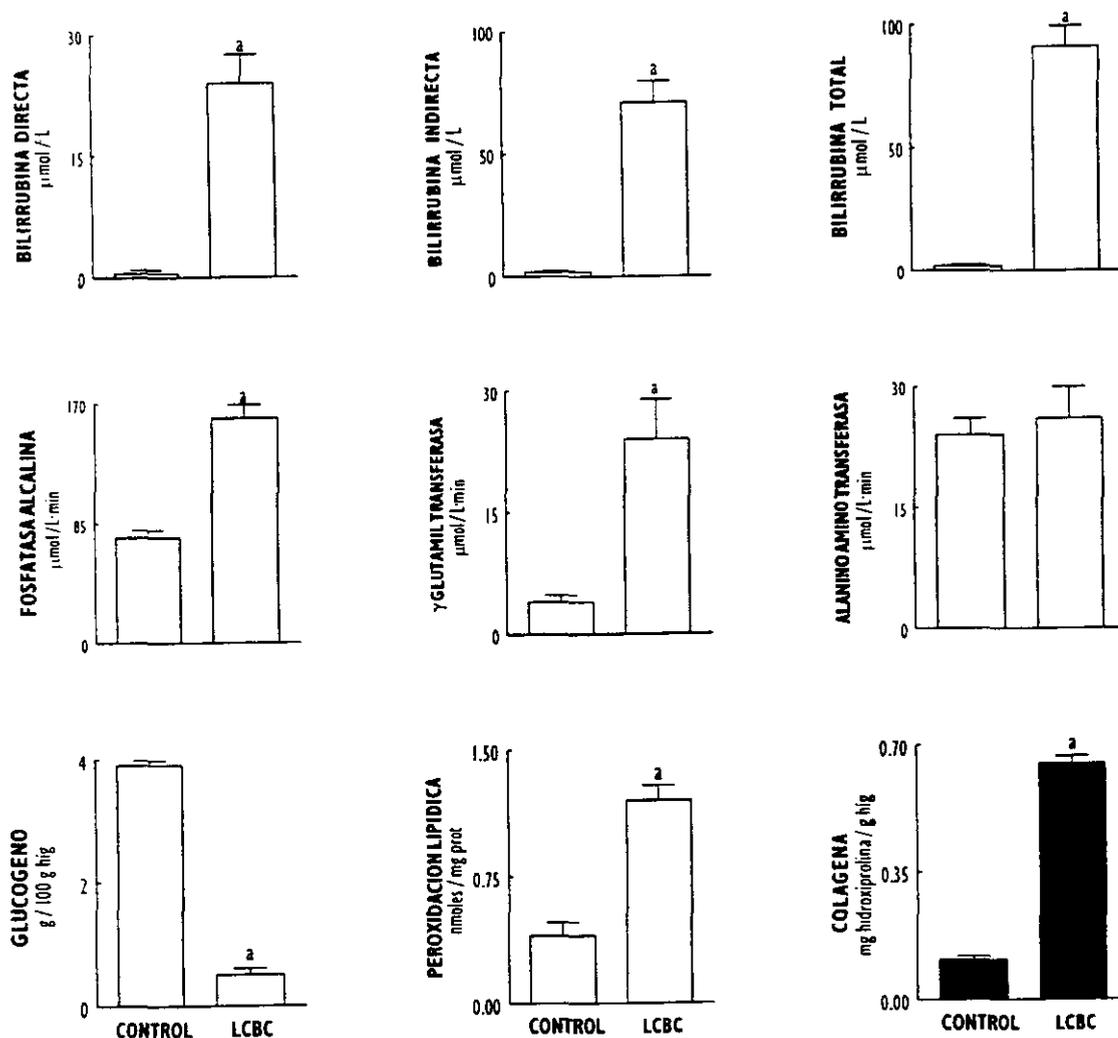
Las actividades de la fosfatasa alcalina y de la γ -glutamyl transferasa en suero son buenos indicadores de daño a la membrana del hepatocito y de colestasis.

En los animales con obstrucción del conducto biliar, la actividad sérica de la fosfatasa alcalina incrementó más de dos veces y media su valor con respecto a las ratas control ($p \leq 0.05$); la administración de la colchicina no causó modificación del parámetro, pero la administración de TMCA a las tres dosis señaladas previno notablemente el incremento de este marcador de daño hepático, y su diferencia fue significativa en los tres casos, como puede observarse en la gráfica 5.

La actividad de la γ -glutamyl transferasa en suero aumentó más de 5 veces en el grupo con LCBC; las administraciones de la colchicina y del TMCA previnieron el incremento de este parámetro (gráfica 6), y en todos los casos hubo diferencia significativa.

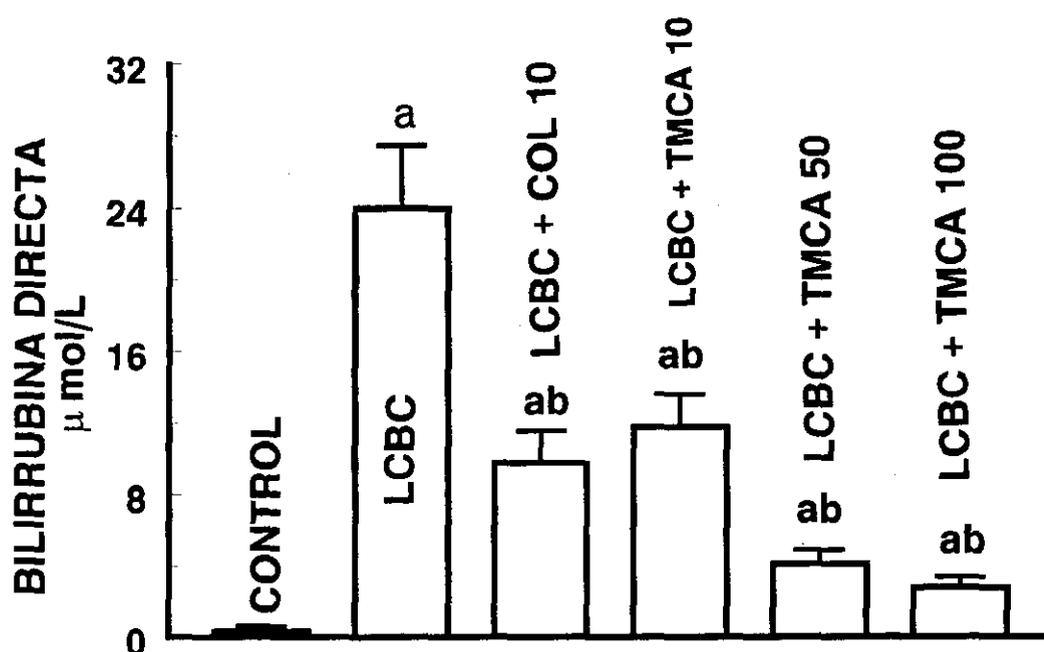
IV.3.3. Efecto sobre el grado de peroxidación lipídica en hígado.

El valor del grado de peroxidación lipídica (gráfica 7), se incrementó más de 3 veces en las



Gráfica 1. Efecto de la ligadura del conducto biliar común (LCBC) sobre 9 marcadores de daño hepático. Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

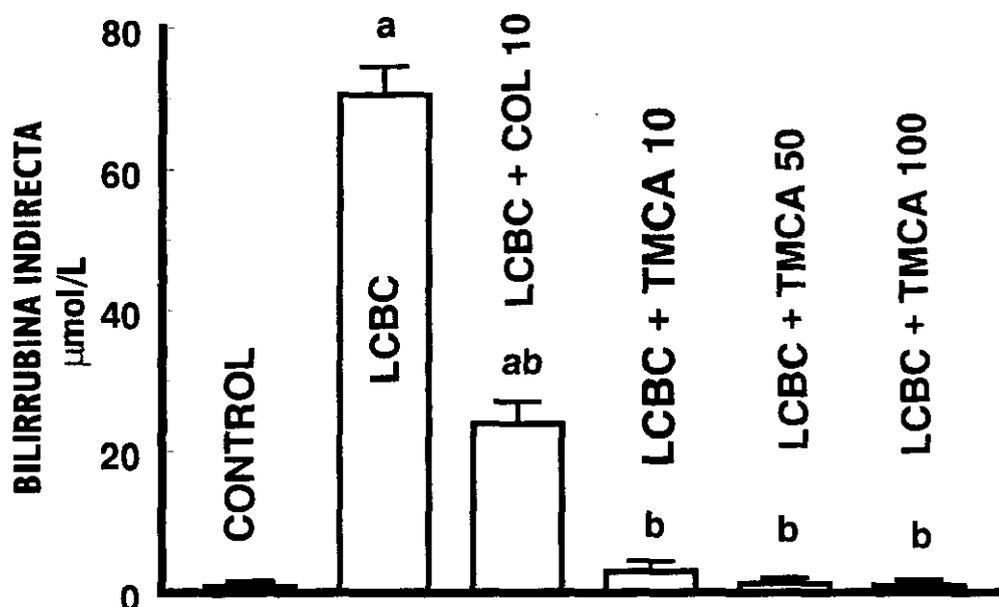
a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.



Gráfica 2. Concentración de bilirrubina directa en sueros de ratas con ligadura del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

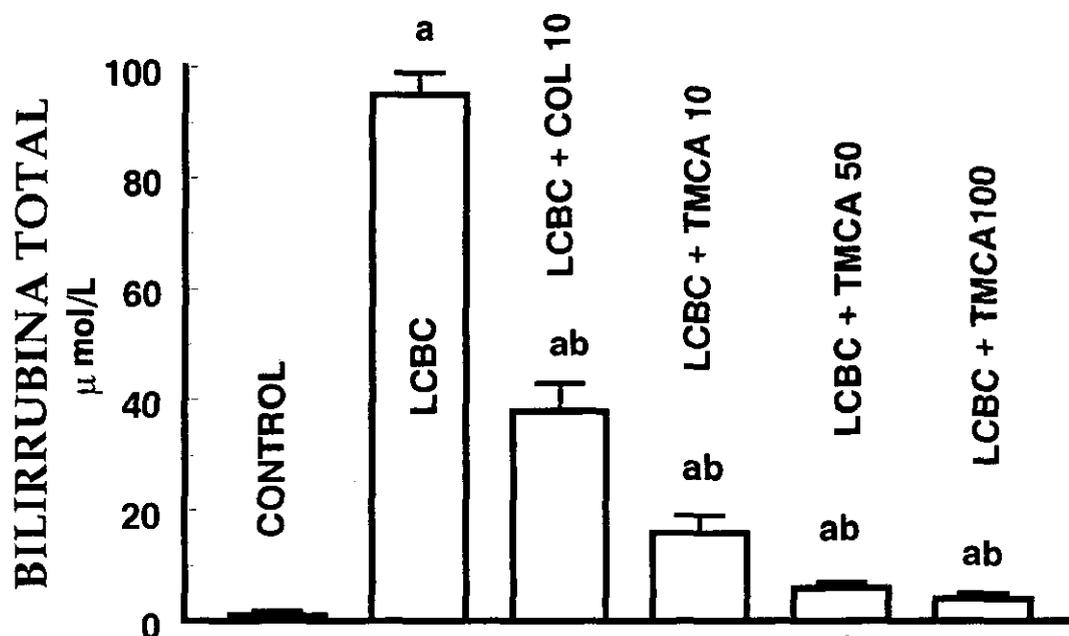
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 3. Concentración de bilirrubina indirecta en sueros de ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

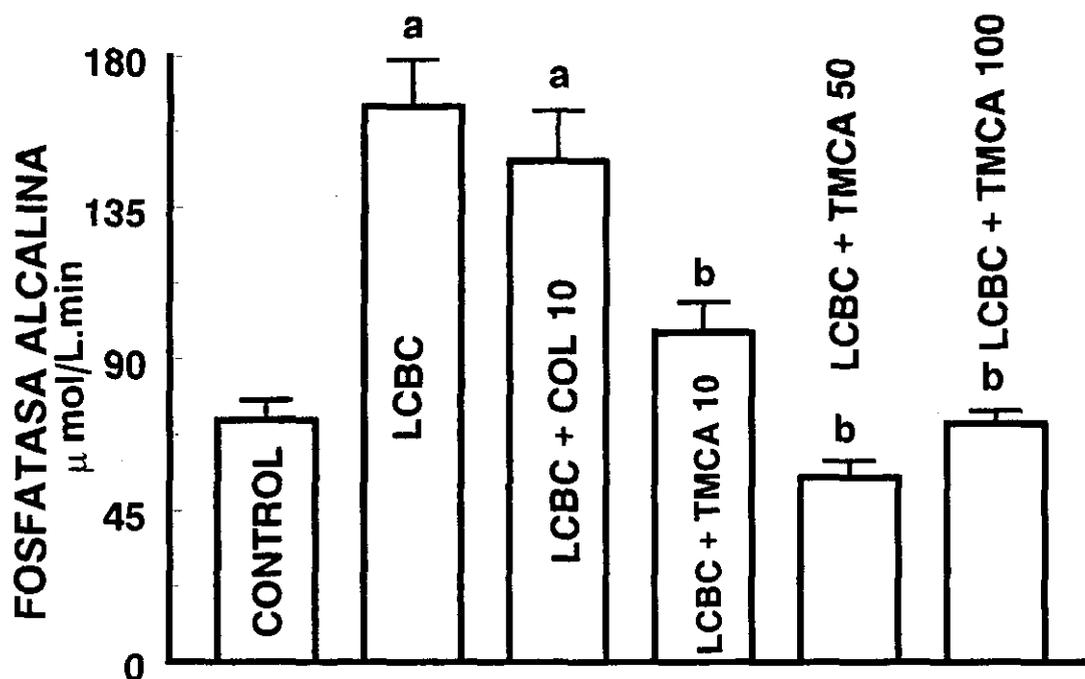
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 4. Concentración de bilirrubina total en sueros de ratas ligadas de conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

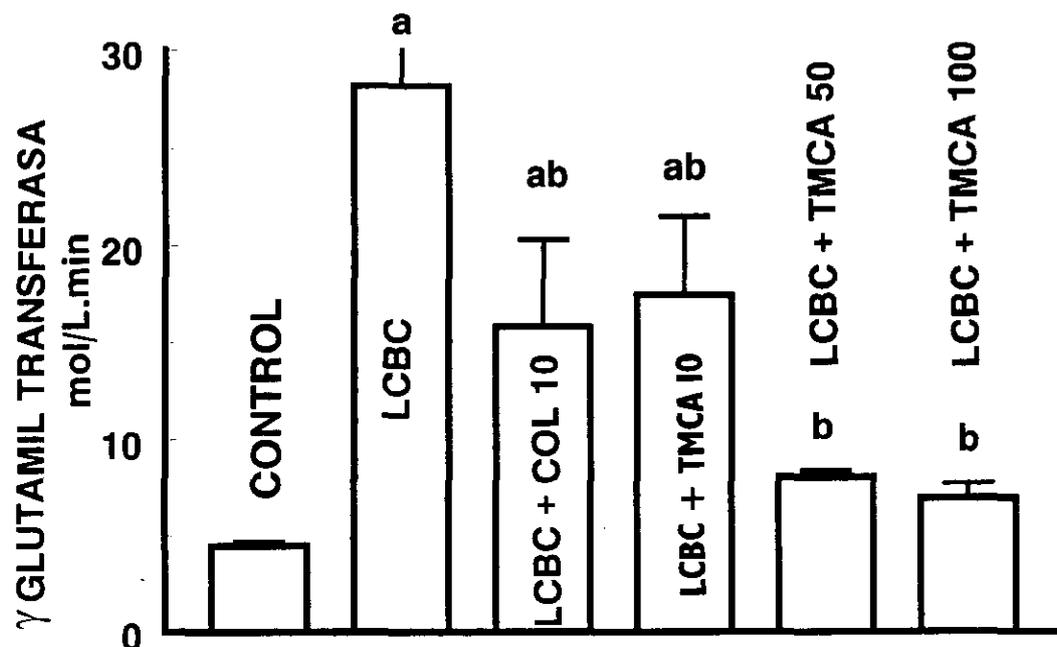
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 5. Actividad de la fosfatasa alcalina en sueros de ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

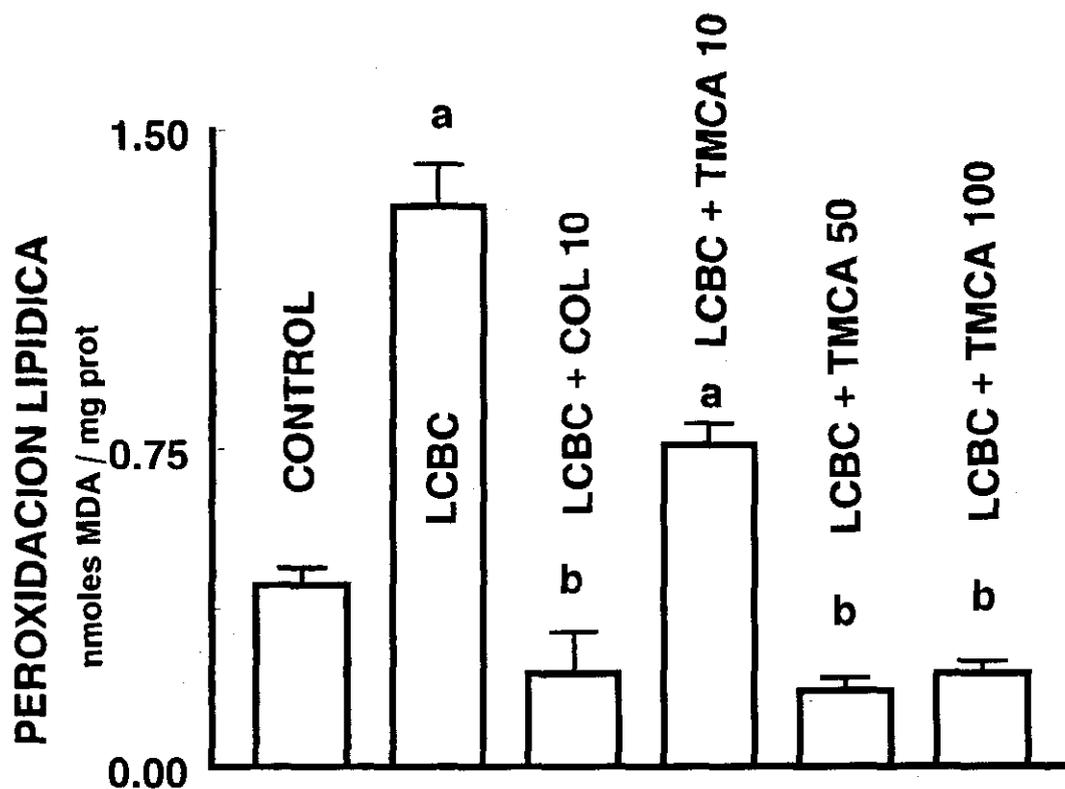
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 6. Actividad de la γ -glutamyl tranferasa en sueros de ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 7. Grado de peroxidación lipídica en sueros de ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.

ratas con LCBC. La administración de 10 μ g de colchicina previno este efecto totalmente, mientras que el TMCA a una dosis equivalente, sólo lo hizo parcialmente; las dosis más altas de TMCA fueron suficientes para prevenir completamente el aumento en el grado de peroxidación lipídica.

IV.3.4 Efecto sobre los marcadores que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado.

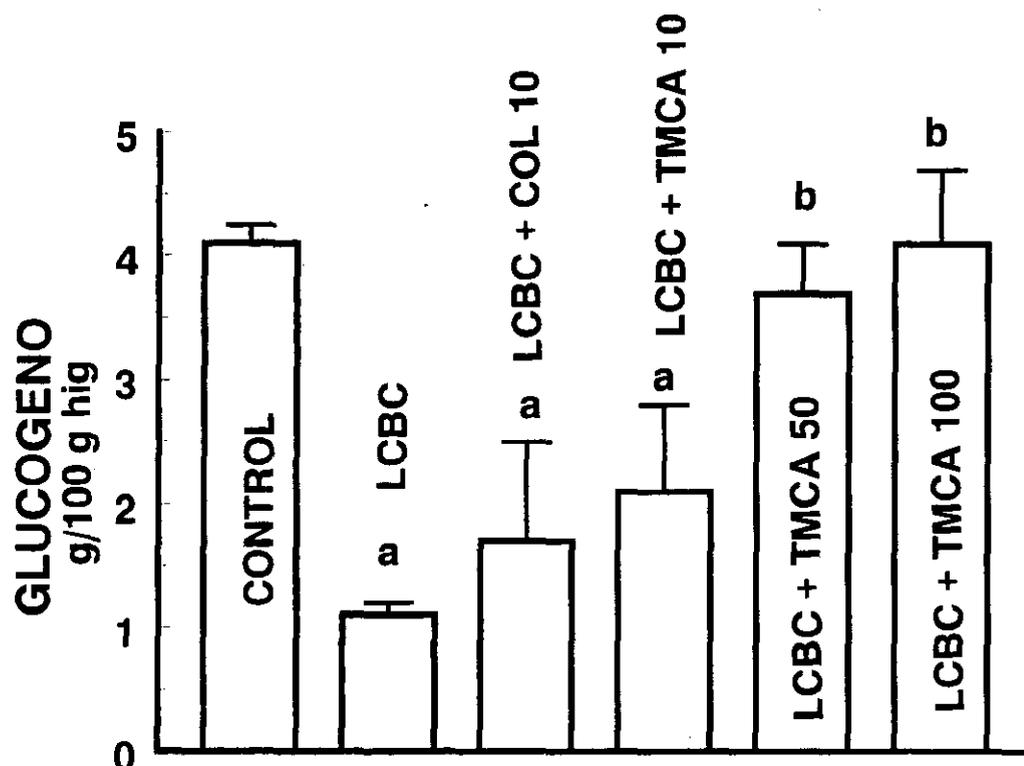
El parámetro usado fue el contenido de glucógeno, cuyo valor para las ratas control fue de 4.04 g/100 g, y en las ratas sometidas a LCBC, descendió hasta 1.07 g/100g; el contenido de glucógeno se preservó parcialmente con la administración de colchicina, ó 10 ó 50 μ g de TMCA. El contenido de glucógeno alcanzó los valores normales con dosis de 100 μ g de TMCA (gráfica 8).

IV.3.5. Efecto sobre los marcadores que evalúan el grado de fibrosis.

El contenido intrahepático de hidroxiprolina se utilizó como un marcador de la acumulación de colágena en el hígado. Como se observa en la gráfica 9, el contenido hepático de hidroxiprolina en los animales con obstrucción biliar incrementó más de 6 veces su valor con respecto a los animales control; con la administración de 100 μ g de TMCA, su valor descendió alrededor del 50%.

IV.3.6. Efecto sobre las alteraciones de las membranas plasmáticas de hepatocitos y eritrocitos.

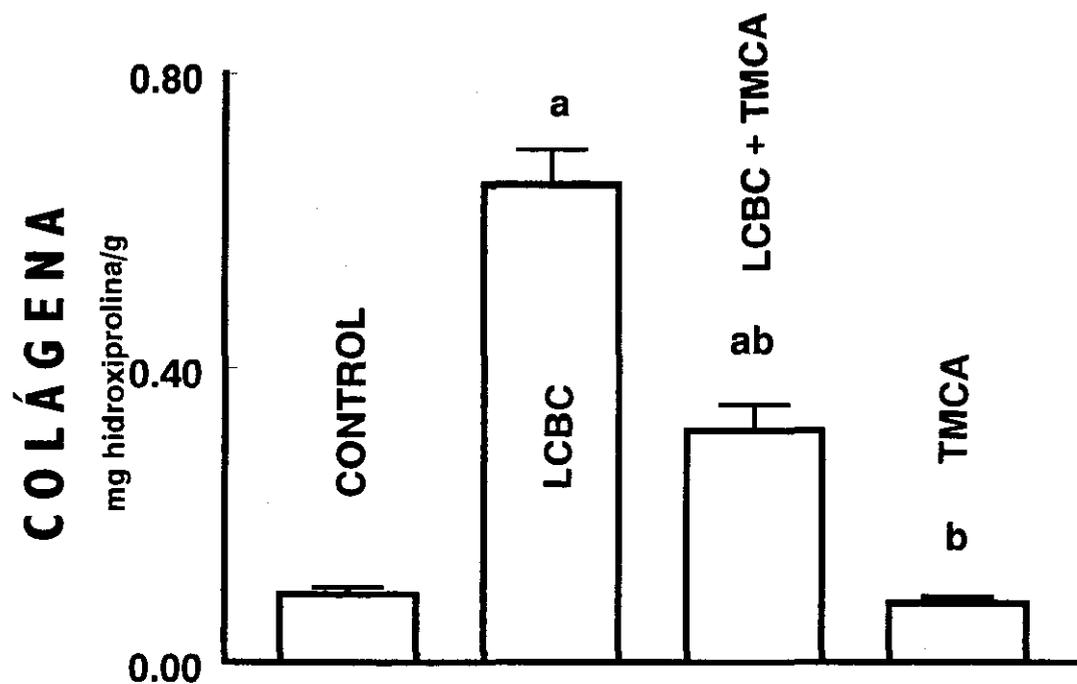
En las gráficas 10 y 11 pueden apreciarse que los cambios que ocurren en cuanto a la actividad de las ATPasas en los hepatocitos, son similares a los que ocurren en los eritrocitos. La actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ y la de Ca⁺⁺ tanto de hepatocitos como de eritrocitos, disminuyó



Gráfica 8. Contenido de glucógeno hepático en ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

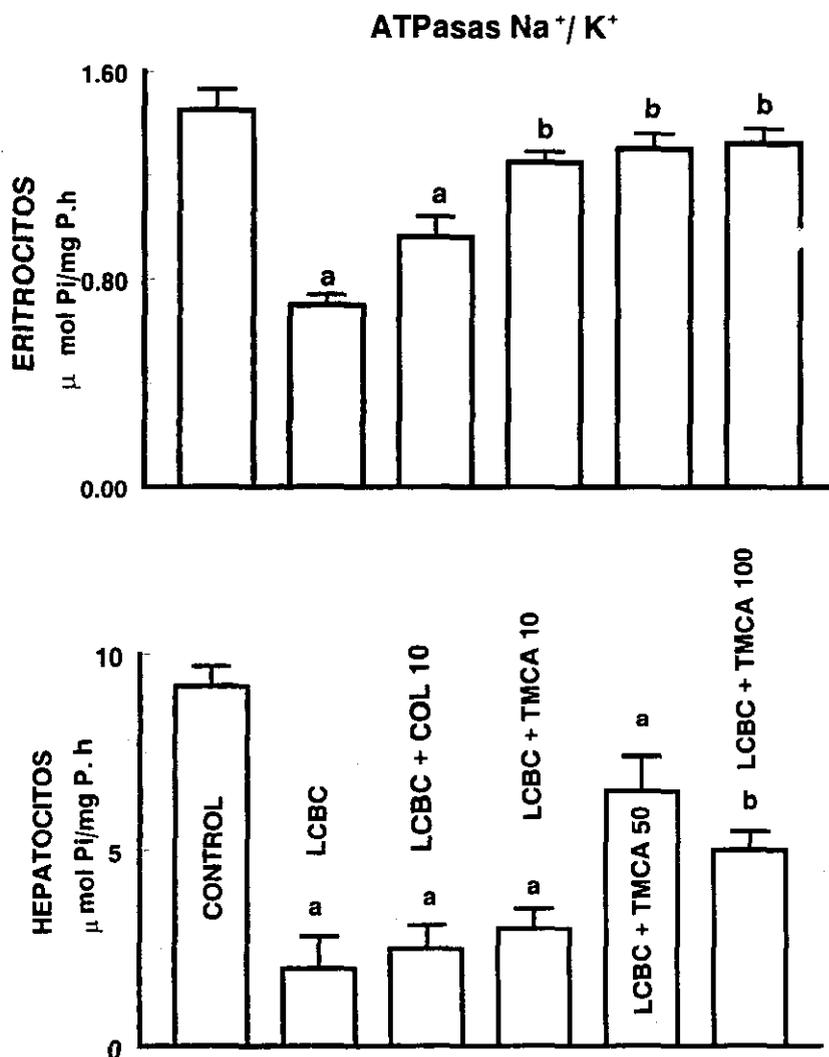
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 9. Contenido de colágena hepática en ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

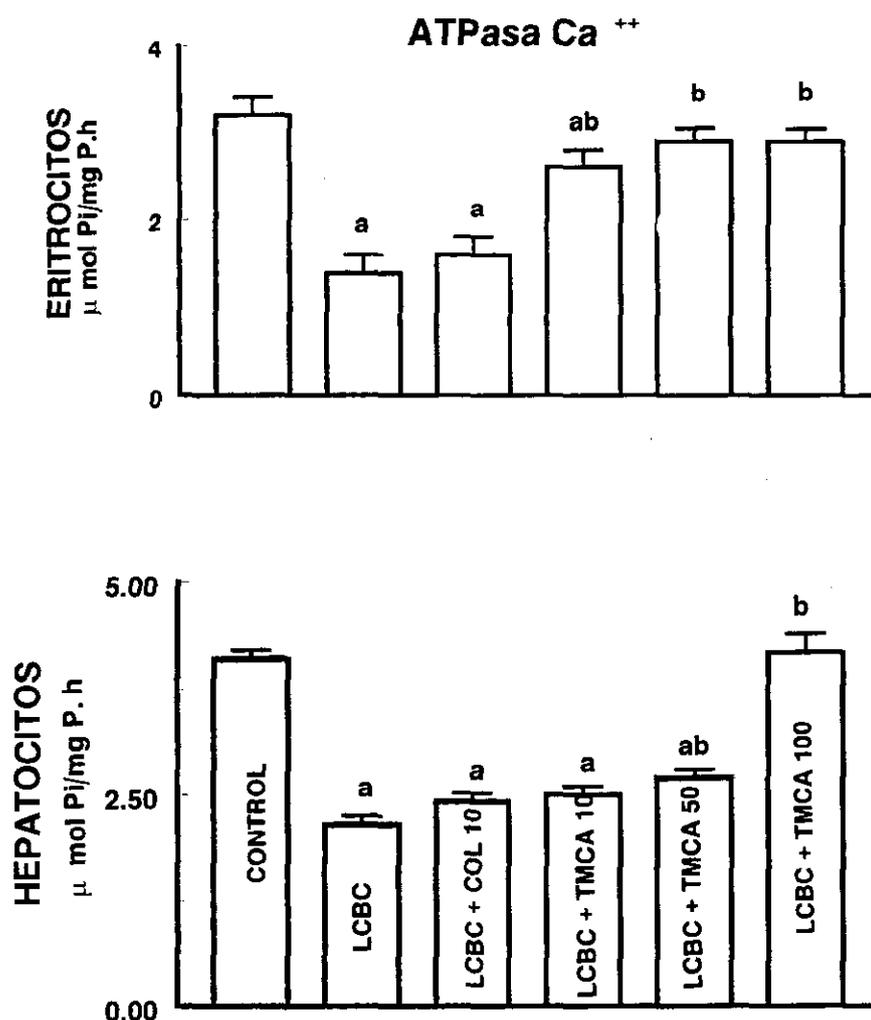
b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 10. Actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en las membranas de eritrocitos y hepatocitos en ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas ± EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC.



Gráfica 11. Actividad de la ATPasa de Ca⁺⁺ en las membranas de eritrocitos y hepatocitos en ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC) y tratadas con colchicina (COL) o ácido trimetilcolchicínico (TMCA). Los fármacos se administraron a partir del primer día de la cirugía (LCBC). Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas ± EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo con LCBC

más del 50% a causa de la obstrucción biliar ($p < 0.05$); la administración de 10 μg de colchicina o TMCA no las modificó significativamente. En las membranas de eritrocito su actividad se preservó completamente con la administración de 50 ó 100 μg de TMCA, tal como se muestra en la gráfica 10; en las membranas de hepatocito la recuperación de la actividad fue parcial, gráfica 11.

El contenido de colesterol en las membranas plasmáticas de los eritrocitos mostró un aumento significativo por la obstrucción biliar; la colchicina o el TMCA a cualquiera de las dosis empleadas, mantuvieron el contenido de colesterol en cifras normales (tabla V). En el caso de las membranas de los hepatocitos, la ligadura del conducto biliar favoreció que el contenido de colesterol disminuyera de manera importante. Este efecto se previno con la administración de 50 y 100 μg de TMCA (ver tabla VI).

El contenido de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas de hepatocitos y de eritrocitos, no se vio afectado en ninguno de los grupos experimentales, y por lo tanto el índice colesterol/fosfolípidos sólo se modificó en los casos y en la medida en que lo hizo el contenido de colesterol (ver tablas V y VI).

IV.4. Efecto del ácido trimetilcolchicínico para revertir la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono.

Los resultados presentados hasta este momento indican que ambos fármacos son capaces de prevenir el daño producido por la obstrucción biliar, con la ventaja de que el TMCA se puede administrar a dosis mayores y por lo tanto con mejores efectos farmacológicos sin mostrar toxicidad. La siguiente pregunta que nos planteamos fue si el TMCA (además de prevenir) era

Tabla V. Contenido de colesterol, fosfolípidos y cociente colesterol/fosfolípidos en membranas plasmáticas de eritrocitos en ratas con ligadura del conducto biliar común (LCBC) ^a.

Grupo	Colesterol ($\mu\text{mol mg}^{-1}\text{P}$)	Fosfolípidos (FL) ($\mu\text{mol mg}^{-1}\text{P}$)	C/FL
Control	0.33 ± 0.010	0.65 ± 0.021	0.51 ± 0.014
LCBC	0.42 ± 0.007^b	0.67 ± 0.043	0.66 ± 0.016^b
LCBC + 10 μg COL	0.34 ± 0.014^c	0.66 ± 0.037	0.52 ± 0.017^c
LCBC + 10 μg TMCA	0.34 ± 0.011^c	0.65 ± 0.026	0.52 ± 0.012^c
LCBC + 50 μg TMCA	0.32 ± 0.011^c	0.63 ± 0.036	0.51 ± 0.018^c
LCBC + 100 μg TMCA	0.33 ± 0.011^c	0.66 ± 0.018	0.50 ± 0.012^c

^a Cada valor representa la media de al menos 5 ratas \pm EEM

^b Media diferente del grupo control, $p \leq 0.05$

^c Media diferente del grupo con LCBC, $p \leq 0.05$.

COL colchicina

TMCA ácido trimetilcolchínico

Tabla VI. Contenido de colesterol, fosfolípidos y cociente colesterol/fosfolípidos en membranas plasmáticas de hepatocitos, en ratas con ligadura del conducto biliar común (LCBC) ^a.

Grupo	Colesterol ($\mu\text{mol mg}^{-1}\text{P}$)	Fosfolípidos (FL) ($\mu\text{mol mg}^{-1}\text{P}$)	C/FL
Control	0.31 ± 0.012	0.67 ± 0.020	0.46 ± 0.020
LCBC	0.20 ± 0.016^b	0.69 ± 0.023	0.29 ± 0.011^b
LCBC + 10 μg COL	0.21 ± 0.013^b	0.68 ± 0.029	0.31 ± 0.008^b
LCBC + 10 μg TMCA	0.23 ± 0.013^b	0.67 ± 0.024	0.34 ± 0.019^b
LCBC + 50 μg TMCA	0.30 ± 0.008^c	0.66 ± 0.027	0.45 ± 0.018^c
LCBC + 100 μg TMCA	0.31 ± 0.008^c	0.66 ± 0.026	0.47 ± 0.016^c

^a Cada valor representa la media de al menos 5 ratas \pm EEM.

^b Media diferente del grupo con operación falsa, $p \leq 0.05$

^c Media diferente del grupo con LCBC, $p \leq 0.05$.

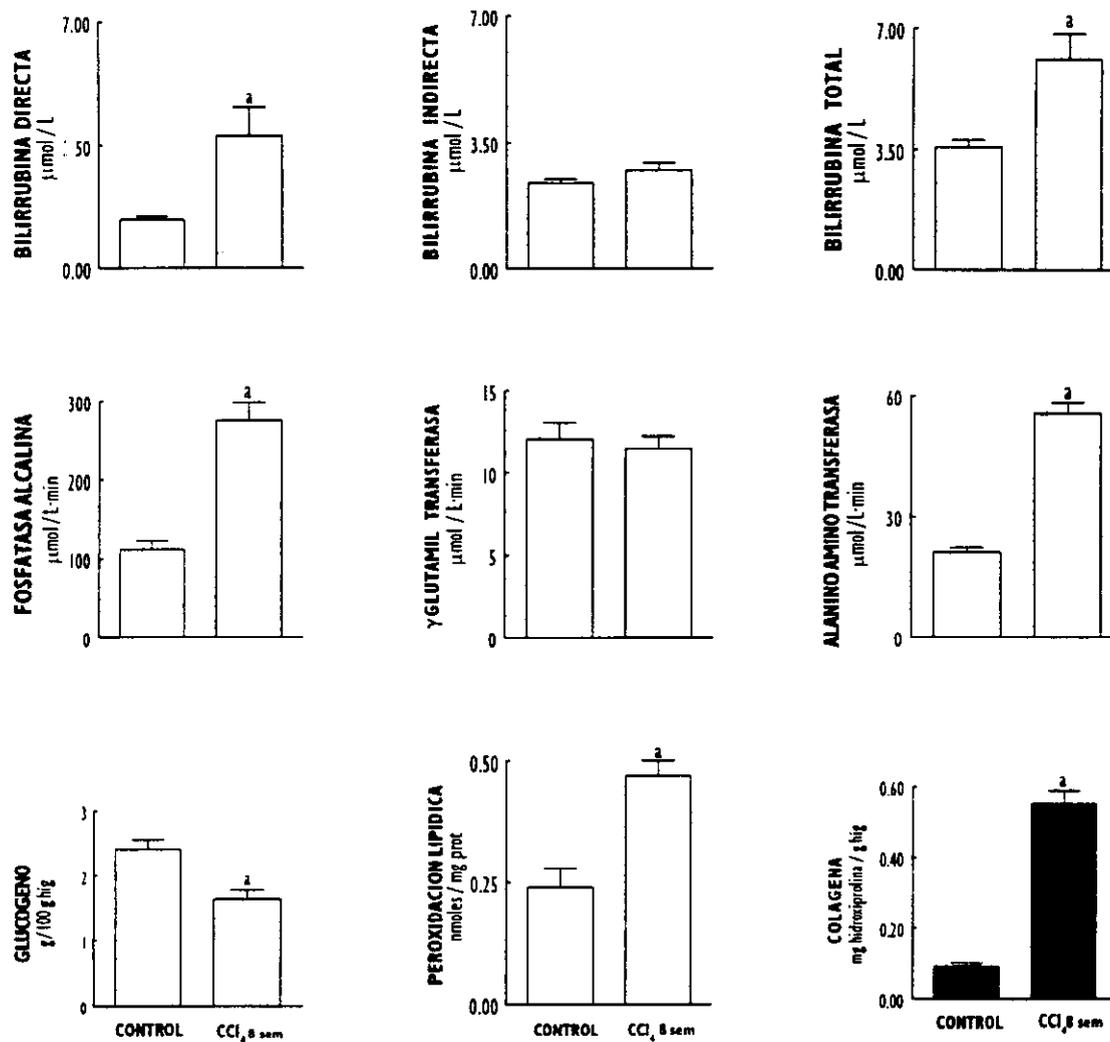
COL colchicina

TMCA ácido trimetilcolchínico

capaz de revertir el daño ya establecido, para lo cual (y con fines prácticos) decidimos utilizar el modelo de cirrosis inducida por la administración crónica de CCl_4 . El modelo de CCl_4 tiene la ventaja de que se puede suspender el tratamiento con el tóxico una vez establecido el daño, y entonces empezar con el tratamiento farmacológico. Este esquema requiere de un control al que se le produce el daño y luego se le administra sólo el vehículo del TMCA con el fin de monitorear la posible reversión espontánea del daño al suspender el tóxico. Las modificaciones que sufren todos los parámetros empleados para medir el daño hepático en el tratamiento crónico con CCl_4 , se muestran de manera resumida en la gráfica 12. Nótese en particular, que la colágena aumentó aproximadamente 6 veces su valor normal indicando una fibrosis importante. El tratamiento de reversión consistió en la administración de $100 \mu\text{g}$ /rata/día de TMCA durante 6 semanas a ratas previamente tratadas con CCl_4 durante 8 semanas.

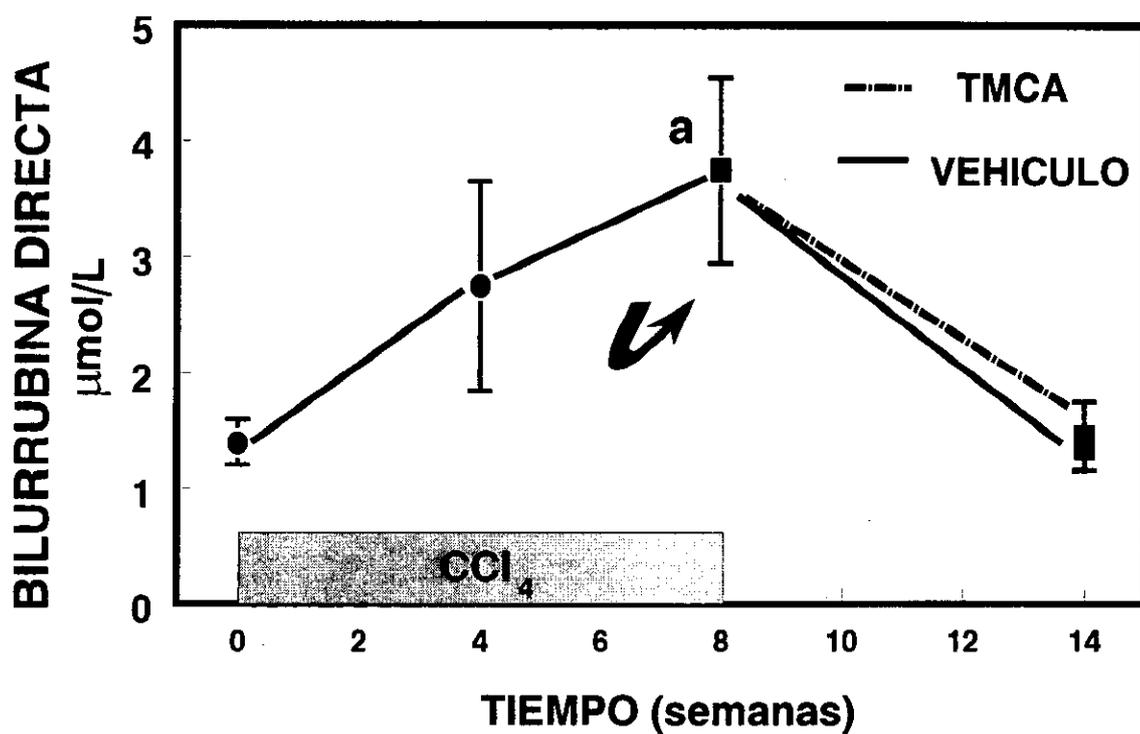
IV.4.1. Efecto sobre los marcadores del transporte de los aniones orgánicos.

La bilirrubina total aumentó sus valores a más del doble, tras la intoxicación con CCl_4 a expensas de la bilirrubina directa. A las 6 semanas de la suspensión del CCl_4 se revirtieron dichos valores a la normalidad de manera espontánea, y también lo hicieron a expensas de la bilirrubina directa como se muestra en las gráficas 13, 14 y 15. Debido a que al suspender el tóxico las bilirrubinas se normalizaron espontáneamente, no se pudo observar ningún efecto con el tratamiento de TMCA.



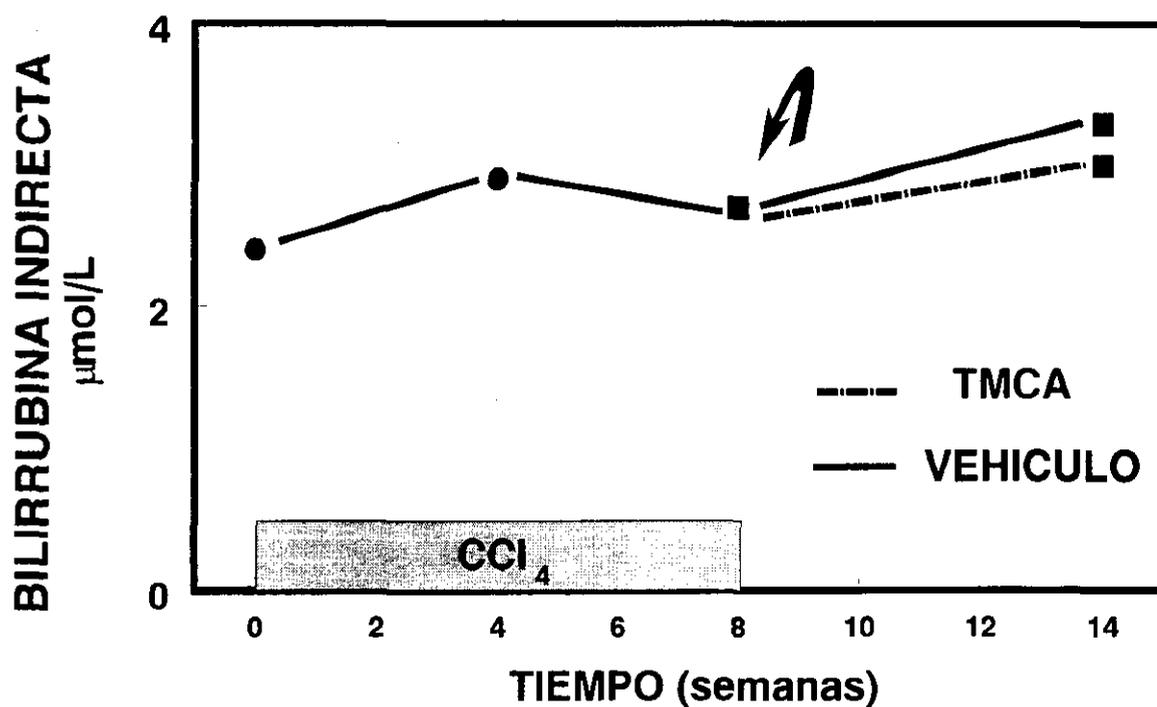
Gráfica 12. Efecto de la administración crónica de CCl₄ sobre 9 marcadores de daño hepático. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas ± EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo control.

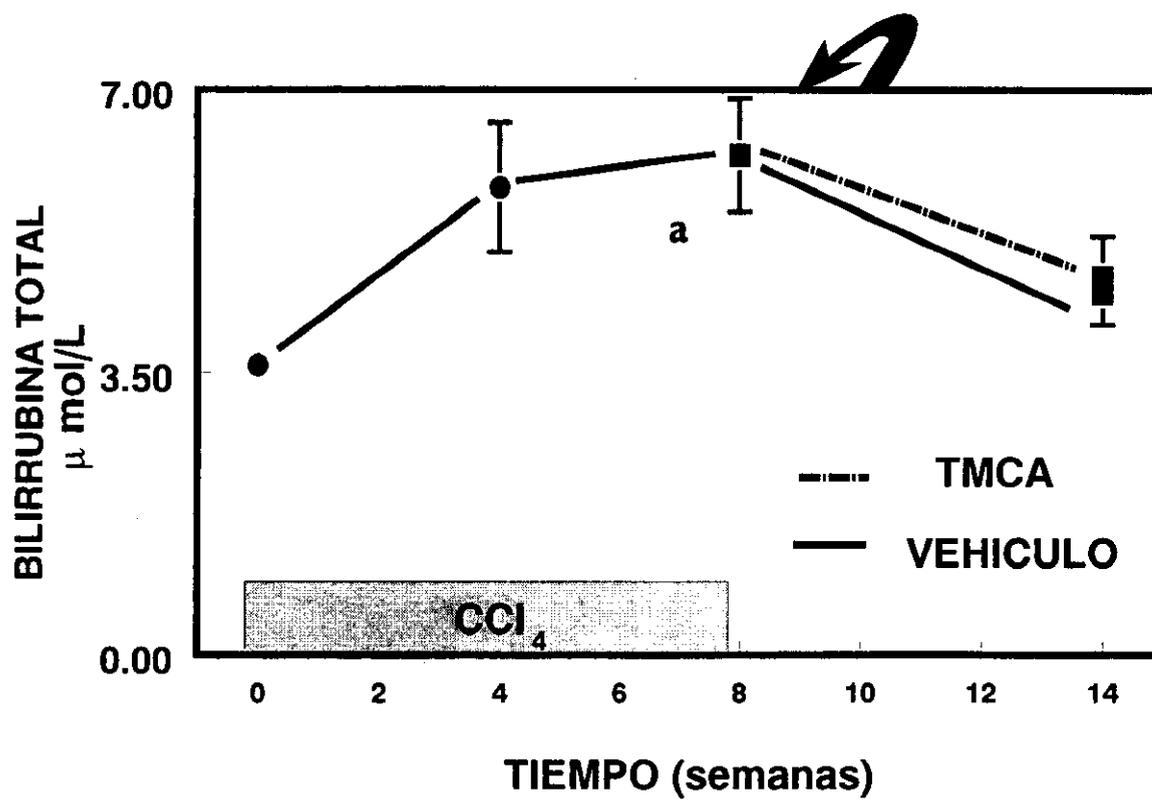


Gráfica 13. Curso temporal de la concentración de bilirrubina directa en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p < 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.



Gráfica 14. Curso temporal de la concentración de bilirrubina indirecta en sueros de ratas tratadas con CCl₄ y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas ± EEM



Gráfica 15. Curso temporal de la concentración de bilirrubina total en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.

IV.4.2. Efecto sobre los marcadores que detectan daño al hepatocito.

La actividad de la fosfatasa alcalina aumentó significativamente a más del doble de su valor inicial a la octava semana de tratamiento con CCl_4 (gráfica 16). La actividad de la γ -glutamyl transferasa no sufrió variaciones en su valor, durante todo el curso temporal del experimento (gráfica 17). La actividad de la alanino aminotransferasa tuvo un aumento significativo durante la cuarta semana, a partir de este momento su valor descendió y recuperó su valor normal al término del tratamiento (gráfica 18). El grado de peroxidación lipídica aumentó 100% su valor a la cuarta y a la octava semanas después de las cuales disminuyó a valores casi normales al finalizar los tratamientos (gráfica 19).

Las actividades de la fosfatasa alcalina, de la γ -glutamyl transferasa, de la alanino aminotransferasa, así como el grado de peroxidación lipídica, revirtieron a valores normales o cercanos a éstos, de manera espontánea al suspenderse el CCl_4 por seis semanas sin necesidad de tratamiento farmacológico (gráficas 16 a 19).

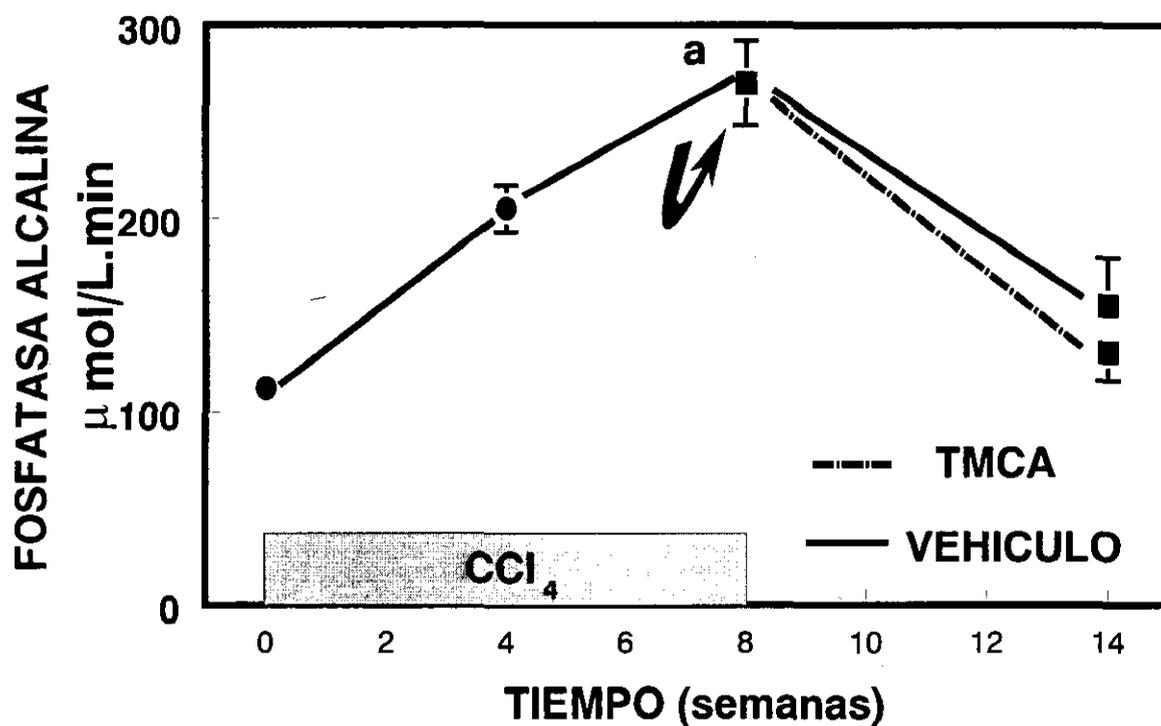
IV.4.3. Efecto sobre los marcadores que detectan la capacidad de síntesis del hígado.

En la gráfica 20 se observa que el contenido de glucógeno se abatió significativamente a las 4 y 8 semanas de la intoxicación con CCl_4 . No hubo diferencia significativa entre el grupo tratado con TMCA y el tratado sólo con el vehículo (gráfica 20).

IV.4.4. Efecto sobre el grado de fibrosis hepática.

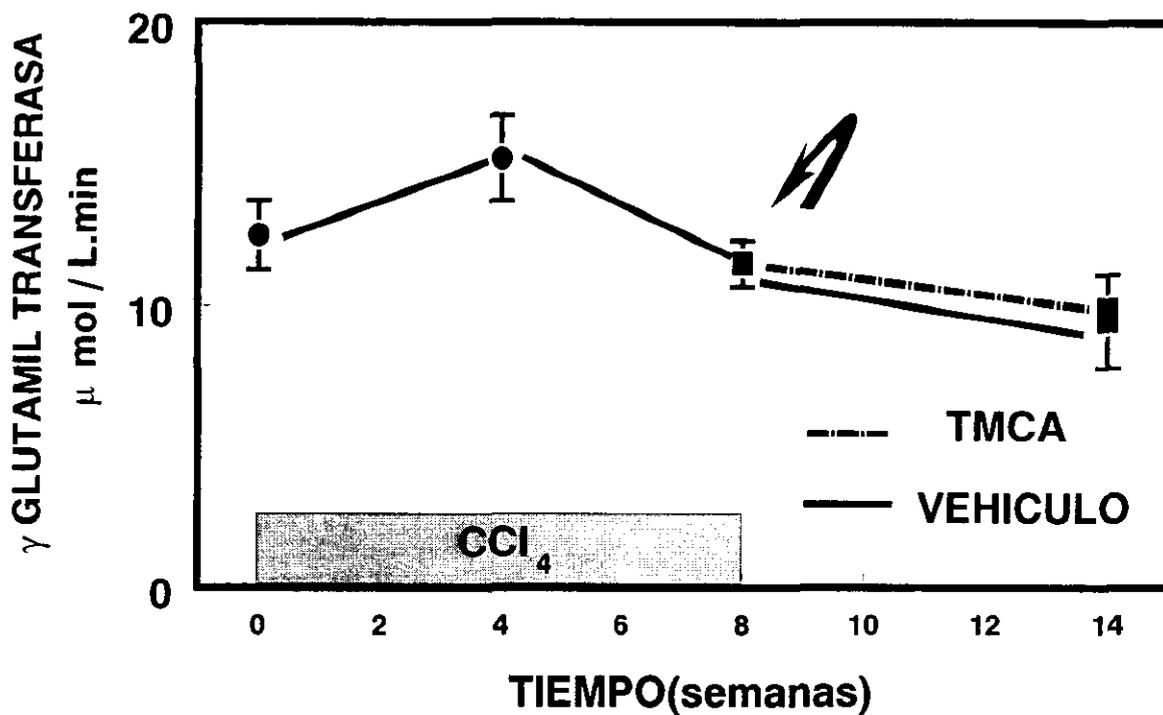
Después de la administración de CCl_4 por 8 semanas, la cantidad de hidroxiprolina se incrementó más de cinco veces ($p \leq 0.05$). Este efecto no fue reversible al suspenderse el tóxico,

pero la administración del TMCA disminuyó significativamente el contenido de colágena, como se puede apreciar en la gráfica 21.

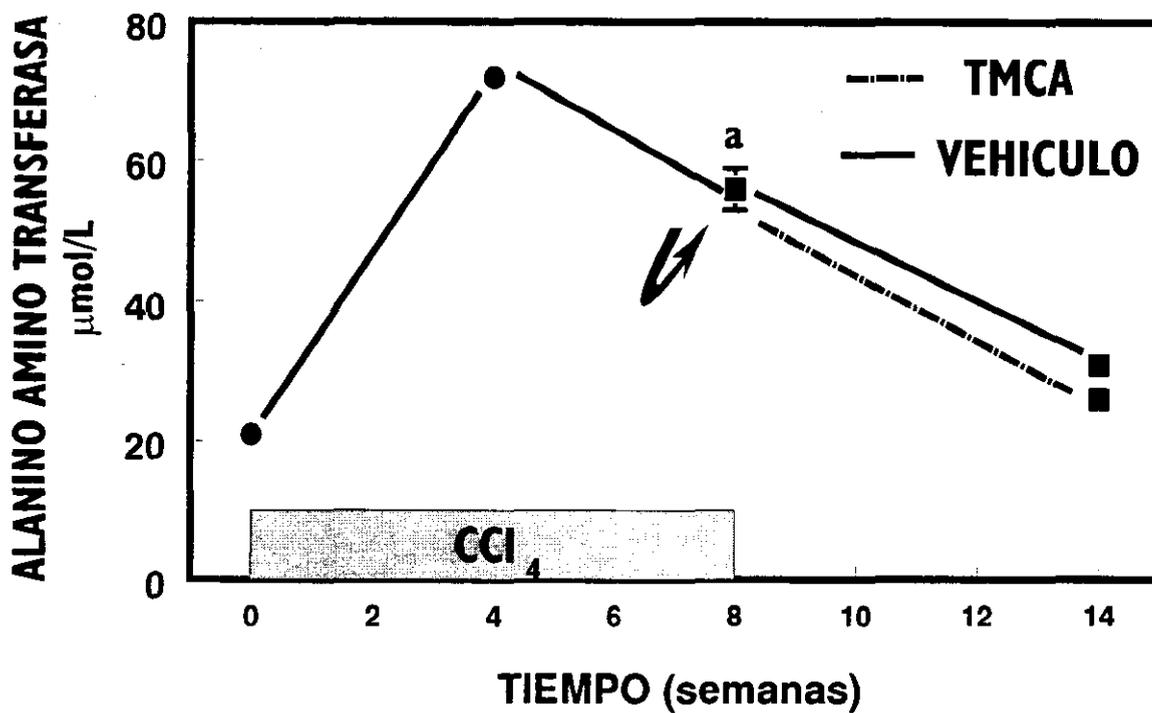


Gráfica 16. Curso temporal de la actividad de la fosfatasa alcalina en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.

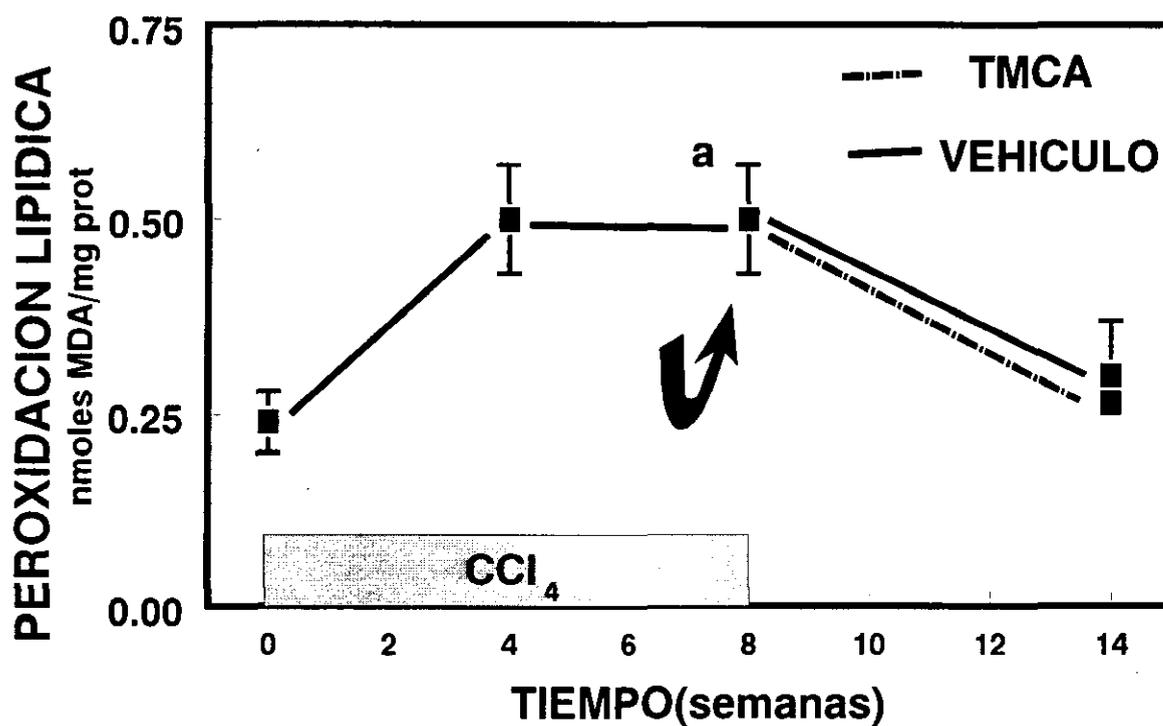


Gráfica 17. Actividad de la γ -glutamyl transferasa en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.



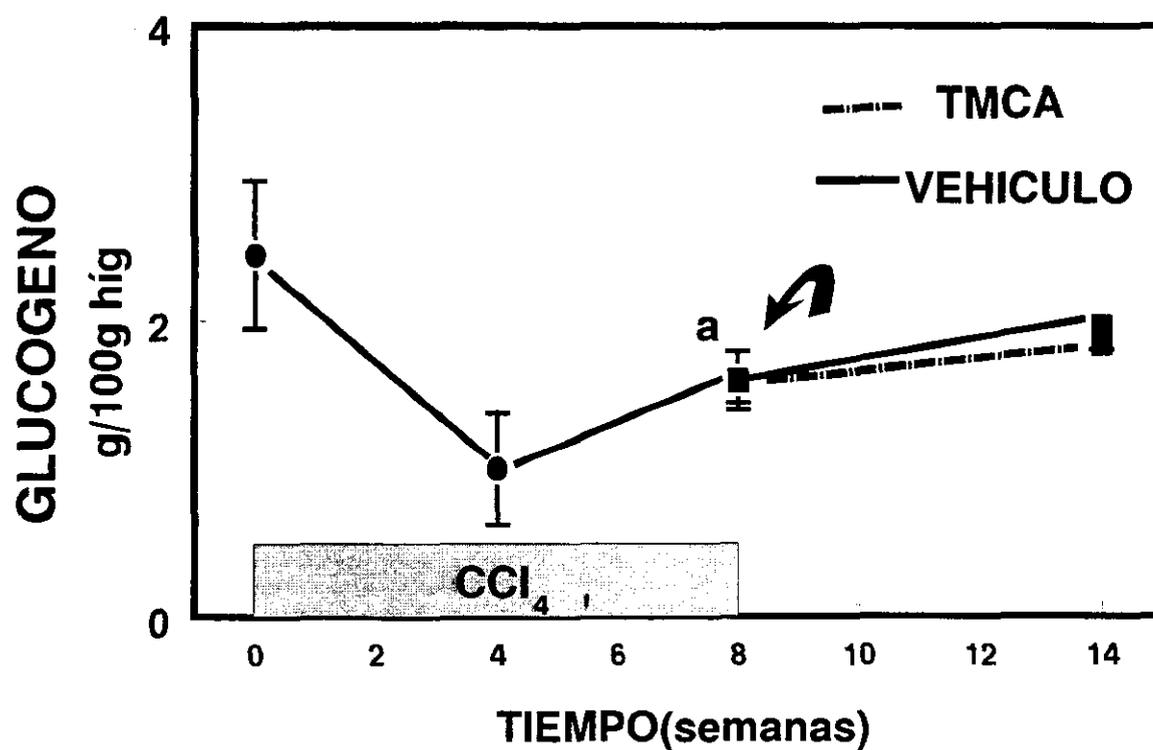
Gráfica 18. Actividad de la alanino amino transferasa en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p < 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.



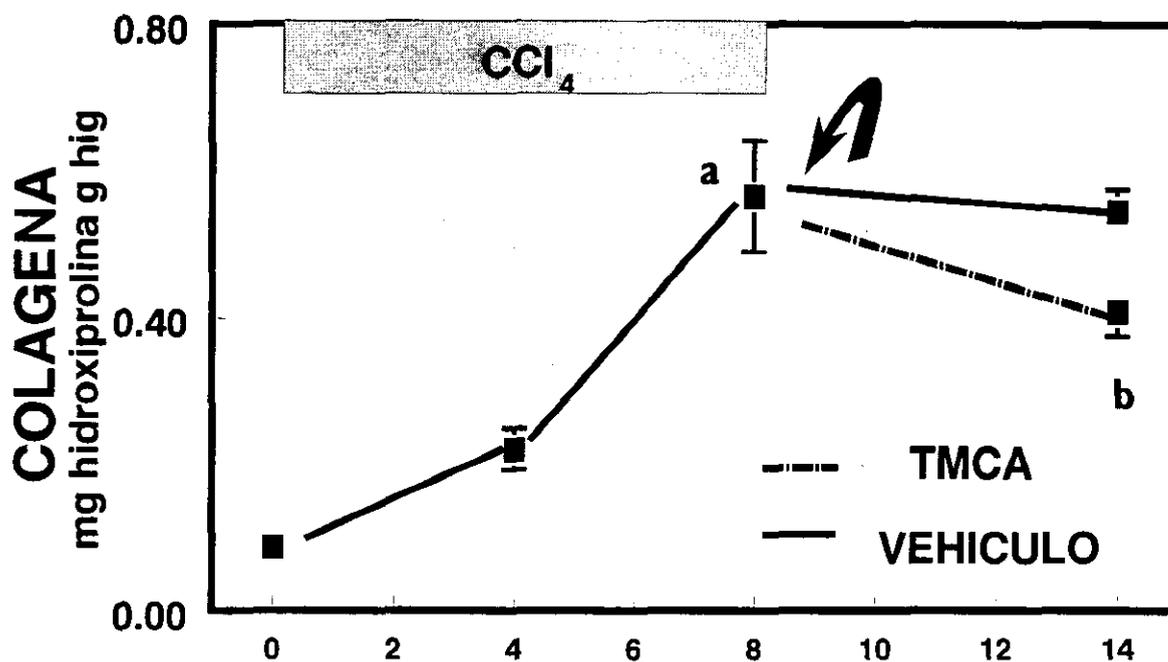
Gráfica 19. Grado de peroxidación lipídica en sueros de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.



Gráfica 20. Contenido de glucógeno hepático en ratas tratadas con CCl₄ y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.



Gráfica 20. Contenido de colágena en hígado de ratas tratadas con CCl_4 y ácido trimetilcolchicínico (TMCA). El fármaco se administró a partir de la octava semana. Los resultados se muestran como la media de al menos 10 ratas \pm EEM.

a: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo del tiempo 0.

b: indica diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ comparado con el grupo vehículo.

V. DISCUSIÓN

A pesar de su eficacia farmacológica, la toxicidad de algunos medicamentos restringe su uso; la síntesis de análogos de tales compuestos intenta preservar sus características terapéuticas y atenuar sus efectos colaterales indeseables. Los resultados de este estudio muestran que el ácido trimetilcolchicínico (TMCA), un análogo de la colchicina, posee los efectos benéficos de ésta sobre el hígado ya que disminuyó el contenido de colágena de manera significativa (gráficas 9 y 21), pero su toxicidad es mucho menor ya que las dosis administradas del TMCA fueron 10 veces mayores que las de la colchicina sin los efectos adversos de esta última (tabla IV)

Pudiera postularse que el TMCA se metaboliza a colchicina en el organismo y sea esta última quien ejerza el efecto hepatoprotector. Contra esta hipótesis se argumenta que dosis tan altas como 16 a 25 mg de TMCA administradas a pacientes con cuadros agudos de gota en períodos de dos días no tienen efectos colaterales (Wallace, 1967; Smyth y Frank, 1962). Sí esta cantidad de TMCA se transformara a colchicina causaría toxicidad sobre el tubo digestivo y aún produciría efectos letales (Wallace, 1974). Además, no existe ninguna evidencia de que esta biotransformación ocurra *in vivo*.

Prevención vs. reversión.

Al evaluar la eficacia terapéutica de cualquier fármaco se tiene que tomar en cuenta su utilidad en las diferentes etapas clínicas de la enfermedad a tratar, ya que algunos serán más eficaces si se emplean en los estados iniciales de la misma. Los modelos de cirrosis experimental en la rata permiten explorar posibles tratamientos al inicio de la enfermedad, es decir, tratamiento

preventivo, o bien en estados avanzados para intentar revertir el proceso.

En el modelo de LCBC uno de los posibles mecanismos responsables del daño hepático es la retención de las sales biliares en el hepatocito (Rosser y Gores, 1995); las sales biliares son tóxicas a causa de su acción detergente sobre las membranas. Otra posibilidad sugiere que su toxicidad sea debida a su acción sobre la mitocondria (Rosser y Gores, 1995). Esta hipótesis se apoya en las observaciones hechas en mitocondrias de ratas sometidas a LCBC (Krahenbuhl y cols, 1994), tales como alargamiento e hinchamiento de las mitocondrias, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que conduce a la disminución del ATP y ésta a la necrosis celular.

El daño hepático causado por la administración crónica con CCl_4 se debe a la biotransformación de este último por el citocromo P-450 2E1 que genera los radicales libres triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$), causantes de la inhibición del citocromo y de las enzimas microsomales aminopirina N-demetilasa, anilina hidroxilasa y glucosa 6 fosfatasa. Estas razones explican por qué la administración de las dosis del CCl_4 se difieren a intervalos que permiten restablecer la actividad del contenido del citocromo P-450 (Sayato y cols 1987; Mourelle y cols, 1988; Martínez y cols, 1995).

Al considerar los posibles mecanismos responsables del daño hepático de ambos modelos se pueden explicar las razones por las que se empleó uno u otro método en los tratamientos preventivo y de reversión, respectivamente. En el tratamiento preventivo se requiere que el daño inducido y la administración de fármacos sean simultáneos. Además el mecanismo de acción de los fármacos probados no deben interferir con los mecanismos responsables del daño hepático. De manera que el modelo de LCBC resulta idóneo para probar el tratamiento preventivo, ya que de emplearse el inducido por CCl_4 , la colchicina podría disminuir la activación inicial del mismo al

reducir el contenido del citocromo P450 2E1, o bien capturar los radicales libres CCl_3 (Sayato y cols, 1987; Mourelle y cols, 1988; Martínez y cols, 1995). En el tratamiento de reversión una vez que se ha inducido la cirrosis, es muy importante eliminar el agente que la causó; razón por la cual la intoxicación crónica con CCl_4 resultó mas adecuada, ya que su administración se interrumpe con facilidad. La anastomosis de la ligadura del conducto biliar es mas complicada por razones técnicas (riesgo anestésico y quirúrgico) y hemodinámicas (mal estado general, tiempo de protrombina e inestabilidad) del animal.

La cirrosis hepática humana y la experimental inducida en algunas especies animales son estadios finales de un proceso fibrótico cuya etiología es diversa (viral, parasitario, obstrucción biliar, alcoholismo, galactosamina, CCl_4 , etc.) pero no por ello sus características histológicas y bioquímicas son diferentes. Se ha aceptado que la cirrosis experimental inducida por CCl_4 en animales, es un modelo semejante a la cirrosis humana de diferente etiología (Pérez Tamayo, 1983), en tanto que la cirrosis causada por la LCBC es comparable a la cirrosis biliar secundaria humana (Kountouras y cols, 1984).

Las membranas plasmáticas y el daño hepático.

En el análisis de los marcadores de daño hepático, debe destacarse la importancia de los marcadores asociados a las membranas plasmáticas, porque sus modificaciones pueden explicar la disfunción hepática. Por ello se requiere de la explicación de las relaciones entre la membrana y cada uno de los marcadores de daño hepático.

Los ácidos biliares son capaces de lisar las membranas plasmáticas de los hepatocitos *in vitro* (Vyvoda y cols, 1977) e inducir la formación de bulas en la membrana plasmática y la

liberación de enzimas citosólicas en hepatocitos humanos (Human y cols, 1991). A concentraciones elevadas como las que se obtienen en la colestasis de los ácidos biliares tienen acción detergente, y se atribuyen a este mecanismo los efectos sobre la membrana (Vyvoda y cols, 1977; Schoelmerich, 1984). Algunos ácidos biliares particularmente el litocolato, incrementan el flujo del calcio al interior de la célula (Anwer y cols, 1988), o bien lo liberan de sus almacenes internos (Combettes, 1990). Esta circunstancia es importante, ya que algunas de las características de la muerte inducida por los ácidos biliares, son muy similares a las que ocurren en la muerte celular inducida por aumento en la concentración de calcio intracelular (Farrel y cols, 1990).

Los ácidos biliares al atacar a la membrana plasmática, principalmente a su región canalicular, pueden liberar algunas de las enzimas embebidas en ella, como la fosfatasa alcalina y la γ -glutamil transferasa, aumentando su actividad en el suero. Adicionalmente, los ácidos biliares son capaces de aumentar la síntesis *de novo* de dichas enzimas (Kaplan MM, 1986). Cabe mencionar que el incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina puede persistir a pesar del tratamiento con colchicina, posiblemente debido a que la colchicina *per se* induce la actividad de la enzima, por un mecanismo desconocido que es independiente de la colestasis y no requiere de la presencia de los ácidos biliares (Hatoff y cols, 1985).

Las consideraciones anteriores permiten explicar el comportamiento de varios de los marcadores de daño hepático evaluados en los animales de experimentación al cabo de dos meses de la ligadura del conducto biliar: i) el aumento importante de la bilirrubina total a expensas de la fracción indirecta (gráfica 3) indica la pérdida de la capacidad del hígado para conjugar la bilirrubina; ii) aumento de las actividades en el suero de la fosfatasa alcalina (gráfica 5) y de la γ -glutamil transferasa (gráfica 6); iii) la persistencia del aumento de la fosfatasa alcalina, a pesar del

tratamiento con la colchicina (gráfica 5).

Probablemente una de las alteraciones membranales más preocupantes en el daño hepático es la pérdida de las actividades de las ATPasas embebidas en las membranas plasmáticas. La actividad de las ATPasas es dependiente de la composición lipídica del microambiente en el que se encuentran embebidas. Se sabe que factores tales como la relación lípido/proteína, la cantidad de colesterol, la relación colesterol/fosfolípidos (C/FL), el grado de saturación de las cadenas de los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos entre otros, modifican la fluidez de la membrana alterando así la actividad de dichas enzimas (Schachter, 1984; Muriel y Mourelle, 1992; Muriel y cols, 1994). En estudios *in vitro*, cuando las membranas plasmáticas de hepatocitos normales, son enriquecidas artificialmente en colesterol, muestran aumento de la actividad de la adenilato ciclasa y disminución de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ (Leoni y cols, 1982). En la rata a las que se indujo cirrosis por intoxicación crónica con CCl_4 , se encontró aumento de la actividad de la adenilato ciclasa en las membranas plasmáticas de los hepatocitos, que explica la importante disminución del glucógeno (gráfica 8) en el hígado (Mourelle y cols, 1981). En este trabajo se demostró disminución de las actividades de las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} , y disminución de la relación C/FL en membranas plasmáticas de hepatocitos en animales sometidos a ligadura del conducto biliar (gráficas 10 y 11; tabla V y VI). Las modificaciones en las actividades de estos sistemas enzimáticos, pueden ser explicadas por los siguientes mecanismos: i) la LCBC causa un incremento considerable de las sales biliares lo que promueve la solubilización de la membrana plasmática seguida de la pérdida de proteínas tales como las ATPasas (Sanderman, 1978); ii) la actividad de las ATPasas requiere un cociente C/FL óptimo con variaciones dentro de rangos muy estrechos, y su aumento o disminución (Bleich y Boro, 1977; Schuller y cols, 1986) modifica el

microambiente lipídico, lo que puede favorecer que las enzimas se encuentren en forma críptica (Yahuaca y cols, 1985). En este sentido es posible que el efecto benéfico del TMCA sobre las enzimas membranales esté asociado a su capacidad para preservar la composición lipídica de las membranas plasmáticas. Desafortunadamente no se conoce un mecanismo específico por el cual el TMCA ejerza sus efectos sobre los lípidos de las membranas, pero bien pudiera ser que sus efectos hepatoprotectores generales (p. ej. disminución de la fibrosis) puedan mejorar la función del hepatocito, incluyendo la homeostasis de la composición lipídica de sus membranas.

El eritrocito y el daño hepático

El colesterol y los fosfolípidos de las lipoproteínas plasmáticas interactúan con los eritrocitos y las plaquetas. Estas interacciones son particularmente importantes puesto que ninguna de estas células dispone de los organelos celulares para la síntesis del colesterol, su esterificación y la síntesis de los fosfolípidos. Es importante mencionar que la composición de los fosfolípidos y ácidos grasos de las células rojas se semeja a las del plasma, por la razón antes señalada, de manera que las alteraciones hepáticas que causan modificaciones de la síntesis de las lipoproteínas, se reflejan en la composición de las membranas de los eritrocitos. Los sistemas enzimáticos y las funciones de las membranas de los eritrocitos (ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{++}), son relativamente semejantes a las de los hepatocitos de manera que si se conocen las características de las membranas de los eritrocitos, se puede obtener (de forma indirecta) información de la funcionalidad de los lípidos membranales de los hepatocitos (Muriel y cols, 1993; Nava-Ocampo y cols, 1997).

Sin embargo, en los resultados de este trabajo (gráficas 10 y 11), es aparentemente

contradictorio que mientras el cociente C/FL en hepatocitos disminuyó, en eritrocitos aumentó después de 2 meses de obstrucción biliar. Esto pudiera explicarse tomando en cuenta que las sales biliares pueden solubilizar el colesterol de las membranas de los hepatocitos por su efecto detergente (Vyvoda y cols, 1977; Schoelmerich, 1984) y así aumentarlo en el plasma; otra manera de explicarlo es considerar que en los cuadros de colestasis el colesterol no esterificado se incrementa notoriamente (Glickman y Sabesin, 1994) esto ocurre junto con otras alteraciones de los lípidos y las lipoproteínas en el plasma, a causa del daño sufrido en el parénquima hepático. Consecuentemente la elevación del colesterol en plasma permitiría que éste se elevara en la membrana del eritrocito, ya que puede difundir entre compartimientos lipídicos a pesar de su baja solubilidad en el agua (Bleich y Boro, 1977; Lange y cols, 1983; Muriel y cols, 1993). Bajo esta hipótesis, la pérdida de la actividad de las ATPasas en las membranas plasmáticas de los hepatocitos pudiera deberse a una pérdida de la proteína (por solubilización, tal como se mencionó anteriormente) mientras que en el eritrocito la disminución en la actividad ATPásica pudiera ser un problema de inhibición de la actividad por aumento en el cociente C/FL, tal como se ha demostrado (Leoni y cols, 1982).

Efecto antifibrótico de los colchicinoides.

Los agentes antifibróticos pueden actuar al reducir la síntesis de colágena (efecto antifibrogénico) o al incrementar la degradación de la misma (efecto fibrolítico) o mediante ambas acciones. Los agentes que inhiben la síntesis de la colágena son probablemente más efectivos en etapas tempranas de la enfermedad. Los agentes fibrolíticos tienen más posibilidades en la fibrosis avanzada, sin embargo las fibras de colágena recién sintetizada son más fáciles de hidrolizar que

áquellas con más tiempo y que poseen enlaces entrecruzados (“cross-links”), que hacen más difícil su degradación. Naturalmente, los mejores resultados se obtendrán cuando se usen fármacos con propiedades antifibrogénicas y fibrolíticas en etapas tempranas del desarrollo del proceso fibrótico.

La regulación de la síntesis de la colágena puede efectuarse a diferentes niveles, pues el proceso tiene varias etapas: i) transcripción de los genes de la colágena y traducción de los respectivos RNA_m; ii) modificaciones postraduccionales intracelulares y iii) modificaciones postraduccionales extracelulares. En tanto, la degradación de la colágena depende de: i) la síntesis y secreción de la procolagenasa; ii) activación de este precursor enzimático; iii) propiedades de la colágena que se va a degradar, y iv) regulación de la actividad de la colagenasa por inductores e inhibidores de la misma.

Posiblemente la acción antifibrótica de la colchicina se debe a que: i) inhibe la síntesis de colágena (Mansour y cols, 1988; Rojkind y Kershenobich, 1975; Kershenobich y cols, 1979) probablemente a nivel transcripcional, ya que recientemente se demostró que inhibe la expresión del RNA_m de la procolágena (Greenwel y cols, 1995); ii) modula la respuesta de linfocitos y monocitos durante la respuesta inflamatoria crónica (Kershenobich y cols, 1990) y iii) favorece la actividad de la colagenasa en algunos tipos celulares (Wahl y Winter, 1984). Las acciones farmacológicas de la colchicina sobre la síntesis y sobre la degradación de la colágena, pudieran probablemente ser compartidas por el TMCA, por su semejanza estructural. La similitud de los efectos benéficos de ambos colchicinoides apoyan esta idea.

Tanto la colchicina como el TMCA previnieron de manera significativa el incremento en el contenido de colágena producido por la obstrucción biliar prolongada. La fibrosis propicia la capilarización de los sinusoides hepáticos, impidiendo el intercambio de metabolitos y gases, con

el consecuente deterioro de la función hepática. En humanos, el tratamiento con colchicina a pacientes cirróticos mejora algunas de sus manifestaciones clínicas como ascitis, edema y encefalopatía (Kershenobich y cols, 1979; 1988).

En la rata normal el contenido de colágena hepática se halla alrededor de 1 mg/g de tejido fresco. Las colágenas tipo I y III, representan cada una, alrededor del 40% del contenido total de la colágena hepática (Kivirikko y Savolainen, 1988), y el tipo IV representa entre el 5 y 10% (0,06mg/g), aunque otros laboratorios han reportado para la colágena tipo IV, sólo el 1% del contenido total (Seyer, 1980). La colágena tipo I se encuentra en forma de haces gruesos en las triadas portales, en las regiones vasculares y en las áreas centrolobulares; la colágena tipo III tiene las mismas localizaciones, en forma de haces delgados. Para ambas colágenas, los valores normales de 0.4 mg/g de tejido fresco se incrementan hasta 3.5 mg/g (8 veces el valor normal), en los animales cirróticos.

La colágena tipo IV se halla en las membranas basales de vasos, de conductos biliares y a lo largo de los sinusoides en el espacio de Disse; sus valores crecen desde 0.06 mg/g hasta 0.8 mg/g de tejido en los animales cirróticos. Tal cantidad es difícilmente apreciable dentro del incremento total que sufre la colágena, incluidos los tipos tipos I y III. A pesar de ello, el incremento en el contenido de colágena tipo IV es muy importante, ya que su localización alrededor de los sinusoides, permite que se capilarizen y así impide el libre intercambio de metabolitos y gases de los hepatocitos, conduciendo primero a la necrosis celular y posteriormente al aumento en el depósito de colágenas tipo I y III principalmente.

Para que la colágena sea hidrolizada por la colagenasa, debe ser activado primero su precursor (procolagenasa) por la plasmina, que también es secretada como prostrato

(plasminógeno), y que a su vez requiere un activador. Muriel y cols. (1997) han demostrado que el tratamiento con TMCA a ratas sometidas a ligadura del conducto biliar (8 semanas), incrementa la actividad del activador del plasminógeno lo que conduce a un aumento en la degradación de proteínas de matriz extracelular (Matrigel®) entre las que se encuentra la colágena tipo IV.

Los resultados de Muriel y cols. (1997) junto con los del presente estudio nos permiten suponer que por lo menos uno de los efectos benéficos del TMCA está asociado a su capacidad de estimular la degradación de la colágena tipo IV (vía estimulación del activador del plasminógeno) evitando así la capilarización de los sinusoides, la necrosis y la subsecuente acumulación de otros tipos de colágena (I y III) que se producen como respuesta al daño (necrosis). De esta manera la función hepática se ve también preservada como lo indican los marcadores séricos de daño hepático y la actividad de importantes sistemas enzimáticos como las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} de la membrana plasmática del hepatocito.

Es posible que el TMCA también ejerza sus efectos antifibróticos a otros niveles, como lo hace su análogo la colchicina. También es posible que actúe directamente sobre las membranas regulando el cociente C/FL y/o protegiendo los grupos -SH de los sitios activos de las enzimas que como ya se mencionó son propiedades reportadas para la colchicina (Schnell y cols, 1976).

Aunque en términos generales se considera que la cirrosis hepática es irreversible, Pérez-Tamayo (1983) ha postulado que la cirrosis experimental inducida por CCl_4 , puede ser reversible dependiendo de la duración del tratamiento, número de dosis de CCl_4 , etc. En nuestro caso al suspender el tratamiento con CCl_4 por 6 semanas, todos los parámetros estudiados revirtieron a valores normales espontáneamente, con excepción de la fibrosis. Frecuentemente en la clínica ocurre algo similar, cuando un cirrótico (por alcoholismo), interrumpe su ingesta etílica por un tiempo

considerable (3 meses o más) los marcadores séricos de daño hepático revierten hacia valores normales, pero la fibrosis permanece. La reversión espontánea en la mayoría de los marcadores de daño hepático, observada en este estudio no permitió evaluar el efecto del TMCA sobre esos marcadores. Sólomente la colagéna permaneció aumentada a pesar de la suspensión del CCl_4 . El TMCA produjo una disminución pequeña pero significativa en el contenido de colagéna. A pesar de que el efecto fue modesto no deja de ser muy importante si tomamos en consideración que a la fecha no existe ningún fármaco que "cure" la cirrosis. Además, el resultado concuerda con el hecho de que la colagéna "vieja" es muchos menos susceptible de degradación que las fibras de colagéna recién formadas; por eso el efecto del TMCA fue mucho mayor cuando se administró durante el desarrollo de la fibrosis (esquema de prevención) en comparación con su efecto discreto cuando se empezó a administrar a ratas con una fibrosis ya establecida.

En resumen, el TMCA posee efectos benéficos en la cirrosis experimental similares a los de la colchicina, con la ventaja de que su baja toxicidad permite administrarse a dosis más efectivas y sin efectos colaterales.

VI. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La administración del TMCA cursa sin aparentes efectos colaterales indeseables, a pesar de usar dosis hasta 10 veces mayores a las empleadas de la colchicina.
2. El TMCA a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ aumentó la sobrevivencia de las ratas con obstrucción biliar en un 80%. A la misma dosis la colchicina es muy tóxica, y causa diarrea y/o muerte de los animales.
3. La colchicina y el TMCA previnieron la elevación significativa de los valores de los marcadores de daño hepático en la cirrosis inducida por ligadura del conducto biliar común.
4. La colchicina y el TMCA previnieron que se elevaran los marcadores de colestasis en suero, ya que mejoraron la conjugación de la bilirrubina, y disminuyeron las actividades de la fosfatasa alcalina y de la γ -glutamyl transferasa en suero; la actividad de la fosfatasa alcalina persistió aumentada a pesar del tratamiento con colchicina.
5. Ambos fármacos impidieron que se elevara el grado de peroxidación lipídica en hígado, e impidieron que se perdiera el contenido hepático de glucógeno.

6. El TMCA limitó de manera importante el contenido de la colágena hepática en el tratamiento preventivo, debido probablemente a un efecto antifibrogénico. La fibrosis se limitó probablemente, al impedir la acumulación de colágena tipo IV, y por lo tanto la capilarización de los sinusoides, evitando así la necrosis celular y el depósito de las colágenas intersticiales tipos II y III. En el tratamiento de reversión el contenido de colágena disminuyó significativamente.

7. La colchicina y el TMCA preservaron las actividades de las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} , en las membranas plasmáticas de los hepatocitos y de los eritrocitos, posiblemente debido a su capacidad para conservar el microambiente lipídico de estas enzimas.

VII. CONCLUSIÓN

El TMCA posee efectos benéficos semejantes a los de la colchicina, pero es menos tóxico, lo que permite administrar dosis más altas sin efectos colaterales.

BIBLIOGRAFIA

- Abell LL, Levy BB, Brodie BB y Kendall FE. A simplified method for the estimation of cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952;195:357.
- Ala-Kokko L, Pihlaneimi T, Myer JC, Kivirikko KI y Savolainen ER. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine. *Biochem J* 1987;244:75.
- Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 1966;8:115.
- Anwer MS, Engelking LR, Nolan K, Sullivan D, Zimniak P y Lester R. Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca^{++} activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1988;8:887.
- Aterman K. Studies in fibrosis of the liver induced by carbon tetrachloride. I. Relation between hepatocellular or cellular injury and new formation of fibrosis tissue. *Arch Pathol* 1954;57:1
- Baptista A, An International Group. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. *Lancet* 1981;1:707.
- Baumgartner U, Scholmesrich J, Karsch J, Gerok W y Farthmann EH. Loss of zonal heterogeneity and cell polarity in rat liver with respect to bile acid secretion after bile drainage. *Gastroenterology* 1991;100:1054.
- Bergmeyer HU, M Grabl y Walter HE. Enzymes. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. Eds Bergmeyer and Grabl M. Verlag-chemie, Weinheim. pp 269-270. 1983
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL y Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Ann Rev Cell Biol*

1992;8:365.

Betro MG. Gamma-glutamyl transpeptidase in diseases of the liver and bone. *Am J Clin Pathol* 1973;60:672.

Bleich H y Boro E. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *New Eng J Med* 1977;297:371.

Bloch EH. The termination of hepatic arterioles and the functional unit of the liver as determined by microscopy of the living organ. *Ann NY Acad Scie* 1970;170:78.

Boyde TRC y Latner AL. Starch gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and serum. *Biochem J*, 1961;82:52.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248.

Brissaud E y Sabourin D. Sur la constitution lobulaire du foie et le voies de la circulti sanguine intra-hepatique. *C R Soc Biol* 1888;40:757.

Brown WO y Seed L. Effect of colchicine on human tissues. *Amer J Clin Path* 1945;15:189.

Brues AM y Cohen A. Effects of colchicine and related substances on cell division. *Biochem J* 1936; 30:1363.

Cameron GR y Karunaratne WAE. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* 1936;42:1.

Carruthers JS y Steiner JW. Experimental extrahepatic biliary obstruction: fine structural changes of liver cell mitochondria. *Gastroenterology* 1962;42:419.

Chau-Wong M y Seeman P. The control of membrane-bound Ca^{2+} by ATP. *Biochem Biophys Acta* 1971;241:473.

- Chiquoine AD. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J Histochem Cytochem* 1953;1:429.
- Clarke LC y Beck E. Plasma "alkaline" phosphatase activity I. Normative data for growing children. *J Pediatr* 1950;36:335.
- Clermont RJ y Chalmers TC. The transaminase tests in liver diseases. *Medicine* 1967; 46:197.
- Combettes L y Berthon B, Doucet E, Erlinger S, Claret M. Bile acids mobilise internal Ca^{++} independently of external Ca^{++} in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1990;190:619.
- Crofton PM. Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1982;16:162.
- Damsky CH y Bernfield M, eds. Current opinions cell biology, vol 1: Cell to cell contact and extracellular matrix. Current Biology, Ltd, 1989.
- Debroe ME. The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. *Clin Chim Acta* 1975;59:369.
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245.
- De Ritis F. Biochemical laboratory tests in viral hepatitis and other hepatic diseases. *Bull WHO* 1965;32:59.
- De Ritis F. Serum transaminase activities in liver disease. *Lancet* 1972;1:685
- Desmet VJ. Current problems in diagnosis of biliary disease and cholestasis. *Semin Liver Dis* 1986;6:175.
- Desmet VJ. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. En: *Pathology of the liver*. Eds MacSween RN, Anthony PP, Scheuer PJ, 2nd ed. Edinburgh: Churchill

Livingstone, 1987.

De Vos R, De Wolf-Peeters C, Desmet V, Bianchi L y Rohr HP. Significance of liver canalicular changes after experimental bile duct ligation. *Exp Mol Pathol* 1975;23:12.

De Vos R y Desmet VJ. Morphologic changes of the junctional complex of the hepatocytes in rat liver after bile duct ligation. *Br J Exp Pathol* 1978;59:220.

Dreyfus JC. Serum enzymes in the physiopathology of muscle. *Ann NY Acad Sci* 1959;75:235.

Ehrinpreis MN, Grambone M y Rojkind M. Liver proline oxidase activity and collagen synthesis in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Biochim Biophys Acta* 1980;629:184.

Ekataksin W, Wake K, Nishida J, Krasovich M y McCuskey R. HMS, hepatic microcirculatory subunit: three dimensional observations on development and special distribution in mammalian livers. *Hepatology* 1993a:153A.

Ekataksin W, Nishida J, Mc Donnell D, Krasovich M y McCuskey RS. Postnatal development of the hepatic microvasculature and microcirculation in rats. *Hepatology* 1993b;18:157A.

Elias H y Sherrick JC. *Morphology of the liver*. New York: Academic Press, 1969.

Ellis G. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol* 1978;70:248.

Erlinger S. Bile flow. En: *The liver biology and pathobiology*. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachte D, Shafritz DA, eds. 2nd ed New York: Raven Press, 1988;643.

Erslev AJ. Hemopoietic functions of the liver. En: *The liver: biology and pathobiology*. Eds Arias IM, Boyer JL, Fausto, Jakoby WB, Schachter D y Shafritz DA. 3rd ed. New York: Raven Press, 1993:1073.

Farrel GC, Duddy SK, Kass GEN, Llopis J y Grahm A. Orrenius S. Release of calcium from the endoplasmic reticulum is not the mechanism for bile acid-induced cholestasis and

- hepatotoxicity in the intact rat liver. *J Clin Invest* 1990;85:1255.
- Folch J, Lees M y Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497.
- Fricker G, Landmann L, Meier PJ. Extrahepatic obstructive cholestasis reverses the bile salt secretory polarity of rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1989;84:9876.
- Fukuoto T. Possible developmental interactions of hematopoietic cells and hepatocytes in fetal rat liver. *Biomed Res* 1992;13:395.
- Fuller GC. Prospectives for the use of collagen synthesis inhibitors as antifibrotic agents. *J Med Chem* 1981;24:651.
- Fu XX, Su Cy, Lee Y, Hintz R, Biempical L, Snyder R y Rogler CE. Insulin-like growth factor II expression and oval cell proliferation associated with hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus carries. *J Virol* 1988;62:3422.
- Gebhardt R. Different proliferative activity in vitro of periportal and perivenous hepatocytes *Scand J Gastroenterol* 1988;23:8.
- Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275.
- Glickman R y Sabesin S. Lipoprotein Metabolism. En: *The liver: Biology and Patholbiology*. Eds. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D y Shafritz DA. 3rd ed New York, Raven Press, 1994;841.
- Glossmann M y Neville DM. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett* 1972; 19:340.
- Goldberg B, Ortega L y Goldin A. Studies on colchicine derivates. *J Cancer* 1950;3:124.

- Greenwel P, Iraburu MJ, Reyes-Romero M, Meraz-Cruz N, Casado E, Solis-Herruzo JA y Rojkind M. Induction of an acute phase response in ratas stimulates the expression of $\alpha 1(I)$ procollagen messenger ribonucleic acid in their livers. Possible role of interleukin-6. *Lab Invest* 1995;72:83.
- Guzman M y Castro J. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J* 1989;264:107.
- Gutman AB. Serum alkaline phosphatase activity in diseases of the skeletal and hepatobiliary systems. *Am J Med* 1959;27:875.
- Harris ED y Krane SM. The effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1971;14:669.
- Harris ED, Welgus HG y Krane SM. Regulation of the mammalian collagenases. *Collagen Rel Res* 1984;4:493.
- Hasthorpe S, Bogdanovski M, Rogerson H y Radley JM. Characterization of endothelial cells in murine long-term marrow culture: implication for hemopoietic regulation. *Exp Hematol* 1992;20:476.
- Hatoff DE, Toyota H y Wang C. Rat liver alkaline phosphatase. Evidence that hepatocyte and portal triad enzymes differ. *Dig Dis Sci* 1985;30:564.
- Hems DA y Whitton P. Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol Rev* 1980;60:1.
- Heuman DM, Pandank WM, Hylemon PB y Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts : in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1991;14:920.
- Hubbard AL y Stieger B. Biogenesis of endogenous plasma membrane proteins in epithelial cells. *Annu Rev Physiol* 1989;1:755.

- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11.
- Iga T y Klaasen CD. Uptake of bile acids by isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1992;31:211.
- Inoue M, Kinne R, Tran T y Arias IM. Taurocholate transport by rat liver canalicular membrana vesicles. Evidence for the presence of an Na-independent transport system. *J Clin Invest* 1984;73:649.
- Jones AL, Schumucker DL, Mooney JS, Adler RD y Ockner RK. Morphometric analysis of rat hepatocytes after total biliary obstruction. *Gastroenterology* 1976;71:1050.
- Jungermann K. Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes. *Enzyme* 1986;35:161.
- Kaplan MM y Righetti A. Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction: *J Clin Invest* 1970;49:508.
- Kaplan MM. Alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 1972;62:452
- Kaplan MM. Increased synthesis of rat liver alkaline phosphatase by bile duct ligation. *Hepatology* 1983;3:368.
- Kaplan MM. Serum alkaline phosphatase: another piece is added to the puzzle. *Hepatology* 1986;6:526
- Kaplan MM. Laboratory tests. En: *Diseases of the liver*. Eds Schiff L, Schiff ER. 7th ed Philadelphia: Lippincott, 1993: 108.
- Katz N, Thiele J y Giffhorn-Katz S. Zonal distribution of fatty acid synthase in liver parenchyma of male and female rats. *Eur J Biochem* 1989;180:185.
- Kershenobich D, Uribe M, Suárez GI, Mata JM, Pérez-Tamayo Ruy y Rojkind M. Treatment of

- cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. *Gastroenterology* 1979;77:532.
- Kershenobich D, Rojkind M, Quiroga A y Alcocer-Varela J. Effect of colchicine on lymphocyte and monocyte function and its relation to fibroblast proliferation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:205.
- Kiernan F. The anatomy and physiology of the liver. *Philos. Trans R. Soc Lond* 1833;123:711.
- Kivirikko KI y Myllylä R. Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Scie*, 1985;460:187.
- Kivirikko KI y Savolainen ER. Hepatic collagen metabolism and its modification by drugs in: *Liver drugs: from experimental pharmacology to therapeutic application*. Eds. Bernar Testa y Daniel Perrissoud. CRC PRESS, 1988.
- Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reiche J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 1994;19:471.
- Kountouras J, Billing BH y Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J exp Path* 1984;65:305.
- Lamers WH, Moorman AFM y Charles R. The metabolic lobulus, a key to the architecture of the liver. En: *Revisiones sobre biología celular*. Gumucio JJ, ed. *Cell biology reviews*. Vol 19 Berlin: A Springer International, 1989:5-26.
- Landmann L, Meier PJ y Bianchi L. Bile duct ligation-induced redistribution of canalicular antigen in rat hepatocyte plasma membranes demonstrated by immunogold quantification. *Histochemistry* 1990;94:373.
- Lange Y, Molinaro A, Chauncey T y Steck T. On the mechanism of transfer of cholesterol between human erythrocytes and plasma. *J Biol Chem*;1983;258:6920.

- Lee KS y Au MS. A protein inhibitor of erythrocyte membrane Ca^{2+} Mg-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1983;742:54.
- Leoni S, Luly P, Mangiantini MT y Spagnuolo S. Effect of free fatty acids and cholesterol in vitro on liver plasma membrane-bound enzymes. *Experientia* 1982;38:102.
- Lotersztajn S y Pecker FA. Membrane-bound protein inhibitor of the high affinity Ca^{2+} ATPase in rat liver plasma membranes. *J Biol Chem* 1982;257:6638.
- Lum G y Gambino SR. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem* 1972;18:358.
- Mall FP. A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat* 1906;5:227.
- Malawista SE. Colchicine: a common mechanism for its antiinflammatory and antimitotic effects. *Arthritis Rheum* 1968;11:191.
- Mansour MM, Dunn M A y Salah LA. Effect of colchicine on collagen synthesis by liver fibroblasts in murine schistosomiasis. *Clin Chim Acta* 1988;177;11.
- Marchand YL y Singh A. A role for the microtubular system in the release of very low density lipoproteins by perfused mouse livers. *J Biol Chem* 1973;218:6862.
- Martínez-Hernández, Delgado FM y Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen I,III, IV, laminin and fibronectin. *Lab Invest* 1991;64:157.
- Martínez M, Mourelle M y Muriel P. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl_4 . Role of cytochrome P-450. *J Appl Tox* 1995;15:49.
- Maruyama K, Feinman L, Fainalko M, Okazaki I y Lieber CS. Mammalian collagenase increase in early alcoholic liver diseases and decreases with cirrhosis. *Life Scie* 1982;30:1379.
- Matsumoto R y Kawakami M. The unit-concept of hepatic parenchyma a re-examination based on

- angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 1982;32:285.
- Mayani H, Guilbert LJ y Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225.
- McCuskey RS, Vonahme FJ y Grüm M. In vivo and electron microscopic observation of the rat hepatic microvasculature after portacaval anastomoses. *Hepatology* 1983;3:96.
- McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R y Urbaschek B. Kupffer cell function in host defense *Rev Infect Dis* 1987;5:S616-S619.
- McLeod JG y Phillips L. Hypersensitivity to colchicine. *Ann Rheum Dis* 1947;6:224.
- Mecham RP. Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEBJ* 1991;5:2538-2546.
- Meier-Abt PJ. Cellular mechanisms of intrahepatic cholestasis. *Drugs* 1990;40 (Suppl 3):84.
- Meister A y Tate SS. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 1976;45:559.
- Montfort I y Pérez-Tamayo R. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 1978;92:411.
- Montfort I, Pérez-Tamayo R, Alvizour AM y Tello E. Collagenase of hepatic and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1990;59:281.
- Mourelle M, Rojkind M y Rubalcava B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology* 1981;21:213.
- Mourelle M, Villalon C y Amezcua JL. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 1988;6:337.
- Mourelle M y Meza Angel. Colchicine prevents D-galactosamine-induced hepatitis. *J Hepatol*

1989;8:165.

Muriel P y Mourelle M. Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. Role of S-adenosyl-L-methionine. *J Hepatol* 1992;14:16.

Muriel P, Quintanar M E y Pérez-Alvarez V. Effect of colchicine on acetaminophen-induced liver damage. *Liver* 1993;13:217.

Muriel P, Favari L y Soto C. Erythrocyte alterations correlate with CCl₄ and biliary obstruction-induced liver damage in the rat. *Life Sciences* 1993;52:647.

Muriel P y Suárez OR. Role of lipid peroxidation on biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1994;14:423.

Muriel P, Suárez OR, González P y Zúñiga L. Protective effect of S-adenosyl-l-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach. *J Hepatol* 1994;21:95.

Muriel P. High fat diet and liver damage induced by biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1995;15:125.

Muriel P. Interferon- α preserves erythrocyte and hepatocyte ATPase activities from liver damage induced by prolonged bile duct ligation in the rat. *J Appl Toxicol* 1995;15:449.

Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. En: *Antioxidants, Oxidants and Free Radicals*. Eds Baskin S I y Salem H. Taylor & Francis, 1997.

Muriel P, Ostoa-Saloma PU, Reyes-Esparsa JA y Rodríguez-Fragoso L. Trimethylcolchicinic acid decreases liver fibrosis and cholestasis induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *J Appl Tox* 1997 (en prensa).

Nathanson MH y Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991;14:551

- Nava-Ocampo AA, Suster S y Muriel P. Effect of colchicine and ursodeoxycholic acid on hepatocyte and erythrocyte membranes and liver histology in experimentally induced carbon tetrachloride cirrhosis in rats. *Eur J Clin Invest* 1997;27:77.
- Neville DM. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 1960;8:413.
- Nogawa H y Mizuno T. Mesenchymal control over elongating and branching morphogenesis in salivary gland development. *J Embryol Exp Morphol* 1981;66:209.
- Oguey D, Marti U y Reichen J. Epidermal growth factor receptor its possible implication in the maintenance of hepatocellular mass in biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Cell Biol* 1992;59:187.
- Ohkawa H, Ohnishi N y Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351.
- Owen JS, Bruckdorfer KR, Day RC y McIntyre N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J Lipid Res* 1982;23:124.
- Pérez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease; En: *Pathology annual*, Vol 2. Eds Sommers SC y Rose PP. New York: Appleton-Century-Crofts, 1979:183.
- Pérez-Tamayo R. Enfermedad veno-oclusiva del hígado. *Patología* 1981;19:277.
- Pérez-Tamayo R. Degradation of collagen: pathology. En: *Collagen in Health and Disease*. Eds. Weise JB y Jayson MIV. Churchill Livingstone. Edinburgh 1982, 135.
- Pérez-Tamayo R. Is Cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;3:112.
- Peterkofsky B y Prockop J. A method for the simultaneous measurement of the radioactivity of

- proline-C¹⁴ and hydroxyproline-C¹⁴ in biological materials. *Anal Biochem* 1962;4:400.
- Petrides AS, Groop LC, Riely CA y DeFronzo RA. Effect of physiologic hyperinsulinemia on glucose and lipid metabolism in cirrhosis. *J Clin Invest* 1991;88:561.
- Pohl S, Birnbaumer L y Rodbell M. Glucagon-sensitive adenylyl cyclase in plasma membrane of hepatic parenchymal cells. *Science* 1969;164:566.
- Proctor E y Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in rat. *Gastroenterology* 1982;83:1183.
- Popper H. Pathologic aspects of cirrhosis. *Am J Pathol* 1977;87:228.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM y Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Ant Rec* 1954;119:11.
- Rappaport AM y Hiraki GY. The anatomical pattern of lesions in the liver. *Acta Anat* 1958;32:126
- Raymond GD y Galambos JT. Hepatic storage and excretion of bilirubin in man. *Am J Gastroentrol* 1971; 55:135.
- Recknagel RO y Ghoshal AK. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab Invest* 1966;15:132.
- Recknagel RO y Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 1973;2:263.
- Reinols M, McDonald S y Salem N. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. *Anal Biochem* 1982;124:19.
- Reitman S y Frankel S. A colorimetric and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28:56
- Rej R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. *Clin*

Chem, 1978;24:1971.

Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F y Dexter TM. Heparan sulphate-bound growth factors: a mechanism of stromal cell-mediated haemopoiesis. Nature 1988;332:376.

Rojkind M y González Elvira. An improved method for determining specific radioactivities of proline-C¹⁴ and hydroxyproline-C¹⁴ in collagen and in noncollagenous proteins. Anal Biochem 1974;57:1.

Rojkind M y Kershenobich D. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. Biochim Biophys Acta 1975;378:415.

Rojkind M, Giambrone MA y Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 1979;76:710.

Rojkind D, Uribe M, Suárez GI, Mata JM, Pérez-Tamayo R y Rojkind M. Treatment of cirrhosis with colchicine: a double blind randomized trial. Gastroenterology 1979;77:532.

Rojkind M y Pérez-Tamayo R. Liver fibrosis. Int Rev Connect Tissue Res 1983;10:333.

Rojkind M, Rojking MH y Cordero-Hernández J. En vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regenerating rat liver. Collagen Relat Res 1983;3:335.

Rojkind M, Mourelle M y Kershenobich D. Antiinflammatory and antifibrogenic activities of colchicine: Treatment of liver cirrhosis: myelofibrosis and the biology of connective tissue, p 475, New York, Alan R Liss Inc, 1984.

Rojkind M y Greenwel P. Extracellular matrix. En: The liver: Biology and Pathobiology. Eds. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D y Shafritz DA. 3rd ed New York, Raven Press, 1994;841.

- Rose H y Oklander M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res* 1965;5:318.
- Rosser B. y Gores G. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995;108:252.
- Rubin E, Krus S y Popper H. Pathogenesis of postnecrotic cirrhosis in alcoholics. *Arch Pathol* 1963;73:288.
- Rubin E, Hutterer F y Popper H. Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication. *Am J Pathol* 1963;42:715.
- Ruoslahti E y Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulator of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867.
- Saksela O y Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 1990;110:767.
- Salz JL. Serum alkaline phosphatase activity during adolescence. *J Pediatr* 1973;82:536.
- Sánchez JA y Mourelle M. Esteatosis en el hígado de ratas durante la intoxicación aguda con colchicina, *Biochimia* 1987;9:9.
- Sayato Y, Nakamuro K y Usui S. *Japan J Pharm* 1987;33: 394.
- Sandermann H. Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim Biophys Acta* 1978;515:209.
- Schachter D. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. *Hepatology* 1984;4:146.
- Schaffner F y Popper H. Electron microscopic study of human cholestasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;101:777.
- Schnell E, Schönharting M y Suebert G. Metabolic transformation of colchicine, IV. On the

interaction of colchicine and colchicine with sulfhydryl compounds. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 357:567.

Schoelmerich J, Becher MS, Schmidt KH, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S y Gerok W. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties- studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. Hepatology 1984;4:661.

Schuller A, Solis-Herruzo J, Moscat J, Fernandez-Checa J y Municio A. The fluidity of liver plasma membranes from patients with different types of liver injury. Hepatology 1986;6:714.

Schumacher HH. Histochemical distribution pattern of respiratory enzymes in the liver lobule. Science 1957;125:501.

Seifter S, Seymour B, Novic B y Muntwyler E. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch Biochem 1950; 25:191.

Seyer JM. Interstitial collagen polymorphism in rat liver with CCl₄-induced cirrhosis. Biochim Biophys Acta, 1980;629:490.

Shaw LM y Neuman DA. Hydrolysis of glutathione by human liver γ -glutamyl transferase. Clin Chem 1979;27:75.

Skou JC. Overview: the Na,K-pump. Methods Enzymol 1988;156:125.

Simons K y Fueller SD. Cell surface polarity in epithelia. Annu Rev Cell Biol 1985;1:295.

Smyth CJ, Frank LS. Treatment of gout and arthritis. Rheumatism 1962;18:2.

Sokol RJ, Devereaux M y Rashmi AK. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. J Lipid Res 1991;32:1349.

Spector AA y Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. J Lipid Res 1985;26:1015.

- Stein O y Stein Y. Colchicine-induced inhibition of very low density lipoproteins released by rat liver in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1973;306:142-147.
- Szas G. Reaction rate method for γ -glutamyl transferase activity in serum. *Clin Chem* 1976;22:2051.
- Tereda T y Nakanuma Y. Immunohistochemical demonstration of pancreatic alpha-amylase and trypsin in intrahepatic bile ducts and peribiliary glands. *Hepatology* 1991;14:1129.
- Thurman RG y Kauffman FC. Metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule: sublobular compartmentation of pharmacologic event (SCOPE). *Hepatology* 1985;144:151.
- Traber PG, Chianale J y Gumucio JJ. Physiologic significance and regulation of hepatocellular heterogeneity. *Gastroenterology* 1988;95:K1130.
- Uitto J, Ryhänen L, Tan EML, Oikarinen AI y Zaragoza EJ. Pharmacological inhibition of excessive collagen deposition in fibrotic disease. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 1984;43:2815.
- Van Eyken P, Sciote R y Desmet V. A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express "bile duct-like" cytokeratins. *Histopathology* 1989;15:125.
- Vital A, Bioulac-Sage P, Iron A y Balabaud D. Morphologic structure of bile canaliculi after bile duct ligation in the rat. A time course study. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:464.
- Volpes R, Van den Oord JJ y Desmet VJ. Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. *Gastroenterology* 1991;101:200.
- Vyvoda OS, Coleman R y Holdsworth G. Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation. *Biochim Biophys Acta* 1977;465:68.

- Whal LM y Winter CC. Regulation of guinea pig macrophage collagenase production by dexamethasone and colchicine. *Arch Bioch and Bioph* 1984;230:661.
- Wallace SL, Bernstein D y Diamond H. Diagnostic value of the colchicine therapeutic trial. *JAMA* 1967;199:525.
- Wallace SL. Colchicine. *Semin Arthritis Rheum* 1974;3:369.
- Wallace SL. Colchicine and new antiinflammatory drugs for the treatment of acute gout. *Arthritis and Rheumatism* 1975;18:847.
- Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR y Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 1969;42:68.
- Whitefield JB. Changes in plasma γ -glutamyl transferase activity associated with alterations in drug metabolism in man. *Br Med J* 1973;1:316.
- Whitehead TP. Biochemical and haematological markers of alcohol intake. *Lancet* 1978;1:978.
- Wisse E, DeZanger RB, Charels K, y McCuskey RS. The liver sieve considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal well and the space of Disse. *Hepatology* 1985;5:692.
- Yahuaca P, Amaya A, Rojkind y Mourelle M. Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. *Lab Invest* 1985;53:441.
- Zein M, Discombe G. Serum gamma-glutamyl transpeptidase as a diagnostic aid. *Lancet* 1970;2:748.
- Zieve L. Normal and abnormal variations and clinical significance of the one-minute and

total serum bilirubin determinations. *J Lab Clin Med* 1951;38:446.

Zimmerman HJ y West M. Serum enzyme levels in the diagnosis of hepatic disease. *Am J Gastroenterol* 1963;40:387.

Zsebo KM, Wypych J y McNiece IK. Identification, purification and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990;63:195.