



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY
MEDICAL CENTER I.A.P.

EFFECTO DE LA RAPAMICINA SOBRE LA
INHIBICIÓN DE LA FIBROGENESIS EN LA
CIRROSIS BILIAR SECUNDARIA

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA GENERAL

PRESENTA:

DR. JUAN MANUEL CHAPARRO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS FLOREZ ZORRILLA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:
DR. JORGE CERVANTES CASTRO



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2008



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.

**DR. CARLOS FLOREZ ZORRILLA
CIRUJANO GENERAL,
CIRUJANO HEPATOLÓGO Y DE TRANSPLANTES
CENTRO MÉDICO ABC**

**DR. JORGE CERVANTES CASTRO
PROFESOR TITULAR DEL CIRUGÍA GENERAL
CENTRO MÉDICO ABC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

**DR. JOSÉ HALABE CHEREM
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN
E INVESTIGACIÓN MÉDICA
CENTRO MÉDICO ABC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A todos los médicos y personas que me han ayudado a ser lo que soy.

Al Dr. Jorge Cervantes Castro, por sus enseñanzas y amistad

Al Dr. Guillermo Rojas Reyna, por hacerme saber mis errores.

Al Dr. Felipe Cervantes, por ver la cirugía desde otro nivel.

Al Dr. Alberto Chousleb por su paciencia.

Al Dr. Samuel Shuchleib por sus perlas de conocimiento en cada sesión.

Al Dr. Carlos Cosme por su profesionalismo y amistad.

A la Dra. María del Carmen Hernández, Patricia y Javier del Centro de Cirugía Experimental

“Karl Storz” Brimex II.

Al Dr. Carlos Ortiz y Dr. César Lara del Departamento de Patología del CMABC Observatorio.

Al Departamento de Laboratorio Clínico del CMABC Observatorio.

Al Bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Antecedentes.....	3
Modelos experimentales.....	4
Antecedentes bibliográficos.....	12
Planteamiento del problema.....	13
Objetivo.....	13
Hipótesis.....	13
Justificación.....	13
Material y métodos.....	14
Tipo de estudio.....	16
Resultados.....	17
Discusión.....	18
Conclusiones.....	19
Bibliografía.....	20
Anexos (Figuras, Tablas)	23

RESUMEN ESPAÑOL

Las hepatopatías crónicas se caracterizan por la progresión hacia fibrosis secundaria al depósito de proteínas de la matriz extracelular (PME). Las PME son producidas por células del tipo de los miofibroblastos entre ellas las células hepáticas estelares (CHE), localizadas en los espacios perisinusoidales. Posterior a una lesión hepática las CHE se transforman en miofibroblastos proliferativos y fibrogénicos.

La rapamicina es un macrólido que se utiliza como inmunosupresor ya que inhibe al blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), suprimiendo así la proliferación de linfocitos T y B. Se sugiere que su acción sobre las CHE tiene un efecto antifibrogénico.

Se diseñó un ensayo controlado, aleatorio y doble ciego en 20 ratas Wistar, a quienes se dividió en grupos control y estudio. En ambos grupos se realizó ligadura de la vía biliar para inducción de cirrosis biliar secundaria y posteriormente se le administra rapamicina al grupo estudio durante un mes, evaluando desde el punto de vista histológico el grado de fibrosis/cirrosis en cada grupo.

PALABRAS CLAVE

Rapamicina, fibrosis, cirrosis, miofibroblastos, mTOR, células hepáticas estelares, proteínas de matriz extracelular, ligadura de la vía biliar

ABSTRACT

Chronic hepatopathies are characterized by progression to secondary fibrosis because of extracellular matrix protein deposit (EMP). EMP are produced by myofibroblasts cell type like stellate hepatic cell (SHC), located in perisinusoidal spaces. After a hepatic injury the SHC transforms into proliferative and fibrogenic myofibroblasts.

Rapamycin is a macrolide used as immunosuppressant that inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR), suppressing the lymphocytes B and T proliferation. It is suggested that this effect on SHC have antifibrogenic properties.

It has been designed a randomized control trial, double blinded, in 20 Wistar rats divided in control and study groups. Both groups underwent common bile duct ligation in order to induce secondary biliary cirrhosis, then rapamycin was given to study group for a month, testing the histological grade of fibrosis/cirrhosis in each group.

KEY WORDS

Rapamycin, fibrosis, cirrhosis, myofibroblasts, mTOR, hepatic stellar cells, extracellular matrix proteins, bile duct ligation.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Las hepatopatías crónicas se caracterizan por la progresión hacia fibrosis secundaria al depósito de proteínas de la matriz extracelular (PME) ⁽¹⁾. Las PME son producidas por células del tipo de los miofibroblastos, hasta ahora se reconocen tres tipos de acuerdo a su localización histológica; las células hepáticas estelares (CHE, localizadas en los espacios perisinusoidales), los miofibroblastos portales/septales, y los miofibroblastos de interfase ^{(2) (3) (4)}. Posterior a una lesión hepática las CHE se transforman en miofibroblastos proliferativos, fibrogénicos y miofibroblastos contráctiles.

Un paso importante para la transformación de las CHE es la activación del mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos) dependiente de la P13-K/AK1, el cual es una cinasa que controla la proliferación celular a través de la síntesis de proteínas.

De las células mencionadas anteriormente, las CEH son las mejor estudiadas, y que además son claves para el desarrollo de fibrosis hepática ⁽⁵⁾. El mitógeno más potente para la activación de las CEH, es el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCDP) ⁽⁶⁾.

Este factor es secretado en forma autócrina por las CEH, pero también es sintetizado por los colangiocitos durante la colestasis ⁽⁷⁾.

El factor de crecimiento transformador (FCT- β 1) es el estímulo fibrogénico más importante para las CEH ⁽⁸⁾. Los niveles del FCT- β 1 aumentan en la fibrosis hepática y regulan la actividad de CEH de modo autócrino. Otra citocina

importante que también se encuentra involucrada en la fibrogénesis es el factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC). Este es un mediador del FCT- β 1, mediando y potenciando algunos de sus efectos, como la proliferación de fibroblastos y la producción de MEC ⁽⁹⁾.

La transformación de las células estelares, es mediante la activación de mTOR, una kinasa que está involucrada en el control de las funciones celulares relacionadas al crecimiento; en primer lugar, mTOR fosforila a p70 activándola e inhibe el factor de iniciación eucariótico (eIF) y a la proteína de unión 4E (4E-BP-1), por lo tanto imposibilita el ensamblaje del complejo eIF4F. En segundo lugar, p70 fosforilada, activa a la kinasa S6 y ésta aumenta la translación de mRNA de proteínas esenciales para la progresión del ciclo celular.

MODELOS EXPERIMENTALES

Uno de los modelos más usados y aceptados para el estudio de los cambios fisiopatológicos que tienen lugar durante el desarrollo de fibrosis hepática e hipertensión portal, es la inducción de la cirrosis biliar secundaria por la ligadura del conducto biliar. Una vez ligado el conducto biliar, existe disminución del parénquima funcional, aumento en la fibrosis y proliferación de ductos biliares ⁽¹⁰⁾.

Además de desarrollar de manera paralela hipertensión portal, cortocircuitos portosistémicos y el síndrome de circulación hiperdinámico, descrito por Van de Casteele ⁽¹¹⁾ manifestado por una disminución de las resistencias vasculares sistémicas y un aumento en el gasto cardiaco.

La rapamicina también conocida como Sirolimus[®] (Wyeth Pharmaceuticals) (Fig. 1), Inicialmente fue introducida a la práctica clínica como un fármaco inmunosupresor. Sin embargo, se han observado otras propiedades, como la inhibición de la proliferación la cual interfiere con la progresión del ciclo celular entre otras⁽¹²⁾ (Tabla 1). Se sabe que la rapamicina se une dentro de la célula a las proteínas que unen al tacrolimus (FK506). La proteína de unión más importante es la FKBP12⁽¹³⁾.

El complejo rapamicina – FKBP12 inhiben a mTOR, enzima importante en la proliferación celular como ya se ha mencionado (Fig. 2). La rapamicina también disminuye la concentración de ciclina D1 y por lo tanto bloquea la eliminación del inhibidor p27 y p21, contribuyendo a la disminución de la proliferación celular (Fig. 3).

Además se cree que al inhibir la proliferación de las células T, limite la respuesta inmunológica patogénica, el cuales un componente importante también en la fibrosis hepática.

En 1999, Zhu et al, investigó por primera vez, los efectos de rapamicina en la fibrogénesis hepática⁽¹⁴⁾. El experimento se realizó en ratas, que se dividieron en tres grupos; el grupo de rapamicina consistió en 7 animales tratados con inyecciones intraperitoneales (IP) con tetracloruro de carbono (CCl₄) 2 veces por semana durante 8 semanas.

El CCl₄ fue administrado en dosis mayores de 0.3ml/kg durante la primer semana, 0.7ml/kg la segunda semana, y 1ml/kg la tercer semana y hasta que se terminara el experimento. Estas ratas fueron tratadas además con rapamicina IP (1.5mg/kg/día) durante todo el estudio. El segundo grupo consistió en 8 animales tratados solo con CCl₄ como se describió antes y en lugar de rapamicina se usaron volúmenes equivalentes de solución inyectable diariamente.

Por último, el tercer grupo incluía 3 animales solo tratados con solución inyectable IP (grupo control). Todos los animales se sacrificaron después de las 8 semanas de tratamiento; los hígados se extrajeron al momento de su muerte y se fijaron en formalina al 10% para su estudio histológico.

Cuando se evaluó la histología del hígado de las ratas tratadas con CCl₄ más solución inyectable se observó depósito de MEC en localización centrilobulillar y periportal, en tanto que hubo una disminución en el depósito de MEC en el hígado de las ratas tratadas con rapamicina y CCl₄ con una $P < 0.025$.

La disminución del depósito de colágena se confirmó también con hidroxiprolina en el hígado de las ratas tratadas, comparado con el de las ratas con CCl₄ + solución inyectable. Mediante análisis de hibridación, se encontró un aumento de los niveles de mRNA de procolágena y FCT- β 1 inducida en los hígados que recibieron CCl₄ y que fue inhibido con el tratamiento con rapamicina, con una $P < 0.01$.

Se analizó también la actividad de transglutaminasa, que aumenta durante la lesión hepática y fibrosis y está involucrada también en la síntesis de MEC y por lo tanto es otro factor que participa en la fibrogénesis. En base a lo anterior, se observó que la actividad de ésta enzima aumenta 3-4 veces cuando se induce lesión con CCl_4 , en tanto que rapamicina, disminuye la actividad de esta enzima con una $P < 0.01$.

Se estudió también el efecto de la rapamicina sobre la proliferación de las CEH, usando la incorporación de timidina a estas células como indicador de proliferación celular, observándose una menor incorporación en las células que recibieron FCDP + RAPA que en las que solo recibieron PDGF con una $P < 0.01$. Por los resultados anteriores se concluyó que rapamicina es una alternativa in vivo para frenar la progresión de la lesión hepática, inhibiendo la fibrosis.

Posteriormente en el 2005, Biecker et al ⁽¹⁵⁾ investigó también el impacto de rapamicina en la fibrosis hepática y en la hemodinamia de ratas con ligadura del conducto biliar (LCB). Para inducir la cirrosis, se sometió a 16 animales (ratas) a la ligadura de la vía biliar común bajo anestesia con pentobarbital. Las ratas se dividieron en tres grupos: los animales con LCB que recibieron 2 mg/kg/día de rapamicina, los animales con LCB sin tratamiento y un tercer grupo que fue el grupo control.

El tratamiento fue por 28 días y se inició inmediatamente después de la LCB. Como resultados, se obtuvo lo siguiente: el peso del bazo fue mayor en los animales sin tratamiento que los que recibieron rapamicina y el grupo control, con una $P < 0.001$. Los valores séricos de AST y bilirrubinas reflejaron el efecto positivo con el tratamiento con rapamicina, ya que estos marcadores séricos fueron mayores en el grupo que no fue tratado comparado con los que recibieron

rapamicina ($P < 0.01$). En cuanto a los parámetros hemodinámicos, la presión arterial media no tuvo diferencias significativas entre los dos grupos, sin embargo hubo una tendencia a la baja en el grupo que no recibió tratamiento.

La presión venosa porta, fue mayor en el grupo sin tratamiento y menor en el grupo con rapamicina con una $P < 0.01$. El gasto cardiaco fue mayor en las ratas sin tratamiento en relación a los que recibieron el fármaco sin embargo la diferencia no tuvo significancia estadística. Por otro lado, se observó que el efecto positivo de la rapamicina en cuanto a parámetros hemodinámicos fue paralelo a la inhibición de los cambios histológicos posterior a la LCB, con los siguientes resultados: el grupo con rapamicina tuvo un mayor volumen de hepatocitos comparado con el grupo no tratado. En contraste, el volumen de tejido conectivo, las células del epitelio del ducto biliar y las células positivas para actina y desmina fueron menores en el grupo tratado en relación al grupo sin tratamiento.

En cuanto a los factores de crecimiento, se pudo demostrar que la rapamicina bloquea el desarrollo de fibrosis, así como la proliferación de ductos biliares. Se observó entonces que el FCT- $\beta 1$ (medido por PCR cuantitativo), aumentó 5 veces en el grupo sin tratamiento, comparado con los controles ($P < 0.001$), mientras que las ratas que recibieron rapamicina, solo aumentó 2.5 veces más con una $P < 0.05$. Este efecto inhibitorio fue paralelo a los niveles plasmáticos de FCT- $\beta 1$ en cada grupo, observando que la rapamicina disminuye sus niveles plasmáticos hasta en un 20%. Se midieron también los niveles de mRNA para FCTC que aumentaron hasta 86.8 veces más en los animales sin tratamiento en relación a los controles con una $P < 0.001$; mientras que en los animales que recibieron tratamiento mostraron solo un factor de incremento de 11.4 veces con una $P < 0.001$.

En cuanto al mRNA para el FCDP, se observó un aumento de 29 veces en los animales sin tratamiento comparados con los controles con una $P < 0.001$, siendo que las ratas que recibieron sirolimus mostraron un aumento solo de 8.8 veces comparado con los controles $P < 0.001$ y con las que no recibieron tratamiento $P < 0.01$.

Estos resultados claramente muestran que el tratamiento con rapamicina inhibe la expresión génica de las citocinas profibrogénicas y promitogénicas más importantes. Además se sabe que la rapamicina tiene un efecto inhibitorio directo en la maquinaria del ciclo celular, observando que el grupo de ratas sin tratamiento tuvieron niveles plasmáticos más bajo de p27, en tanto que la rapamicina indujo un aumento en los niveles plasmáticos de p27, pero no alcanzó los niveles de p27 de las ratas control $P < 0.01$. En cuanto a los niveles plasmáticos de p21, los mayores niveles se encontraron en las ratas con LCB con tratamiento, en tanto que las ratas sin tratamiento, tuvieron niveles menores con una $P < 0.01$. De igual manera los niveles de p70 fueron disminuidos en forma significativa por la rapamicina en relación a las ratas que no la recibieron con una $P < 0.001$. Por lo anterior, se confirmó una vez más el efecto inhibitorio de la proliferación celular así como la disminución de la fibrosis hepática.

Durante el 2006 Neef et al, ⁽¹⁶⁾ publicó nuevamente los efectos de rapamicina en dos modelos animales de cirrosis establecida: cirrosis biliar inducida por la ligadura del conducto biliar (LCB) y cirrosis inducida por tioacetamida (TAA). Un total de 89 ratas Wistar recibieron LCB, de éstas, 12 ratas murieron los primeros 10 días posteriores a la LCB. Por otra parte, en 40 ratas se inyectó TAA a 200mg/kg dos veces por semana; 5 ratas de éstas murieron en los próximos 21 días después de la inyección. El régimen de tratamiento fue como sigue: el día 28 después de la LCB,

las ratas fueron aleatoriamente asignadas a tratamiento con rapamicina oral ó bien no recibieron tratamiento. La rapamicina se dio por un régimen de 14 días ó un régimen extendido de 28 días. Las ratas con LCB sin tratamiento sirvieron como control de ambos regímenes. Los niveles de bilirrubina fueron medidos al final del experimento para asegurar la LCB; 5 animales (2 LCB-14, 1 LCB-RAPA-28 y 2 LCB-28), mostraron niveles de bilirrubina menor a 20mmol/L por lo que fueron excluidos del análisis estadístico. Las ratas TAA, fueron aleatorizadas al día 42 de la inducción del TAA, a algunas se les dio tratamiento por 14 y a otras por 28 días, y hubo algunas que no recibieron tratamiento y sirvieron como grupo control para ambos subgrupos. Se obtuvieron los siguientes resultados: 20% de las ratas control LCB-14 y 5.5% de las ratas RAPA-LCB-14 murieron durante la fase del tratamiento. 41% de las ratas LCB-28 y 18% de las ratas RAPA-LBC-28 murieron; por lo anterior se observó que el tratamiento con rapamicina prolongó la sobrevida en los animales tratados, con respecto a los controles con una $P=0.017$. Ningún animal murió durante la fase de tratamiento del experimento con TAA.

Se observó mayor volumen de hepatocitos en las ratas LCB-RAPA-14, en relación con el grupo LCB-14 con una $P<0.001$, no así en las ratas que recibieron régimen de 28 días, en donde no hubo cambios significativos. De igual forma, no se encontró diferencia en cuanto al volumen de hepatocitos en las ratas con TAA con y sin tratamiento. En cuanto al depósito de matriz extracelular, fue menor en las ratas LCB-RAPA-14 en comparación con el grupo control LCB-14 con $P<0.001$. En las ratas LBC-RAPA-28 hubo menos depósito de MEC, en relación a las del grupo control con $P<0.05$. En las ratas TAA-RAPA-14 también se encontró menor depósito de MEC en relación al grupo control con P significativa, pero no en las TAA-RAPA-28.

Se midió también la actividad de MMP-2, considerada una enzima que participa en la activación de la producción de MEC; su actividad aumentó en forma significativa en las ratas con LCB y TAA, y disminuyó después del tratamiento con rapamicina a un 26% en las ratas LCB-RAPA-14, a un 46% en LCB-RAPA-28 y en un 68% en TAA-RAPA-14 pero no en las ratas TAA-RAPA-28.

Lo anterior se asoció con una preservación de la función hepática metabólica y aún cuando no se pudo medir directamente la presión portal, se midió el peso de bazo como medida indirecta, de manera que el peso de éste órgano fue menor en las ratas con LCB-RAPA-14 en relación a las control con una $P < 0.001$, así como en las TAA-RAPA-14 en relación al grupo control en quienes el peso del bazo también fue menor $P < 0.05$; sin embargo no hubo ninguna diferencia estadística en las ratas con regímenes más largos tanto en el grupo con LCB como en las que recibieron TAA.

Los resultados anteriores, específicamente la falla del tratamiento para inhibir la fibrogénesis en el modelo TAA sugiere dos conclusiones: la primera, que la efectividad de la rapamicina puede variar según la causa de la fibrosis y la segunda que mecanismos alternativos pueden compensar la inhibición de mTOR y por lo tanto conferir resistencia a rapamicina.

Según los resultados mencionados, se podría especular que la rapamicina puede ser más efectiva en las ratas con LCB, por su efecto antiproliferativo en los conductos biliares, sin embargo, la proliferación de los ductos biliares no cambió en forma significativa en uno y otro grupo.

Con respecto a la resistencia con rapamicina, no podemos concluir aún que es igualmente resistente en humanos, porque tanto con la LCB como el uso de TAA, ambos tienen un estímulo profibrótico mucho más intenso que la mayoría de las causas de hepatopatía en el hombre. Por lo tanto, este estudio demuestra nuevamente el efecto antifibrótico de la rapamicina en modelos animales establecidos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Existen 3 estudios evaluando la eficacia de la rapamicina como antifibrogénico, el primero de ellos por el grupo de la Universidad Thomas Jefferson, Pensilvania ⁽¹⁾, donde se apreciaron los posibles efectos antifibrogénicos en ratas expuestas a tetracloruro de carbono, posterior a este estudio se publicaron 2 trabajos del grupo de la Universidad de Berna, Suiza ^{(2) (3)}, en los que se utilizaron modelos de cirrosis biliar secundario a ligadura de la vía biliar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sirolimus es un fármaco que fue introducido inicialmente como inmunosupresor, sin embargo se le han descubierto nuevas propiedades, entre ellas, inhibe la fibrogénesis en hígados lesionados. Hasta ahora hay pocos ensayos que aprueben el efecto anterior.

OBJETIVO

Analizar el impacto que tiene el uso de rapamicina sobre los cambios fisiopatológicos que tienen lugar durante el desarrollo de la fibrosis hepática y con ello, la disminución de la progresión de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Si se demuestra, que el uso de rapamicina tiene un efecto inhibitor sobre la fibrogénesis en un modelo animal con LCB para inducción de lesión hepática, entonces podríamos darle una utilidad futura en el ser humano como inhibidor de la progresión de la enfermedad hepática que es hoy en día un problema de salud pública en nuestro país y en el mundo.

JUSTIFICACIÓN

La justificación del estudio fue demostrar el efecto antifibrogénico de la rapamicina en un modelo experimental controlado y que carezca de los sesgos de los estudios anteriores. Actualmente no se dispone de ningún factor protector o tratamiento que limite la progresión hacia cirrosis en grupos de riesgo, por lo que se busca desarrollar o encontrar fármacos con éste efecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 150 a 300 mg Todos los animales recibieron cuidados por personal calificado. Se les mantuvo en ciclos de luz / oscuridad de 12 hrs. Los estudios fueron aprobados por un Comité de ética del laboratorio.

Modelo experimental de cirrosis

Se indujo cirrosis mediante la ligadura del conducto biliar principal, de acuerdo a la técnica descrita por Zimmermann ⁽¹⁰⁾.

Tratamiento

28 días después de la ligadura de la vía biliar, se asignó aleatoriamente a las ratas para recibir rapamicina a 0.5mg/kg/día o bien no recibir tratamiento.

Toma de biopsias

Se tomó biopsia hepática a todas las ratas (día 0) antes de someterlas a ligadura del conducto biliar y a los 28 días de la ligadura de la vía biliar. De igual manera al término del tratamiento con rapamicina y a las que no hayan recibido tratamiento se sometieron a biopsia hepática para su análisis.

Procedimiento quirúrgico

Ligadura de la vía biliar. Se realizó laparotomía media previa infiltración con xylocaina al 1%. Se identificó la vía biliar y se ligó con Vicryl 5-0 y se seccionó.

Biopsia control. Se realizó laparotomía media y toma de biopsia, hemostasia con electrocauterio.

Hepatectomía y sacrificio. Al día 56 de posoperatorio. Laparotomía media, hepatectomía de lóbulo anterior, toma de muestra sanguínea, sacrificio del animal.

Procedimiento anestésico

En los tres procedimientos quirúrgicos se realizó anestesia intraperitoneal con pentobarbital a dosis de 50mg/kg.

Procesamiento de muestras

- **Biopsias** Se colocaron en formol al 4% y se enviaron al laboratorio de patología para análisis con tinción de Masson e inmunohistoquímica (actina, desmina). Se evaluaron y graduaron parámetros de fibrosis hepática.
- Se realizó determinación morfométrica del área ocupada por proliferación ductal en 10 espacios porta al azar en cada sujeto.
- Se utilizó Microscopio Axioscope Carl Zeiss – Programa KS300
- Promedio y desviación estándar para cada sujeto. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$ (t-Student pareada).

Sangre Se tomaron muestras previo al sacrificio del animal para biometría hemática y pruebas de funcionamiento hepático (TGO, TGP, fosfatasa alcalina bilirrubinas y albúmina). (Fig.4).

TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio prospectivo, aleatorizado, controlado, doble ciego.

RESULTADOS

Se aplicaron medidas de tendencia central y prueba de T de student. Los valores de P fueron significativos si <0.05 .

- El grupo control mostró proliferación extensa de colangiomas en el espacio porta con extensión al lobulillo hepático.(Tabla 2)
- El grupo tratado con rapamicina mostró proliferación restringida al espacio porta con área de $108.37 - 376.96\mu\text{m}^2$ (promedio $208.32 \mu\text{m}^2$).
- El área ocupada por estos varió de $1543.03 - 1800.8\mu\text{m}^2$ (Promedio $1562.07\mu\text{m}^2$). La diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa ($P<0.001$) (Grafica 1).

DISCUSIÓN

Desde 1999, Zhu et al, investigó por primera vez, los efectos de rapamicina en la fibrogénesis hepática, bajo el modelo experimental para la inducción de la cirrosis biliar secundaria por medio de la ligadura del conducto biliar. La rapamicina, (Sirolimus[®] de Wyeth Pharmaceuticals) Tiene múltiples efectos, principalmente como un fármaco inmunosupresor. Sin embargo, se han observado otras propiedades, entre ellas la inhibición de la proliferación la cual interfiere con la progresión del ciclo celular. Se sabe que la rapamicina se une dentro de la célula a las proteínas que unen al tacrolimus (FK506). La proteína de unión más importante es la FKBP12. El complejo rapamicina – FKBP12 inhiben a mTOR, enzima importante en la proliferación celular. La rapamicina también disminuye la concentración de ciclina D1 y por lo tanto bloquea la eliminación del inhibidor p27 y p21, contribuyendo a la disminución de la proliferación celular, además de que inhibe la proliferación de las células T, limita la respuesta inmunológica patogénica, el cual es un componente importante también en la fibrosis hepática.

En este trabajo se demostró el efecto antifibrogénico de la rapamicina en un modelo experimental controlado sin sesgos de los estudios anteriores.

No es claro si este efecto antiproliferativo es el mismo en otras causas de lesión hepática, ya que no fue objeto de este estudio, lo que vale la pena seguir investigando, ya que esto nos ampliaría la aplicabilidad de este fármaco.

CONCLUSIONES

- La rapamicina disminuye significativamente la proliferación ductal. (Foto 1).
- Los sujetos tratados con rapamicina muestran fibrosis reticular limitada al espacio porta. (Foto 2).
- La dosis necesaria para éste efecto aún no está estandarizada por lo que podría ser objeto de otro estudio. Sin embargo la dosis usada en este estudio fue menor a la utilizada con efectos inmunosupresores.
- El impacto de la rapamicina como terapia antifibrogénica en los pacientes con cirrosis, podría cambiar la historia natural de la enfermedad, ya que hasta ahora no existe ningún medicamento que detenga la progresión hacia cirrosis, y con ello se podría disminuir la necesidad de trasplante hepático.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003; 38:S38–S53.
- (2) Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 2002; 37:527–535.
- (3) Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36:231–242.
- (4) Knittel T, Kobold D, Saile B, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999. 1244-1246.
- (5) Friedman SL. The Virtuosity of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*.1999; 117: 1244-1246
- (6) Pinzani M, Knauss TC, Pierce GF, Hsieh P, Kenney W, Dubyak GR, and Abboud HE Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fatstoring cells. *Am J Physiol.* 1991; 260:C485–C491.
- (7) Grappone C, et al. Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J Hepatol* 1999; 31:100–109.

- (8) Friedman SL Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129–140.
- (9) Frazier K, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Investig Dermatol*. 1996; 107: 404–411.
- (10) Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, and Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 1994; 20:231–239.
- (11) Van de Casteele M, et al. Characterization of portal hypertension models by microspheres in anaesthetized rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther* 2001; 90:35–43.
- (12) Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, and Abraham RT Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 1:53–71.
- (13) Fruman DA, Wood MA, Gjertson CK, Katz HR, Burakoff SJ, and Bierer BE. 1995. FK506 binding protein 12 mediates sensitivity to both FK506 and rapamycin in murine mast cells. *Eur J Immunol* 25:563–571.
- (14) Zhu J, Wu J, Frizell E, et al. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999; 117: 1198-1204.

- (15) Biecker E, Gottardi A, Neef M, et al. Long Term treatment of bile duct – ligated rats with rapamycin (Sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005; 313: 952-961.
- (16) Neef M, Lederman M, Saegesser H, et al. Low dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2006; 45:786-796.

ANEXOS

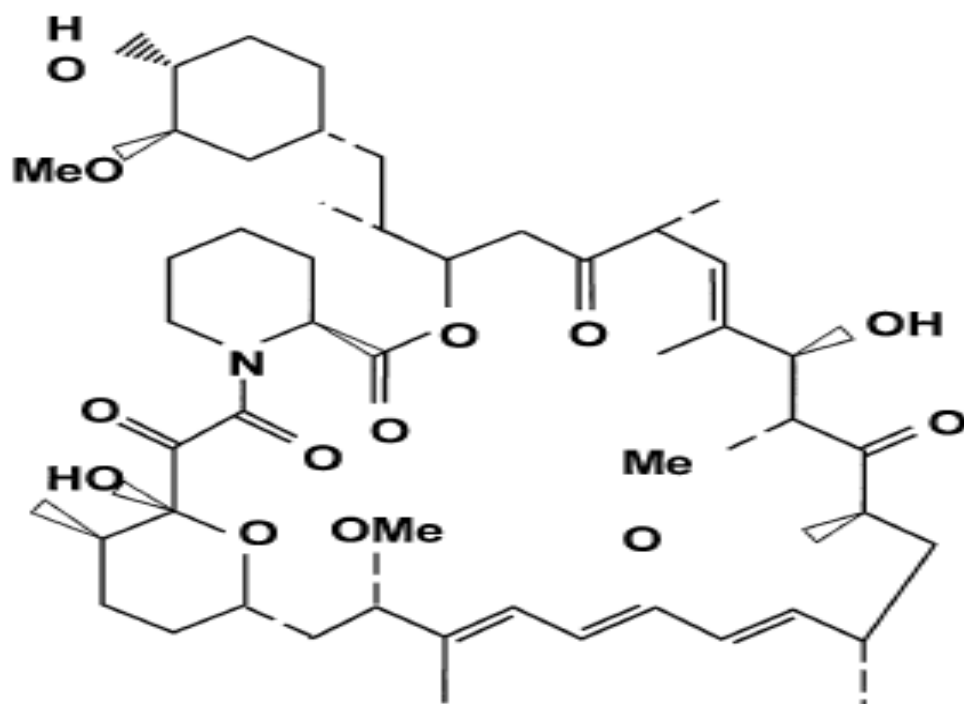


Figura 1. Estructura química de la Rapamicina.

Tomado de: Sehgal SN. Sirolimus: Its Discovery, Biological Properties, and Mechanism of Action Transplantation Proceedings 2003; 35: (Suppl 3A, 7S–14S)

PROPIEDADES DE LA RAPAMICINA

- Macrólido
- Antibiótico, inmunosupresor.
- Acción anti-proliferativa
- Inhibición de la progresión del ciclo celular, inhibición de la síntesis proteica.
- Inhibición de cinasas de 3-fosfoinositol (PI-3K)
- Inhibición de la subunidad ribosomal 40S
- Disminuye la concentración de ciclina D1 y pRb

Tabla 1. Propiedades de la Rapamicina.

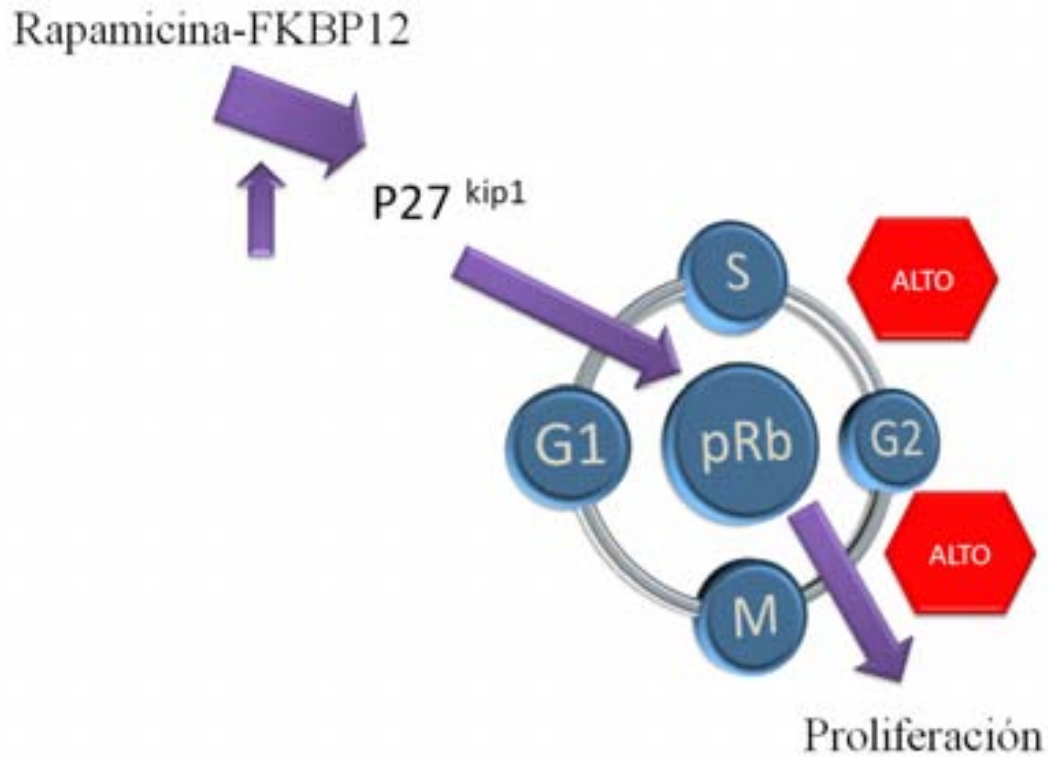


Figura 2. Rapamicina inhibe la progresión del ciclo celular.

Rapamicina-FKBP12 inhibe mTOR (objetivo de rapamicina), e inhibe la progresión celular en la transición G1-S, vía regulación a la alta del inhibidor de la ciclina dependiente del inhibidor de la cinasa p27^{kip1}. La habilidad de la rapamicina de inhibir la fosforilación de la proteína del retinoblastoma es un marcador para sus acciones inhibitorias del ciclo celular.

Modificado de: Marks AR Rapamycin: Signaling in Vascular Smooth Muscle *Transplantation Proceedings*, 2003; 35: Suppl 3A, 231S–233S

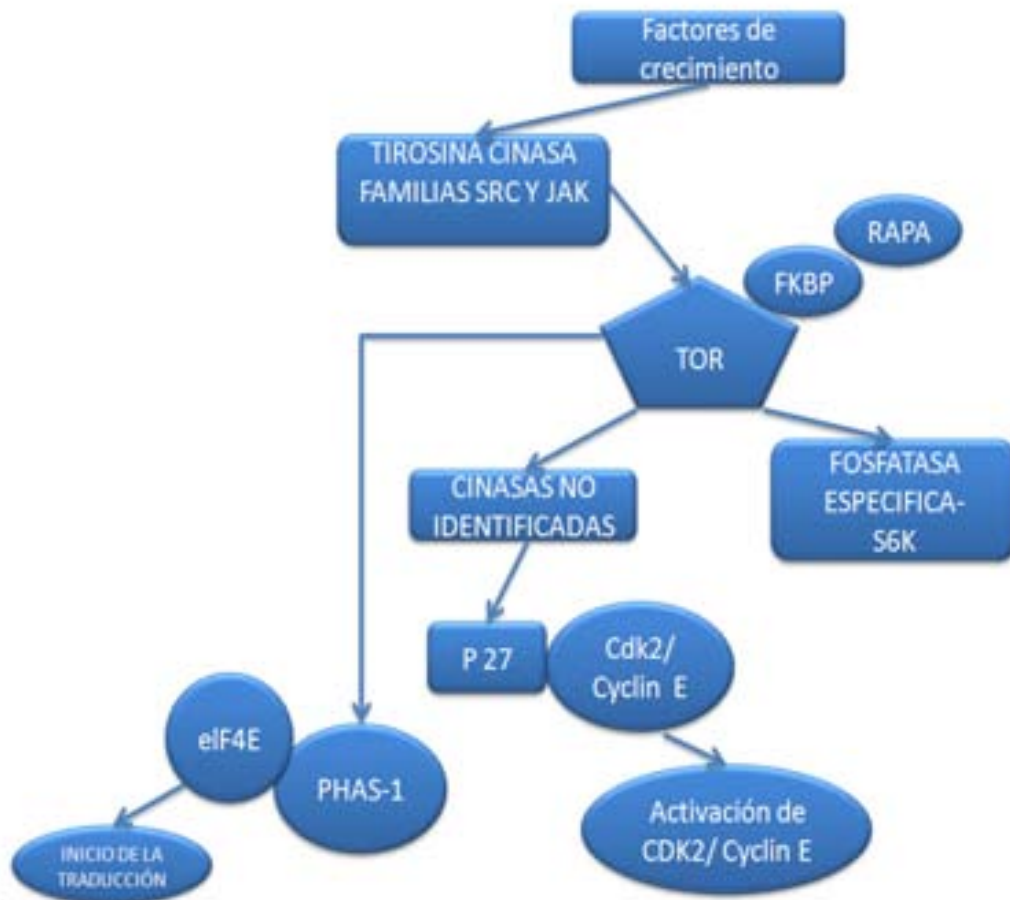


Figura 3. Efectos bioquímicos que acompañan la activación de mTOR.

Sirolimus causa inactivación rápida de S6K1 que es crítica para la fosforilación de la proteína ribosomal S6. También inhibe el evento bioquímico mediado por mTOR que lleva a la traducción. mTOR activado fosforila 4E-BP1 por medio de la disminución de la afinidad por eIF-4E. Esto resulta en la inhibición de la traducción de algunos mRNAs específicos para el crecimiento celular y proliferación. Otro evento afectado por sirolimus es la disociación de p27kip1 del complejo cdk2: ciclina E, inhibiendo su activación.

Modificado de: Sehgal SN. Sirolimus: Its Discovery, Biological Properties, and Mechanism of Action Transplantation Proceedings 2003; 35: Suppl 3A, 7S-14S

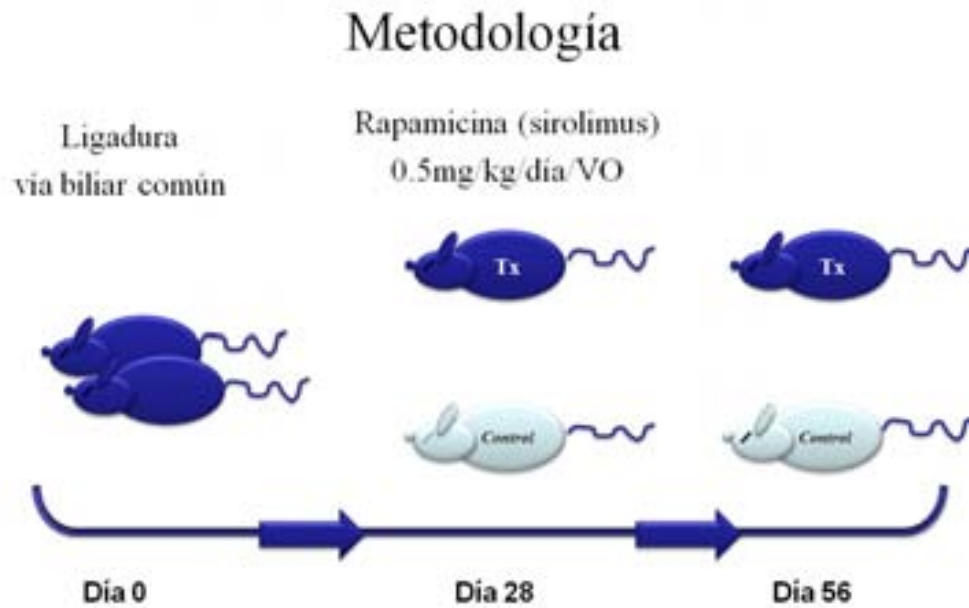


Figura 4. Metodología de estudio experimental. Modificado de Lara y cols. 2007.

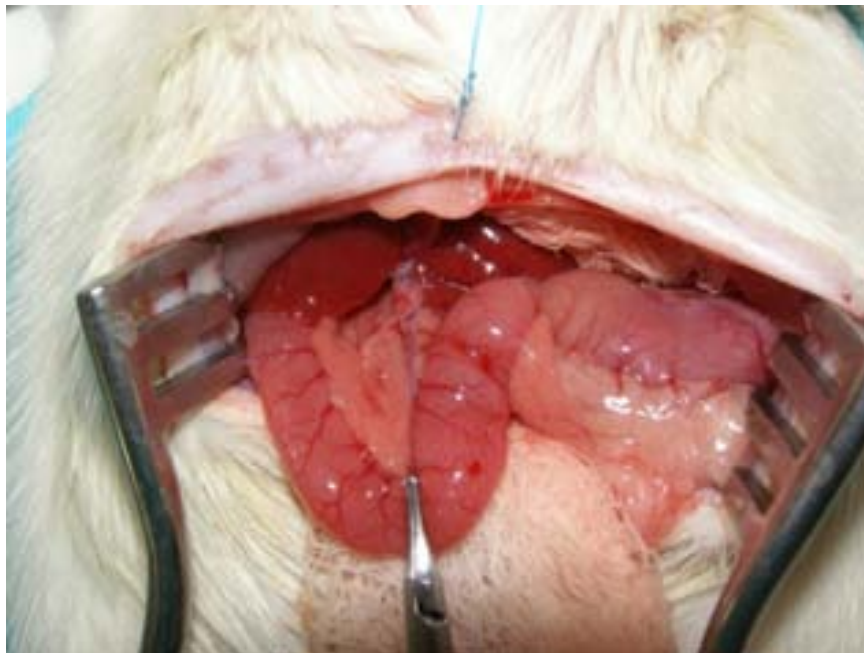
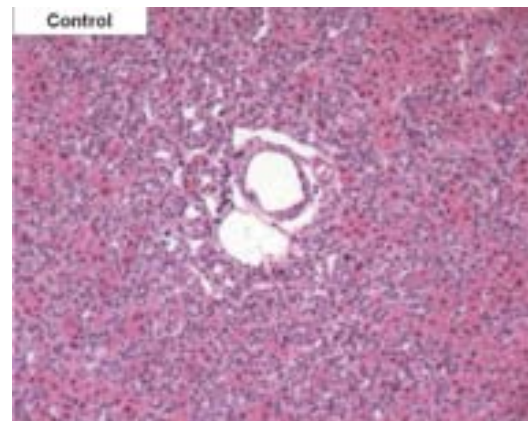
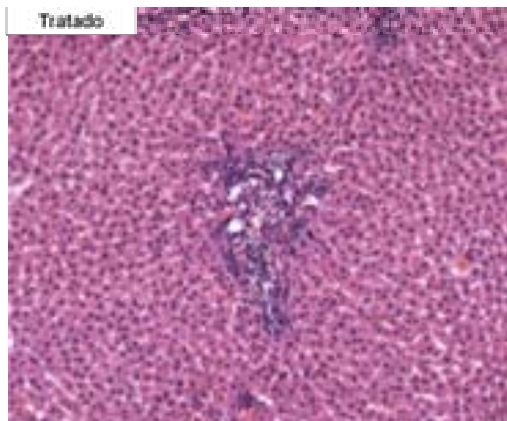
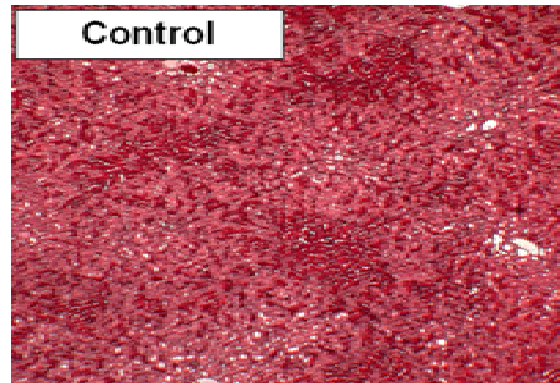
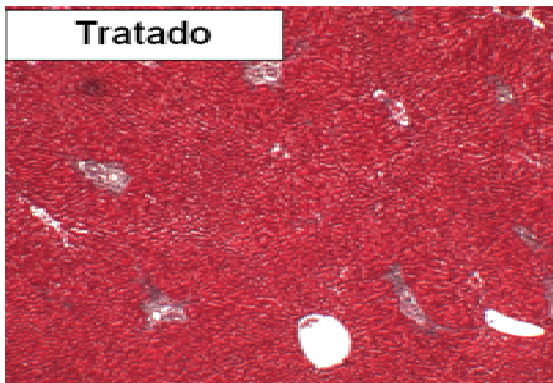


Foto 1. Disminución de la proliferación ductal en la fase prefibrotica por medio del tratamiento con rapamicina en el modelo experimental de cirrosis biliar secundaria en rata

Tinción H/E



Tricrómico de Masson



Tinción para Retículo

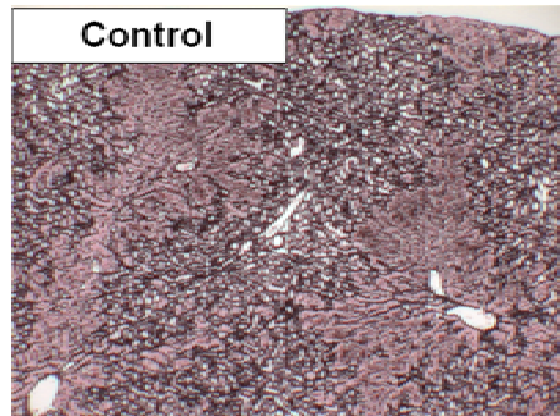
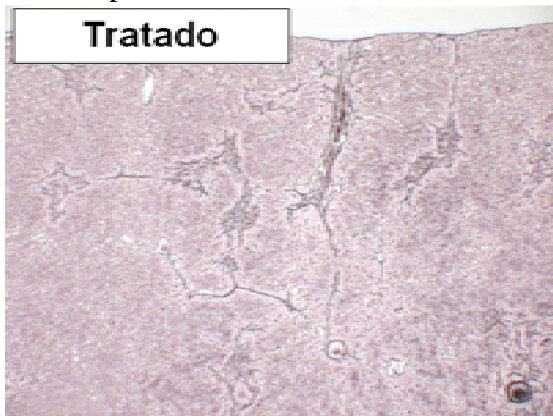
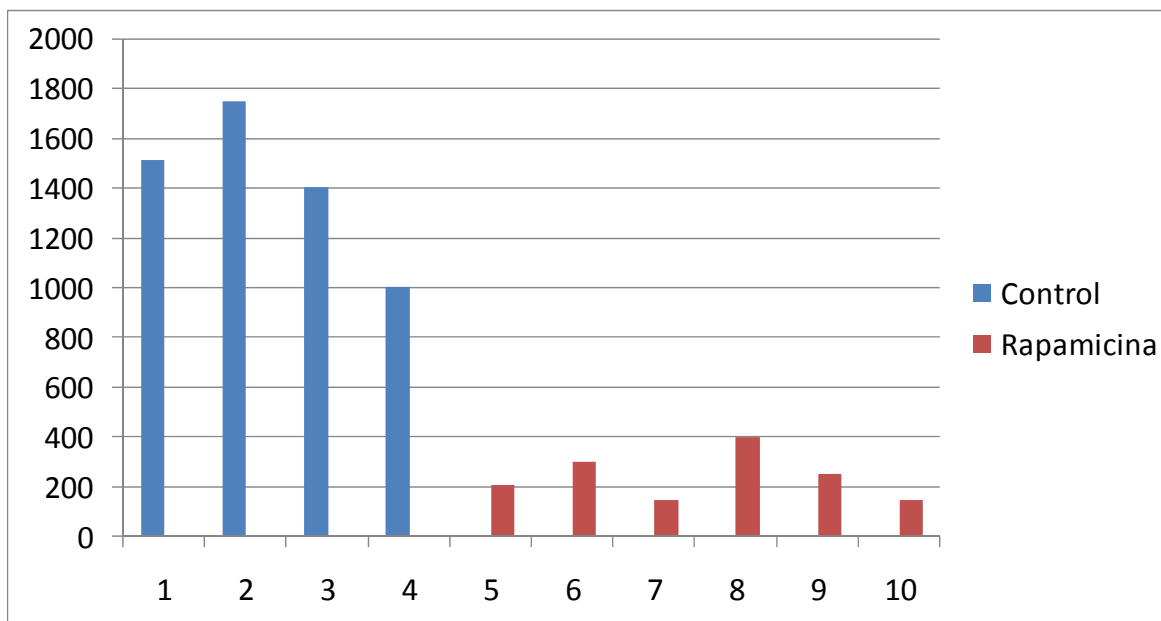


Foto 2. Análisis con tinción de H/E, Tricrómico de Masson y tinción para retículo.

	Grupo Rapamicina	Grupo Control	Valor "p"
Área de proliferación ductal	208.32 μm^2	1562.07 μm^2 (1543 – 1800)	< 0.001
TGO	Media 97.5	Media 240	< 0.05
TGP	Media 52.0	Media 87.5	< 0.05
Bilirrubina Total	Media 0.20	Media 1.35	< 0.001
Bilirrubina Directa	Media 0.10	Media 1.10	< 0.001

Tabla 2. El grupo control mostró proliferación extensa de colangiomas en el espacio porta con extensión al lobulillo hepático.



Grafica 1. El área ocupada por estos varió de 1543.03 - 1800.8 μm^2 (Promedio 1562.07 μm^2). La diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa (P<0.001)