



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL PROBABLE EFECTO ANTIFIBRÓTICO
DEL COMPUESTO COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA
SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR
TETRACLORURO DE CARBONO, EN RATAS WISTAR.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSARIO PINTOR ELIZALDE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR

M en IBB SAÚL CANO COLÍN

2013



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.

JURADO

DATOS DEL ALUMNO

PINTOR
ELIZALDE
ROSARIO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA
089552650

TUTOR

M en IBB
SAÚL
CANO
COLÍN

SINODAL 1

DRA.
MARÍA DE LOURDES
SEGURA
VALDEZ

SINODAL 2

DRA.
MARÍA SANDRA
CABRERA
BENÍTEZ

SUPLENTE 1

DR.
JORGE ANTONIO
GARCÍA
ALVAREZ

SUPLENTE 2

DRA.
PATRICIA
RIVAS
MANZANO

A mis hijos: Octavio y Mauricio a quienes amo profundamente y son la más bella motivación que tengo en la vida.

A mis hermanas Gabriela y Norma por ser ejemplo de superación, tenacidad y logro.

A mi amigohermano Vicente Anislado Tolentino por su cariño y apoyo, por ser un ejemplo académico y mostrarme que siempre se alcanza lo que se propone.

Al Dr. Saúl Cano por su conocimiento, paciencia y apoyo en la realización de esta tesis y su contribución para mi formación profesional.

Al Dr. Ernesto Guerrero Padilla que me enseñó todo lo que ahora se y aplico del proceso histológico y quien me brindo enormes consejos académicos y personales.

A las Doctoras Paty Rivas y Maricela Villagrán por ser un ejemplo para mí además de escucharme y animarme.

A mi amiga M. en C. Eva Mendoza por compartir conmigo no solo conocimientos, también pan, alegrías y tristezas.

A la Dra. Marce Aguilar Morales † donde ahora se encuentre, gracias por sus consejos personales y profesionales y por el enorme apoyo que me brindo desde que la conocí.

A mi amiga Lulú fuentes, mi compañera en la mayor parte del camino.

A todos mis amigos:, Lulú Pérez Línaldí, Renato León, Rodolfo Nava, Bety Domínguez, Ramiro Cruz, Vicente Castrejón, Ayhesa Muñiz, Margarita Jiménez, Victor Motolínea, José Luis Cruz, Fabián Romero, Miguel Mondragón , Lulú Juárez, Víctor (crísto) y Rosa, Jesús Vargas, Anita, Lalito e Inés†, a todos ellos por estar conmigo en alguna parte del camino hasta llegar aquí, y que también de alguna manera apoyaron la realización de este trabajo de tesis y mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al M en IBB Saúl Cano Colín por integrarme en el proyecto de investigación a su cargo, llamado “Estudio histopatológico y bioquímico de los efectos antifibróticos del compuesto colágena-polivinilpirrolidona sobre la fibrosis hepática, valorado en un modelo in vivo (ratas) e in vitro (hepatocitos primarios de rata)”, mismo en el que lleve a cabo el presente trabajo de tesis, bajo su supervisión y revisión.

Al Dr. Ernesto Guerrero Padilla por el tiempo, dedicación y valiosa contribución en la enseñanza y la aplicación de su conocimiento en el proceso histológico realizado durante este trabajo de Tesis.

A la Dra. Patricia Rivas Manzano por su asesoría en la evaluación histológica, correcciones y revisión del presente trabajo de tesis.

Al Centro Médico Nacional “20 DE Noviembre” ISSSTE por proporcionar las instalaciones donde se llevó a cabo el proyecto de investigación del que fue parte este trabajo de tesis.

Al apoyo del fondo sectorial CONACyT-FONSEC SALUD 2004 C01-162, para los reactivos e insumos necesarios para la parte experimental, para los libros y herramientas necesarias para la parte bibliográfica y por la beca que me fue otorgada durante 1 año.

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
I.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL HÍGADO	9
I.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS GENERALES DEL HÍGADO.....	10
I.3. ETIOLOGÍA DE LA FIBROSIS/CIRROSIS	14
I.4. MODELOS PARA INDUCIR LA FIBROSIS/CIRROSIS	16
I.5. MARCADORES DEL METABOLISMO HEPÁTICO.....	17
I.6. TRATAMIENTOS PARA FIBROSIS/CIRROSIS HEPÁTICA.....	18
II. ANTECEDENTES.....	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	22
IV. OBJETIVOS.....	22
IV. 1. GENERAL	22
IV.2. PARTICULARES.....	22
V. METODOLOGÍA.....	23
V.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE FIBROSIS HEPÁTICA POR CCL₄.....	23
V.2. ESQUEMA DE TRATAMIENTO Y APLICACIÓN DEL BIOFÁRMACO DE COLÁGENA-PVP.....	23
V.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
V.4 OBTENCIÓN DEL HÍGADO POR DISECCIÓN.....	25
V. 5. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE MARCADORES DEL METABOLISMO HEPÁTICO.....	27
V.6. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	27

VI. RESULTADOS	28
VI.1. ANÁLISIS SEROLÓGICO	28
VI.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	32
VI.3. SERIES DE IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS PREPARACIONES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO POR GRUPOS	34
VI. 3.1. PREPARACIONES CONTROLES NORMALES	34
VI. 3.2. PREPARACIONES EXPERIMENTALES CON FIBROSIS	35
VI.3.3. PREPARACIONES CONTROLES DEL TRATAMIENTO Y TRATAMIENTO CON EL BIOFÁRMACO	37
VI. 3.3.1. PRIMERA SEMANA	37
VI.3.3.2. SEGUNDA SEMANA	42
VII. DISCUSIÓN	47
VIII. CONCLUSIÓN	50
IX. PERSPECTIVAS	50
IX. REFERENCIAS	50
X. ANEXOS	57
X.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS	57
X.2.TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	58

ABREVIATURAS

AH	Arteria hepática
ALT	Alanintransaminasa
Am	Aceite mineral
AST	Aspartatotransaminasa
ATSDR	Agencia para sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, División de Toxicología
BI	Bilirrubina Libre
CB	Conducto biliar
CCl ₄	Tetracloruro de Carbono
CH	Cirrosis Hepática
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
Col-Pvp	Colágena-Polivinilpirrolidona
CMN	Centro Médico Nacional
DBIL	Bilirrubina Directa o Conjugada
DMN	Dimetilnitrosamina
E	Esteatosis
ELAM-1	Moléculas de Adhesión de Leucocitos Endoteliales
EPA	Agencia de Protección Ambiental
Fbq	Fibroquel
H	Hepatocito
H/E	Hematoxilina/eosina
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 β
IUPAC	Unión Internacional de Aplicación de sustancias Químicas (siglas en inglés).
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLD	Lóbulo lateral derecho
LMD	Lóbulo medial derecho
LLI	Lóbulo lateral izquierdo
LMI	Lóbulo medial medio izquierdo
MEC	Matriz Extracelular
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PVP	Polivinilpirrolidona
TGF- β 1	Factor de Crecimiento Transformante- β 1
RA	Artritis Reumatoide
TBIL	Bilirrubina Total
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
VCAM	Molécula de Adhesión Celular Vascular
VC	Vena Central
VHC	Virus de la hepatitis C
VP	Vena porta

RESUMEN

La fibrosis hepática es el resultado de un proceso inflamatorio y de reparación del tejido en respuesta a un daño hepático prolongado y se caracteriza por la acumulación de tejido conectivo en el hígado, debido a un importante desequilibrio entre la producción y la degradación de la matriz extracelular y en el cual existe una importante participación de células inmunocompetentes y citocinas que regulan el proceso fibrogénico. El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de estudiar los efectos sobre un modelo de fibrosis hepática, del biocompuesto *FIBROQUEL^{MR}* que es un biofármaco mexicano que consiste de una mezcla de colágena tipo I y polivinilpirrolidona (PVP), con propiedades antifibrogénicas, fibrolíticas e inmunomoduladoras de la respuesta fibrogénica y el cual ha sido utilizado en muchos estudios preclínicos y clínicos. Para tal efecto, se estableció la fibrosis hepática en un modelo *in vivo* con ratas Wistar siguiendo un protocolo con CCl₄. Una vez montado el modelo se evaluaron los efectos del compuesto, a una y dos semanas postratamiento. En los resultados de la valoración serológica de los marcadores del metabolismo hepático: bilirrubinas, alaninoaminotransferasa (ALT), aspartatoaminotransferasa (AST) y Lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó que solamente esta última fue significativa al compararse sus valores entre las ratas a las que se les indujo la fibrosis y las tratadas con el biofármaco, en las ratas a las que se les indujo la fibrosis los valores aumentaron, indicándonos que el daño generado al órgano en estas ratas fue considerable y que esta condición se logró revertir después del tratamiento. En cuanto a los resultados histopatológicos realizados en colaboración con la jefa del servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico, se llevó a cabo un análisis ciego de varias series de preparaciones histológicas teñidas con las tinciones de Hematoxilina/Eosina (H/E), Herovici y Tricrómica de Masson que correspondían al tejido hepático de ratas con fibrosis hepática, tejido hepático de ratas con fibrosis hepática a las que se les aplicó el tratamiento con el biofármaco y sus respectivos controles, para detectar lesiones hepáticas utilizando el sistema de clasificación por etapas y niveles de Knodell, conocido como “Índice de Actividad Histológica Knodell”; dicha evaluación demostró que en las ratas a las cuales se les indujo la fibrosis presentaron el máximo puntaje y en aquellas a las que se les aplicó el biofármaco se observó que desde la primera semana de tratamiento el puntaje tendió a valores normales y ya en la segunda semana se obtuvo un puntaje de cero (hígado normal). Estos resultados se evidenciaron con una serie de imágenes obtenidas a partir de las preparaciones teñidas con las distintas técnicas de tinción histológica utilizadas. En las imágenes correspondientes a las ratas con fibrosis hepática no tratadas se observó un alto grado de fibrosis, y en las que corresponden a las tratadas con el biofármaco, desde la primera semana de tratamiento se observó que la fibrosis disminuyó y en la segunda semana ya no se encontraron evidencias histológicas de dicha fibrosis, mejorando la arquitectura del tejido y alcanzándose la histología del tejido hepático normal.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL HÍGADO

El hígado está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos, tiene forma cónica, consistencia blanda, pesa en el humano alrededor de 1.5 kg o más, es de color rojo oscuro o pardo rojizo en estado fresco, debido principalmente a su muy abundante riego sanguíneo. No sólo recibe riego arterial del tronco celiaco, sino también obtiene sangre del tubo digestivo por la vena porta. Su drenaje venoso regresa a la vena cava inferior, y por tanto está interpuesto en el drenaje del intestino. Recibe todo el material absorbido en el intestino con excepción de los lípidos, que en su mayor parte son transportados por el sistema linfático. Además del material absorbido y digerido que se asimila y se almacena en el hígado, la sangre de la vena porta también lleva a este órgano diversos materiales tóxicos que luego son destoxificados o excretados por él.

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea. La vena porta, que transporta sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, el bazo y el páncreas, suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al hígado. Es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno. La arteria hepática, rama del tronco celiaco, transporta sangre bien oxigenada y provee el resto de la sangre que llega al hígado. La sangre de las ramas de estos dos vasos se mezcla al pasar por los sinusoides de los lobulillos hepáticos. La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central; al abandonar los lobulillos, las venas centrales se unen para formar las venas sublobulillares o intercalares, que finalmente se unen a las venas hepáticas. La sangre vuelve al corazón por vía de la vena cava inferior (Figura No.1).

El hígado está cubierto por una cápsula fibroconectiva (de Glisson), de la cual parten delgados tabiques de tejido conectivo que penetran en el parénquima hepático en el hilio hepático para dividir el órgano en lóbulos y lobulillos [1,2].

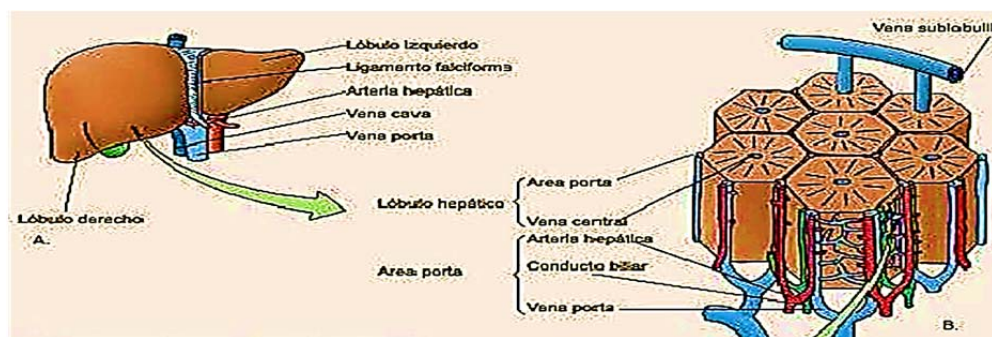


Figura 1. Esquema del hígado. A, anatomía macroscópica del hígado. B, lobulillos hepáticos que muestran las áreas portales y la vena central (Modificado de Gartner *et al.*, 2003).

I.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS GENERALES DEL HÍGADO

La presencia de unidades histológicas o lobulillos pequeños dentro del hígado de los mamíferos ha sido universalmente aceptada desde los trabajos de Wepfer (1664) y Malpighi (1666); sin embargo, se ha cuestionado la validez y utilidad de la definición tradicional del lobulillo hepático, basada fundamentalmente en la disposición de límites estructurales tales como los tabiques de tejido conectivo y los vasos en el interior de los lóbulos hepáticos. En consecuencia, se desarrollaron tres esquemas que describen las unidades histológicas o fisiológicas del hígado, que reciben los nombres de lobulillo clásico, lobulillo portal y acino hepático (Figura 2).

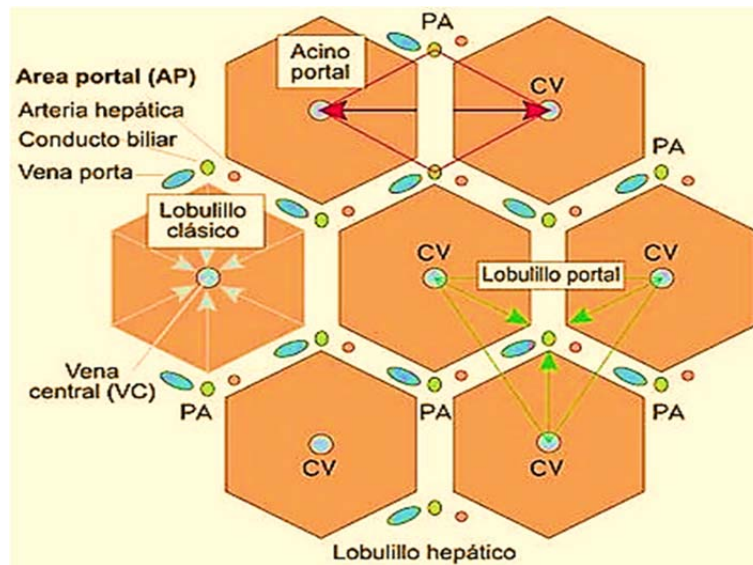


Figura 2. Esquema de los tres lobulillos en el hígado: clásico, portal y acino hepático (Gartner *et al.*, 2003).

Cada concepto fue formulado bajo circunstancias diferentes; sin embargo, no se contradicen entre sí, ya que representan distintas maneras de interpretar aspectos particulares de la estructura y función hepáticas y, por lo tanto, facilitan la comprensión de este órgano (Tabla 1 y Figura 3).

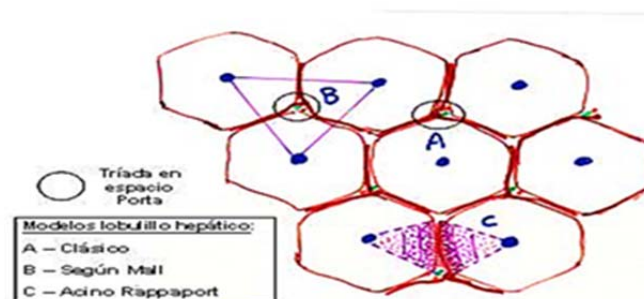


Figura 3. Las tres concepciones de la lobulación hepática (Lesson *et al.*, 1982).

	Lobulillo clásico	Lobulillo portal	Acino hepático
Forma	Poligonal o hexagonal.	Aproximadamente triangular o cuneiforme.	Irregular, a veces oval o de forma prismática.
Eje morfológico	Vena central.	Área portal, especialmente conducto biliar interlobulillar.	Ramas terminales de la tríada portal, que se encuentran en los bordes de dos lobulillos clásicos adyacentes.
Límites periféricos.	Cerca de 6 áreas portales.	3 (o más) venas centrales.	2 (o más) venas centrales.
Relación con el lobulillo clásico		Comprenden aquellas porciones que envían bilis a un mismo conducto interlobulillar.	Pequeños sectores de dos lobulillos clásicos.
Circulación sanguínea	De la periferia (área portal) al centro (vena central).	Del centro (área portal) a la periferia (vena central).	Del centro (área portal y bordes de dos lobulillos adyacentes) a la periferia.
Circulación biliar	Del centro a la periferia.	De la periferia al centro.	De la periferia al centro.
Ventajas	1. Destaca la función endócrina del hígado. 2. Facilita la comprensión de los cambios histológicos de la necrosis centrolobulillar (por ejemplo, por intoxicación con CCl ₄)	1. Hace hincapié en la función exocrina (secreción biliar). 2. Permite la comparación del lobulillo hepático con los de las glándulas exocrinas.	1. Explica mejor el gradiente de actividad metabólica del hígado, es decir, la correlación entre la irrigación y el metabolismo. 2. Ayuda a explicar el proceso de regeneración. 3. Es útil para entender el desarrollo de la cirrosis.
Principales sostenedores de la teoría	Wepfer, Malpighi, Mascagni, Kiernan y Mueller.	Theile, Brissaud y Sabourin, Mall y Arey.	Rappaport y col., Novikoff y Essner.

Tabla 1. Características de las tres concepciones de la lobulación hepática (Lesson *et al.* 1982).

El epitelio del hígado está constituido por dos clases de células: las parenquimatosas y las no parenquimatosas. Las células parenquimatosas están formadas por hepatocitos que incluyen alrededor del 80% de la población celular del hígado. Estas son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos poliploides y nucléolo prominente, tienen un diámetro de 30 a 40 μm altamente polarizados, su función es principalmente metabólica. Están dispuestas en cordones o hileras que conectan las diferentes zonas. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos y son muy ricos en organelos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta dos orientaciones: la sinusoidal con microvellosidades que es hacia el espacio de Disse y la lateral que mira hacia el hepatocito vecino. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo al cual será secretada la bilis [3, 4, 5]. También se advierten zonas llamadas zonas o conductos portales, cada una de las cuales contienen ramas de la vena porta, de la arteria hepática, un conducto biliar y a menudo también un vaso linfático, incluidos en una pequeña cantidad de tejido conectivo [1]. La Zona Uno o

Periportal, representa el área de tejido hepático que rodea en forma inmediata al ducto biliar y a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática; la Zona tres, comprende el parénquima más alejado de estas estructuras, la región que rodea a la vena central; la Zona Dos, está formada por el tejido hepático ubicado entre las dos zonas anteriores [6]. Las zonas portales están dispuestas de tal manera que delimitan los lobulillos del tejido hepático. Cada uno de estos lobulillos, el lobulillo hepático o clásico, tiene varios conductos en la periferia y en su centro hay una vena central, tributaria de la vena cava inferior, a partir de la cual irradian las láminas de células parenquimatosas como los rayos de una rueda a partir de su eje (Figura No.4). Esta unidad se repite miles de veces. Con los vasos aferentes (vena porta y arteria hepática) en la periferia del lobulillo y los vasos eferentes (vena central) en el centro del mismo, es evidente que el flujo sanguíneo va de la periferia a la vena central, pasando por los vasos sinusoidales situados entre las láminas de células hepáticas. Por otra parte, la secreción de bilis va de las células hepáticas a los pequeños conductos biliares a la periferia. El examen cuidadoso de un corte a mayor aumento revela que cada cordón o lámina de células hepáticas consta de una o dos hileras de células, entre las cuales hay conductos diminutos, los canaliculos biliares, que drenan en los conductos biliares de la periferia del lobulillo. Estos canaliculos biliares son simplemente espacios entre células adyacentes y no tienen ningún otro revestimiento epitelial. Los espacios sinusoidales entre las láminas hepáticas están revestidos por una capa de células análogas a las células endoteliales, que se encuentran en una malla de fibras reticulares finas [1].

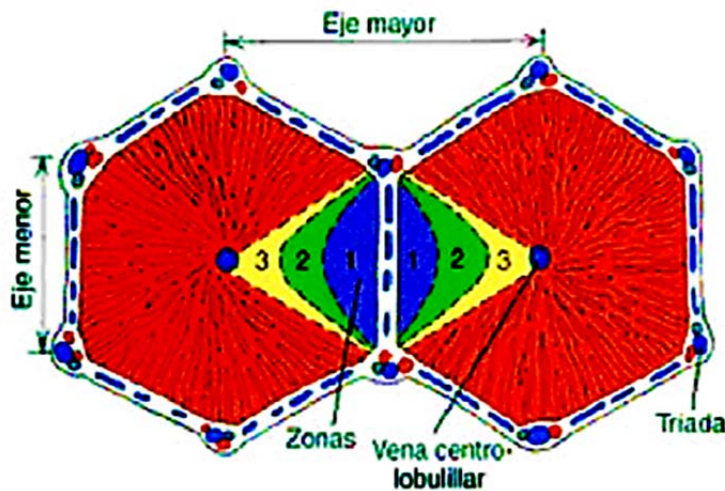


Figura 4. Zonas o conductos portales (Ross Michael *et al.*, 2013)

Las células no parenquimatosas, son las células de Kupffer, las células estelares o de Ito y las endoteliales. Las células de Kupffer son macrófagos fijos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear que se encuentran adheridos al endotelio y emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar eritrocitos envejecidos y antígenos. Además, actúan como células presentadoras de antígeno. Las células estelares o de Ito, son almacenadoras de grasa y tienen gran importancia en la patogénesis de la

cicatrización y en la génesis de la fibrosis hepática, ya que su activación es el evento central en ésta, así como también tienen la capacidad para promover y amplificar la respuesta inflamatoria en diversas enfermedades hepáticas [4, 5] y en el hígado normal se encuentran en el espacio subendotelial de Disse, encargadas del almacenamiento de retinoides, ya que contienen el 95% aproximadamente de los depósitos que hay en el cuerpo [7]. Las células endoteliales se encuentran formando la pared de los sinusoides, su característica principal es la presencia de fenestraciones en el citoplasma, característica indispensable para mantener el hígado en óptimo estado; algunas de sus funciones además del transporte de sustancias entre el sinusoide y el espacio de Disse son la coagulación, la fibrinólisis, la regulación de la presión sanguínea sinusoidal, la angiogénesis y el metabolismo de los lípidos [8] (figura 5).

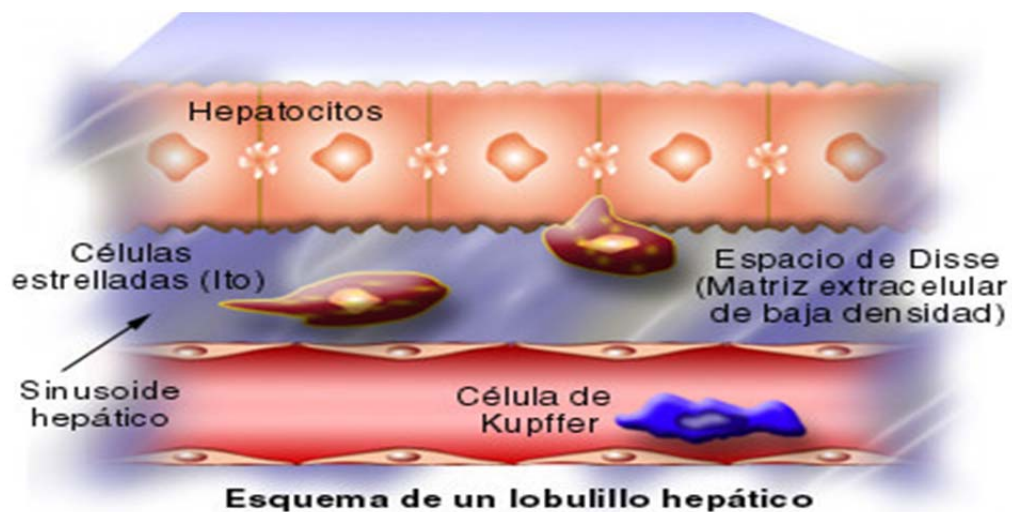


Figura 5. Se muestra el esquema del aspecto microscópico de un sinusoide, con células endoteliales separadas por amplios espacios (fenestrados). Los macrófagos pueden encontrarse intra o extravascularmente. La matriz extracelular del espacio de Disse es poco densa (modificado de Bloom-Fawcet, 1973).

Toda la sangre que sale del estómago y los intestinos llega al hígado por la vía porta-hepática, en donde se procesan y metabolizan los nutrientes y drogas en formas más fáciles de usar por el resto del cuerpo. Se han identificado más de 500 funciones en el hígado. Entre las funciones más conocidas se incluyen las siguientes: producción de bilis, la producción de la mayoría de las proteínas del plasma sanguíneo, la producción de colesterol y proteínas específicas para el transporte de grasas a través del cuerpo, la conversión del exceso de glucosa en glucógeno (glucógeno que luego puede ser convertido nuevamente en glucosa para la obtención de energía, así como para el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea), la regulación de los niveles sanguíneos de aminoácidos, que son las unidades formadoras de las proteínas, el procesamiento de la hemoglobina para utilizar su contenido de hierro (el hígado almacena hierro), la conversión del amoníaco tóxico en urea (la urea es un producto final del metabolismo proteico y se excreta en la orina), la depuración de la sangre de drogas y otras sustancias tóxicas, la regulación de la coagulación sanguínea, la resistencia a las infecciones mediante la producción de factores de inmunidad y la eliminación de bacterias del torrente sanguíneo, etc. [7, 8, 9, 10].

I.3. ETIOLOGÍA DE LA FIBROSIS/CIRROSIS

La cirrosis hepática es una de las diez causas más frecuentes de muerte en el mundo occidental y en nuestro país ocupa el cuarto lugar como causa de muerte, un lugar prominente dentro de las causas de morbi-mortalidad, sólo en 2010 causó en nuestro país, 28,369 muertes, siendo una de las tres primeras causas de muerte entre la población económicamente activa de 40 a 60 años de edad. En México, estudios estadísticos han demostrado que la cirrosis hepática causa la muerte en el 80% en hombres y el 20% en mujeres que padecen esta enfermedad [11], ya que ésta es progresiva y debido a la formación de fibrosis en el hígado da como resultado graves alteraciones en la función metabólica. Existen otras causas además del alcoholismo que, en menor proporción, también conducen a la cirrosis hepática, como son la hepatitis crónica, la enfermedad biliar crónica y los padecimientos relacionados con depósitos de hierro. Las causas de la cirrosis no alcohólica pueden ser por hepatitis B y C, cirrosis biliar primaria y secundaria, fármacos, enfermedades hereditarias, entre otras [13] (véase tabla 2) [14].

Las causas más frecuentemente involucradas en el desarrollo de un proceso cirrótico son:

- Ingesta de alcohol
- Virus de la Hepatitis B y C
- Cirrosis biliar primaria: Debida a una enfermedad inicial crónica que destruye los conductos biliares.
- Cirrosis biliar secundaria: Debida al bloqueo prolongado de los conductos biliares.
- Obstáculo al drenaje venoso del hígado: es decir, bloqueo de la salida de sangre del hígado.
- Fármacos: Aunque en pocas ocasiones la administración de un medicamento produce este tipo de enfermedad, algunos suministrados durante largo tiempo si pueden desencadenarla.
- Enfermedades de base genética: Algunas enfermedades genéticas pueden acompañarse de cirrosis hepática, es el caso de la enfermedad de Wilson.
- Otras.

Tabla 2. Monfort *et al.* 1978.

La fibrosis/cirrosis hepática es una enfermedad en la que el tejido pasa por un proceso inflamatorio debido al infiltrado de linfocitos en el parénquima hepático, algunos hepatocitos sufren apoptosis y otros esteatosis, incluso llega a presentarse necrosis. El consumo crónico y excesivo de alcohol es la principal causa etiológica de la cirrosis hepática. En cuanto a la cirrosis alcohólica el desarrollo de esta enfermedad está asociado sobre todo a la alta ingesta de alcohol, lo que también ocasiona es la baja nutrición del

paciente, y se caracteriza patológicamente por una excesiva producción y deposición de la matriz extracelular. Este proceso normalmente ocurre por varios meses o años y conduce a la disfunción del órgano hasta la muerte. Las enfermedades fibróticas representan uno de los grandes grupos de patologías en los cuales no hay una terapia efectiva, por lo que el paciente requiere, en último caso, de un trasplante de órgano, pero debido a la gran demanda de esta alternativa, a la insuficiencia de donadores de órganos y al bajo porcentaje de trasplantes exitosos, frecuentemente el paciente muere [12, 14, 16, 17].

En los sitios lesionados del hígado, las células estelares comienzan a proliferar, abandonan su función habitual y son “activadas”. Las células de Kupffer, principales estimuladoras de las células estelares, activan a éstas por medio de la producción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1). Una vez hecho esto, la célula estelar comienza a producir sustancias que a su vez son activadoras y mediadores de la fibrogénesis (TGF- β 1), que además estimulan su propia proliferación, tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Figura 6). Al activarse éstas se transforman en células semejantes a miofibroblastos; de esta manera se convierten en las principales productoras de colágena tipo I y tipo III, y de proteínas fibrilares de la matriz extracelular (MEC). El depósito y producción de todas esas proteínas se lleva a cabo en forma incontrolada, debido a la disminución de la capacidad de las células estelares para producir metaloproteinasas que degraden a las colágenas y las proteínas no colagénicas de la MEC y a un aumento en sus inhibidores tisulares (TIMP, por sus siglas en inglés). Al existir cicatrices fibrosas y nódulos de regeneración se da una distorsión de la arquitectura del hígado, entonces podemos decir que existe una disfunción hepatocelular e hipertensión portal; por lo tanto, la fibrosis ha pasado a convertirse en cirrosis hepática [17, 18, 19].

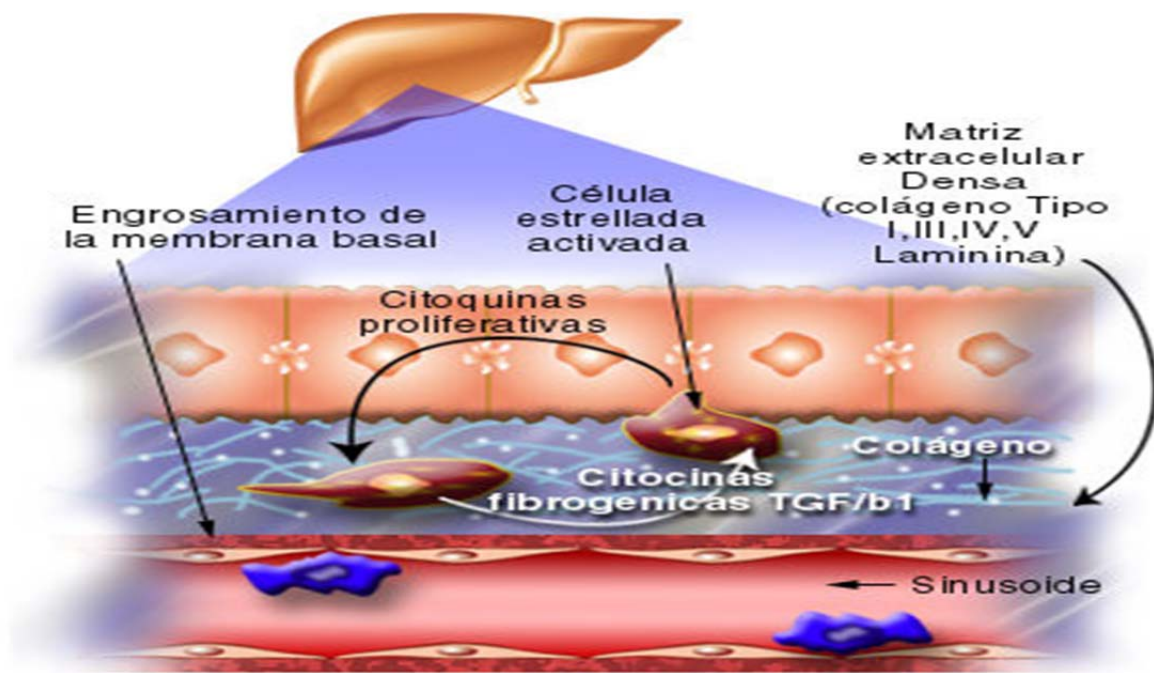


Figura 6. Esquema de los sucesos que promueven la fibrogénesis. Los hepatocitos pierden las microvellosidades superficiales. Hay activación de las células estelares, que se transforman en miofibroblastos, este proceso se autorregula, la célula comienza a producir

colágena que se deposita en matriz extracelular haciéndola más densa, se engrosa la membrana basal ocluyendo las fenestraciones de los sinusoides (Bloom-Fawcet, 1973).

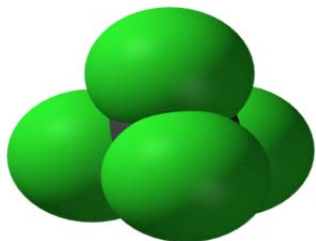
Las colágenas son una familia de proteínas fibrosas, encontradas en todos los animales multicelulares, además son las proteínas más abundantes en los mamíferos, constituyen hasta el 25% del total proteico del animal. La característica principal de todas las moléculas de colágena es su estructura de triple hélice. Las tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α , son helicoidales y están enrolladas una sobre otra de manera ordenada en una hélice regular de aproximadamente 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro. Hasta el momento se han descrito más de 20 tipos genéticamente diferentes de colágenas. Los tipos más abundantes son las colágenas tipo I, II, III, IV y V, dependiendo del tejido en que se encuentren. Los tipos I, II y III son las principales colágenas encontradas en tejidos conjuntivos. La colágena tipo I es la más común debido a que constituye el 90% de toda la colágena del cuerpo humano y está constituida por fibras que tienen un diámetro entre 100 a 500 nm dependiendo de su localización. La colágena tipo I está compuesta de 2 cadenas α 1 que son idénticas y una cadena α 2 [20].

Con el aumento progresivo y descontrolado de matriz extracelular fibrosa, ocurre la alteración en el funcionamiento normal de los sinusoides y los hepatocitos adyacentes. La arquitectura del hígado sufre deformación progresiva por la presencia de nódulos de regeneración y de septos fibrosos, que conllevan a la aparición de hipertensión portal [21].

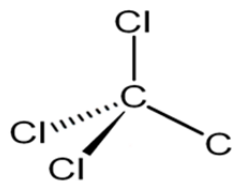
I.4. MODELOS PARA INDUCIR LA FIBROSIS/CIRROSIS

Existen diversas formas de inducir, experimentalmente, la fibrosis hepática; por ejemplo, utilizando Dimetilnitrosamina (DMN) que se ha aplicado en un modelo con ratas Wistar a las que se les administró una inyección intraperitoneal, llevando una dieta controlada en la que recibieron idoxifeno para comprobar la importancia de éste como antioxidante y antiapoptótico en la fibrosis hepática [22]. El método experimental más utilizado y estudiado ha sido por tetracloruro de carbono (CCl_4) y uno de los modelos más antiguos se hizo con ratas Wistar hembras alimentadas de manera no controlada con purina y agua, y a las que se les inyectaron 0.2 ml de una solución al 33% de CCl_4 , por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 7 semanas, con el principal objetivo de observar la presencia y distribución de la colágena, mediante técnicas inmunohistoquímicas [23]. A la fecha, existe una gran lista de referencias correspondientes al uso de este compuesto en la inducción de la fibrosis y cirrosis hepáticas.

El tetracloruro de carbono (CCl_4) (figura 4) es un compuesto químico sintético con una densidad de 1,6 g/ml, solubilidad en agua 0,08 g/100 g de agua [25].



a



b

Figura 7. Esquemas del tetracloruro de carbono a) tridimensional y b) fórmula de tetraclorometano de IUPAC.

El CCl_4 un líquido incoloro, no inflamable y de olor dulce, no se disuelve en agua fácilmente, ya que se trata de un compuesto orgánico hidrofóbico. En el pasado se usó en la producción de líquido refrigerante y propulsor de aerosoles, como plaguicida, como agente para limpiar y desengrasar, en extinguidores de fuego y para remover manchas. Debido a sus efectos perjudiciales, estos usos están prohibidos y solamente se usa en ciertas aplicaciones industriales. También se ha empleado con fines médicos, como agente anestésico y antihelmíntico [26]. Debido a su excesiva toxicidad, su uso ha sido severamente restringido por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) [27] y por la agencia para sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, División de Toxicología (ATSDR). La intoxicación aguda, voluntaria o accidental, se puede producir tanto en el ambiente industrial como doméstico [28].

Metabólicamente es reducido por el citocromo P-450 a radicales triclorometilo como un intermediario reactivo. El tetracloruro de carbono es el modelo más estudiado de biotransformación para la iniciación de radicales libre. Estos radicales son químicamente muy reactivos y pueden ser formados por radiaciones electromagnéticas o por reacciones de óxido-reducción en las cuales pueden estar involucradas enzimas o metales [29]. El CCl_4 es un hepatotóxico y nefrotóxico plenamente comprobado [30] ya que se ha visto que causa necrosis centrolobulillar, generación de hígado graso, iniciación de la peroxidación de lípidos, inhibición de la síntesis de proteínas y se une covalentemente a metabolitos de lípidos [31].

I.5. MARCADORES DEL METABOLISMO HEPÁTICO

La bilis es un líquido isotónico compuesto de ácidos biliares, bilirrubina conjugada, colesterol, lecitina, electrolitos y agua. Los ácidos biliares actúan como detergentes para facilitar la excreción de fosfolípidos y la absorción de lípidos y moléculas liposolubles incluyendo vitaminas A, D, E y K. La mayoría de los ácidos biliares excretados dentro del intestino son reabsorbidos en el íleon y retornados al hígado a través de la vena porta en un proceso de circulación enterohepática. La bilirrubina es un producto de la desintegración de la hemoglobina, mioglobina y algunos pigmentos no hemo (por ej., citocromos). La hemoglobina es eliminada de la sangre por fagocitos mononucleares del cuerpo y convertida a bilirrubina. Esta bilirrubina no conjugada es liberada de vuelta dentro de la sangre y se une a la albúmina para facilitar su transporte hacia el hígado. La bilirrubina no conjugada es eliminada de la sangre por los hepatocitos y conjugada a glucurónido. La bilirrubina conjugada es excretada por la bilis dentro del intestino donde es reducida por la microflora residente a urobilinógeno y estercobilina [32, 33, 34].

La hiperbilirrubinemia puede producirse como resultado de hemólisis, enfermedad hepatocelular primaria o enfermedad colestásica. La hiperbilirrubinemia está asociada con ictericia, hemólisis o hepatopatía. Los incrementos de la bilirrubina conjugada (DBIL) son indicativos de enfermedad colestásica [32, 33, 34].

En el hígado existen enzimas que se encuentran en los hepatocitos y que se liberan en la sangre, estas células hepáticas producen la enzima alanintransaminasa (ALT). Las concentraciones de ALT aumentan cuando las células hepáticas están dañadas o se están

muriendo. A concentraciones de ALT más elevadas, mayor muerte celular o inflamación del hígado está ocurriendo. Sin embargo, las ALT no siempre son buenos indicadores de qué tan bien está funcionando el hígado, sólo una biopsia del hígado puede revelar eso. Las concentraciones de ALT pueden permanecer bajas aún si el hígado está inflamado o se está formando tejido cicatricial, o durante la fase inmunotolerante. Tal como la enzima ALT, la aspartatotransaminasa (AST) es una enzima producida por las células hepáticas, pero los músculos también producen AST y puede estar elevada por enfermedades diferentes a la enfermedad hepática. Por ejemplo, a menudo la AST es alta durante un infarto del miocardio (ataque al corazón). En muchos casos de inflamación del hígado, las ALT y AST también están altas. En algunas enfermedades, como la hepatitis alcohólica, las concentraciones de AST pueden ser más altas que las de ALT. Las concentraciones de AST pueden ser normales, y de todas maneras se puede estar presentando daño hepático. Esta prueba agrega tan sólo otro punto de vista más sobre la enfermedad hepática [32, 33, 34].

La LDH o lactato deshidrogenasa se conoce también como LD, deshidrogenasa láctica, LDH total e isoenzimas LDH. La LDH se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, como el corazón, el hígado, los riñones, el músculo esquelético, el cerebro, las células sanguíneas y los pulmones. La LDH existe en 5 formas o isoenzimas, las cuales difieren ligeramente en estructura: La LDH-1 se encuentra principalmente en el músculo cardíaco y en los glóbulos rojos. La LDH-2 se concentra en los glóbulos blancos. La LDH-3 es más alta en los pulmones. La LDH-4 es más alta en los riñones, la placenta y el páncreas. La LDH-5 es más alta en el hígado y en el músculo esquelético. La determinación de LDH se utiliza principalmente como indicador general de existencia y severidad de lesión tisular aguda o crónica y algunas veces para monitorear enfermedades progresivas. Las isoenzimas de LDH pueden utilizarse en el diagnóstico diferencial para determinar qué órganos están probablemente involucrados. La LDH-5 puede ser liberada en concentraciones más altas de sus valores normales cuando se presentan enfermedades del hígado. Una concentración moderadamente elevada de LDH puede persistir en algunas enfermedades crónicas y con algunos fármacos. Las transaminasas y la deshidrogenasa láctica (LDH) son marcadores de necrosis celular [35].

I.6. TRATAMIENTOS PARA FIBROSIS/CIRROSIS HEPÁTICA

Diversas investigaciones sobre el estudio de la fibrosis /cirrosis han permitido establecer variadas estrategias terapéuticas, algunas han sido con el fin de inhibir la función fibrogénica de las células estelares y otras más han sido desarrolladas para la degradación del exceso de la colágena depositada de manera más activa. Para inhibir la transformación fenotípica de las células estelares en miofibroblastos, se han usado diferentes estrategias antioxidantes, particularmente el alfa-tocoferol o vitamina E actúa como antioxidante a nivel de la síntesis del grupo hemo, que es el grupo prostético de la hemoglobina, previene la oxidación de ácidos grasos, reacciona con radicales libres, ya que estos son la causa del daño oxidativo de la MEC, sin la formación de otros radicales libres durante el proceso, por lo que se sabe puede suprimir la fibrogénesis en la cirrosis experimental [36]. Algunas citocinas como el interferón γ (IFN γ) y el factor de crecimiento hepático (HGF) inhiben la activación de las células estelares en modelos animales; actualmente este interferón se ha comenzado a usar, con buenos resultados, en casos de fibrosis avanzada del hígado en pacientes con hepatitis C persistente [37].

Sakamoto, *et al.*, en 1999 examinaron el efecto del trasplante de células progenitoras endoteliales en la hipertensión portal de ratas cirróticas. Tras inducir cirrosis con tetracloruro de carbono, a las siete semanas se iniciaron infusiones endovenosas semanales de células progenitoras durante cuatro semanas. Los autores observaron que en el grupo tratado, la presión portal era significativamente inferior al grupo control, y el flujo sanguíneo hepático era superior. Además, mediante microscopia confocal pudieron localizar las células progenitoras endoteliales en los sinusoides hepáticos y los septos fibrosos, demostrando que las estructuras sinusoidales estaban mejor conservadas en las ratas tratadas comparadas con las ratas control. En definitiva, el tratamiento con células progenitoras endoteliales podría ser una nueva arma terapéutica en la hipertensión portal de la cirrosis hepática [38].

Uno de los mecanismos responsables de la resistencia intrahepática aumentada en la cirrosis hepática es una disminución de la producción de óxido nítrico por un defecto en la óxido nítrico sintetasa (NOS) endotelial intrahepática. Laleman, *et al.*, (2003) investigaron si un inhibidor endógeno de la NOS, la dimetilarginina asimétrica podría estar implicada en este defecto. Utilizando dos modelos de inducción de cirrosis en ratas con tetracloruro de carbono y ligadura de colédoco, sólo pudieron demostrar que la dimetilarginina tenía un papel importante en la cirrosis biliar. La actividad de la NOS intrahepática estaba disminuida y la concentración plasmática de dimetilarginina era alta en las ratas con cirrosis biliar respecto a las ratas control. En el hígado normal perfundido, la administración de dimetilarginina asimétrica provocaba una vasodilatación defectuosa al administrar acetilcolina, con menos producción de nitratos en el perfundido. En los hígados de las ratas con cirrosis biliar, la relajación endotelial alterada se agravaba cuando se añadía dimetilarginina, asociándose a una menor extracción intrahepática de dimetilarginina comparado con los hígados sanos. Parece que la acumulación intrahepática de dimetilarginina asimétrica, un inhibidor endógeno de la NOS, puede contribuir a la disfunción endotelial de la cirrosis biliar [39].

En la historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se reconoce el desarrollo de la cirrosis hepática (CH) y la aparición del carcinoma hepatocelular (CHC) como eventos tardíos. Aún en estas fases, la enfermedad tiene muy poca expresividad clínica hasta que aparecen los síntomas y signos característicos de la hipertensión portal y la encefalopatía hepática [40]. El tratamiento con interferón alfa (INF α) sostiene los beneficios de reducir la actividad necroinflamatoria y en detener el deterioro funcional e histológico del hígado. Los efectos benéficos del tratamiento consisten en la disminución de la concentración sérica de las aminotransferasas y la mejoría de las lesiones inflamatorias en el hígado [41]. El INF α también ejerce una acción antiproliferativa, ya que es capaz de actuar sobre los mecanismos responsables de la aparición de fibrosis y provoca la reducción de ésta. También existen evidencias de que el tratamiento con interferón puede reducir el riesgo de desarrollar el carcinoma hepatocelular. En un estudio multicéntrico desarrollado en unidades asistenciales de Italia y Argentina, se pudo comprobar que el tratamiento con interferón disminuye en 2 veces el riesgo de progresión al hepatocarcinoma en los pacientes tratados [42, 43].

II. ANTECEDENTES

En México se ha desarrollado y patentado un biofármaco que es un polímero de colágena inyectable con propiedades antifibrogénicas e inmunomoduladoras que consiste en una mezcla sometida a irradiación gama de colágena porcina tipo I y polivinilpirrolidona (PVP), disuelta en una solución amortiguadora de citratos, y que ha sido llamado *FIBROQUEL^{MR}*. Datos experimentales indican que el *FIBROQUEL^{MR}* no es genotóxico ni inmunogénico y que su administración en humanos no provoca efectos secundarios. Por el contrario, la asociación colágena-PVP incrementa la estabilidad de la colágena y reduce su inmunogenicidad. Se usa de manera externa en pérdidas cutáneas, soluciones de continuidad (úlceras de tipo arterial venoso o linfático, úlceras de decúbito, quemaduras de segundo grado, áreas donadoras de injertos, heridas accidentales, raspones, debido a sus propiedades hemostáticas y cicatrizantes). Puede administrarse junto con antibióticos en caso de infección. La administración de este biofármaco en un sitio de lesión en tejidos blandos favorece la cicatrización, induciendo una mejor arquitectura tisular que semeja a la piel normal. El biofármaco se administra por irrigación en el área dañada hasta formar una película uniforme en una herida incisional, o en la zona de lesión, en una quemadura de hasta segundo grado, en el área donadora de injerto o abrasiones, etc. [44].

El biofármaco ha sido utilizado en diversos proyectos experimentales tales como el estudio morfológico sobre los efectos del fibroquel durante la cicatrización de heridas quirúrgicas en ratas donde la cicatrización de la herida es un proceso reparativo como una respuesta biológica a los diferentes tipos de agresiones y lesiones en piel. Estos constituyen una serie de eventos muchas veces caracterizados por la inflamación, la formación de cicatrices, la síntesis y deposición de tejido de granulación y la presencia de infiltrados celulares (fibroblastos y células mononucleares) en las áreas de lesión. En algunos desordenes de tejido conectivo (escleroderma, queloides, hipertrofia), que constituyen serios problemas en la formación de piel, por interferir con el funcionamiento normal de la piel en el área reparada después de la lesión. Debido a la fuente de obtención de la colágena empleada en el fármaco antes mencionado y su antigenicidad característicamente baja, se considera un material prácticamente inocuo, excepto en pacientes que manifiesten hipersensibilidad a ella. Por su parte, la polivinilpirrolidona es un polímero inerte prácticamente no metabolizable que se excreta principalmente por vía urinaria (95%) en un período menor a 24 hrs. [44].

Al ponerse en contacto con los tejidos el Fibroquel crea una capa protectora sobre áreas donde hay una lesión, siendo hemostático e inductor de la cicatrización favoreciendo una rápida reepitelización. Puede aplicarse internamente en áreas de sangrado en capa donde efectúa una cicatrización y regeneración adecuada [44].

Los datos generados de los estudios *in vivo* sugieren que el biofármaco FIBROQUEL en su presentación en esponja, actúa en el parénquima dañado o perdido al generar una matriz

temporal por la cual pueden migrar y depositarse diferentes componentes celulares del tejido de granulación para posteriormente ser reemplazado por una matriz propia de tal forma que dicha regulación participa en los procesos reparativos con una mejor calidad y tiempo de respuesta en la cicatrización. También los estudios *in vivo* han mostrado que éste modula el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 1 β (IL-1 β), así como moléculas de adhesión celular que favorecen la diapédesis leucocitaria al endotelio (ELAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), hasta alcanzar niveles semejantes a los normales lo que favorece el recambio de los componentes del tejido conjuntivo con la consecuente eliminación del exceso de proteínas fibrosas [45].

Cuando el biofármaco se aplica en regiones fibrosas, promueve la remodelación del tejido conjuntivo disminuyendo la fibrosis y normalizando la zona previamente dañada. Tal es el caso de las cicatrices hipertróficas y queloides, en donde se ha demostrado su participación en el control del proceso inflamatorio crónico asociado a la patología, lo que conlleva a la remodelación de la zona afectada para su posterior “normalización”, esto implica la eliminación de signos y síntomas patognomónicos de estos padecimientos. Utilizado post-resección de la cicatriz que loide impide la recidiva de la misma [46]. En algunos tipos de fibrosis internas, como las que se presentan en el tendón de Aquiles asociadas a las contracturas, Fibroquel reduce la fibrosis y permite la movilidad de la articulación, además de favorecer la elasticidad del tendón [47].

En el caso de fracturas, la administración del biofármaco como regenerador tisular disminuye el dolor en el sitio de la fractura, regenera el tejido y acelera el proceso de consolidación. Lo anterior se basa en su capacidad para la producción de proteínas de reparación temprana durante la osteogénesis, como son la osteopontina y la osteonectina; así como la fosfatasa alcalina [49, 50].

En adherencias abdominales el biofármaco ayuda a la disminución de la incidencia y tamaño de adhesiones [50]. En el tratamiento para disminuir la inflamación en las articulaciones, la respuesta inmune anormal y la hiperplasia sinovial de la artritis reumatoide (RA), el biofármaco modula el metabolismo de la colágena y disminuye la actividad colágenolítica, así como la alteración del proceso inflamatorio crónico, la disminución de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias en las cicatrices hipertróficas y lesiones de escleroderma [51].

El biofármaco ha sido aplicado en diversos tratamientos terapéuticos para evaluar su funcionalidad; en la regeneración de hueso donde los resultados mostraron que posiblemente acelera el proceso de reparación ósea [52]. En la cicatrización aguda en humanos contribuyendo a una fibrogénesis moderada revelada por el arreglo de las fibras elásticas y de colágena semejante al de la piel normal [53]. En la enfermedad de Peyronie llegaron a la conclusión de que el biofármaco, es un medicamento útil y seguro en los pacientes que presentan esta enfermedad [54]. En estudios estéticos se aplicó para la cicatrización de heridas, la cicatriz estéticamente resultó menos prominente [55]. En la prevención de la formación de adherencias peritoneales logro disminuir el proceso adherencial [56]. Al aplicarlo para evaluar la respuesta humoral y celular durante períodos

cortos y largos en humanos con cicatrices hipertróficas, los resultados mostraron que este biofármaco no estimula la linfoproliferación ni produce daño al DNA *in vitro*, tampoco produce anticuerpos humanos anti-colágena Tipo I porcina o anti-colágena-PVP *in vivo*. Además, no se observaron disfunciones metabólicas hepáticas o renales durante la administración de colágena-PVP de manera intradermal o intramuscular en tratamientos largos o cortos. Se logró demostrar que no hay daño celular o efectos adversos inmunológicos (celular y humoral) durante el tratamiento incluso después de más de 400 semanas de administración consecutiva [57]. De esta manera el biofármaco se ha utilizado en proyectos preclínicos y clínicos para evaluar sus efectos en algunas patologías odontológicas [58, 59].

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La cirrosis hepática es una de las causas más comunes de muerte a nivel mundial, la disfunción del hígado da como resultado, a mediano o largo plazo, la muerte. Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para la reversión de esta patología, excepto el trasplante de hígado como último recurso. Debido a que esta enfermedad se caracteriza por la sustitución progresiva de tejido hepático por tejido fibrótico, al mismo tiempo que se presenta un proceso inflamatorio, complicándose al presentarse cambios en la circulación hepática con hipertensión portal y falla generalizada de las funciones del hígado. Una terapia efectiva sería la que actuara contra el proceso fibrosante e inflamatorio previos, y en tal caso el daño producido pudiera ser detenido y revertido. Con base en lo antes mencionado, se planteó probar en un modelo experimental *in vivo* de fibrosis hepática en ratas, si el biofármaco presentaría sus efectos antifibróticos ya demostrados en otras diversas patologías fibrosantes; evaluándose parámetros serológicos e histopatológicos en espera de que éstos alcanzaran valores y un comportamiento semejante a los normales.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar histopatológica y serológicamente el probable efecto del biofármaco de colágena-PVP, en la resolución de la fibrosis hepática establecida en un modelo *in vivo*, inducida por Tetracloruro de Carbono (CCl₄).

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES

IV.2.1. Evaluar serológicamente los efectos del inductor de la fibrosis (CCl₄) sobre marcadores metabólicos hepáticos: LDH, bilirrubinas y transaminasas hepáticas (ALT y AST).

IV.2.2 Evaluar de manera histológica el establecimiento de la fibrosis hepática inducida por CCl₄ en ratas Wistar por medio de técnicas de tinción (H/E, Herovici y Tricrómica de Masson).

IV.2.3. Evaluar los efectos del biofármaco (colágena-PVP) sobre la reversión de la fibrosis, mediante los dos análisis mencionados en los objetivos uno y dos, siguiendo el esquema de tratamiento de inyecciones vía intramuscular tres veces por semana, a una y dos semanas de tratamiento.

V. METODOLOGÍA

V.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE FIBROSIS HEPÁTICA POR CCL₄

Para el desarrollo experimental se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200-250 g. de peso.

La fibrosis se estableció por medio de inyecciones con CCl₄ en una proporción de 25 µl por 125 µl de aceite mineral (15 ratas), mientras que a las controles (9 ratas) se les inyectaron 150 µl de aceite mineral, ambos vía intraperitoneal, 3 veces por semana durante cuatro semanas.

Después de las cuatro semanas se sacrificaron 8 ratas (5 fueron fibróticas y 3 controles) para obtener el hígado y ser procesado para tener fragmentos dirigidos al análisis bioquímico e histológico correspondientes y por punción de la vena porta hepática el volumen máximo posible de sangre (aproximadamente 1 ml), para la obtención del suero y su congelamiento hasta su análisis posterior.

V.2. ESQUEMA DE TRATAMIENTO Y APLICACIÓN DEL BIOFÁRMACO DE COLÁGENA-PVP

Éste se administró inyectándolo por vía intramuscular a 10 ratas, en dosis de 20 µl del compuesto de colágena-PVP conocido como Fibroquel^{MR}. A los animales controles (6 ratas) se les administraron por la misma vía, 20 µl de citratos que se utiliza como la solución amortiguadora en la cual se prepara y presenta el biofármaco; las inyecciones se aplicaron tres veces por semana durante dos semanas, llevándose a cabo el sacrificio de 3 ratas controles y 5 experimentales en cada uno de los tiempos mencionados y siguiendo el mismo procedimiento ya mencionado en el párrafo anterior.

Esquema temporal de la inducción experimental de fibrosis hepática y tratamiento con el biofármaco:

- Inducción experimental de la fibrosis hepática con CCl₄:

Cuatro semanas con tres aplicaciones por semana, de aceite mineral al grupo control y tres inyecciones por semana de CCl₄ intramuscularmente, al grupo de ratas de inducción experimental de fibrosis.

- Después de las cuatro semanas de inducción experimental de la fibrosis hepática con sus controles respectivos, se llevó a cabo el sacrificio de 3 ratas control y 8 ratas con fibrosis hepática. De las 16 ratas restantes, 6 fueron controles y 10 con fibrosis hepática y a todas se les aplicó el tratamiento con el biofármaco, de la siguiente manera:

1^a. Semana.

Tres aplicaciones del biofármaco al grupo de ratas con fibrosis hepática.

Tres aplicaciones de citratos al grupo de ratas control de fibrosis.

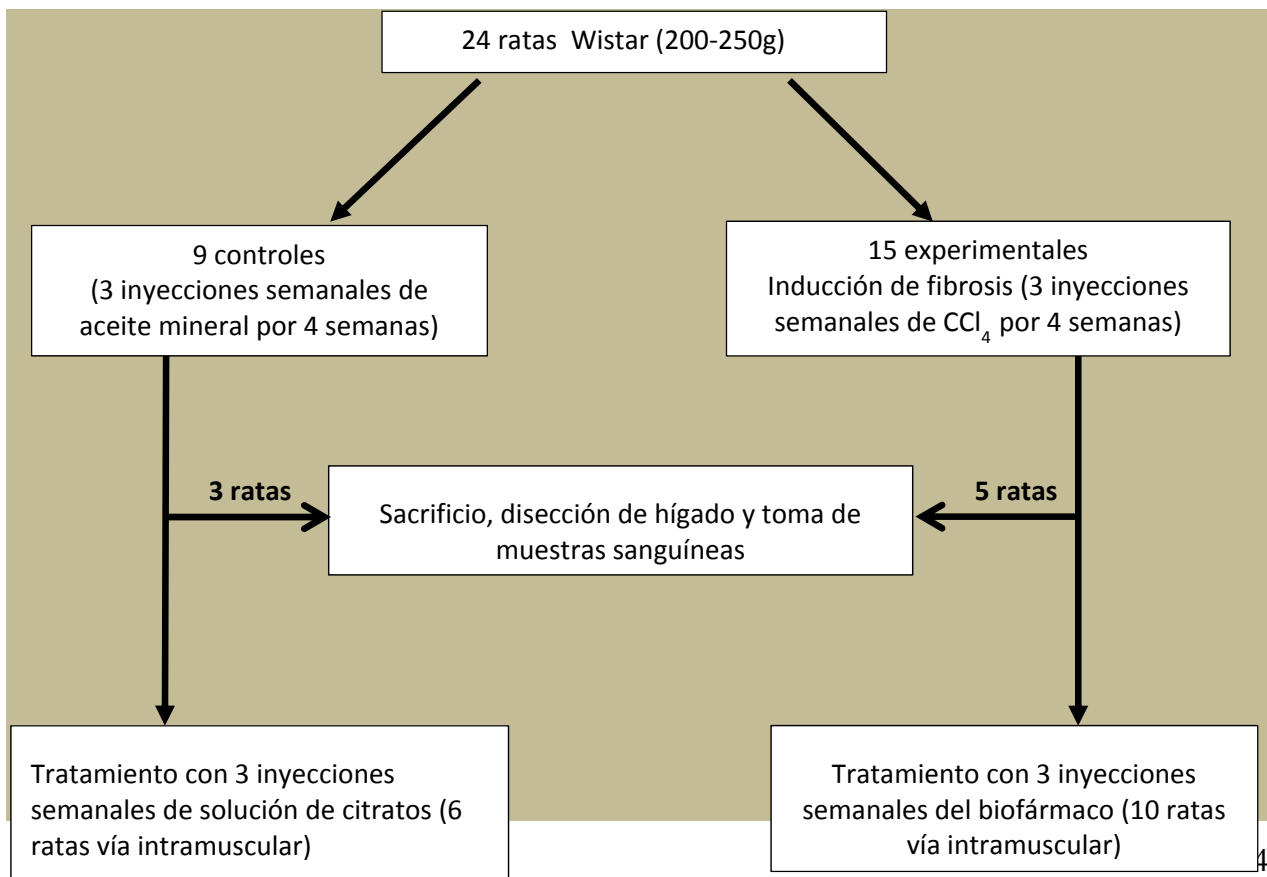
Tres aplicaciones del biofármaco al grupo de ratas al que se le administró en la primera fase aceite mineral.

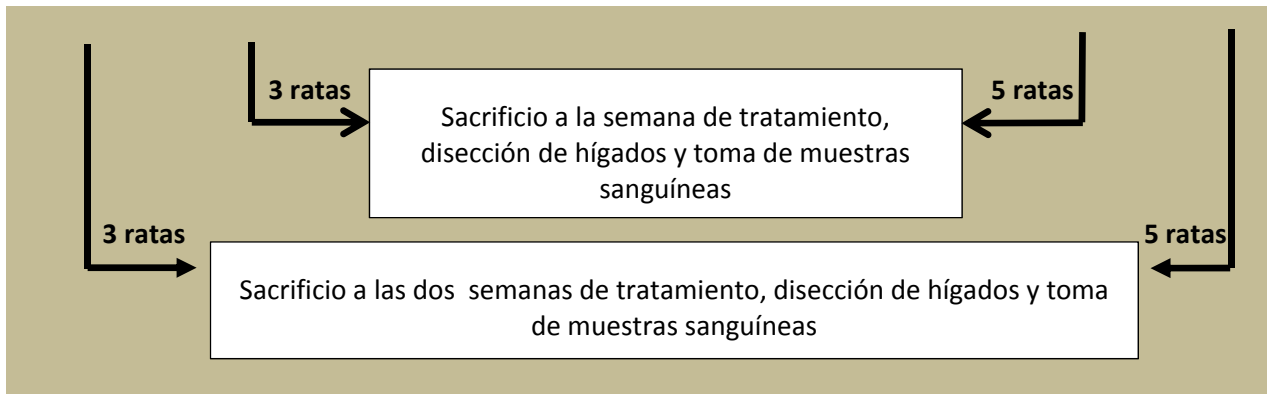
Tres aplicaciones de citratos al grupo de ratas a las que se les administró en la primera fase aceite mineral.

2^a. Semana.

Mismo esquema que en la primera semana.

V.3 DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL





V.4. OBTENCIÓN DEL HÍGADO POR DISECCIÓN

Las ratas Wistar fueron anestesiadas con éter, posteriormente descerebradas, e inmediatamente disecadas. Ya que el hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*) se ubica sobre la cara caudal del diafragma y se extiende hacia a ambos lados del plano mediano, desde el arco costal derecho hasta el izquierdo, se abordó el abdomen por una línea paramediana y mediante dos incisiones sobre el arco costal hacia el dorsal se expusieron las vísceras del aparato digestivo (figura 4). Cabe mencionar que el hígado presenta anatómicamente, las caras: parietal (cranial) de forma convexa relacionada al músculo diafragma y una cara visceral (caudal) cóncava relacionada al estómago y parte craneal del duodeno. Está dividido en los lóbulos derechos (lateral y medial), izquierdos (lateral y medial), cuadrado (muy pequeño) y caudado el cual presenta los procesos caudado y papilar (subdividido en parte dorsal y ventral) (figura5) [60]. Al realizar la disección se extrajo el hígado completo y se lavó con PBS frío (véase anexo 1), se obtuvieron fragmentos de 0.5 mm de los lóbulos: 1. Lóbulo lateral derecho (LLD); 2. Lóbulo medial derecho (LMD); 3. Lóbulo lateral izquierdo (LLI); 4. Lóbulo medial medio izquierdo, (LMI) (figura 5 y 6), que inmediatamente se fijaron en formalina al 10% (véase anexo1).

En todo momento, tanto los tratamientos como los procedimientos de sacrificio de los animales se llevaron a cabo siguiendo las normas y lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio, vigilados por el CICUAL (Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la institución CMN “20 DE Noviembre” ISSSTE y siguiendo la Norma Oficial Mexicana-ZOO- 062-1999.

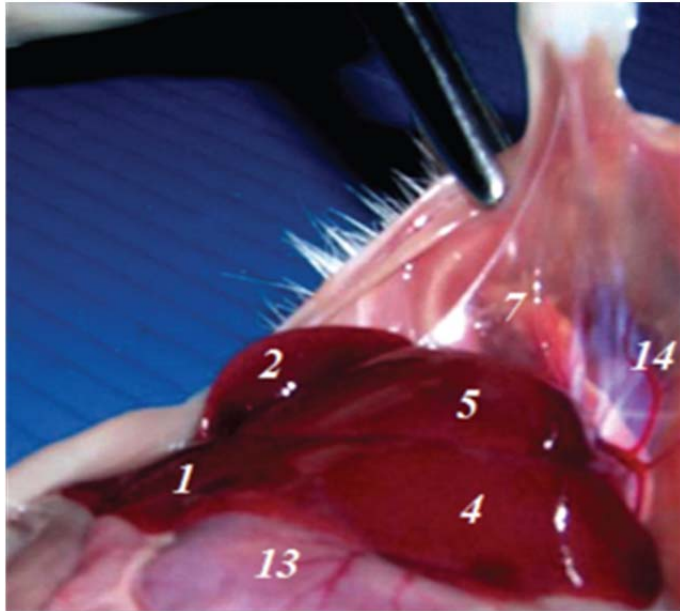


Figura 8. Cara parietal del hígado.
 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo Medial derecho;
 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial Izquierdo;
 13. Estómago; 14. Diafragma.

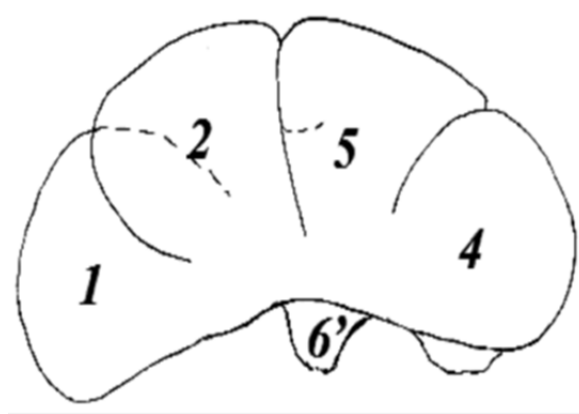


Figura 9. Cara parietal del hígado.
 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo Medial derecho;
 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial Izquierdo; 6. Proceso papilar del lóbulo caudado.

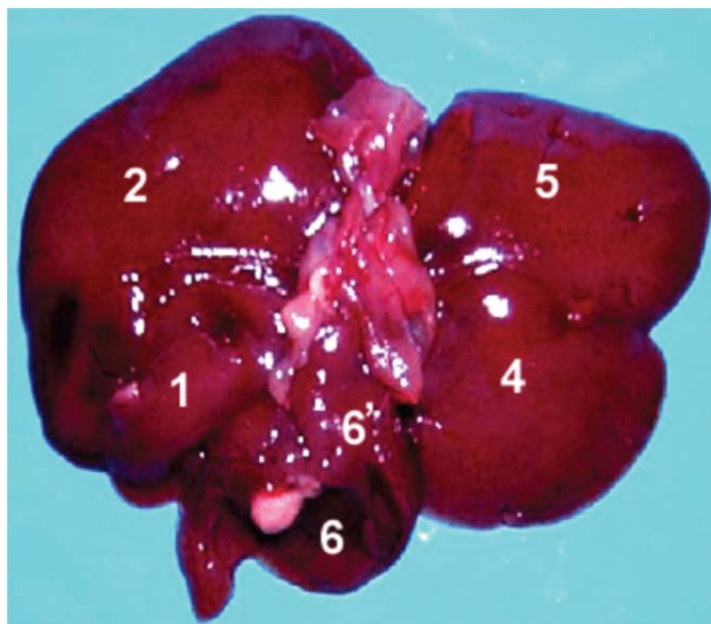


Figura 10. Cara visceral del hígado.

1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo Medial derecho;
4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial Izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado.

V.5. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE MARCADORES DEL METABOLISMO HEPÁTICO

Durante todas las disecciones realizadas en el proyecto, de cada rata se obtuvo aproximadamente un mililitro de sangre de la vena porta hepática, cuando el corazón aún estaba latiendo. Ésta se dejó que coagulara a temperatura ambiente, para después centrifugarla a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, recolectándose aproximadamente 500 μ l de suero, los que se congelaron para posteriormente enviarse al área de pruebas especiales del Laboratorio Central del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, para la cuantificación de los niveles séricos de bilirrubinas totales, lactatodeshidrogenasa (LDH) y las alanintransaminasa (ALT) y aspartiltransaminasa (AST) hepáticas. Además de los sueros obtenidos durante el proyecto, se envió el suero de 5 ratas normales (datos no mostrados), sin ningún tratamiento, con el fin de que sirvieran como sueros de referencia para estandarizar los parámetros cuantitativos de los equipos automatizados utilizados para todas las cuantificaciones mencionadas.

V.6. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

De los fragmentos obtenidos y fijados para la evaluación histológica, se procesaron los del lóbulo medial derecho, utilizando la técnica de inclusión en parafina.

Esta técnica se realizó de la siguiente manera: después de ser fijados en formol al 10%, los fragmentos se lavaron en agua corriente, inmediatamente después se inició el proceso de deshidratación haciendo varios cambios, los primeros en alcoholes graduales que iban en concentraciones de alcohol etílico del 30% al 100%, siguiendo con una mezcla de etanol/xileno 50% y 50%, posteriormente únicamente xileno; en seguida se transfirieron a una mezcla de 50% xileno y 50% parafina líquida, la cual es de alta calidad llamada paraplast y que tiene un punto de fusión de 56-58° C, para continuar con el paso de preinclusión en el que los fragmentos tuvieron dos cambios de paraplast a 56° C, el primero de 20 minutos, y el segundo de 12 horas, hecho esto se procedió a la inclusión en moldes utilizando paraplast. Se obtuvieron varios bloques de parafina, con los que se hicieron cortes de 5µm en un micrótopo rotatorio tipo Minot, estos cortes se pasaron a un baño de flotación con control termostático a una temperatura de 52° C que contenía agua con grenetina la que permitió la adhesión del tejido al portaobjetos con el que fueron recogidos los cortes (Véase anexo1).

Para llevar a cabo las técnicas de tinción, los cortes tuvieron primero que ser rehidratados con el proceso inverso a la deshidratación, el primer paso fue el xileno que eliminó la parafina, siguiendo con la mezcla 1:2 de etanol/ xileno, para continuar con varios cambios de alcoholes graduales empezando con el absoluto hasta llegar al alcohol del 50% y terminar con agua destilada. Rehidratados los tejidos se realizaron las técnicas de tinción de Hematoxilina/Eosina, Herovici y Tricrómica de Masson. Una vez teñidos los tejidos se deshidrataron de nuevo de la manera antes mencionada y para el montaje se limpió el portaobjeto alrededor del corte y se depositó sobre el mismo una gota de Bálsamo de Canadá disuelto en xilol y se cubrió con un cubreobjetos, para su observación al microscopio. Donde la tinción Hematoxilina/Eosina tiñe los núcleos azules (hematoxilina), citoplasma rosado y colágena y fibras musculares de rosado pálido (Eosina), la tinción Herovici tiñe los núcleos en negro, citoplasma en amarillo verdoso o café claro dependiendo del daño en el tejido, queratina, músculo y glóbulos rojos en amarillo brillante colágena tipo III en azul, colágena tipo I en rojo y el citoplasma en verde azulado. Y por último la tinción Tricrómica de Masson que muestra un marcado contraste de los componentes celulares y tisulares, los núcleos aparecen en marrón o negro, los citoplasmas en tonos de rosa y las fibras de colágena en azul (Véase anexo1).

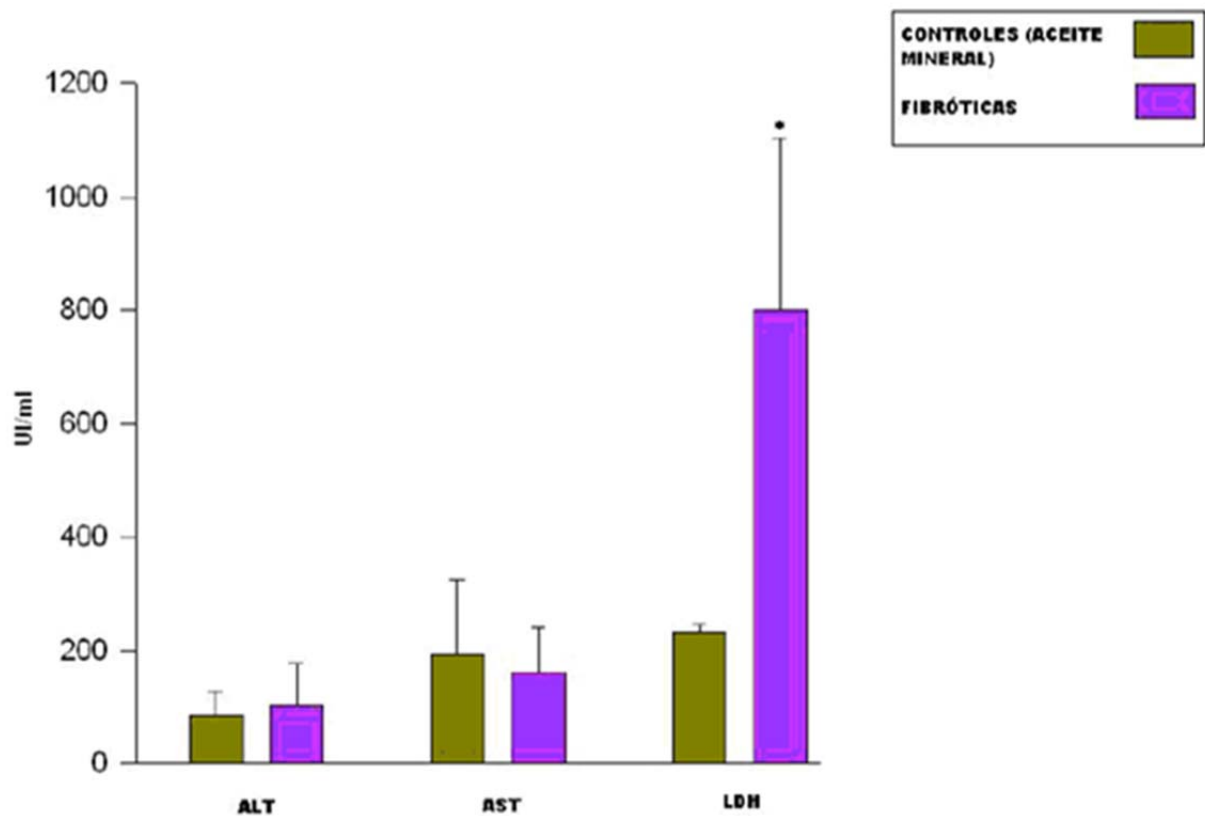
VI. RESULTADOS

VI.1. ANÁLISIS SEROLÓGICO

Tomando como valores de referencia los de las ratas normales, encontramos que los resultados obtenidos de los niveles serológicos de todas las moléculas estudiadas, no tuvieron variaciones significativas (datos no mostrados), excepto para la enzima LDH, como se muestra en la gráfica número 1, en donde las actividades enzimáticas de la ALT y de la AST mantuvieron sus valores, tanto en las ratas fibróticas como en las controles, mientras que la enzima LDH presentó un cambio significativo, ya que sus niveles se vieron aumentados cuatro veces más en las ratas fibróticas sobre los niveles de las ratas control.

En la gráfica no. 2 se observa menor actividad enzimática de ALT y de AST en las ratas fibróticas con aplicación de Clg-PVP que en las ratas fibróticas con aplicación de citratos (control del tratamiento), éstas mostraron valores elevados a casi el doble de las tratadas, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa; sin embargo, fue en la actividad de la LDH donde los niveles se vieron disminuidos considerablemente en las ratas fibróticas a las que se les aplicó el biofármaco y con significancia estadística, alcanzando valores semejantes a los normales; mientras que las ratas fibróticas con aplicación de citratos continuaron mostrando un aumento significativo de hasta siete veces sus valores, por encima de las tratadas con el compuesto.

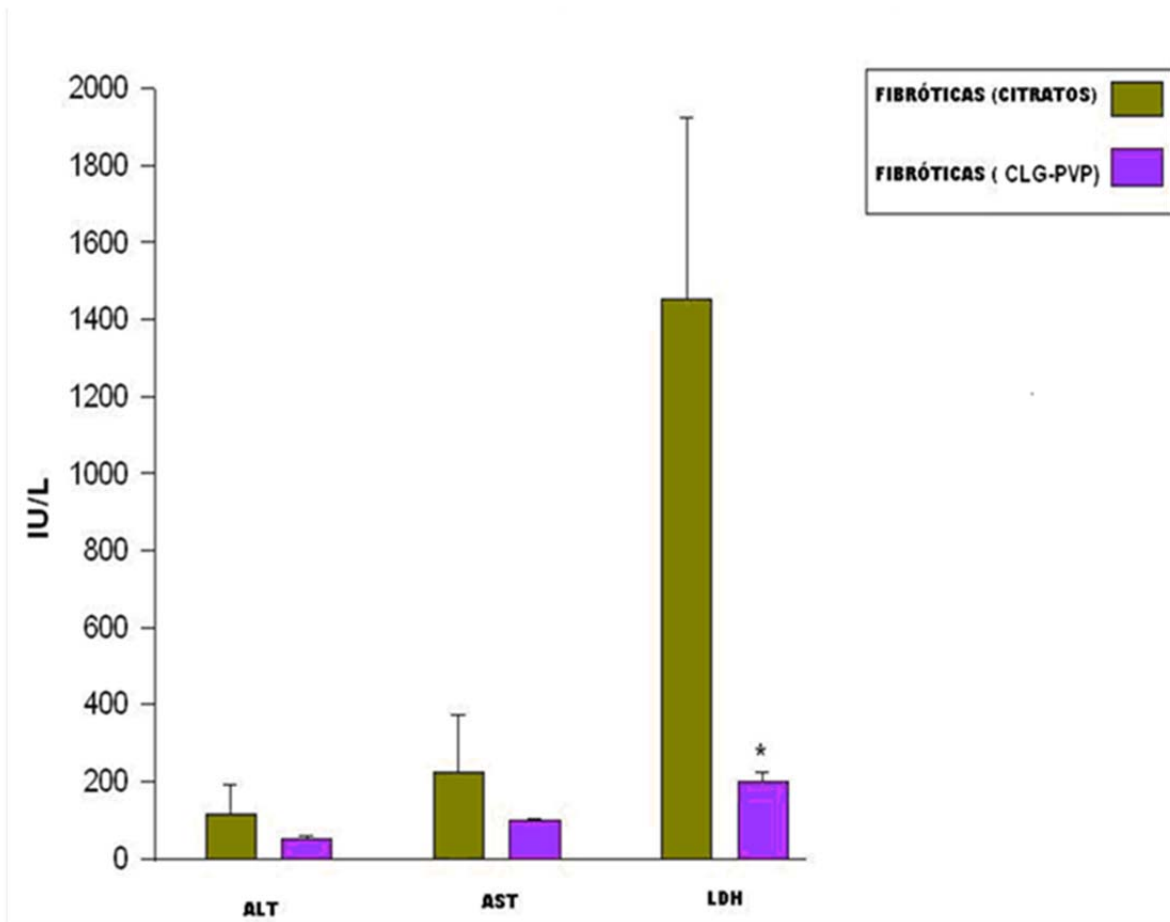
En la gráfica 3 que corresponde a la segunda semana de tratamiento, la actividad enzimática de ALT y la AST siguió siendo mayor, pero sin significancia estadística; mientras que la de la LDH en las ratas fibróticas con aplicación de citratos continuó siendo significativamente mayor que en las ratas fibróticas tratadas con el biocompuesto; por el contrario, en las ratas fibróticas tratadas con el biofármaco se mantuvieron los valores de esta enzima en el intervalo de las normales, como podemos compararlos en la gráfica 1.



GRÁFICA No. 1. MARCADORES SÉRICOS DE DAÑO HEPÁTICO

Las barras representan la desviación estándar a partir de los valores promedio de cada tratamiento (3 ratas controles y 5 experimentales).

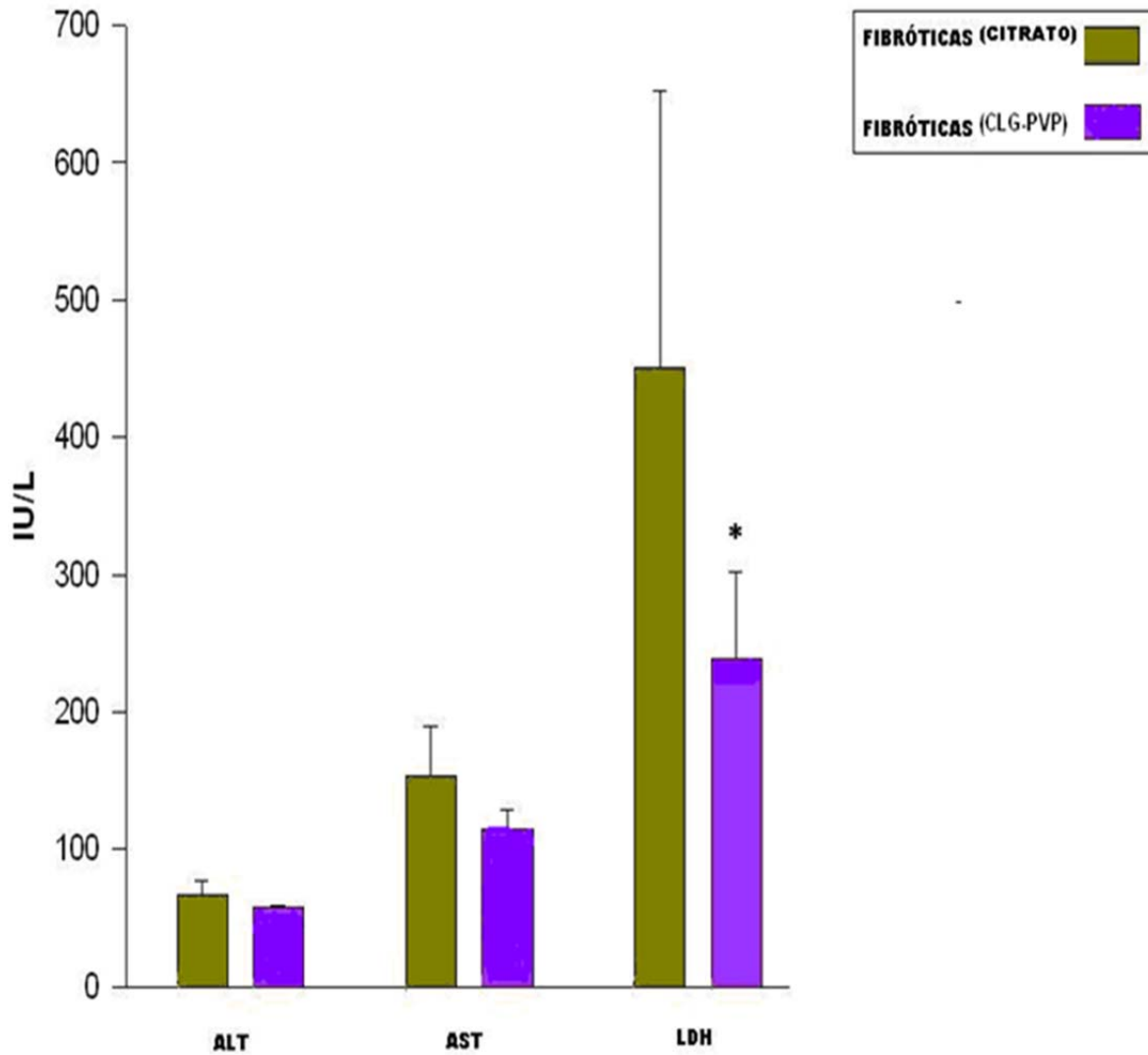
* Representa la significancia estadística aplicando la prueba t de student, con un valor $p < 0.05$, comparando entre el grupo de ratas fibróticas contra las tratadas con aceite mineral.



GRÁFICA No. 2. EFECTOS DE Clg-PVP SOBRE LOS MARCADORES SÉRICOS DEL DAÑO HEPÁTICO(1ª. SEMANA DE TRATAMIENTO)

Las barras representan la-desviación estándar a partir de los valores promedio de cada tratamiento (3 ratas controles y 5 experimentales).

* Representa la significancia estadística aplicando la prueba t de student, con un valor $p < 0.05$, comparando entre el grupo de ratas fibróticas con aplicación de citratos contra las ratas fibróticas tratadas con el biofármaco.



GRÁFICA No. 3. EFECTOS DE Clg-PVP SOBRE LOS MARCADORES SÉRICOS DEL DAÑO HEPÁTICO (2^a. SEMANA DE TRATAMIENTO)

Las barras representan la-desviación estándar a partir de los valores promedio de cada tratamiento (3 ratas controles y 5 experimentales).

* Representa la significancia estadística aplicando la prueba t de student, con un valor $p < 0.05$, comparando entre el grupo de ratas fibróticas con aplicación de citratos contra las ratas fibróticas tratadas con el biofármaco.

VI.2. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Con la colaboración de la Dra. María Teresa Gorráez de la Mora, jefa del Servicio de Anatomía Patológica del CMN “20 DE Noviembre” ISSSTE, se llevó a cabo el análisis histopatológico. Se realizó un análisis ciego de varias series de preparaciones histológicas con las tinciones de Hematoxilina/Eosina (H/E), Herovici y Tricrómica de Masson para detectar lesiones hepáticas utilizando el sistema de clasificación por etapas y niveles de Knodell, conocido como “Índice de Actividad Histológica Knodell” [61], este índice fue desarrollado de un estudio médico en el cual se establecieron cuentas numéricas generadas de muestras de biopsias de hígado, las biopsias fueron graduadas en cuatro categorías: necrosis portal, necrosis intralobular, inflamación portal y fibrosis [62]. Con base en lo anterior se estableció un “score” para evaluar la fibrosis y los efectos terapéuticos del biofármaco (Fibroquel^{MR}), tomando en cuenta también la pérdida de la arquitectura lobular hepática, la fibrosis en nódulos, la inflamación del hígado sin fibrosis, la inflamación más fibrosis confinada a una zona portal del hígado, la fibrosis que está extendida hasta otras zonas portales adyacentes (fibrosis en puente), fibrosis leve o moderada, esteatosis (acumulación de grasa en las células del hígado) macro y microvesicular, etc. Aplicando los valores numéricos de la siguiente tabla (No. 2):

Características histológicas de daño hepático	Valor numérico
Sin fibrosis, es decir arquitectura normal del lobulillo clásico.	0
Expansión de fibrosis de algunas áreas portales, con o sin septos pequeños fibrosos.	1
Expansión de fibrosis en muchas áreas portales, con o sin septos pequeños fibrosos.	2
Expansión de fibrosis (colágena tipo I) en muchas áreas portales, presencia de ocasionales puentes de vena porta a vena porta. Presencia de esteatosis moderada.	3
Expansión de fibrosis en muchas áreas portales, presencia de repetidos puentes de vena porta a vena porta. Presencia de esteatosis media, presencia de colágena tipo I y tipo III de forma moderada.	4
Marcados puentes con ocasionales nódulos, presencia de colágena tipo I y tipo III de forma media. Abundante esteatosis.	5
Fibrosis definida con presencia de colágena tipo I y tipo III de forma abundante, se observa disminución de esteatosis.	6

Tabla 3. Adaptación del Índice de Actividad Histológica Knodell

Hecha esta adaptación para nuestro análisis histopatológico, se elaboró la tabla que presentamos a continuación (Tabla No. 4).

Fibrosis			Control/ clg-pvp		Fibróticas/ citrato		Fibróticas/ clg-pvp	
	Control/ Aceite mineral	CCl ₄	1 ^a semana	2 ^a semana	1 ^a semana	2 ^a semana	1 ^a Semana	2 ^a semana
Evaluación hematoxilina/ eosina (H-E)								
Necrosis Zona 3	0	Puentes delgados completos	Puentes gruesos y fibrosis central tipo III	0	0 Edema portal	1	Puentes de colapso	0
Necrosis periportal y en puente	0	5 infiltrado 2% Fibrosis en puente colágena tipo III	No valorable	0	3	2	0	0
Degenera- ción y necrosis lobular	1	1	No valorable	0	1	2	2	0
Evaluación Herovici								
Inflama- ción portal	0	0	0	0	1	1	0	0
Fibrosis portal	0	0	0	0	0	0	0	0
Colágena tipo I	Menos	Menos	Menos	Menos	Más	Más	Menos	0
Colágena tipo III	Más	Más	Más	Más central y focal	Más (mínima)	Más central y portal	Más	0
Suma (X)	1	6	0	0	5	6	2	0
Observa- ciones	Autolisis	Esteato- sis macro y microve- sicular 5% autolisis	s/obser- vaciones	autolisis	Autolisis poco variable	Autolisis	Esteato- sis microve- sicular 3%	Normal

Tabla 4. “SCORE” HISTOPATOLÓGICO SEGUN KNODELL

*Los datos mostrados en la tabla son el resultado del promedio del valor numérico del análisis histopatológico hecho a las preparaciones histológicas (aproximadamente 8 por cada rata, con dos cortes c/u) correspondientes a cada una de las tres técnicas de tinción histológica de cada tratamiento, por cada una de las 24 ratas utilizadas en el presente trabajo de investigación.

VI.3. SERIES DE IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS PREPARACIONES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO POR GRUPOS

VI.3.1. PREPARACIONES CONTROLES NORMALES

En las imágenes correspondientes al lote control al que se le inyectó aceite mineral, tomadas de las preparaciones teñidas con (H/E) vemos la arquitectura normal del hígado, es decir, podemos observar el parénquima hepático con hepatocitos, dispuestos en láminas que se organizan formando los lobulillos clásicos, con mayor amplificación vemos la vena central y los hepatocitos bien alineados alrededor de ésta formando el lobulillo hepático clásico (Figuras 1a y 1b).

Mientras que con la tinción de Herovici también se observa la vena central con colágena tipo I, rodeada de hepatocitos a los que se les distingue muy bien el núcleo teñido de azul oscuro (Figura 1c).

Con la tinción Tricrómica de Masson, se pueden apreciar diferentes lobulillos hepáticos, en donde cada vena central está rodeada de colágena, los hepatocitos con la característica arquitectura radial, lo que permite distinguir cada lobulillo clásico (Figura 1d).

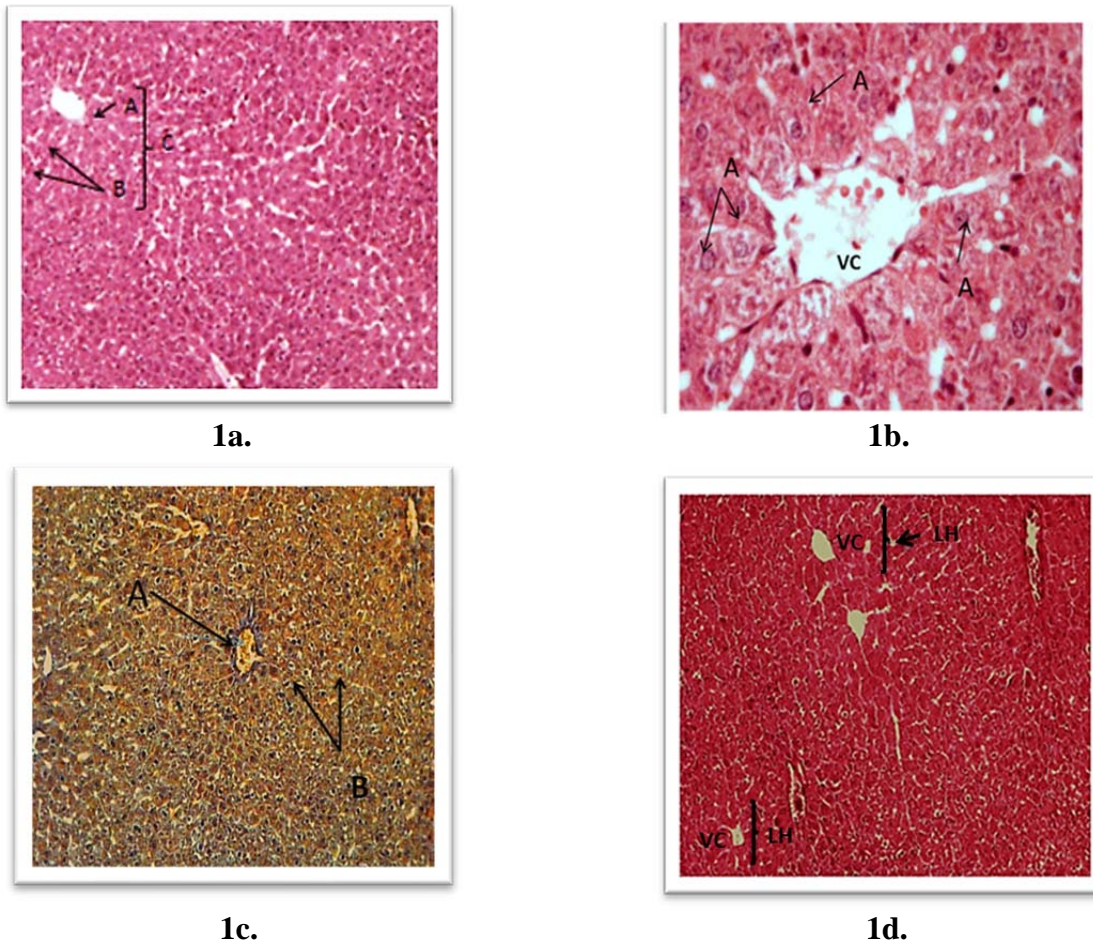


Figura 1. Cortes representativos del grupo control. Figura 1a. (normal sin fibrosis). H/E 100x. (A) Vena central (B) hepatocitos, formando el lobulillo hepático clásico (C) lobulillo hepático clásico. Figura 2a. H/E 400x. (A) Hepatocitos. (VC) vena central.

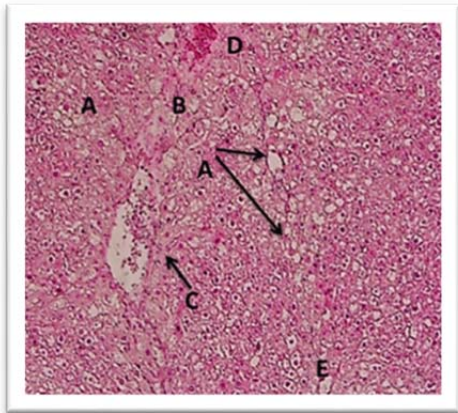
Figura 1c. Herovici 100x. (A) colágena tipo I en azul, (B) hepatocitos. Figura 1d. Tricrómica de Masson 50x. (VC) vena central. (LH) lobulillo hepático.

VI.3.2. PREPARACIONES EXPERIMENTALES CON FIBROSIS

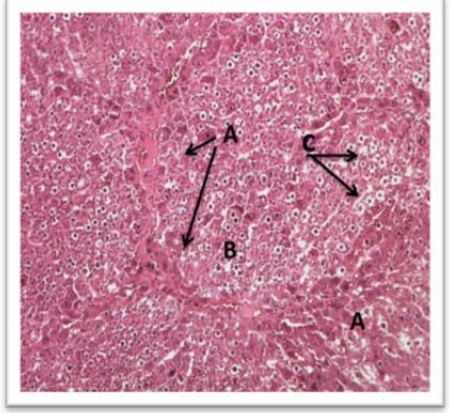
En los tejidos fibróticos correspondientes a la tinción Hematoxilina/Eosina vemos claramente una distorsión arquitectónica del hígado, ha perdido la arquitectura normal de los lobulillos hepáticos debido a la presencia de esteatosis macrovesicular, que se caracteriza por grandes gotas de grasa que han desplazado el núcleo del hepatocito, como se muestra en la figura 2a, varios hepatocitos presentan pérdida de la membrana plasmática, presencia de macrófagos (teñidos de color más oscuro) y fibroblastos, espacios sinusoidales indefinidos, acinos indefinidos y deformes, con una alta fibrosis, la que se caracteriza por tejido fibroso de un tono rosa como se observa en la figura 2b, en la que forma septos gruesos que están presentes a lo largo de todo el tejido, seccionando el lobulillo hepático.

En las imágenes correspondientes a la tinción de Herovici se puede apreciar la abundante colágena tipo III en color azul, en la figura 2c se observa alrededor de las venas centrales y en fibras que corren de forma radial formando puentes, por lo que no existe diferenciación de lobulillos, se ha perdido por completo la arquitectura histológica del hígado, incluso se observan claramente hepatocitos sin núcleo. En la figura 2d se pueden observar con más detalle las fibras de colágena que forman los puentes o nódulos de regeneración, los hepatocitos que han perdido las delimitaciones dadas por la membrana celular, y los hepatocitos necrosados.

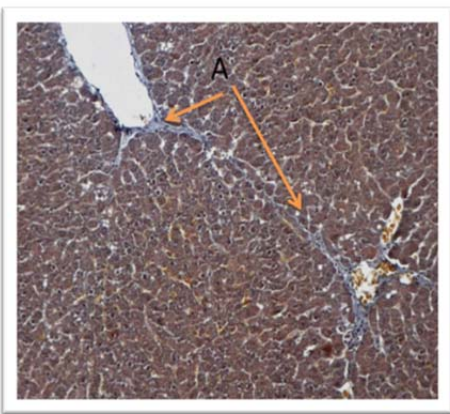
En la tinción Tricrómica de Masson se observan claramente las bandas de fibras (como indican las flechas) formando puentes de fibrosis gruesos y delgados, que corren de una vena central a otra (la figura 2e).



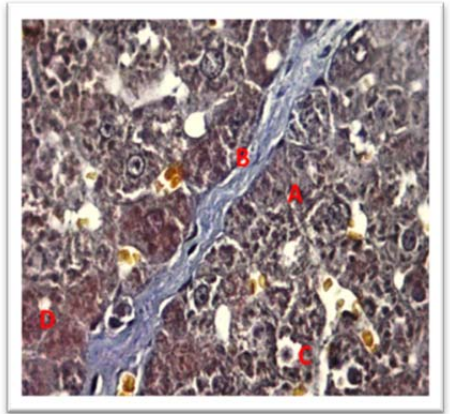
2a.



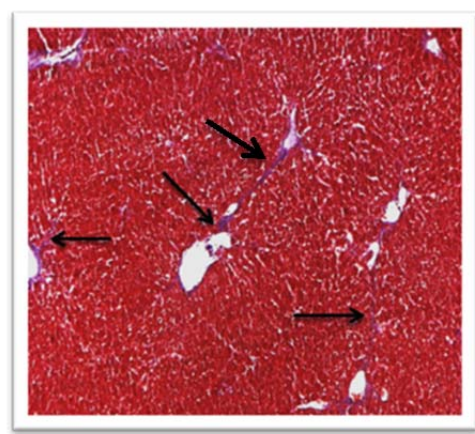
2b.



2c.



2d.



2e.

Figura 2. Cortes representativos del grupo tratado con CCl₄. Figura **2a.** H/E 50x. (A) Esteatosis macrovesicular, (B) fibrosis, (C) la vena central está rodeada de fibras, (D) Infiltrado celular, (E) Hepatocitos con citoplasma vacío y con aumento en el tamaño de la membrana plasmática por la inflamación. Figura **2b.** H/E 50x. (A) Puentes de fibrosis, (B) zona donde los hepatocitos se pierden por la fibrosis, (C) los hepatocitos han perdido las

delimitaciones del citoplasma. Figura **2c**. Herovici 100x. (A) puentes de fibrosis. Figura **2d**. Herovici 400x. (A) Hepatocitos sin núcleo, (B) puente de fibrosis, (C) Hepatocitos con pérdida de las limitaciones del citoplasma y (D) Hepatocitos necrosados. Figura **2e**. Tricrómica de Masson 50x. Las flechas indican las bandas del material fibroso.

VI. 3.3. PREPARACIONES CONTROLES DEL TRATAMIENTO Y TRATAMIENTO CON EL BIOFÁRMACO

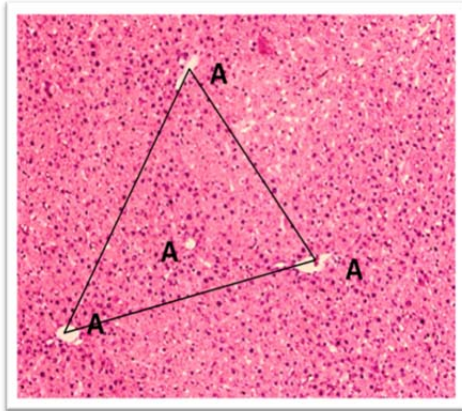
VI.3.3.1. PRIMERA SEMANA

En el grupo de ratas tratadas con aceite mineral y citratos, las imágenes correspondientes a la tinción de Hematoxilina/Eosina muestran que no hay cambios significativos, se aprecian dos diferentes tipos de lobulillos: los lobulillos clásicos que se pueden distinguir claramente partiendo de cada vena central, donde se observan los hepatocitos alrededor de ésta, y un lobulillo portal que va de una vena central a otra, siendo tres venas centrales formando un triángulo, (figura 3a), se observa una triada portal integrada por la vena porta, rama de la arteria hepática y el conducto biliar (figura 3b).

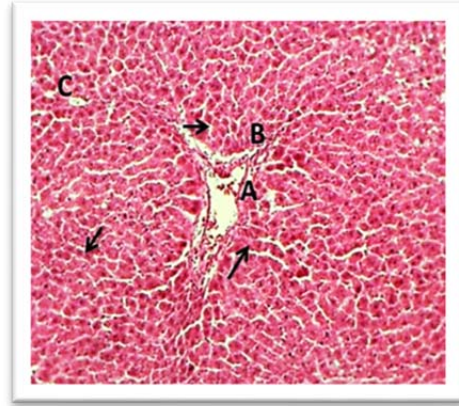
En la tinción Herovici correspondiente al grupo de ratas tratadas con aceite mineral y posteriormente citratos se observa la morfología típica del tejido hepático, claramente se muestra una triada portal integrada por la rama de una vena porta, la rama arterial hepática y el conducto biliar, , todos ellos rodeados de colágena tipo I (figura 3c).

En el grupo de ratas tratadas con aceite mineral y posteriormente citratos al igual que en las tinciones de H/E y Herovici en la tinción correspondiente a tricrómica de Masson también se observa la morfología típica del tejido hepático, se puede apreciar la triada portal con la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar teñidos de violeta, la vena central y todos ellos rodeados de colágena teñida de azul, debido a la amplificación de la imagen se aprecian pocos hepatocitos (figura 3d).

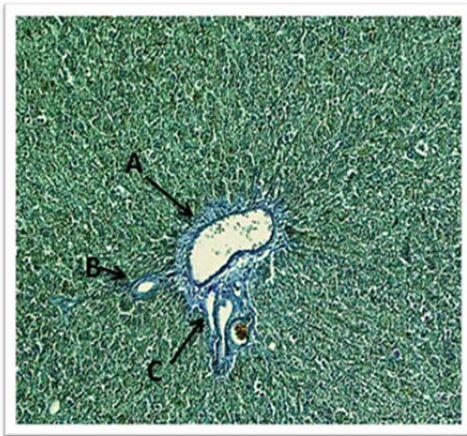
En el grupo de ratas tratadas con aceite mineral y con la mezcla de clg-PVP, con la tinción Hematoxilina/Eosina, vemos varios lobulillos hepáticos clásicos que se distinguen por las venas centrales que presentan hepatocitos alrededor formando láminas (figura 4a). En un acercamiento, se puede apreciar la formación de los hepatocitos alrededor de la vena central (figura 4b). Con la tinción Herovici se observa un corte transversal de una vena central, rodeada de colágena tipo I y los hepatocitos alrededor (figura 4c), se observa también en un acercamiento de una vena central, la colágena tipo I y alrededor los hepatocitos (figura 4d). Mientras que en la tinción tricrómica de Masson se observa la típica vena central que presenta en el contorno colágena tipo I y alrededor los hepatocitos de forma radial, a su vez formando el lobulillo hepático característico del tejido hepático normal (figura 4e).



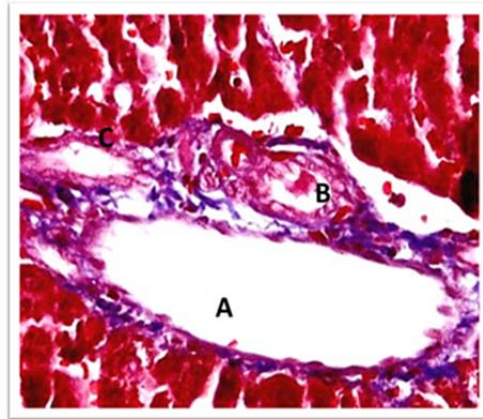
3a.



3b.

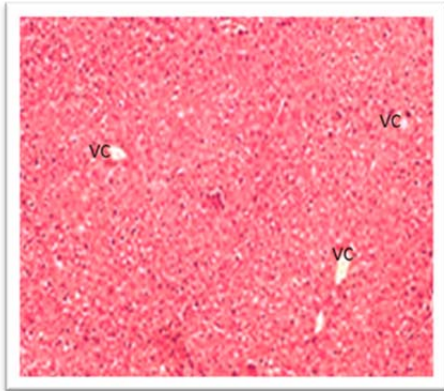


3c.

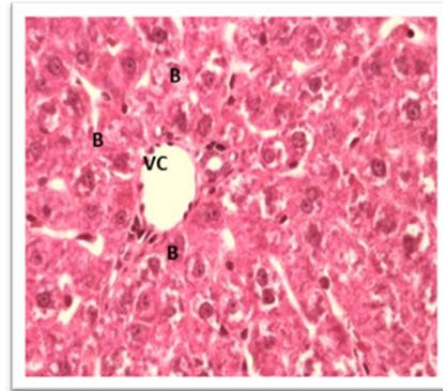


3d.

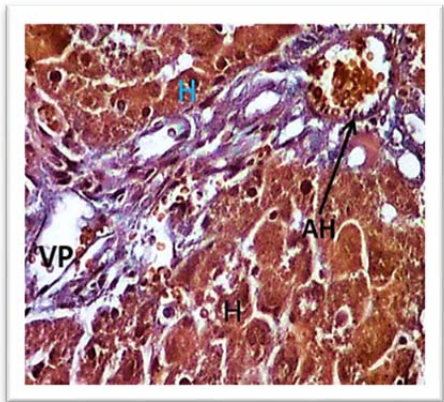
Figura 3. Cortes representativos de tejido hepático de ratas tratadas con aceite mineral y posteriormente citratos, figura **3a.** H/E 50x. (A) Vena central de cada lobulillo hepático clásico. El triángulo forma un lobulillo portal. Figura **3b.** H/E 100x. (A) Vena porta, (B) conducto Biliar, (C) rama de la arteria hepática. Las flechas señalan los hepatocitos. Figura **3c.** Herovici 400x. (A) Vena porta, (B) Conducto biliar (C) rama arteria hepática. Figura **3d.** Tricrómica de Masson 400x. (A) Vena porta, (B) Conducto biliar, (C) rama del conducto biliar.



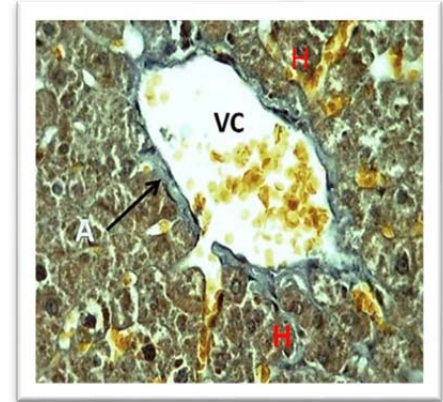
4a.



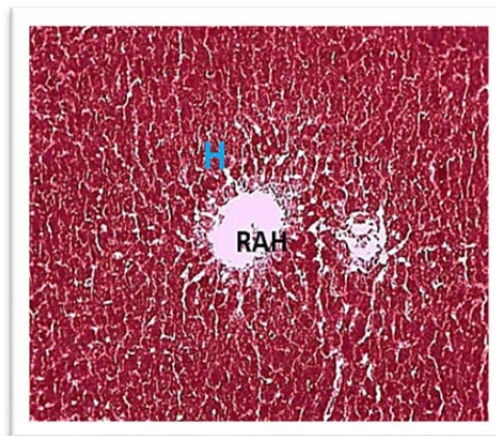
4b.



4c.



4d.

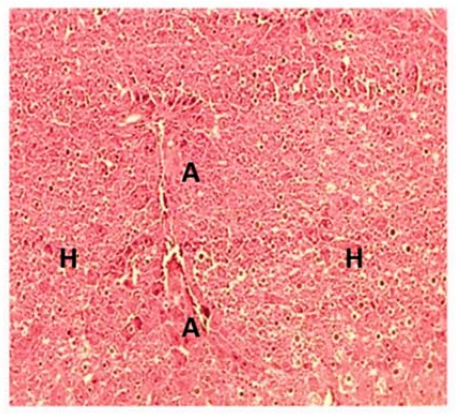


4e.

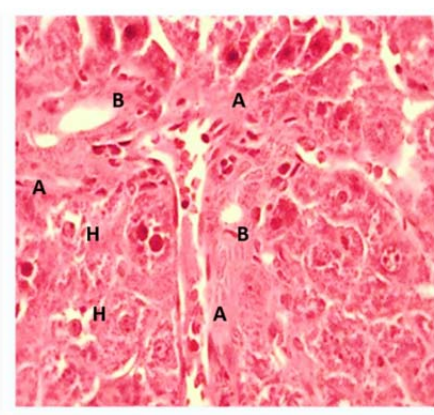
Figura 4. Cortes representativos del tejido hepático de ratas control con aceite mineral y posteriormente aplicación de clg-PVP. Figura **4a.** Estructura lobulillar normal, se observan las venas centrales (VC). H/E 100x. 4b. En una ampliación se observan (VC) Vena central, (B) Hepatocitos. H/E 400x. Figura **4c.** Se observan (VP) Vena porta. (H) Hepatocitos. (AH) Arteria hepática. Figura **4d.** Se observan (A) Fibras de colágena. (VC) Vena Central. (H) Hepatocitos. Herovici 400x. Figura **4e.** (H) Hepatocitos. (RAH) Rama de una Arteria Hepática. Tricrómica de Masson 100x.

En el grupo de ratas fibróticas tratadas con la solución de citratos, con la tinción Hematoxilina/Eosina podemos observar que debido a lo que parece ser fibrosis no se observa ninguna vena central, también observamos que existe esteatosis incipiente muy cerca de los puentes gruesos de colágena y hepatocitos que han perdido las delimitaciones del citoplasma (figura 5a). En un acercamiento se ve claramente lo que podría ser fibrosis teñida de rosa pálido, se aprecia mejor la esteatosis, así como el desarreglo de los hepatocitos, también observamos en los hepatocitos como se va llenando el citoplasma por vesículas de grasa dando paso a la esteatosis (figura 5b). Con la tinción Herovici se observa un puente de colágena de una vena central a otra, pérdida de las delimitaciones de la membrana celular de los hepatocitos y leve presencia de esteatosis macrovesicular (figura 5c). En un acercamiento vemos que esta técnica resalta abundante presencia de colágena tipo I alrededor de vena central, un puente de fibras de colágena que parten de la vena central, alrededor de este se puede ver la pérdida de hepatocitos a su alrededor, los hepatocitos que están presentes se encuentran alejados de la vena central y han perdido las delimitaciones de la membrana celular, así como la presencia de esteatosis macrovesicular (figura 5d). En la tinción de Tricómica de Masson se pueden apreciar las fibras de colágena de forma abundante, mismas que son muy delgadas entre los hepatocitos, también se ve ensanchamiento de los espacios sinusoidales (figura 5e).

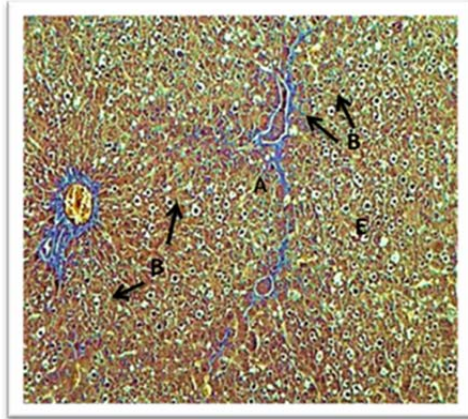
En el grupo de ratas fibróticas al que se le administró la mezcla de clg-PVP, en esta primera semana de tratamiento, con la tinción de Hematoxilina/Eosina se observan las venas centrales formando varios lobulillos clásicos (figura 6a), así como varias venas centrales en las que se observa la típica arquitectura radial del lobulillo clásico, en la que la disposición de los hepatocitos está empezando a tomar la posición radial (figura 6b). Con la tinción Herovici se observan un lobulillo clásico con la característica vena porta rodeada de colágena tipo I, parte de una triada portal con la vena porta y el conducto biliar, (figura 6c). Con la tinción de Tricómica de Masson se observa un lobulillo clásico en el que la vena central presenta abundante colágena tipo I en la periferia (figura 6d).



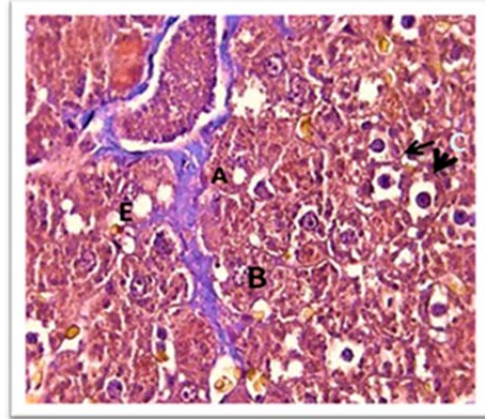
5a.



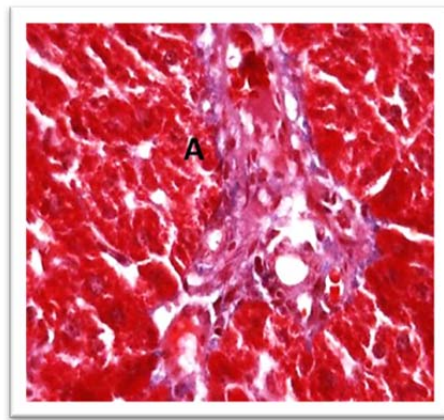
5b.



5c.



5d.



5e.

Figura 5. Cortes representativos del tejido hepático de ratas fibróticas tratadas con la solución de citratos. Figura 5a. (A) Lo que parecen ser puentes gruesos de colágena. (H) hepatocitos que han perdido las delimitaciones del citoplasma. H/E 100x. Figura 5b. (A) Lo que parecen ser fibras de colágena. (B) Leve presencia de esteatosis macro y microvesicular. (C) hepatocitos que perdieron las delimitaciones del citoplasma. H/E 400x. Figura 5c. (A) Puente de colágena. (B) pérdida de las delimitaciones de la membrana celular de los hepatocitos. (E) Esteatosis. Herovici 100x. Figura 5d. (A) Puente de colágena. (B) Pérdida de los hepatocitos. (C) Flechas indican hepatocitos que han perdido el contenido del citoplasma. (E) Esteatosis. Herovici 400x. Figura 5e. (A) Fibras de colágena. Tricrómica de Masson 400x.

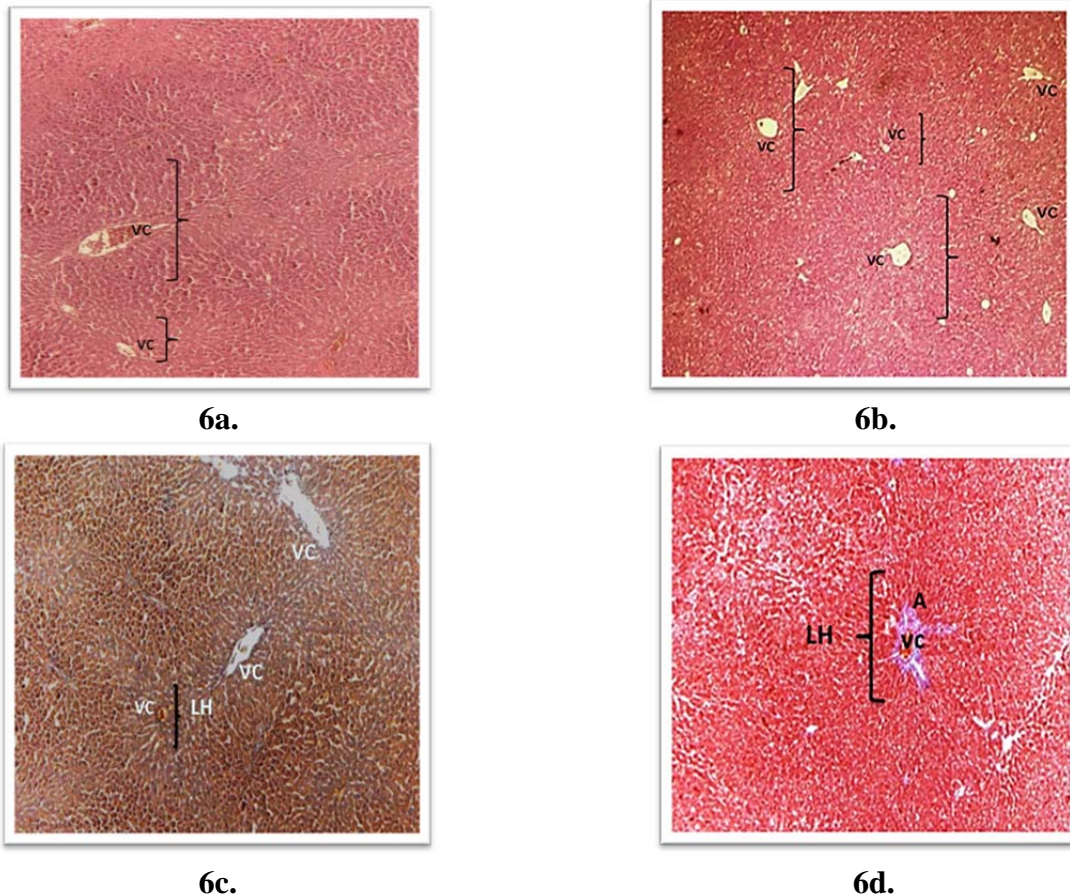
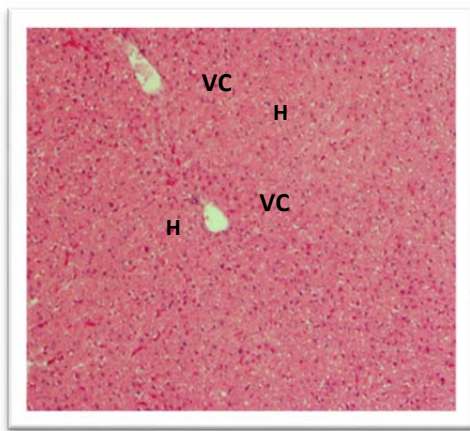


Figura 6. Cortes representativos del tejido hepático de ratas fibróticas con aplicación de Clg-PVP. Figura 6a. (VC) Vena central de cada lobulillo hepático. H/E 100x. Figura 6b. (VC) Vena central de cada lobulillo hepático. H/E 50x. Figura 6c. (VC) Vena Central, (LH) Lobulillo Hepático. Herovici 50x. Figura 6d. (A) Colágena. (VC) Vena central. (LH) lobulillo hepático. Tricrómica de Masson 50x

VI.3.3.2. SEGUNDA SEMANA

En la segunda semana de tratamiento en el grupo de ratas tratadas con aceite mineral y citratos, se observa: con la tinción Hematoxilina/Eosina parte un lobulillo clásico con la vena central y los hepatocitos a su alrededor (figura 7a), con la tinción Herovici parte de la triada portal con la vena porta y el conducto biliar (figura 7b) y con la tinción Tricrómica de Masson en una amplificación una triada portal con la vena porta, el conducto biliar y a un lado de éste la arteria hepática, la colágena tipo I rodeando estas estructuras, así como los hepatocitos alrededor dispuestos en forma radial (figura 7c).

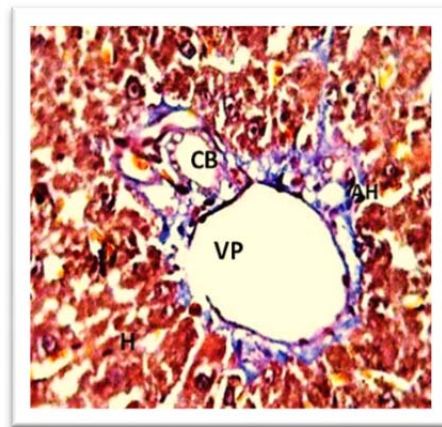
En el grupo de ratas tratadas con aceite mineral y con la mezcla de clg-PVP en la tinción Hematoxilina/Eosina (figura 8a) se observan el tejido hepático, la vena central (VC) con los hepatocitos alrededor, en la parte inferior la vena porta y el conducto biliar. En la tinción Herovici (Figura 8b) se observan varias vena porta rodeadas de hepatocitos, formando lobulillos clásicos. En la tinción Tricrómica de Masson, (figura 8c) en una ampliificación de una triada portal que consta de la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) con el conducto biliar (CB) todos ellos rodeados de colágena.



7a

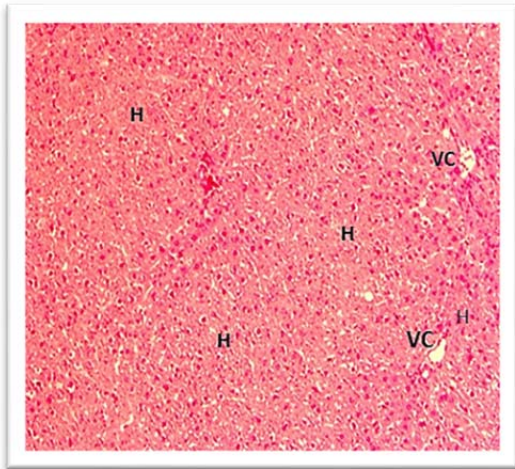


7b



7c

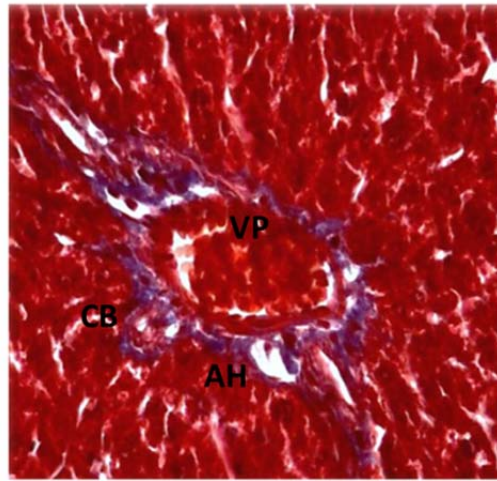
Figura 7. Cortes representativos del tejido hepático de ratas tratadas con aceite mineral y posteriormente con citratos. Figura 7a. (A) Vena central (H) hepatocitos. H/E 100x. Figura 7b. (VC) Vena central (VP) Vena porta y (CB) Conducto biliar. Herovici 100x. Figura 7c. (VP) Vena porta, (CB) Conducto biliar. (AH) Arteria hepática. (H) Hepatocitos alrededor. Tricrómica de Massón 400x..



8a.



8b.



8c.

Figura 8. Cortes representativos del tejido hepático de ratas control con aceite mineral y posteriormente aplicación de clg-PVP. Figura **8a.** (VC) Vena central. (H) Hepatocitos. H/E 100x. Figura **8b.** (VC) Vena central. (H) hepatocitos. Herovici 100x. Figura **8c.** (VP) Vena porta. (AH) arteria hepática. (CB) Conducto biliar. Tricrómica deMasson 400x.

En el grupo de ratas fibróticas tratadas con la solución de citratos la tinción Hematoxilina/Eosina se observa que alrededor de la vena central se perdió la disposición radial de los hepatocitos, cerca de la vena central existe infiltrado celular, alrededor de la vena central se observa esteatosis que se presenta en todo el tejido (figura 9a.), en una ampliación se puede observar infiltrado celular muy cerca de la vena central, misma que ha perdido su forma convencional, también se observa esteatosis microvesicular (figura 9b.) En la tinción

Herovici en una amplificación se observa un puente grueso de fibras de colágena tipo I, así como la pérdida de hepatocitos alrededor del mismo, y en algunos el citoplasma se lleno de grasa (figura 9c). En la tinción Tricrómica de Masson se observan las fibras de colágena muy abundantes que corren desde la vena central y siguen entre los hepatocitos haciéndose más delgadas y los espacios intercelulares mas amplios (figura 9d.).

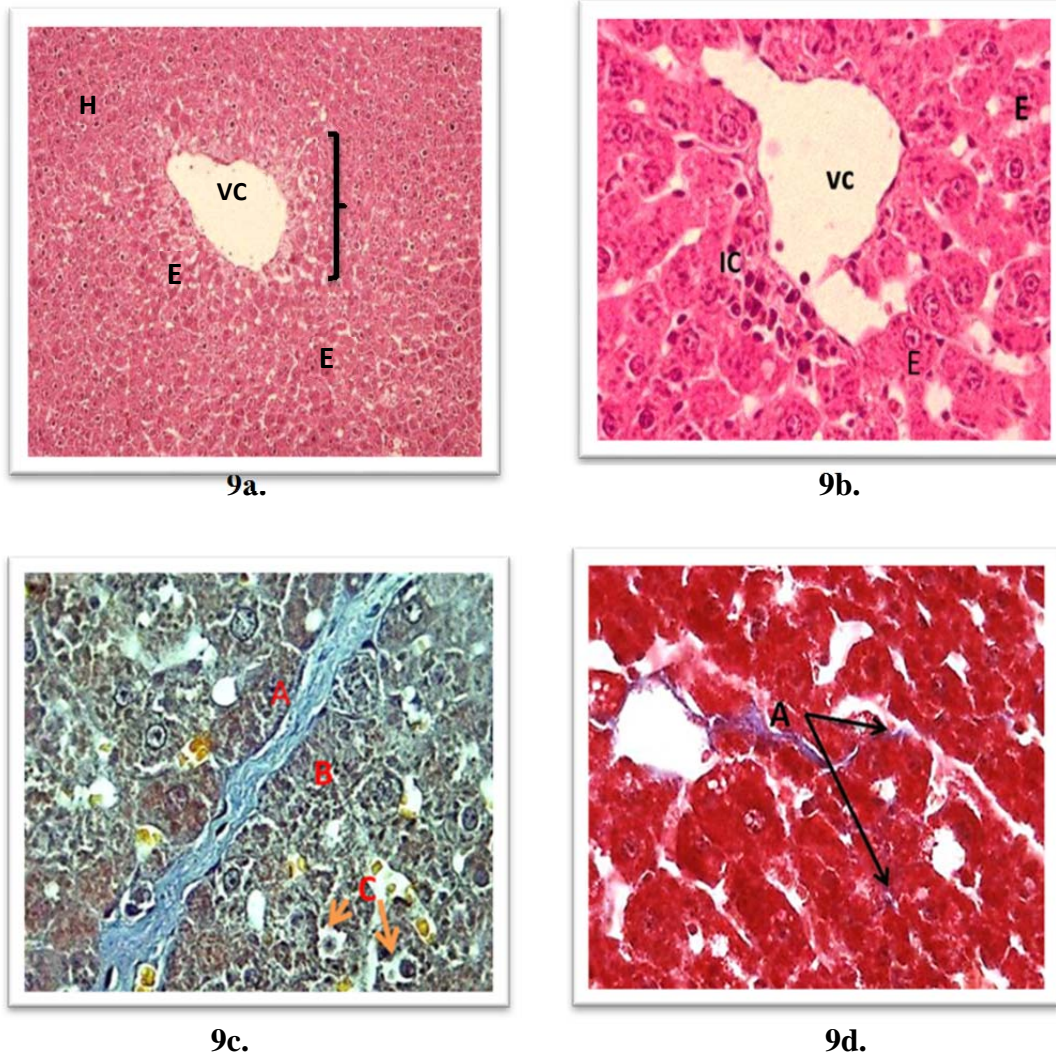
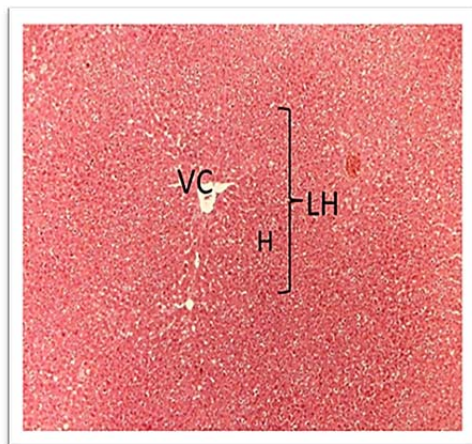


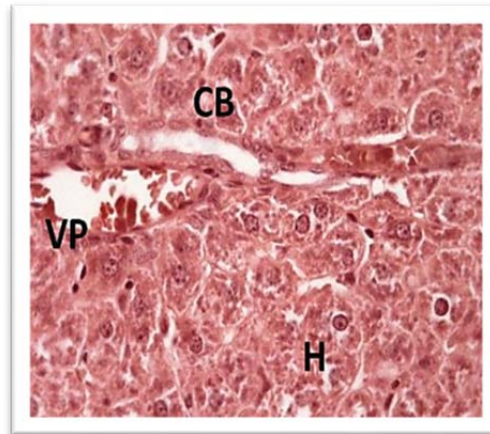
Figura 9. Cortes representativos del tejido hepático del grupo de ratas fibróticas con aplicación de citratos. Figura **9a.** (VC) Vena Central. (H) Hepatocitos. (E) Esteatosis. H/E 100x. Figura **9b.** (VC) Vena central. (IC) Infiltrado celular y (E) Esteatosis H/E 400x. **9c.** (A) Fibras de colágena. (B) Hepatocitos sin núcleo. (C) Hepatocitos con el citoplasma lleno de grasa. Herovici 400x. Figura **9d.** (A) Fibras de Colágena. Tricrómica de Masso 400x.

En el grupo de ratas fibróticas al que se administró la mezcla de clg-PVP, con la tinción Hematoxilina/ Eosina vemos la arquitectura normal del lobulillo hepático clásico, la vena central y los hepatocitos alrededor de ésta formando los lobulillos hepáticos, (figura 10a.) y

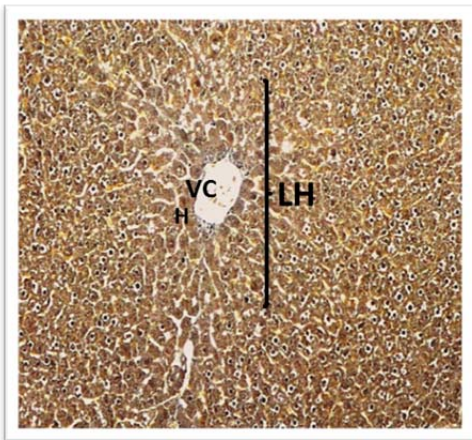
en una ampliación se observa la vena central rodeada de hepatocitos que están dispuestos con la arquitectura normal del lobulillo clásico (figura 10b). En la tinción Herovici se observa una vena central con los hepatocitos alrededor de esta, se observa la arquitectura del lobulillo hepático clásico, los hepatocitos alejados de la vena central están recuperando el citoplasma (figura 10c). En la tinción Tricrómica de Masson se observan dos lobulillos hepáticos clásicos, caracterizados por una vena central que presenta material fibroso y los hepatocitos alrededor de cada vena central en una disposición arquitectónica radial (figura 10d).



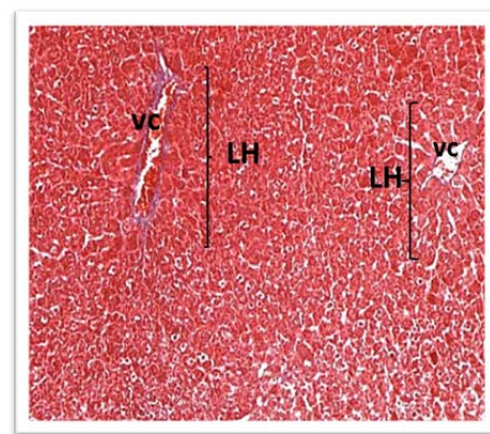
10a.



10b



10c.



10d.

Figura 10. Cortes representativos del tejido hepático de rata fibrótica con aplicación de Clg-PVP. Figura **10a.** (VC) Vena Central. (LH) Lobulillo hepático. (H) Hepatocitos. H/E 50x. Figura **10b.** (VP) vena porta. (CB) Conducto biliar. (H) Hepatocitos. H/E 400x. Figura **10c.** (VC) Vena central. (H) Hepatocitos. (LH) lobulillo hepático. Herovici 100x. Figura **10d.** (VC) Vena central. (LH) lobulillo hepático clásico. Masson 100x.

VII. DISCUSIÓN

La cuantificación de las enzimas alanintransaminasa (ALT), la aspartiltransaminasa (AST) y de la lactato deshidrogenasa (LDH) representa un método indirecto en el diagnóstico y valoración funcional del hígado que permite distinguir, junto con la cuantificación de las bilirrubinas (directa, indirecta, total), las diferentes clases de hepatopatías [63].

Ya que la actividad de estas enzimas forma parte del estudio clínico en humanos, debido a que cuando existe un daño a nivel de este órgano, son liberadas de los hepatocitos a la circulación sistémica donde pueden cuantificarse con métodos colorimétricos y enzimáticos, esta cuantificación es utilizada para el diagnóstico del funcionamiento hepático [64, 65]. En nuestros estudios, al obtenerse el modelo animal de fibrosis hepática, aplicando el CCl_4 como hepatotóxico, se utilizaron como indicadores de toxicidad hepática las actividades enzimáticas de las ALT, AST y LDH. Como ya mencionamos este tipo de pruebas son aplicadas para el diagnóstico clínico humano, por lo que se tienen valores estándares y se realizan con “kits” específicos para su determinación en equipos automatizados; por lo tanto, para considerar las determinaciones de los sueros de rata de la cepa Wistar, procedimos a proporcionarles a los técnicos especialistas del laboratorio de pruebas bioquímicas, el suero de 5 ratas normales sin ningún tratamiento, con el fin de que sirvieran como sueros de referencia para estandarizar los parámetros cuantitativos de los equipos automatizados utilizados. En este contexto, los resultados de las actividades enzimáticas de ALT y AST, como se observa en la gráfica 1 que representa los niveles del grupo de ratas control con aceite mineral y las ratas con fibrosis hepática no mostraron niveles que significaran daño hepático [66], al compararse con los valores normales obtenidos de ratas control (sin CCl_4), quizá porque como lo mencionan algunos autores que consideran que la AST es más un marcador para el diagnóstico de daño a nivel cardiaco, ya que esta enzima se encuentra en altas cantidades en células del miocardio, aunque también se encuentran en menores cantidades en otros tejidos como el hígado y los músculos; por lo tanto, es una enzima muy sensible pero muy poco específica a la hora de determinar funciones hepáticas, su sensibilidad es alta debido a que es una enzima que se localiza en el citosol y las mitocondrias de las células por lo que una elevación puede indicar una lisis completa del hepatocito [67]. Sin embargo, no es un marcador hepático muy específico, ya que se encuentra en considerables cantidades en el músculo estriado y cardiaco. Además, los resultados pudieron no ser significativos, debido tal vez a que el tiempo que transcurrió desde el momento en que se tomaron las muestras y el que se mantuvieron congeladas antes de su determinación, perturbó su actividad, como ya lo han observado en muchos laboratorios de pruebas clínicas [66].

Respecto a la actividad de la enzima LDH el aumento fue significativo tanto en el grupo de ratas a las que se les indujo la fibrosis con CCl_4 (gráfica 1), como en el grupo de ratas a las que se les aplicó el tratamiento control (amortiguador de citratos) en la primera semana (gráfica No. 2) y segunda semana (la gráfica No. 3), lo que nos indicó que el daño generado a nivel celular fue considerable, ya que esta enzima eleva sus valores al presentarse una enfermedad hepática, como la hepatitis aguda. Cabe mencionar que la enzima LDH así como la ALT y la AST, también se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, especialmente el corazón, el hígado, el riñón, el músculo esquelético, el cerebro, las células sanguíneas y

los pulmones; sin embargo, a diferencia de las enzimas ALT y AST, la LDH es una enzima tetramérica, que consta de cinco isoenzimas, las proporciones relativas de dichas isoenzimas varían con el tejido en el cual se encuentren, siendo la isoenzima LDH-5 del hígado y el músculo estriado y esquelético, la que eleva sus niveles de concentración cuando se presentan condiciones patológicas cardíacas y hepáticas, elevándose considerablemente en los procesos malignos que afectan al hígado [68,69], por lo que es probable que en nuestros resultados los niveles séricos elevados que se obtuvieron se deban a esto, y esta elevación ratifica la presencia de daño a nivel hepático.

Como ya hemos mencionado, el progreso de la fibrosis lleva poco a poco a la cirrosis, no se conoce hasta qué punto la cirrosis es reversible, pero la fibrosis si es considerado un proceso reversible [70], por lo que en el presente trabajo los resultados correspondientes al análisis serológico e histopatológico demostraron que se estableció la fibrosis hepática en el mayor nivel de puntaje que es de 6, como se asentó en la tabla No. 2, que se basó en el “Índice de Actividad Histológica de Knodell”.

En las preparaciones histológicas analizadas correspondientes al grupo de ratas fibróticas al que se le administró el biofármaco, en la primera semana de tratamiento, notamos que la presencia de fibrosis fue muy leve, es decir la fibrosis disminuyó casi por completo, acercándose a la histología del tejido hepático normal. Y en la segunda semana en las preparaciones histológicas correspondientes a ésta se observaron los lobulillos hepáticos clásicos, los hepatocitos alrededor de cada vena central en una disposición arquitectónica radial, y siguiendo el score de Knodell el nivel de fibrosis fue de 0, no existe ninguna característica histológica de daño hepático, por lo que la histología del tejido hepático es similar a la normal.

En este trabajo al evaluar histopatológica y serológicamente el efecto del biofármaco colágena-PVP como agente terapéutico en la resolución de la fibrosis hepática inducida por CCl₄, observamos que éste tuvo un efecto favorable, de esta manera, al comparar sus efectos y beneficios terapéuticos con otros tratamientos actuales contra la fibrosis hepática, como en el caso de la fibrosis causada por VHC, y para la cual a la fecha ya se utilizado una alternativa farmacológica, administrándose interferón- α , ya que tiene un efecto antiviral [71]; sin embargo, éste es efectivo para evitar el progreso de la fibrosis cuando se emplea en una etapa temprana del proceso fibrosante. Por otro lado, conteniendo con la supresión de la inflamación hepática, la estrategia alternativa para disminuir la inflamación es intentando la neutralización de las citocinas proinflamatorias, por ejemplo de IL-1, IL-10 o TNF- α ; así como la utilización de sustancias que inhiban la respuesta inflamatoria en el hígado, para intentar limitar la fibrogénesis, entre estas sustancias se encuentran los corticoesteroides, la colchicina y el malotilato, las cuales han sido empleadas en humanos, pero su uso frecuente conlleva a efectos adversos [72]. En la modulación de la actividad de citocinas específicas también puede inhibirse la fibrosis hepática, tal es el caso de la inhibición de la acción del TGF- β , el cual es el principal factor de crecimiento inductor de la fibrosis. Las estrategias enfocadas en bloquear o disminuir la expresión del TGF- β han resultado en la disminución de la fibrosis hepática en modelos experimentales. La desventaja que presenta este tipo de terapias es que la inhibición del TGF- β no debe ser prolongada, ya que esta citocina también participa en el control del ciclo celular, entre muchas otras actividades fisiológicas normales, así que su atenuación podría llevar al desarrollo de

algunos cánceres, por ejemplo [72]. También se han estudiado diferentes compuestos herbales en la resolución de la fibrosis, al ser administrados en cultivos de HSC, como es el caso del *sho-saiko-to* y el glicirricina, que han mostrado resultados benéficos, ya que la proliferación y el depósito de colágena tipo I disminuyen [73]. La mayoría de estas estrategias terapéuticas sólo han sido probadas en modelos experimentales, demostrando que favorecen la disminución de la fibrosis, pero también presentan efectos negativos al aplicarlas, incluso contraproducentes como el cáncer, por lo que su uso en humanos no ha sido probada. De esta manera, en relación al biofármaco colágena-PVP, éste no presentó efectos negativos en el tejido hepático, tanto en los grupos control como en los grupos fibróticos tratados, por lo que parece ser probablemente la alternativa más viable como agente terapéutico en la resolución de la fibrosis hepática, no sólo por ser un compuesto prácticamente inocuo lo cual ha sido demostrado por ensayos de bioseguridad [57] sino porque también con respecto a su farmacodinamia los datos generados de los estudios *in-vitro* sugieren que fibroquel actúa a nivel de fibroblastos y macrófagos modulando el metabolismo de la colágena, de tal forma que dicha regulación participa en los procesos reparativos con una mejor calidad y tiempo de la respuesta en la cicatrización. Por su parte, los estudios *in vivo* han mostrado que Fibroquel® modula el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral α , (TNF- α), la interleucina 1 β (IL-1 β), así como moléculas de adhesión celular que favorecen la diapédesis leucocitaria, como son la molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio (ELAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), hasta alcanzar niveles semejantes a los normales, lo que favorece el recambio de los componentes del tejido conjuntivo, con la consecuente eliminación del exceso de proteínas fibrosas [74]. Estos estudios de bioseguridad y farmacovigilancia de la clg-PVP incluyen análisis clínicos y pruebas de laboratorio en voluntarios sanos y pacientes de cicatrices hipertróficas o escleroderma, muestran que citología hemática, el examen general de orina y el perfil hepático han permanecido sin alteraciones. Tampoco se ha observado la inducción de anticuerpos anti ADN de doble cadena o antirribonucleoproteína por el uso de la colágena-PVP aun por periodos mayores a 12 meses. También, se ha demostrado que el biofármaco no produce fibroproliferación, ni linfoproliferación y no tiene efectos genotóxicos o mielotóxicos [75]. Y con base en la inocuidad y farmacodinamia del biofármaco, mismas que son ya conocidas y están establecidas de manera segura y efectiva, se planteó y llevó a cabo el proyecto de investigación financiado por un Fondo Sectorial del CONACYT, llamado “Estudio histopatológico y bioquímico de los efectos antifibróticos del compuesto colágena-polivinilpirrolidona sobre la fibrosis hepática, valorado en un modelo *in vivo* (ratas) e *in vitro* (hepatocitos primarios de rata)”, con el propósito de probar los efectos terapéuticos del biocompuesto por primera vez en este tipo de fibrosis, donde una parte del grupo de trabajo realizó la cuantificación de proteína total y del contenido total de colágena, en particular de todos los hígados de cada lote estudiado; , además se determinaron los niveles de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa en los homogenados correspondientes de cada hígado, así como de los productos finales de lipoperoxidación, como marcadores del estado oxidativo en los órganos de las ratas controles, fibróticas y tratadas con el compuesto, teniendo como resultado la disminución y normalización de estos parámetros estudiados, lo cual estaría representando un probable balance de su estado oxidativo, favoreciendo la recuperación del órgano, disminuyendo el exceso de colágena depositada para alcanzarse la homeostasis fisiológica del órgano, lo más cercano posible a

lo normal, y en el que la parte correspondiente a la evaluación histopatológica y serológica se realizó en el presente trabajo de tesis. Cabe mencionar que finalmente conjuntando los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis con los resultados bioquímicos, ya está en proceso la elaboración de un artículo.

VIII. CONCLUSIÓN

La recuperación de las actividades enzimáticas normales sólo es posible cuando el daño hepático no es muy severo ya que, como un mecanismo de defensa el hígado responde activando la regeneración celular y la reparación tisular [70], por lo que la aplicación del CCl₄ como agente hepatotóxico indujo con éxito la fibrosis hepática aguda, la que quedó demostrada en el análisis serológico cuando la actividad enzimática de la LDH aumentó significativamente, aunque se esperaba un aumento en la actividad enzimática de la AST y de la ALT, la actividad de la LDH fue bastante contundente para demostrar el daño hepático al elevar significativamente sus niveles y al descender esos niveles con la aplicación de Biofármaco. En el análisis histopatológico, al aplicar el sistema de evaluación del “escore” de Knodell, se estableció la fibrosis en el nivel 6, considerado como el nivel más alto, es decir el grado fibrótico fue tal que se perdió la arquitectura normal del lobulillo clásico hepático, lo que quedó demostrado en todas las preparaciones de tejido con fibrosis hepática en las tres diferentes tinciones: H/E, Herovici y Tricrómica de Masson, y que al aplicar el Biofármaco como agente terapéutico, se observó como el tejido fue recuperándose hasta llegar a la histología hepática normal, lo que nos permitió evaluar durante la realización de este proyecto el efecto antifibrótico del biofármaco conocido como Fibroquel^{MR}.

Con todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, evaluados mediante parámetros serológicos e histopatológicos, podemos concluir que el compuesto de colágena-polivinilpirrolidona (CLG-PVP) aplicado en el modelo murino de fibrosis hepática, tiene efectos que disminuyen la fibrosis hepática, mejorando la arquitectura del tejido, hasta mostrar la histología del tejido hepático normal.

IX. PERSPECTIVAS

Ya que la cirrosis hepática provoca la disfunción del hígado dando como resultado a mediano o largo plazo la muerte y dado que actualmente no existe un tratamiento efectivo para la reversión de esta patología, excepto el trasplante de hígado, el cual es un recurso muy costoso y muy difícil de obtener debido a que la donación de órganos es muy limitada y, por lo tanto no es suficiente para la cantidad de trasplantes requeridos, la mayor parte de los esfuerzos médicos se dirigen a poder detener este proceso en su fase de fibrosis, ya que esta condición es inherente a la patología. Con este propósito fue que se llevó a cabo este trabajo y debido a los resultados positivos y prometedores obtenidos, ya se ha considerado llevar a cabo un estudio piloto en pacientes seleccionados, principalmente derivados de hepatitis B y C que presenten fibrosis hepática bien clasificada (Tipo I y II) para ser sometidos a un esquema de tratamiento con el biofármaco y evaluar su efecto sobre la reversión de la

fibrosis y, de esta manera, poder considerar dicho esquema como un tratamiento terapéutico contra la fibrosis hepática y así poder contrarrestar su evolución a cirrosis.

X. REFERENCIAS

- 1.** Lesson T.S, Lesson R.C, Paparo A. A. (1988). Texto/atlas de histología. Interamericana. México. 741 pp.
- 2.** Gartner L.P, Hiatt J. L. (2003). Histología Texto y Atlas Color. 3ra. Edición. Interamericana. México. 538 pp.
- 3.** Aguirre G. J, Valencia M. P. (1988). Estructura normal del hígado, Rev Gastroenterol México. 53:133-142.
- 4.** Otero R. W, Sierra A. F. (2003). El Hígado en Cirugía.18:1-18.
- 5.** Ross M, Lynn J. R, Gordon J. K. (1992). Histología, texto y Atlas color. Panamericana. 2ª. Edición. México, D.F. 817 pp.
- 6.** Gartner, L.P.; Hiatt, J. L.; (1994). Color atlas of Histology. 2a. Edition. Williams and Wilkins. E.E.U.U. 578 pp..
- 7.** Bloom-Fawcet. (1973). Tratado de Histología Humana. Mc-Graw Hill. México. 978 pp.
- 8.** Guyton A.C. (1992). Tratado de Fisiología Médica. México D.F. Interamericana, 742 pp.
- 9.** Desment VJ, Erias IM, Boyer JI, Chisari FV, Lippincott. (2001) Organizational Principles, En: The Liver, Biology and Pathobiology. 4 th. Edition. Williams & Philadelphia. 315 pp.
- 10.** Junqueira L.C, Carneiro J. (1978). Histología Básica Texto y Atlas. Masson. México. 779 pp.
- 11.** Botello A.M. (1938). México principales causas de mortalidad .INEGI, OMS y SINAIS.
- 12.** Pérez-Tamayo R, Monfort I, González E. (1987).Collagenolytic activitybin experimental cirrosis of the liver. Exp. Mol. Pathol; **47**:300-308.
- 13.** García B.L, González M.F, Moreno-Otero R. (2012). Cirrosis Hepática. Medicine.; 11 (**11**): 625-33.
- 14.** Bribiesca LB. (2003). La cirrosis hepática. ¿Puede ser reversible? Acta Médica Grupo Ángeles. **1**:37–39.

- 15.** Friedman S.L. (2004). Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Gastroenterol Hepatol.* **1**: 98-105.
- 16.** Bataller R, Brenner D.A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol. 115, No. 2, 209-218.
- 17.** Rachfal A. W and Brigstock D. R. (2003). Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatology research.* 261-9.
- 18.** Senties G.M.D, Gálvez G.F.J, Meza G.E, Armendáriz B.J. (2005). Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF-b. *Gac Méd Méx* Vol. 141 No. 4.
- 19.** Friedman SL. (2000). Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, Issue 4, 2247-2250, Jan. 28.
- 20.** Yllyharju J, Kivirikko KI. (2001). Collagens and collagen-relate diseases. *Ann Med* **33**:7-21.
- 21.** Treviño A. M. G, Villarreal A.K.E, Vidaurri Z.A, Muñoz F.L. (2006). Fibrogénesis Hepática. *Investigación y Ciencia*, septiembre-diciembre. Vol. 14, No 036; 35-38.
- 22.** G. Lu, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. (2004). Antioxidant and antiapoptotic idoxifene and estradiol in hepatic fibrosis in rats. *Life Sciences.* 74. 897-907.
- 23.** Pérez-Tamayo R. (1983). Is cirrosis of the liver experimentally produced by CCl₄? *Hepatology.* 112-120.
- 24.** López L. A, González R.E, Olivera RM, Santolaria F.F, Galindo M. L, Abreu G.P, González H.T, Valladares P.F. (2003). Protein deficiency and muscle damage in carbón tetrachloride induced liver cirrosis. *Food and chemical Toxicology.* 41 1789-1797.
- 25.** Pavlov, B. A. (1970). *Curso de Química Orgánica.* Moscú. México. 668 pp.
- 26.** Daub G. W and Seese W. S. (1996). *Química.* Ed. Pearson educación. México. 470 pp.
- 27.** Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo- España. NIOSH última revisión 9 de Noviembre de 1999.
- 28.** Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, División de Toxicología, 1600 Clifton Road NE, Mailstop E-29, Atlanta, GA 30333. Teléfono: 1-888-422-8737, FAX: 404-498-0093. La dirección de la ATSDR vía WWW es <http://www.atsdr.gov/es/> en español.

- 29.** Hamilton G. A, Jolley S.L, Gilbert D, Coon D.J, Barros S, LeCluyse E. L.(2001). Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res* 306: 85-99.
- 30.** De Ruíz, ML, Muskus, A.J. (1967). Mecanismo de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono. *Acta cient Venez.* 18:44.
- 31.** Losser M.R, Payen D. (1996). Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis Nov*; 16(4):357-67.
- 32.** Balcells, G. A. (2001). La clínica y el laboratorio, 18ª Edición. Masson, México. 879 pp.
- 33.** Fiscbach T.F. (1997). Manual de pruebas diagnósticas, 5ª Edición. Interamericana, México. 917 pp.
- 34.** Treseler, M.K. (1999), Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico, 1ª Edición traducida de la 3ª edición en inglés, Editorial El Manual Moderno, México. 820 pp.
- 35.** Abraham N. ZJr, Carty R.P, DuFour D.R, Pincus M.R. (2006). Clinical enzymology. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier: chap 20.
- 36.** Arthur M.J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteases and their Inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol, Gastrointes Liver Physiol.* 279:G245-G249.
- 37.** Hernández-Bronchud. M. (1996). Papel de las citocinas en los mecanismos de enfermedad y en su terapéutica. *Medicine.* 7 (35): 1556-1563.
- 38.** Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V. and Demetris A.J. (1999). Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6 deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 29, 403-411.
- 39.** Lallemand b, Keuleneer r, Massarani f. (2003). Emphysematous cholecystitis. *Acta Chir Belg.*; 103: 230-2.
- 40.** Mirtha Infante V.M, Franco E.S, Pérez L.M, Winograd L.R, Arús S.E. (2000). Interferón alfa en el tratamiento de la Cirrosis Hepática por Virus C. Presentación de 2 casos. *Rev Cub Méd Mil* v.29 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago.
- 41.** Davis G.L. (1994). Interferon treatment of cirrhotic patients with chronic hepatitis C: a logical intervention. *Am J Gastroenterology*; 89:658-60.
- 42.** Lancet (1998). International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma study group. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. 35:1535-9.

- 43.** Composición moduladora de la inflamación articular crónica a base de colágena-polivinilpirrolidona. WO 2005115443 A1. Número de publicación. WO2005115443 A1. Tipo de publicación Solicitud. Número de solicitud PCT/MX2005/000041. Fecha de publicación 8 Dic 2005. Fecha de presentación 25 May 2005. Inventores Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda, Fernando Edgar Kröttsch Gómez. Solicitante Aspid, S.A. De C.V.
- 44.** Furuzawa C.J, Kröttsch G.E, Barile F.L, Alcalá M, and Espinosa M. R. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1 β , TNF α , TGF- β 1, ELAM-1 and VCAM-1 expression. *Clinical and experimental Dermatology*. 30, 83-86.
- 45.** Furuzawa C. J, Kröttsch G.E, Díaz D.L, Reyes M. (1996). Inhibition on the expression of adhesion molecules ELAM-1 and VCAM-1 in human skin biopsies from hypertrophic and keloid scars treated with Fibroquel^{MR}. 2nd Joint Meeting of the Wound Healing Society and The European Tissue Repair Society. Boston, MA. May 15-19.
- 46.** J. Furuzawa C.J, Macip-R.P.M, Cruz R.D, Soto A.V, Vargas R.M.I , Díaz Z. M, Godina G.S, Alpizar R.D, Limón C.L, (1996). Escobar H.S. Anti-inflammatory Effect of Polymerized Type-I Collagen (Polymerized-IClg) vs. Others Modified Extracellular Matrix Proteins (MECMPs) in CIA.
- 47.** Hernández P. N.E. (1992). Tratamiento de la contractura del tendón de Aquiles en pacientes con parálisis cerebral infantil, con Fibroquel^{MR} (Colágena líquida polimerizada al 1%), asociado a ejercicio terapéutico. Memorias de las jornadas nacionales de médicos residentes en medicina física y rehabilitación.
- 48.** Almazán D.A, De la Cruz G.J.C; Lira R.J.M, Arrelin G, Chimal M.J, Díaz de León L, Furuzawa C.G. J, Kröttsch G.F.E. (1996). Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena 1 polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Rev Mex Ortp Traum*. 10 (3): May-Jun: 142-152.
- 49.** Chimal M.J, Bravo R, Kröttsch G.F.E, Díaz de León. (1997). Implantes de Fibroquel^{MR} aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed*. 8:81-88.
- 50.** Enrique Olaya (1999). Estudio de la colágena PVP, sobre modelos de adherencias abdominales. XXII Congreso de la Asociación Mexicana de Cirugía General. Veracruz, México.
- 51.** Furuzawa C.J, Alcocer V.J, Díaz L. L. (1999). Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci*. 878:598-602.
- 52.** Furuzawa C. J, Macip R.M, Cruz R.D, Soto A.V, Vargas-R. M.I, Díaz Z. M, S. Godina G.S, Alpizar R.D, Limón C.L, Escobar H.S. (1999). Anti-inflammatory Effect of Polymerized Type-I Collagen (Polymerized-IClg) vs. Others Modified Extracellular Matrix Proteins (MECMPs) in CIA.

- 53.** Rodríguez C.R, Furuzawa C.J, Kröttsch G.F.E, Díaz L. L. Análisis Histológico e inmunohistoquímico del efecto de la colágena-polivinilpirrolidona en la cicatrización aguda en humanos. Asociación Mexicana de Quemaduras A.C. Concurso Nacional de Trabajos Libres y de ingreso Monterrey, Nuevo León 2 al 6 de Mayo del 2000.
- 54.** Ugarte R. F, Aragón C. M, Hurtado C. A, González G. E. (2000). Tratamiento de la enfermedad de Peyronie con Colágena-Polivinilpirrolidona. Rev Mex de Urología. Vol. 60 Sep.-Oct del. Número 5.
- 55.** Rodríguez C. R; Furuzawa C.G. J; Kröttsch G.E, Corchado A. Evaluación clínica e histológica de la cicatrización porcina de heridas excisionales de espesor total tratadas con cinco diferentes fármacos. Asociación Mexicana de Quemaduras A. C. XXI.18-21 Abril 2001
- 56.** Furuzawa C. J, González J. I, Corchado G. A, Arrellín G, Kröttsch G.F. (2001). La colágena-polivinilpirrolidona administrada localmente previene la formación de adherencias peritoneales en un modelo murino. Rev. Esp. Med. Quir. 6(2):11-16.
- 57.** Furuzawa C.J, Castillo I.R. E, Valverde M, Díaz de L. L, Kröttsch E. (2003). Cellular and humoral responses of collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. Can J Physiol Pharmacol.; 81:1029-1035.
- 58.** Furuzawa C.J, García R. L, Furuzawa C. J. (2005). Estudio piloto sobre la eficacia del uso de la colágena-polivinilpirrolidona (clg-PVP) en la regeneración ósea en cirugía endodóncica. Revista Odontológica Mexicana. Vol. 9, Núm.4; Diciembre. 191-196.
- 59.** Penilla A.I, Marín G.G, Kröttsch G.E, II. Salgado C.R, Cano C.S. (2008). Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados. Revista Odontológica Mexicana Vol. 12, Núm. 4 Diciembre. 184-191.
- 60.** Möller, R. & Vázquez, N. (2011). Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). Int. J. Morphol., 29(1):76-79. (METODOLOGÍA).
- 61.** Knodell K.G, Ishak K.G, Black W.C. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological Activity in Asymptomatic Chronic Active Hepatitis. Hepatology. Vol. 1. No. 5: 431-435.
- 62.** Desmet V.J, Gerber M, Hoofnagle J.H, Manns M, Scheuer P. J. (1994). Classification of Chronic Hepatitis: Diagnosis, grading and Staging. Hepatology Vol. 19, No. 6: 1513-1520.
- 63.** Lynch M.J; Raphael S.S; Mellor L. D; Spare P.D; Inwood M.J.H. (1977). Métodos de Laboratorio. Tomo II. Ed. Interamericana, S.A. de C.V; México. 1522 pp.
- 64.** Le, Tao, Bhushan, Vikas, Rao Deepak. (2008). "Hepatitis serologic markers". First Aid for the USMLE STEP 1. New York: McGraw Hill Medical. ISBN 978-0-07-149868-5. 1943 pp. "Harrison's Principles of Internal Medicine ed.17th". 168 pp.

- 65.** Burt A.D, Portman B.C, Ferre L.D. (2009). “Mac Seween’s Pathology of Liver” 5ª.Edición. Ed. Churchill Livingstone. 75-119; pp 973.
- 66.** Brandan N, Llanos C, Barrios, Belén I, Escalante M, Andrea P, Ruíz D, Daniel A. N. (2008). ENZIMAS. Universidad nacional del Nordeste Facultad de Medicina Cátedra de Bioquímica. UNNE. 5 pp.
- 67.** Lud. M. 2000.La enzimología. Madrid. España.10 marzo 2012. Pg.3-8.
- 68.** Abraham N, Carty R, DuFour D, Pincus M. (2006). Clinical enzymology. En: McPherson R, Pincus M, eds. Henry’s Clinical Diagnosis y Management by Laboratory Methods. 21st ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. Chap 20.
- 69.** Gregg X, Prchal J.T. (2007). Red Blood Cell Enzymopathies. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SS, et al, eds. Hematology: Basic Principles y Practice. 5th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. Chap 164
- 70.** Benyon R. C. y Iredale J. P.2000. Is liver fibrosis reversible? Gut. 46:443-446
- 71.** León-Buitimea A, Leija-Salas A, Reyes-Esparza J, Garrido-Farina G, Rodríguez Fragoso L. (2006) Tratamiento de la enfermedad hepática crónica inducida por VHC: bases moleculares y celulares. *Rev. Biomed.* 17:195-211
- 72.** R. Battaller y D.A. Brenner. (2001). Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Seminars in liver disease.* 21:437-448
- 73.** Shimizu I, Yue-Rong Ma, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yusada M, Shiba M, Horie T, Amayaga S, Kawada N, Hori H, Ito S. (1999). Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology.* 29:150-160
- 74.** Robinson B, Sullivan F, Bazelleca J, Schwartz S. A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (Povidone). Lewis Publishers, Inc. 1990.
- 75.** Chanda S, Mehendale H.M. (1996). Hepatic cell division and tissue repair: a Key to Survival after liver injury. *Molecular Medicine Today.* Elsevier Science. Ltd.1357-4310. 82-89 pp.
- 76.** Roskams J, Rogers L. (2004) Lab Ref. Ed. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New York pp. 272
- 77.** Aguilar M. M. E, Coutiño B. B, Salinas R.P. (1996). Manual General de Técnicas Histológicas y Citoquímicas. Ed. Facultad de Ciencias, UNAM. 1ª. Edición. 130 pp.
- 78.** Luna L.G. (1992). Manual de Métodos de Tinción Histológica del Instituto de patología de las Fuerzas Armadas. Ed. McGraw Hill. Pp. 258.

X. ANEXOS

X.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS

Preparación de formalina al 10%

El formol viene al 37% así que:

Si queremos preparar una solución de formol amortiguado (formalina) al 10 % debemos considerar tomar el volumen deseado dividido entre 3.7 veces. Entonces 100 entre 3.7 nos dará el volumen de formol a utilizar y se afora a 100 ml con PBS

Preparación de PBS 10X (Buffer Salino)

Solución base

Se Disuelve 110g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 g. de KH_2PO_4 , y 8.5 g. de Nacl en 100 ml de agua des ionizada. Aforamos a 200 ml con agua.

Solución de trabajo:

Diluya 10 ml para 100 ml de H_2O bidestilada para PBS1 x.

Preparación de alcoholes graduados:

Se obtuvo a partir de alcohol a una concentración al 96% donde:

V_1 = volumen de alcohol

V_2 = volumen final

C_1 = concentración de alcohol que se tiene

C_2 = Concentración de alcohol deseada.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$C_1$$

Por ejemplo

Para obtener alcohol al 70%.

$$100 \text{ ml} = \frac{(70)(100)}{96} = 72.91 \text{ ml.}$$

Donde 72.91 ml de alcohol al 96% se afora a 100 ml con agua bidestilada

Otra fórmula sería:

$$\frac{C_1 V_1}{C_2} = V_2 \quad \text{donde} \quad \frac{V_2}{V_1} \text{ el resultado es igual a la cantidad de alcohol que se necesita y se afora al volumen final.}$$

Por ejemplo:

$$\frac{96}{70} = 1.37 \quad \text{donde} \quad \frac{100}{1.37} = 72.91$$

72.91 es la cantidad de alcohol que se necesita para una concentración al 70% y se afora a 100 ml con agua bidestilada

X.2TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

En la disección de cada rata se extrajo el hígado completo y se fragmentó en porciones cuboidales de aproximadamente 0.5 cm de lado.

Se procedió a lavarlos con PBS frío hasta quitar el exceso de sangre.

Posteriormente se fijaron en formalina al 10% por un tiempo mínimo de 24 hrs.

Los fragmentos se colocaron en tres frascos con tres fragmentos cada uno, cada frasco correspondía a un lóbulo del hígado (mayor, menor y central).

Posteriormente se procedió a incluir en parafina de la siguiente manera:

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CORTES EN PARAFINA

- 1.-Fijar el órgano en formol al 4% y dejarlo preferentemente 12 horas.
- 2.-Colocar 2 o 3 muestras en un casete para iniciar el proceso de deshidratación.
- 3.-Sumergir las muestras en etanol al 50% por un tiempo de 15 minutos con agitación suave (150 rpm).
- 4.-Sumergir las muestras en etanol al 70% por un tiempo de 15 minutos con agitación suave (150 rpm).
- 5.-Sumergir las muestras en etanol al 85% por un tiempo de 15 minutos con agitación suave (150 rpm).
- 6.-Sumergir las muestras en etanol al 95% por un tiempo de 15 minutos con agitación suave (150 rpm).
- 7.-Realizar dos cambios de 15 minutos en etanol al 100% con agitación suave en cada caso (150 rpm)
- 8.-Transferir las muestras a una mezcla de etanol/xileno por un tiempo de 15 minutos.
- 9.-Transferir las muestras en xileno por un tiempo de 2 minutos aproximadamente.

En los pasos 10 y 11 se recomienda calentar previamente los reactivos que se van a utilizar como son el xileno/parafina y la parafina pura.

- 10.- Transferir las muestras en xileno/ parafina a 57° C por un tiempo de 15 minutos

11.- Transferir las muestras en parafina a 57° C por un tiempo de 12 horas. Nota: Se pueden dejar más tiempo siempre y cuando estén en parafina solamente.

12.-Incluir las muestras en parafina. La inclusión se debe hacer en un molde especial en el que se coloca la muestra con unas pinzas de punta delgada, se orienta la muestra si es necesario, se cubre todo el molde con parafina líquida y se tapa con una rejilla, se espera a que se enfríe a temperatura ambiente.

Posteriormente se mantienen en refrigeración.

OBTENCIÓN DE CORTES

Una vez incluido el tejido, se procede a realizar los cortes en el micrótopo de deslizamiento o también llamado micrótopo tipo Minot, se obtienen cortes con un espesor de 5µm que son lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz para examinarlo al microscopio después de ser teñidos, una vez hechos los cortes se pasan a un baño de flotación con control termostático a una temperatura de 52° C que previamente se le ha agregado grenetina para que el tejido quede adherido al portaobjetos, el cual debe estar limpio para recoger los cortes, y ya obtenidos los cortes en el portaobjetos se dejan secar.

DESPARAFINACIÓN DE CORTES

- 1.-Colocar los cortes en xileno por un tiempo de 5 minutos con agitación leve (150 rpm). Dos cambios
- 2.-Colocar los cortes en alcohol absoluto por un tiempo de 5 minutos.
- 3.-Colocar los cortes en alcohol al 96% por tiempo de 5 minutos.
- 4.-Colocar los cortes en alcohol al 85% por un tiempo de 5 minutos.
- 5.-Colocar los cortes en alcohol al 70% por un tiempo de 3 minutos.
- 6.-Colocar los cortes en alcohol al 50% por un tiempo de 3 minutos.
- 7.-Colocar los cortes en agua destilada por un tiempo de 5 minutos.

TINCIÓN DE HEMATOXILINA/EOSINA:

- 1) Agua destilada
- 2) Hematoxilina de Harris durante 6 minutos.
- 3) Lavado con agua corriente
- 4) Lavado con agua destilada
- 5) Alcohol acidulado entrada por salida

- 6) Lavado con agua corriente
- 7) Lavado agua Destilada
- 8) Lavado agua Carbonatada
- 9) Agua destilada dos lavados
- 10) Eosina
- 11) Lavado con agua destilada
- 12) Deshidratación con alcoholes graduales por 3 minutos cada uno:
50%, 70%, 80%, 95% y absoluto, etanol/xileno, xileno
- 13) Montar con resina.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

1. Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina	2.5 g.
Alcohol absoluto	25 ml.
Alumbre potásico	50 g. (Sulfato de aluminio y potasio)
Agua destilada	500 ml.
Oxido mercurico	1.25 g.
Ac. Acético glacial	20 ml.

Se disuelve la hematoxilina en alcohol y se le adiciona el alumbre potásico previamente disuelto en agua caliente, la mezcla se lleva hasta el punto de ebullición y se le adiciona el óxido de mercurio. Cuando la mezcla está fría se le adiciona el ácido acético glacial. Puede utilizarse de inmediato o dejarse madurar la solución por una semana.

2. Eosina 0.5% en alcohol:

Solución Stock

Eosina 1.0 g.	
Agua destilada	20 ml.
Alcohol al 96%	80 ml.

Se toma una parte de solución stock por tres partes de alcohol al 80%, y se le agregan 0.5 ml. de ácido acético.

Por ejemplo 25 ml de sol. Stock, 75 ml de alcohol 80% y 0.5 de ácido acético.

3. Solución saturada de carbonato de litio:

Carbonato de litio	1g.
Agua bidestilada	78 ml.

Disolver poco a poco el carbonato de litio en el agua con agitación constante.

Agua carbonatada:

Se toman 100 micro litros de solución saturada de Carbonato de Litio para 60 ml. De agua destilada.

Alcohol acidulado:

A 100 ml de alcohol al 70% se le agregan 1.0 ml de ácido clorhídrico.

TINCIÓN DE HEROVICI (Hígado)

1. Desparafinar e hidratar los cortes incluidos en parafina.
2. Teñir los cortes con la solución de azul celestino por 5 minutos y medio.
3. Lavar con agua destilada, hasta eliminar totalmente el exceso de colorante.
4. Lavar con agua corriente por segundos.
5. Lavar el agua corriente con agua destilada.
6. Teñir con hematoxilina de Regnaud durante 6 minutos.
7. Lavar con agua destilada hasta eliminar totalmente el exceso de colorante.
8. Lavar en agua corriente hasta obtener el viraje.
9. Efectuar varios lavados con agua destilada durante 10 minutos.
10. Teñir con Amarillo metanilo durante 5 minutos y medio.
11. Hacer la diferenciación con solución de ácido acético 0.5% durante 2 minutos.
12. Lavar con agua destilada durante 2 minutos.
13. Virar la tinción en la solución de carbonato de litio durante 2 minutos.
14. Lavar con agua destilada.
15. Teñir con la solución picropolicrómica durante 4 minutos y medio.
16. Sumergir los cortes en la solución de ácido. acético al 1% durante 2 minutos.

17. Transferir los cortes a alcohol al 50%, efectuando tres cambios de 2 minutos cada uno (usar etanol 50% limpio en cada cambio)

18. Dejar secar los cortes laminillas entre 12 y 24 hrs. y montar con resina

NOTA: Si se quieren montar las laminillas de inmediato, efectuar 2 cambios de 2 minutos cada uno con alcohol al 50%. Continuar la deshidratación sumergiendo durante 4 segundos en los alcoholes al 70%, 80%, 96%, absoluto y etanol/xileno (1:1 vol/vol), aclarar con xileno y montar con resina.

RESULTADOS:

Núcleo en negro

Citoplasma en color amarillo verdoso

Queratina, músculo y glóbulos rojos en amarillo brillante

Colágena tipo III en azul

Colágena tipo I en rojo

Hialino en verde azulado

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA TINCIÓN DE HEROVICI.

1. Azul celestino

Azul celestino	0.25 g
Sulfato férrico Amoniacal (alumbre férrico)	2.5 g
Agua destilada	50 ml
Glicerol	10 ml

Disolver el azul celestino en 30 ml de agua destilada. Aparte, disolver el alumbre férrico en 20 ml de agua destilada y mezclar ambas soluciones perfectamente, calentar a ebullición por 3 minutos. Cuando la solución se encuentre fría adicionarle el glicerol y mezclar perfectamente.

2. Hematoxilina

Hematoxilina de Regaud al 1%

Hematoxilina	1.0 g
Etanol al 95%	10 ml
Glicerina	10 ml
Agua destilada	80 ml

Disolver la hematoxilina en 80 ml de agua caliente, dejar enfriar y adicionar el etanol y la glicerina mezclando perfectamente.

Hematoxilina de Herovici.

Sulfato de aluminio	5 gr
Agua Destilada	200 ml
Hematoxilina de Regaud al 1%	50 ml
Solución de Cloruro Férrico al 4%	10 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

Solución de Cloruro Férrico 4%.

Disolver 4g de FeCl_3 en 100 ml de agua

Disolver el sulfato de aluminio en 200 ml de agua destilada y calentarlo hasta que alcance el punto de ebullición, posteriormente adicionarle lentamente 50 ml de una solución de hematoxilina de Regaud al 1% y adicionar finalmente 10 de FeCl_3 al 4% 1 ml de Ácido Clorhídrico concentrado. Esta solución es de color marrón y está lista para usarse, sin embargo, se puede dejar madurar por 15 días o más

3. Amarillo metanilo

Amarillo metanilo	0.25 g
Agua destilada	60 ml
Ácido acético	250 μl

Disolver el amarillo metanilo en el agua destilada agitando hasta su completa disolución, adicionar el ácido acético y mezclar perfectamente.

4. Solución de ácido acético al 1% y al 0.5%

Ácido acético	5 ml
Agua destilada	495 ml

Adicionar al agua destilada el ácido acético y mezclar perfectamente.

Para preparar la solución de ácido acético al 0.5%, tomar 150 ml de la solución al 1% y añadirle 150 ml de agua destilada.

5. Solución de carbonato de litio (Li_2CO_3)

Solución saturada de carbonato de litio	100 μl
Agua destilada	60 ml

Mezclar el agua destilada con la solución acuosa saturada de carbonato de litio.

La solución saturada se prepara agregando 1 gr de Li_2CO_3 a 78 ml de agua destilada fría.

6. Mezcla picropolicrómica

Solución 1	Azul de metilo	0.05 g
	Agua destilada	50 ml
Solución 2	Fucsina ácida	0.1 g
	Sol. saturada de ác. pícrico	50 ml

Para preparar la solución saturada de Ácido pícrico se agrega 1gr de ácido pícrico a 78 ml de agua destilada.

Mezclar la solución 1 con la solución 2 y adicionar 10 ml de glicerol y 0.5 ml de una solución acuosa saturada de carbonato de litio.

TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

- 1.- Desparafinar e hidratar los cortes incluidos en parafina.
- 2.- Colocar los cortes en un mordente (Bouin) por una hora a $56\text{ }^\circ\text{C}$, o a temperatura ambiente si es fijado en formol al 10%.
- 3.- Enfriar los cortes y lavarlos con agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.
- 4.- Lavar los cortes con agua destilada.
- 5.- Se tiñen los cortes con hematoxilina férrica, de 10 a 15 minutos.
- 6.- Lavar los cortes con agua corriente 5 minutos y en agua destilada por 1 minuto.
- 7.- Colocar los cortes en una solución de escarlata por 1 minuto.
- 8.-Lavar los cortes con agua destilada varias veces hasta que queden rosa claro.
- 9.-Colocar los cortes en una solución fosfomolibdica fosfotúngstica de 10 a 15 minutos.
- 10.-Colocar los cortes en una solución de anilina por 7 minutos.

- 11.- Lavar los cortes con agua destilada.
- 12.-Colocar los cortes en una solución de agua acética al 1% por 4 minutos.
- 13.-Deshidratar los cortes con alcohol al 96%, alcohol absoluto y xilol.
- 14.- Montar.

Resultados:

El núcleo se tiñe de color negro

El citoplasma, la queratina y el músculo se tiñen de color rojo.

La colágena de se tiñe de color azul.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Hematoxilina férrica de Weigerts:

Solución A

Cristales de hematoxilina	1 gr.
Alcohol al 95%	100 ml.

Solución B.

Cloruro férrico al 2% acuoso	4 ml.
Agua destilada	95 ml.
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml.

Ácido Fosfomolibdico

Naranja G molibdico	5gr.
Naranja G	2gr.
Agua destilada	100ml.

Ácido fosfotúngstico

Verde luz	1gr.
Agua destilada	100ml.
Ácido acético	2ml.

Solución acuosa de ácido acético 1%

Ácido acético	1ml.
Agua destilada	9.9 ml.