

11237

201

102



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

FOSFOLIPIDOSIS HEPATICA SECUNDARIA
EN RATAS TRATADAS CON AMIODARONA.

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener la Especialidad en
PEDIATRIA MEDICA

p r e s e n t a

Dr. Jesús Nares Cisneros



A S O S O F:

DR. PEDRO F. VALENCIA MAYORAL

México, D. F.

1989

A handwritten signature in cursive script, likely of the author or a reviewer.

FALLA DE CRIGEN



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.

CONTENIDO

Página

Introducción.....	4
Planteamiento del problema.....	5
Objetivos.....	5
Hipótesis.....	5
Material y métodos.....	6
Resultados.....	8
Discusión.....	12
Conclusiones.....	15
Figuras.....	17
Referencias.....	21

INTRODUCCION

Los lisosomas son organelos intracelulares que contienen una gran variedad de hidrolasas, la mayoría de las cuales tienen actividad máxima a pH ácido. Los lisosomas primarios son aquellos que se funden con las vacuolas rodeadas de membrana que contienen el material por digerir para formar los lisosomas secundarios o fagolisosomas (1).

Antes de que se conocieran, la existencia de los lisosomas fue prevista por De Duve en 1963; fue el quien subsecuentemente los identificó con los "cuerpos densos peribiliares" encontrados mediante estudios de microscopía electrónica del hígado y los estableció como una nueva especie de organelos celulares (2,3).

Muchas de las enfermedades debidas a errores congénitos del metabolismo corresponden a enfermedades lisosomales también llamadas enfermedades por acumulación o almacenamiento. Estas entidades se deben a un defecto en la codificación de una o varias enzimas lisosomales lo que da como resultado la falta o disfunción de ellas. Como consecuencia el sustrato de la enzima deficiente se acumula en el interior de los lisosomas y estos organelos aumentan en número y tamaño e interfieren con las funciones de la célula (1-5).

Los lípidos son un grupo de biomoléculas que se degradan en los lisosomas; son insolubles en agua y juegan una gran variedad de papeles biológicos fundamentalmente como componentes de las membranas y en la producción de energía. Los lípidos que

básicamente componen a las membranas son fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Los fosfolípidos son derivados del glicerol, un alcohol de tres carbonos, o de la esfingocina, un alcohol más complejo. Los fosfolípidos derivados del glicerol son llamados fosfoglicéridos, están formados por una cadena de glicerol, dos ácidos grasos y un alcohol fosforilado (5).

Las lipodosis son enfermedades por depósito de los lípidos en las que existe un defecto en el catabolismo de los lípidos (4). A este grupo pertenecen la leucodistrofia metacromática, la enfermedad de Gaucher, la fucosidosis, la enfermedad de Farber (lipogranulomatosa), la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Tay-Sachs y la leucodistrofia de Krabe entre otras (4,6-9).

Existe un grupo de drogas que son capaces de producir fosfolípidosis secundaria con daño celular; entre ellas se encuentran a la cloroquina, el 4'4'-dietilamindetoxihexestrol, el maleato de perhexileno y la amiodarona (10-15). El concepto de fosfolípidosis secundaria a medicamentos se ha generado de estudios clínicos y experimentales (10-18); la presencia de inclusiones intralisosomales características en los hepatocitos, constituyen el denominador común entre las fosfolípidosis primarias tales como la enfermedad de Tay-Sachs, Niemann-Pick y enfermedad de Fabry y las fosfolípidosis secundarias a la administración de drogas (11).

Todas las drogas capaces de producir fosfolípidosis son anfífilicas y lisosomotropicas y capaces de formar uniones con

lípidos dentro de los lisosomas; es probable que el flujo continuo o exagerado de complejos lípidos-droga desde el citoplasma, lleve a la acumulación de estos complejos y se acomoden en los arreglos laminados intralisosomales que caracterizan a las fosfolipidosis. La disfunción celular sería una consecuencia de este acumulo; al retirar el medicamento, los complejos desaparecen (10-19).

La amiodarona que como ya se menciona, es una de las drogas que puede producir fosfolipidosis secundaria, es un derivado yodinado del benzofurano y se utiliza en medicina como antiarritmico de gran eficacia ; es anfifílica y catiónica y se piensa que interfiere con la actividad de las fosfolipasas lisosomales A-1 y A-2 (10,11).

Otros cambios que produce la amiodarona son fibrosis y fosfolipidosis pulmonar y fosfolipidosis generalizada, opacidad corneal, hepatitis fulminante, hepatitis semejente a la alcohólica, hepatitis crónica activa y fibrosis hepática y pulmonar (10-11,20-32). Después de varios intentos en diferentes animales, con diferentes dosis y diferentes métodos, se desarrolló un modelo de fosfolipidosis pulmonar en ratas (11).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de las enfermedades lisosomales es muy difícil de abordar y si sabemos que la amiodarona produce enfermedades lisosomales secundaria creemos posible desarrollar un modelo experimental de fosfolipidosis hepática secundaria.

OBJETIVOS

Desarrollar fosfolipidosis hepática secundaria en un modelo animal mediante la administración de amiodarona.

HIPOTESIS

La amiodarona administrada en dosis altas y en forma crónica es capaz de producir fosfolipidosis secundaria en el hígado de ratas sometidas a la acción de ese medicamento.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 60 ratas Wistar con un peso aproximado de 250 a 300 g divididas en cuatro grupos. Un grupo control de diez ratas, un grupo A con 20 ratas; un grupo B con 20 ratas y el grupo C con diez ratas. Las ratas eran machos, no tratadas con medicamentos previamente, no infectados, con alimentación normal, de la misma camada. Al grupo control no se les administró medicamento alguno.

Al grupo A se les administró amiodarona via oral a razon de 50 mg x kg de peso cada 12 horas durante una semana como dosis de impregnacion y posteriormente 25 mg x kg de peso cada 12 horas durante 21 días mas.

Al grupo B se les administro amiodarona a razon de 100 mg x Kg cada 12 horas durante una semana como dosis de impregnación y posteriormente a 50 mg x k c/12 horas durante 3 semanas mas.

Al grupo C se les administro amiodarona a dosis de 37.5 mg. x kg. cada 12 horas durante 12 semanas. La Amiodarona se les dio suspendida en agua destilada, mediante alimentacion forzada con sonda orogastrica.

Los grupos recibieron agua y comida ad libitum . Al finalizar el tratamiento se les sacrifico con eter y se les exanguino. Se tomaron cortes de higado para histologia y microscopia electronica. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE), tricromico de Masson, acido peryódico de Schiff (PAS), tratados con y sin diastasa, azul prusiano de Perls, orceina de

Shikata, Masson Fontana y Luxol fast blue.

Las muestras para microscopia electronica fueron fijadas al 4% de formol amortiguado y gluteraldehido al 1% durante una hora a 0 grados C, posteriormente se fijo en una solucion a volúmenes iguales de tetraoxido de osmio al 2% y Ferrocianuro de potasio al 3% despues se deshidrato y se incluyo en una mezcla de epon-araldita, se realizaron cortes finos con una cuchilla de punta de diamante y teñidos con citrato de plomo. Se examinaron los cortes con un microscopio electronico.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en el cuadro I, en donde se puede ver que todas las ratas tratadas con amiodarona presentaron debilidad, piloerección, disminución de la ingesta de alimento, pérdida de peso de 40 g promedio, las del grupo A; 70 g de pérdida de peso promedio las del grupo B y las del grupo C perdieron 90 g en promedio. Durante el proceso murieron 2 ratas del grupo A, 3 del grupo B y ninguna del grupo C.

Por otra parte las ratas del grupo control no mostraron ningún cambio, perdieron peso ni fallecieron.

Los hallazgos a la microscopía de luz y electrónica se pueden apreciar en el cuadro II; en los tres grupos el hallazgo de citoplasma granular, que en las ratas del grupo A: fue de + a ++, en las del grupo B de ++ a +++ y en las del grupo C de +++. Cambios catalogados de + fueron aquellos en los cuales solo en algunos hepatocitos se encontraron cambios granulares y cambios mínimos; los cambios con ++ (fig 1) fueron aquellos en los cuales no todos los hepatocitos presentaban cambios, pero más numerosos y en los cambios de +++ todos los hepatocitos con cambios granulares y abundantes (fig 2).

Bajo el microscopio electrónico se observaron a los lisosomas aumentados de número y tamaño, distribuidos difusamente en el citoplasma de los hepatocitos (fig 3) y en menor número en las células de Kupffer; todos ellos estaban rodeados de una unidad simple de membrana y en su interior se apreció la presencia de dos tipos de inclusiones; unas de ellas eran laminares concéntricas que formaban remolinos o impresiones dactilares

electrodensas con zonas claras, mezcladas con el segundo tipo de inclusion; estas eran granulares finas, de electrodensidad media, homogéneas y ocupaban a todo el lisosoma cuando no estaban mezcladas con las otras inclusiones.

Además, con frecuencia se encontró a estos lisosomas asociados a mitocondrias; estas se disponían en la periferia de ellos, en íntimo contacto y en ocasiones ambas membranas se fusionaban y el contenido de ellas se hacía indistinguible (fig 4); además las mitocondrias mostraban cambios degenerativos tales como hinchazón y pérdida de crestas. Ninguno de los cambios al microscopio de luz o al electrónico se observaron en el grupo control.

CUADRO I.- Hallazgos histológicos

Resultados

Grupo	M.L.
A	Citoplasma granular amofílico + a ++
B	Idem ++ a +++
C	Idem +++
Controles	normales

Los cambios fueron encontradas en todas las ratas, aun en las que fallecieron.

CUADRO 2. Hallazgos ultraestructurales

RESULTADOS

GRUPO	M.E.
A	Inclusiones lisosomales
B	" "
C	" "
CONTROL	NINGUNO

DISCUSION :

Como puede observarse, la administracion crónica de amiodarona fue capaz de producir cambios evidentes en las ratas sometidas a la administracion del farmaco aun en dosis bajas. Los cambios más tempranos fueron la piloereccion, seguidos por rechazo al alimento y perdida de peso; todos estos cambios ya han sido informados previamente (10). La muerte de los animales se considera como un efecto del medicamento ...

Las alteraciones morfológicas encontradas con el microscopio de luz son semejantes a las observadas en humanos sometidos a tratamiento prolongado con amiodarona que además desarrollaron fibrosis hepática (11); en nuestros animales de experimentacion llama la atencion que no se encontro ningún otro cambio histopatológico fuera de la granulación citoplásmica. Esto puede ser debido a que el tiempo de administracion no fue lo suficientemente prolongado como para producir necrosis hepatocelular y fibrosis. El daño hepatocelular se puede documentar también por el hecho de que a las ratas del grupo C se les practico determinacion de aminotransferasas séricas y se encontraron elevadas; sin embargo por dificultades técnicas este dato no puede ser considerado dentro de este estudio. Las lesiones descritas fueron obtenidas tanto con la administracion oral dos veces al día con dosis de impregnación de una semana y de mantenimiento de 3 semanas en los grupos A y B y de dosis de mantenimiento y por 12 semanas en las del grupo C. El daño histológico fue semejante en los tres grupos y solo se

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

encontraron variaciones en la intensidad del mismo, es decir en el grupo A el número de hepatocitos afectados y el número de inclusiones intracitoplásmicas fue menor que en el grupo B y las de este grupo fueron menores que las encontradas en el grupo C. Las inclusiones granulares intracitoplásmicas corresponden a lisosomas tal como lo revela la microscopía electrónica; otras posibilidades como megamitocondrias u otros elementos quedan descartados por este procedimiento. Cabe destacar que a las ratas del grupo control que no recibieron el medicamento no presentaron cambios a ningún nivel de organización como ya fue señalado, y como era de esperarse cambios observados a la microscopía de luz son compatibles con inclusiones intralisosomales en los hepatocitos de las ratas tratadas.

Los arreglos laminares concentricos encontrados con el microscopio electrónico son semejante a los descrito por otros autores en biopsias hepáticas en humanos (11); sin embargo las inclusiones intralisosomales granulares homogéneas no han sido descritas hasta donde sabemos. Estas pueden representar parte de la matriz de otros organelos como mitocondrias o peroxisomas; además la presencia de mitocondrias y sus crestas en continuidad con la formación de las inclusiones laminares sugiere que estas últimas provienen de las membranas que forman las crestas mitocondriales. De ser esto cierto, estaríamos presenciando la degradación de las mitocondrias y su incorporación a los lisosomas ; el material granular correspondería a la matriz y el laminar a las membranas de las mitocondrias. por otra parte sabemos que la distinción celular más acentuada en estos casos se debe a la aletración de los mecanismos oxidativos lo que se

podria explicar por lesi3n mitocondrial. Es por demas interesante esta especulaci3n pues podria explicar la serie de manifestaciones cl3nicas y bioqu3micas que se encuentran en otras enfermedades en las que el almacenamiento de lipidos se lleva a cabo en forma de inclusiones laminares. Es decir, en casos de Niemann-Pick, por ejemplo, la serie de trastornos que se observan seria consecuencia no solo del daño mecánico a las telulas que almacenan fosfolipidos si no a disfunci3n celular debido a daño mitocondrial. Sin embargo hay que recordar que la amiodarona produce cambios de acumulaci3n de lipidos a nivel intralisosomal, ya que se piensa que interfiere en la actividad de las fosfolipasas lisosomales A1 y A2.

CONCLUSIONES:

De los hallazgos anteriores y su interpretación, podemos concluir que es posible desarrollar enfermedad lisosomal secundaria a la administración de amiodarona en ratas. Estos cambios aunque son semejantes a los que suceden en las enfermedades lisosomales primarias mostraron algunas diferencias pero al parecer, al igual que ellas son capaces de interferir con la función de las células.

El efecto observado es probablemente dosis dependiente. Pudimos observar que a mayor dosis los cambios mencionados eran mayores en intensidad; los cambios más acentuados a nivel de microscopia de luz y electronica fueron más floridos en el grupo de animales tratados con dosis altas de amiodarona.

El efecto es mayor a mayor tiempo de exposición. En el grupo C en el cual se administro el medicamento durante un tiempo más prolongado se encontraron mayores cambios que en los otros dos grupos mencionados.

El efecto perdura una vez suspendida la droga. De acuerdo a lo revisado en el literatura, una vez retirado el medicamento las lesiones desaparecen; pero en nuestros animales, al suspender el medicamento por tres meses el efecto perduraba. Las lesiones hepáticas fueron semejantes en intensidad y extensión a las descritas en el grupo C; sin embargo es probable que este tiempo no sea suficiente para que el hígado se recupere. De otra forma habrá que analizar este hecho pues de ser permanente o

prolongado el dano, permitiria contar con un buen modelo de enfermedad lisosomal.

Los cambios ultraestructurales son semejantes a los observados en la enfermedad humana inducida por amiodarona, fundamentalmente las inclusiones intralisosomales en forma de remolino dentro de los hepatocitos. Pero las otras inclusiones granulares no estan mencionadas en la literatura y como ya fue discutido, podrian tener implicaciones patogenicas de gran trascendencia.

Por ultimo, es probable que los lipidos que se acumulan provienen de las membranas de las mitocondrias; los cambios observados en la microscopia electronica con las mitocondrias alrededor de los lisosomas tumefactos y con sus membranas formando parte del lisosoma nos sugiere esta afirmacion.

REFERENCIAS

- 1.- Novikoff, AB: Lysosomes. En: The liver: biology and Pathobiology Chapter 2. Eds: J. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Scharitz. Raven Press, New York 1982. p. 9-25.
- 2.- MacSween R.N.M.: Developmental anatomy and normal structure. En: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, eds: Pathology of the liver. 2a edición, Churchill-Livingstone, Edinburgh 1967 p. 1-45.
- 3.- Philips MJ, Puddell S, Patterson J, Valencia P: The liver: an atlas and text of ultrastructural pathology. Raven Press, N. York 1987.
- 4.- Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS: The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, N. York 1983.
- 5.- Stryer L: Biochemistry. second edition. Freeman San Francisco 1981. p.207-209.
- 6.- Kihara H, Ho Che-Kung, Flunarty AL, Tsay KK, Hartlage PL: Prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy in a family with pseudoarylsulfatase A deficiency by the cerebroside sulfate loading test. *Pediatr. Res.* 1980; 14: 224-227.
- 7.- Kousseff BG, Beratis NG, Strauss L, Brill PW, Rosentfield RE, Kaplan B, Hirschhorn K: Fucosidosis Type 2. *Pediatrics.* 1976; 57: 205-213.
- 8.- Dulaney JT, Milunsky A, Sidbury JB, Hobolth N, Moser HW: Diagnosis of lipogranulomatosis (Farbe disease) by use of cultured fibroblasts. *J Ped* 1976; 69: 59-61.
- 9.- Cortner JA, Coates PM, Swoboda E, Schnatz JD: Genetic variation of lysosomal acid lipase. *Pediatr Res* 1980; 10: 927-932.
- 10.-Riva E, Marchi S, Fesenti A, Bizzi A, Cini M, Veneroni E, Tavbani E, Boeri R, Bertani I, Latini R Amiodarone induced phospholipidosis. Biochemical, morphological and functional changes in the lungs of rats chronically treated with amiodarone. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 3209-3214.
- 11.- Foucell S, Ireton J, Valencia Mayoral P, Downar E, Larret L, Patterson J, Blendis L, Phillips MJ: Amiodarone-Associated phospholipidosis and fibrosis of the liver. *Gastroenterology* 1984; 86: 926-936.

12.- Itoh S, Tsukada Y. Clinico-pathological and electron microscopical studies on a coronary dilating agent: 4-4'-diethyl-aminoethoxyhexoestrol-induced liver injuries. *Acta Hepato-Gastroenterol* 1973;20:204-15.

13.- Lullmann H, Lullmann-Rauch R, Wassermann O. Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochem Pharmacol* 1978;27:1103-8.

14.- Pallard P, Vitrey D, Fournier G, Belhadjali J, Patricot L, Berger F. Perhexiline maleate-induced hepatitis. *Digestion* 1978;17:419-27.

15.- Pessayre D, Bichara M, Feldmann G, Degott C, Potat F, Benhamou JP. Perhexiline maleate-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1979;76:170-7.

16.- Abraham R, Hendy R. Effects of chronic chloroquine treatment on lysosomes of rat liver cells. *Exp Mol Pathol* 1970;12:148-59.

17.- Marchlinski FE, Gansler IS, Waxman HL, Josephson ME. Amiodarone pulmonary toxicity. *Ann Int Med* 1982;97:839-45.

18.- Jirik FR, Henning H, Huckell VF, Ostrow DYN. Diffuse alveolar damage syndrome associated with amiodarone therapy. *Can Med Assoc J* 1983;128:1192-5.

19.- Meier C, Kauer B, Muller U, Ludin HP. Neuromyopathy during chronic amiodarone treatment. A case report. *J Neurol* 1979;220:231-9.

20.- Singh BN, Phil D. Amiodarone: Historical development and pharmacologic profile. *Am Heart J* 1983; 106:788-797

21.- Holt WD, Tucker GT, Jackson PR, Storey GCA. Amiodarone pharmacokinetics. *Am Heart J* 1983; 106: 840-846.

22.- Heger JJ, Frystowsky EN, Zipes DP. Clinical efficacy of amiodarone in treatment of recurrent ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. *Am Heart J* 1983; 106:887-893.

23.- Fogoros RN, Anderson KP, WinkleRA, SwerdlowCD, Mason JW. Amiodarone: clinical efficacy and toxicity in 96 patients with recurrent, drug-refractory arrhythmias. *Circulation* 1983; 68: 88-94.

24.- Heger JJ, Frystowsky EN, Zipes DP. Relationships between amiodarone dosage, drug concentrations, and adverse side effects. *Am Heart J* 1983; 106: 931-934.

- 25.- Harris L, William J, McKenna, Rowland E, Krikler DM: Side effects and possible contraindications of amiodarone use. *Am Heart J* 1983; 106:916-922.
- 26.- Yagupsky P, Gazala E, Sofer S, Maor E, Abarbanel J: Clinical and laboratory observations. *J. Ped* 1985; 107:967-970.
- 27.- Simon JB, Manley FH, Brien JF: Amiodarone Hepatotoxicity simulating alcoholic liver disease. *N Engl J Med* 1984; 311 167-172.
- 28.- Rinder HM, Love JC, Wexler R: Amiodarone Hepatotoxicity. *N Engl J Med* 1983; 314: 318-319.
- 29.- Lim PK, Trewby PH, Storey GCA, Holt DM: Neuropathy and fatal hepatitis in a patient receiving amiodarone. *Br Med J* 1984; 288: 1638-1639.
- 30.- Alves LE, Rose EF, Kingale IG, Heinbecker IF, Frawley TF: Adverse effects of amiodarone. *JAMA* 1982; 248:1448.
- 31.- Ingram DV: Ocular effects in long-term amiodarone therapy. *Am Heart J* 1983; 106:902-904.
- 32.- Rakita L, Sobol SH, Mostow N, Vrobel T: Amiodarone pulmonary toxicity. *Am Heart J* 1983; 106:906-914.
- 33.- Mendez Ramirez I, Namihira Guarrero D, Moreno Altamirano L, Sosa de Martinez C: El protocolo de investigacion. *Trillas*, Mexico 1984.

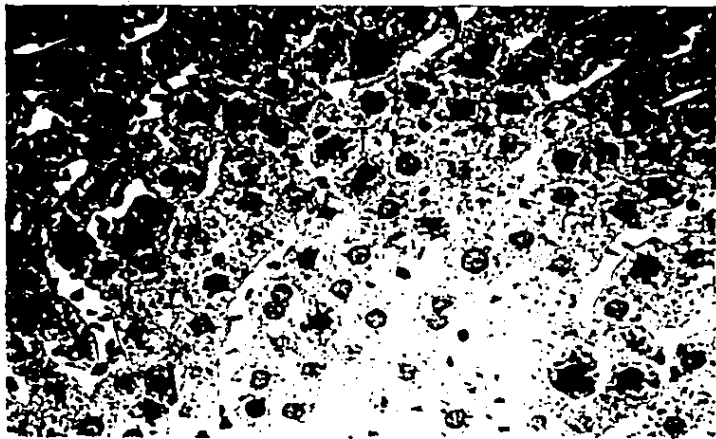


Figura 1.- Microfotografía de uno de los cortes de hígado de una de las ratas del grupo A. En ella se pueden observar varios granulos (flechas) en el citoplasma de los hepatocitos. (Hematoxilina y Eosina x 400)



Figura 2.- Aspecto histológico del hígado de una de las ratas del grupo C. Los granulos intracitoplasmicos son mas numerosos y afectan prácticamente a todos los hepatocitos. (Hematoxilina y eosina x 720).

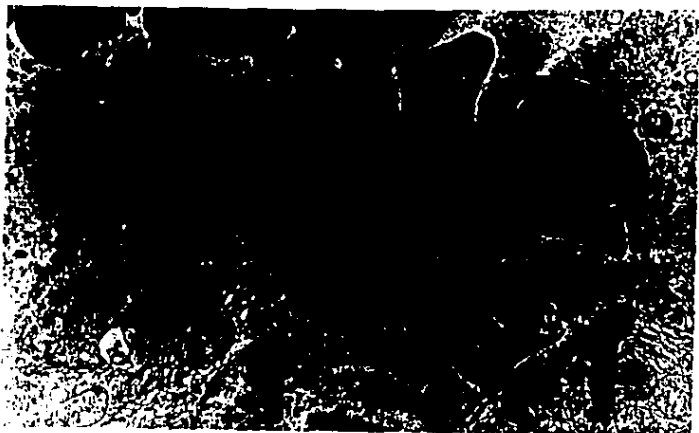


Figura 3.- Microfotografía electrónica del hígado de una de las ratas del grupo C en la que se puede observar un hepatocito con varias inclusiones en su citoplasma que corresponde a lisosomas. (magnificación original $\times 3000$).



Figura 4.- Acercamiento de la anterior en la cual se aprecia a un lisosoma que contiene material finamente granular de electrodensidad media, figuras de mielina y un intimo contacto de las mitocondrias a su alrededor. (Magnificacion original x 3000).