



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS
IZTACALA

400282

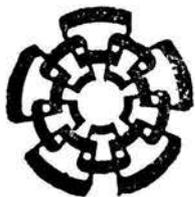


61060

**"EFECTO DEL ACIDO TRIMETILCOLCHICINICO
SOBRE EL DAÑO HEPATICO INDUCIDO POR LA
OBSTRUCCION BILIAR PROLONGADA EN
LA RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ANA RUTH CRISTOBAL RAMOS



**CINVESTAV
I.P.N**

MEXICO, D. F.

1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Farmacología y
Toxicología Hepática del Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
bajo la dirección del Doctor **Pablo Muriel De la Torre.**



“... Sea bendito el nombre de Dios de siglos en siglos, porque suyos son el poder y la sabiduría.

El muda los tiempos y las edades; quita reyes y pone reyes; da la sabiduría a los sabios y la ciencia a los entendidos.

El revela lo profundo y lo escondido; conoce lo que está en tinieblas y con él mora la luz.

A ti, oh Dios de mis padres te doy gracias y te alabo, porque me has dado sabiduría y fuerza...”

Daniel 2:20-23.

A una mujer especial, por su dedicación, apoyo moral y espiritual y por ser la única que me brinda un amor incondicional: Mi Madre.

A quienes amo no por casualidad, Mis hermanos: Tomy, Aracely, Gloria, Angeles, Aurora y Marce.

A unos buenos niños a quienes brindo mi amor, mis sobrinos: Ramón, Abel, Francisco, José Antonio, Hugo Isaac y Ana Laura.

A una persona especial de quien he aprendido muchas cosas y compartido gratos momentos de mi vida: Nahum Aquino Crisóstomo.

AGRADECIMIENTOS

A mis cuñados Ramón, Jaime y especialmente a Francisco Sánchez por su apoyo en toda mi carrera.

A las familias Aquino Crisóstomo, Crisóstomo Echeverría y a Dante Camarillo por su apoyo moral y espiritual.

A la señora Maria Elena Marín por su cariño y atención.

A mis compañeros y amigos de generación. Especialmente a Ramsés por sus consejos y asesoría.

A mis maestros: Enrique Morales, Sergio González, Ignacio Peñalosa, Angel Durán, Samuel Meraz, Héctor Barrera y Roberto Moreno, de quienes aprendí muchísimo.

Muy especialmente al **Dr. Pablo Muriel De La Torre** por su asesoría y paciencia durante el desarrollo de esta tesis.

Al Doctor Víctor Tsutsumi F. por su asesoría en la ultraestructura hepática.

Al CINVESTAV del IPN, institución que me recibió amablemente.

A mis compañeros de Farmacología: Paty, Tere, Toño, Ramón, Benjamín y Liliana por sus enseñanzas y ayuda en la realización de este trabajo.

Al personal de la biblioteca: Héctor y Anita.

A mis compañeros de Patología Experimental: los Doctores: Adolfo Martínez Palomo, Arturo González y Bibiana Chávez, mi admiración y respeto por el ejemplo y apoyo que me brindan para continuar superándome.

A Irene una amiga muy especial y a las personas con quienes comparto diariamente el trabajo: Dra. Silvia Gómez, Dra. Martha Espinoza, José Gpe., Lupita Castañón, Diana, Elsa y Ranferi.

A Nancy y Lupita quienes forman parte importante de mi vida.

A mis compañeros del CENLEX-IPN quienes también ocupan un lugar especial en mi vida.

INDICE

	Página.
Abreviaturas	i
Resumen	ii
Introducción.	
Generalidades .	1
El metabolismo de las grasas.	6
Las sales billiaries.	7
Las enfermedades hepáticas obstructivas.	8
El modelo de daño hepático producido por la ligadura del conducto biliar común en la rata.	16
Evaluación del daño hepático.	16
Antecedentes.	22
Objetivos.	
General.	25
Particulares.	25
Metodología.	
<u>Diseño experimental.</u>	26
Procedimiento para ligar el conducto biliar común.	26
Procedimiento para el sacrificio de las ratas.	27
<u>Determinaciones bioquímicas.</u>	
Determinación del grado de lipoperoxidación por el método	

del ácido tiobarbitúrico (TBA).	28
Determinación del contenido total de proteínas.	30
Determinación de bilirrubina total y directa.	31
Determinación de la actividad de la TGP.	33
Determinación de la actividad de la γ -GTP.	34
Determinación de la actividad de la FA.	36
Determinación del contenido de glucógeno hepático.	36
Determinación de colágena.	37
<u>Histología.</u>	40
<u>Microscopía electrónica.</u>	41
<u>Análisis estadístico.</u>	41
Resultados.	
Efecto del ATMC sobre la fibrosis hepática.	42
Resultados bioquímicos.	47
Resultados ultraestructurales.	53
Discusión.	56
Conclusiones.	66
Bibliografía.	67

ABREVIATURAS

Cirrosis biliar primaria.	CBP
Colangitis esclerosa primaria.	CEP
Cirrosis biliar secundaria.	CBS
Ligadura del conducto biliar común.	LCBC
Fosfatasa alcalina.	FA
Transaminasa glutámico pirúvica.	TGP
Alanina aminotransferasa.	ALAT
Creatina fosfocinasa.	CPK
Colinesterasa.	CHE
Gamma glutamil-transpeptidasa.	γ -GTP
Adenin-monofosfato cíclico.	AMPc
Acido trimetilcolchicínico.	ATMC
Operación falsa.	OF
Acido tiobarbitúrico.	TBA
Malondialdehído.	MDA
Acido tricloroacético.	TCA

RESUMEN

La colchicina es un alcaloide que ha tenido efectos benéficos en animales y en pacientes cirróticos; no obstante, sus efectos benéficos sobre la cirrosis hepática han sido modestos ya que sólo se aplica una pequeña dosis en humanos (1 mg por día durante cinco días por semana) debido a que produce efectos secundarios importantes y posee alta toxicidad; dicha toxicidad se le atribuye a su capacidad de inhibir la polimerización de los microtúbulos. Se ha observado que ciertos análogos de la colchicina poseen algunas de sus propiedades. Uno de ellos es el ácido trimetilcolchicínico (ATMC) que no inhibe microtúbulos y es aproximadamente 500 veces menos tóxico que la colchicina. En el presente estudio se probó el ATMC con el fin de conocer su capacidad para proteger al hígado del daño crónico inducido por la obstrucción del conducto biliar común en ratas.

Se utilizaron cuatro grupos de ratas (6 ratas cada uno) machos de la cepa Wistar de 200-300g de peso. Un grupo se utilizó como control de operación falsa, al segundo grupo se le obstruyó el conducto biliar común de manera quirúrgica por un período de 8 semanas, al tercer grupo se le administró ATMC a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ por vía oral y un último grupo recibió el fármaco solamente. Posteriormente se realizaron las siguientes determinaciones: cuantificación de bilirrubinas y enzimas séricas marcadores de daño hepático. En el hígado se cuantificaron la colágena y el glucógeno. También se realizaron análisis histológicos y ultraestructurales por microscopía óptica y electrónica de transmisión. Los datos se analizaron con ANADEV A y t de Tukey.

La obstrucción biliar en la rata produjo un incremento en el contenido de colágena hepática de aproximadamente 5 veces más que el grupo control. En los resultados histológicos

con tinción para colágena hepática se observó una gran área del tejido hepático invadido por la colágena; también hubo una pérdida en el contenido de glucógeno hepático de casi un 80%. Las bilirrubinas aumentaron en el suero después de la obstrucción biliar; así como el grado de lipoperoxidación hepática, la actividad de las enzimas séricas FA, γ -GTP y TGP. Ultraestructuralmente, la obstrucción biliar produjo un desorden intracelular hepático, un hinchamiento de mitocondrias, retículo endoplásmico y dilatación del canalículo biliar.

El tratamiento con el ATMC previno la acumulación de colágena casi un 50% ($p < 0.05$). Lo anterior fué corroborado con los resultados histológicos en donde no se observa acumulación de colágena entre las células hepáticas, solamente alrededor de la vena central. Respecto a la cantidad de glucógeno hepático, se previno la pérdida del mismo con la administración del fármaco hasta casi un 100%. También se previno parcial, pero significativamente, el aumento de las bilirrubinas. El ATMC previno parcialmente los cambios ultraestructurales observados con la obstrucción biliar; principalmente en el canalículo biliar y las mitocondrias. El grado de lipoperoxidación hepática, la actividad de las enzimas séricas FA y γ -GTP se encontraron elevadas en la LCBC y en el tratamiento con ATMC previo a la LCBC. La sola administración del ATMC no produjo alteraciones en ratas normales.

El ATMC posee efectos hepatoprotectores similares a los de la colchicina, con la ventaja de que la baja toxicidad del ATMC comparada con la colchicina nos permite usar dosis más altas y efectivas sin los efectos secundarios observados en el tratamiento con ésta; sin embargo, es necesario hacer más estudios para conocer el mecanismo de acción del fármaco sobre la fibrosis y sus posibles efectos adversos para poder utilizarlo en la clínica.

INTRODUCCION

Generalidades.

El hígado es un órgano glandular complejo con múltiples funciones indispensables para la vida del organismo. En el hombre comprende del 2 al 3% del peso corporal, se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma (1), está formado por cuatro lóbulos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conectivo (cápsula de Glisson) (2).

El hígado es el centro de la actividad bioquímica del cuerpo. Supera a los otros órganos en cuanto a su diversidad y magnitud de reacciones químicas. Presenta una posición estratégica ya que se encuentra entre la circulación intestinal y general (Fig. 1) (3). Recibe la mayor parte de la sangre de la vena porta (aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo) y una porción menor de la arteria hepática. La vena porta transporta sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas y es rica en sustancias nutritivas pero pobre en oxígeno, mientras que la arteria hepática transporta sangre con alto contenido de oxígeno (4). Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos (Fig. 2). La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central (5).

La unidad estructural clásica del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido, que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro y la vena central pasa por el centro de éste (Fig. 2) (2).

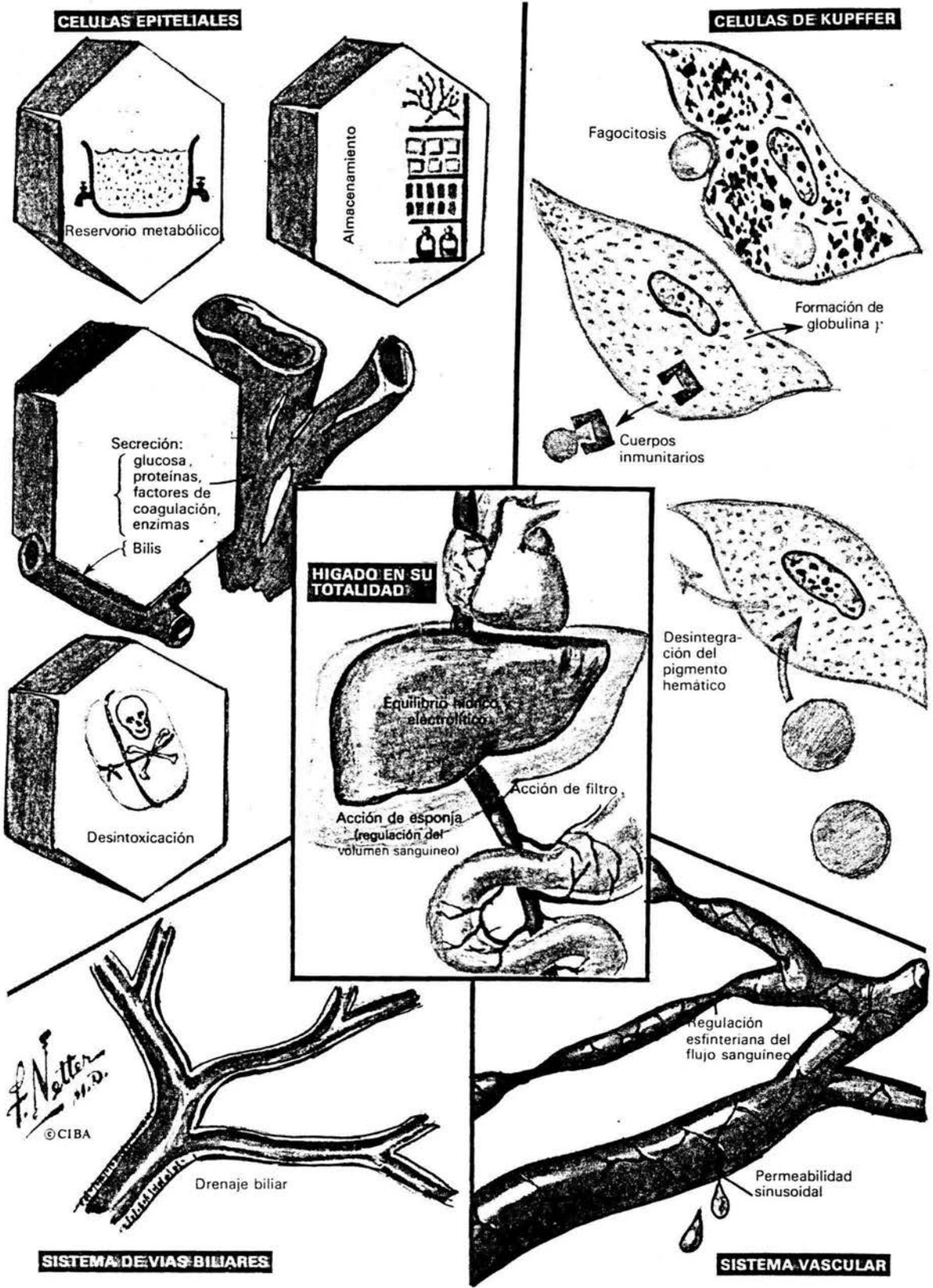


Figura 1. Funciones del hígado (3).

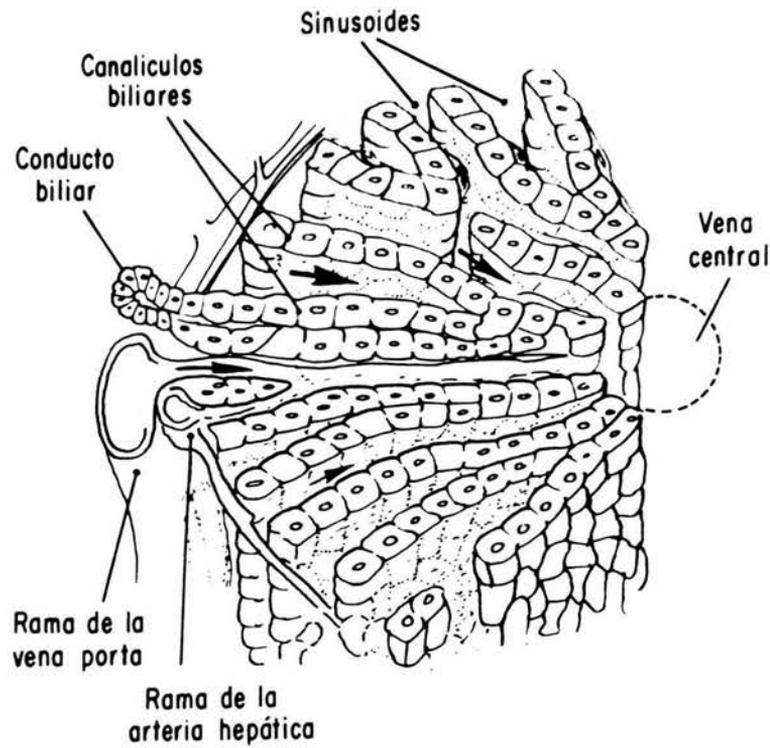


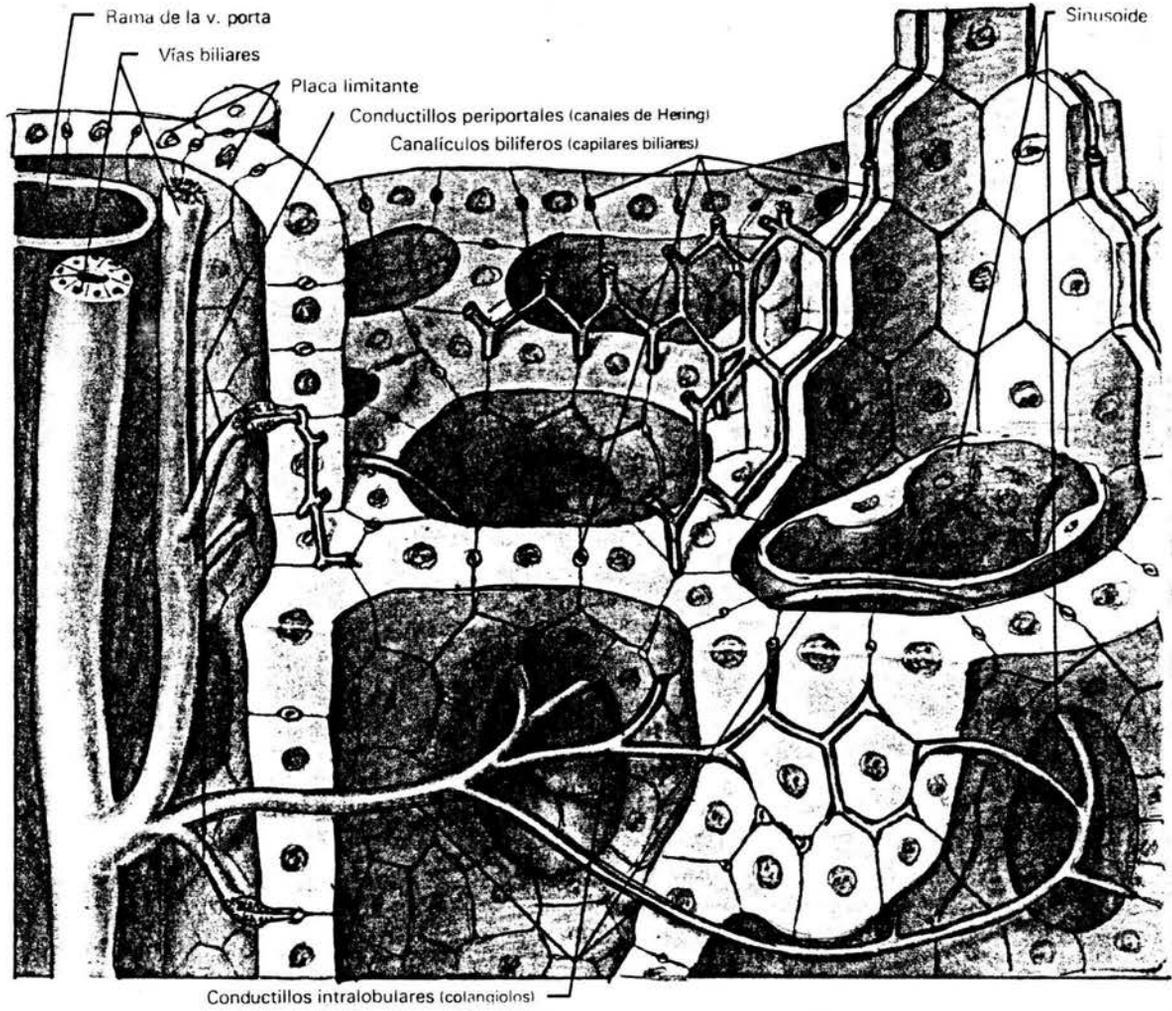
Figura 2. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situada en los canales portales, fluye a lo largo de los sinusoides y se vacía en la vena central (5).

La célula parenquimatosa del hígado es el hepatocito. Otras células del hígado son las células de kupffer, las células endoteliales que tapizan a los sinusoides y las células perisinusoidales estrelladas que almacenan grasa (6).

La bilis producida por las células parenquimatosas, es secretada en el interior de diminutos capilares o canálculos biliares que existen entre las células epiteliales glandulares. En la periferia del lobulillo, la bilis fluye hacia pequeños conductillos hepáticos y posteriormente hacia conductos biliares más grandes. El hígado está formado por aproximadamente un millón de unidades lobulillares (Fig. 3) (3).

El hígado funciona como una glándula de secreción exócrina y endócrina. La bilis, secreción exócrina de la célula hepática, fluye hacia el duodeno y tiene, entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina, que es el fosfolípido más importante y el colesterol son insolubles en agua, pero son capaces de formar micelas mixtas con las sales biliares, por lo cual permiten que se lleve a cabo la emulsificación de las grasas antes de su digestión. La sangre portal lleva los alimentos digeridos al órgano, en donde se almacenan carbohidratos (glucógeno), proteínas, vitaminas y algunos lípidos. Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatocito pueden ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa, o bien, ligadas a un transportador como los triglicéridos que salen formando parte de una lipoproteína (7).

La abundancia de macrófagos hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (8). Este órgano también lleva a cabo la desintoxicación del organismo por medio de reacciones químicas, tales como la oxidación, metilación, acetilación, esterificación y conjugación con ácido



Esquema tridimensional del sistema biliar intrahepático (según Hans Elias)

Figura 3. Esquema tridimensional del sistema biliar intrahepático (3).

glucurónico o glicina, de los cuales especialmente la última ha sido utilizada en el diagnóstico funcional de las enfermedades del hígado (3).

El Metabolismo de las Grasas.

El hígado recibe, procesa y distribuye todos los nutrientes contenidos en la dieta. Entre éstos se encuentran las grasas las cuales aportan los ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los lípidos de los tejidos y membranas celulares. Además, las grasas son una fuente importante de calorías y son necesarias para la absorción y utilización de las vitaminas liposolubles (9).

La grasa o lípidos de la dieta se digieren y se absorben de acuerdo con la siguiente secuencia:

- 1) Hidrólisis de los triglicéridos por la lipasa pancreática a ácidos grasos libres y glicéridos, los cuales se componen de un núcleo de glicerol que tiene unidas una o dos cadenas de ácidos grasos.
- 2) Formación de micelas por agregación de los ácidos grasos y los glicéridos con sales biliares.
- 3) Paso de los productos de la digestión de las grasas al interior de las células de la mucosa yeyunal (enterocito) en donde tiene lugar la esterificación y la formación de los quilomicrones.
- 4) Transporte de los quilomicrones de las células de la mucosa a los vasos linfáticos intestinales (10).

El colesterol realiza funciones importantes como es la de regular la fluidez y la función

de las membranas, servir de sustrato para la producción de hormonas esteroides en las suprarrenales y en las gónadas y como sustrato para la síntesis de ácidos biliares (11).

En la obesidad la bilis se encuentra sobresaturada debido a una elevada síntesis de colesterol, mientras que las dietas ricas en este compuesto incrementan su contenido en la bilis y por lo tanto aumentan el índice de saturación (12). Por esta razón se ha reportado que las personas obesas y las que tienen una dieta rica en grasa especialmente en colesterol tienen mayor riesgo de padecer una enfermedad obstruciva (13), si la obstrucción es completa y prolongada es muy probable que se presente un daño hepático como la cirrosis biliar secundaria (14).

Las Sales Biliares.

La bilis de los mamíferos tiene cuatro constituyentes principales: los ácidos biliares, los fosfolípidos, el colesterol y la bilirrubina (14). Se excreta en los capilares biliares, abandona el hígado a través del sistema de conductos biliares intrahepáticos y llega al duodeno a través de los conductos biliares extrahepáticos (4).

En el humano se excretan alrededor de 1500 ml diarios de bilis por el colédoco. La bilis proveniente del colédoco es una mezcla del líquido secretado por los hepatocitos (secreción canalicular) y las células de los conductillos (secreción de los conductillos) (11).

El colesterol hepático se convierte en los ácidos biliares "primarios" quenodesoxicólico y cólico. Cada día se convierten unos 400 mg de colesterol en ácidos biliares primarios en el ser humano. La síntesis de ácidos biliares es el único mecanismo importante del organismo para degradar el colesterol. Después de la conjugación con glicina o taurina en el hígado, éstos compuestos primarios se secretan con la bilis en el tracto gastrointestinal, donde se forman los

ácidos biliares "secundarios" (desoxicólico, litocólico y urodesoxicólico) como productos del metabolismo bacteriano. Posteriormente los ácidos biliares son absorbidos casi en su totalidad en el íleon y son regresados a través de la vena porta hacia el hígado, donde los hepatocitos los retiran de la sangre portal y los vuelven a excretar hacia la bilis durante la misma comida o la siguiente. Sólo una pequeña porción de los ácidos biliares se pierden cada día con las heces (15).

Los ácidos biliares tienen una acción digestiva o detergente debido a la presencia en su molécula de una parte hidrofílica o polar (grupos hidroxilos), y otra lipofílica o no polar (sistema anular esteroide) que se unen respectivamente a la fase acuosa o lipídica de las sustancias sobre las que actúan. Esta propiedad les permite emulsificar las grasas y participar en su absorción al formar micelas con los lípidos de la dieta. También tienen una acción colerética ya que aumentan el volumen de la secreción biliar por estimulación hepática (16).

La bilirrubina (pigmento biliar más característico) se forma a partir de la destrucción de los glóbulos rojos, con la pérdida del grupo hem del complejo hemo-globina, separándose de los otros pigmentos biliares pasando por el bazo e hígado. La bilirrubina pasa a la sangre y se transporta unida a la albúmina hasta el hígado para su conjugación, eliminándose posteriormente en la bilis a través del intestino en las heces (16).

Las Enfermedades Hepáticas Obstructivas.

Las sales biliares tienen una acción detergente sobre las grasas de la dieta pero cuando existe un proceso patológico como la colestasis, estas sales se empiezan a acumular en los conductos biliares e hígado y se inicia su acción detergente solubilizando los fosfolípidos y las

enzimas de las membranas de los hepatocitos y células del tracto biliar (17). La colestasis se puede definir como la insuficiencia hepática excretora o si se quiere ser más específico como toda interferencia con la excreción biliar o la reducción en el flujo biliar (18). Además, la colestasis se puede clasificar en intrahepática cuando existe un defecto funcional de la formación de la bilis dentro del hepatocito, y en extrahepática cuando existe una obstrucción del flujo biliar dentro del tracto biliar (Fig. 4) (19).

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

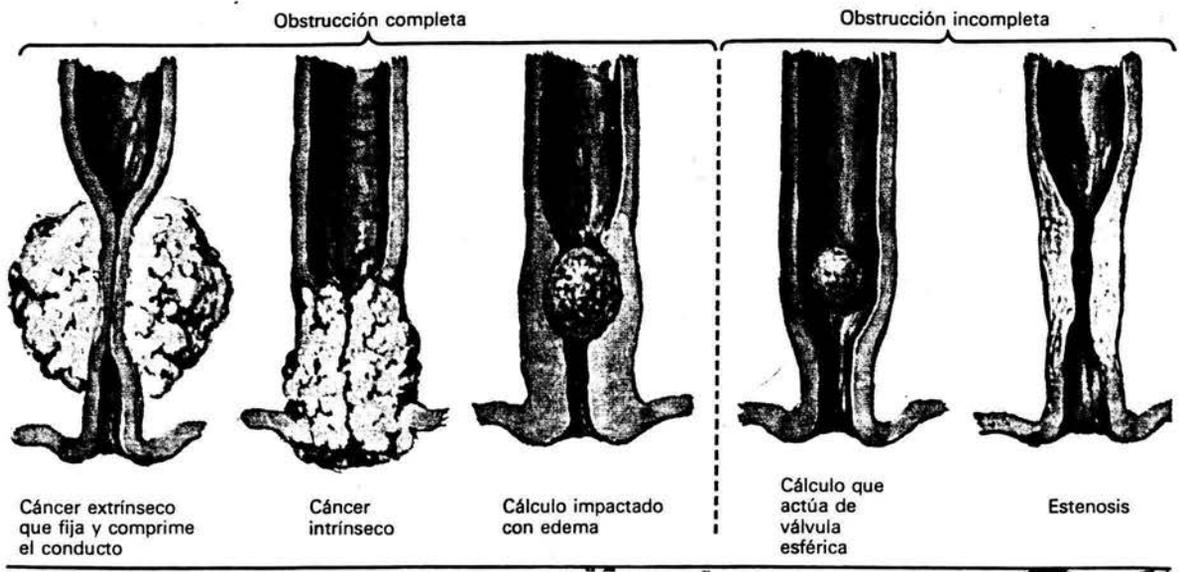


Figura 4. Obstrucción biliar extrahepática (3).

teñir. En las fases finales de obstrucción, las lesiones hepatocelulares secundarias pueden ser graves y terminar en anomalías que indican degeneración de la célula hepática (4).

Clínicamente la colestasis se refleja por la aparición en la sangre de sustancias como bilirrubina, ácidos biliares y colesterol que en condiciones normales se excretan con la bilis. Desde el punto de vista bioquímico la colestasis se caracteriza por elevaciones desproporcionadas de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica y/o de la concentración de bilirrubina sérica en relación con las elevaciones séricas de las transaminasas. Sin embargo, la sola hiperbilirrubinemia, que se manifiesta clínicamente como ictericia, no significa colestasis (20).

La cirrosis biliar primaria (CBP); también conocida como colangitis destructiva no supurada crónica es un síndrome colestático crónico progresivo, de etiología desconocida que afecta con preferencia a mujeres entre la sexta y séptima década de la vida. Según estudios epidemiológicos la CBP produce del 0.6 al 2% de las muertes por cirrosis. La colangitis esclerosante primaria (CEP) es un trastorno inflamatorio progresivo crónico que afecta de preferencia a los conductos biliares intrahepáticos y conduce eventualmente a la fibrosis y estenosis del tracto biliar (20).

Dentro de las colestasis extrahepáticas tenemos a los cálculos biliares (Litiasis Biliar), éste es un padecimiento metabólico multifocal que se produce por precipitación físico-química de los componentes de la bilis. De acuerdo a su composición, los cálculos se clasifican en cálculos de colesterol, cálculos de pigmentos biliares y cálculos mixtos. En general todos éstos tienen los mismos componentes, pero en diferentes proporciones (21). La cirrosis biliar secundaria (CBS) es el producto de una obstrucción extrahepática prolongada, morfológicamente se caracteriza por dilatación de las vías biliares intrahepáticas o por colangitis esclerosante junto

con colestasis severa que progresa a la formación de lagos e infartos biliares (19).

La obstrucción biliar extrahepática puede ser completa, incompleta o intermitente. Y puede ser causada por un cáncer extrínseco o intrínseco, por un cálculo y por estenosis. La obstrucción mecánica lleva rápidamente a la dilatación del sistema biliar por encima del lugar de obstrucción (4) (Fig. 4).

Los padecimientos que causan obstrucción de las vías biliares constituyen un reto para el diagnóstico y el manejo adecuado del individuo, sumado a los problemas agregados que frecuentemente acompañan al enfermo icterico, lo que redundo en una mortalidad que llega hasta el 34% (21).

El término cirrosis biliar se aplica a varios tipos de cirrosis etiológica y morfológicamente distintas, todos los cuales tienen en común una larga historia de colestasis extra o intrahepática y morfológicamente un hígado aumentado de volumen finamente granular y con una coloración verdosa cuya intensidad varía con el grado de ictericia (4).

Cuando el daño hepatocelular producido es masivo, la pérdida súbita del parénquima funcional estimula la regeneración hepática (Fig. 5) (22). La regeneración hepática es un proceso coordinado que incluye regeneración celular, síntesis y degradación de colágena que da lugar a la remodelación del tejido. Si el daño es único y el paciente sobrevive debido al buen funcionamiento de las células hepáticas remanentes o por las medidas médicas utilizadas, el hígado regenera rápidamente y en pocas semanas se reestablece su integridad anatómica y funcional (23). En estos casos no es posible encontrar depósitos de colágena anormales en el hígado.

Cuando el daño es de menor intensidad y el número de células destruidas es pequeño,

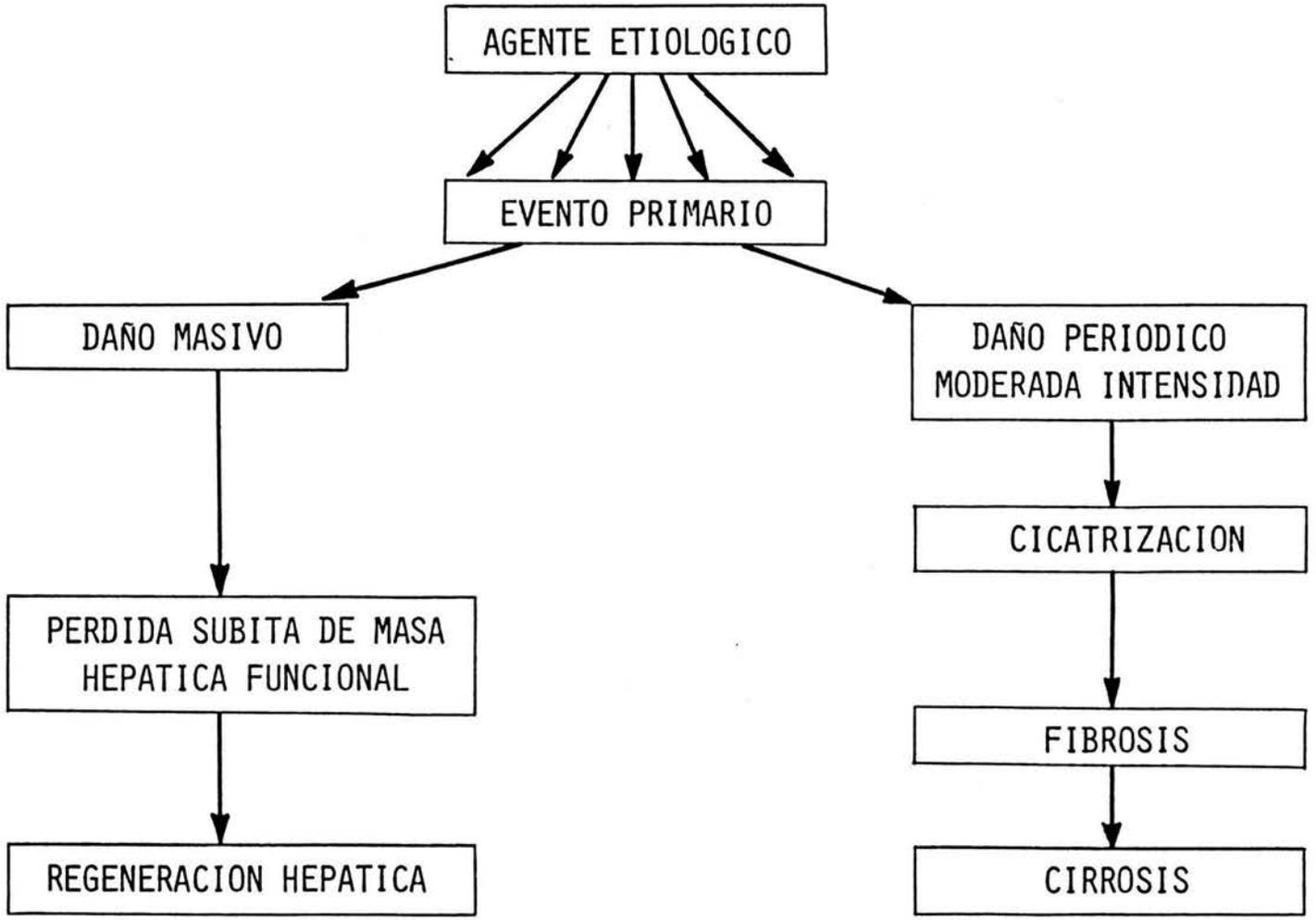


Figura 5. Efecto de agentes hepatotóxicos.

no se estimula la regeneración y sólo se produce una pequeña cicatriz. Si el estímulo lesivo es único, existe remodelación y reabsorción del tejido cicatricial. Cuando la lesión se vuelve a producir, ya sea porque el agente inductor esté presente o porque se estimulen mecanismos inmunológicos que perpetúan la enfermedad, tales como la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de la membrana de los hepatocitos, antígenos virales, proteínas contráctiles del citoplasma, etc., el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero fibrosis y posteriormente cirrosis hepática (Fig. 4). Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente, y el proceso cicatricial predomina (24, 25).

El mecanismo exacto de la estimulación de la respuesta fibrogénica se desconoce; sin embargo, hay datos experimentales que sugieren que los macrófagos desempeñan un papel preponderante en el proceso. Los agentes etiológicos actuando directamente, o a través de sustancias liberadas por los hepatocitos dañados, son capaces de producir una serie de compuestos químicos de diversa naturaleza que estimulan la producción de colágena, produciendo cambios importantes en el metabolismo del tejido conjuntivo en general (26) y del glucógeno hepático en particular (27). Por otra parte, se ha encontrado que la glucoproteína llamada fibronectina que también se libera de los hepatocitos es un agente quimiotáctico que puede dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (28). El cambio en los elementos celulares (aumento de fibroblastos y células inflamatorias), así como la modificación en la matriz extracelular producida localmente, pueden estimular la producción de tejido conjuntivo cicatricial.

Todos los tipos de colágena hepática se encuentran aumentados en la cirrosis. En cuanto a su distribución, se ha observado que todos los tipos se encuentran mezclados en prácticamente

todos los sitios. En especial, en las bandas de tejido conjuntivo que rodean a los hepatocitos se han demostrado todas las variedades genéticas propias del hígado (24-26).

El aumento del contenido de tejido conjuntivo hepático puede deberse a un incremento en su síntesis, a una disminución en su degradación, o a una combinación de ambos factores. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que durante las fases iniciales del proceso, la acumulación de colágena se debe preferentemente a un aumento en su biosíntesis. Tanto en hígados humanos como en hígados de animales tratados con tetracloruro de carbono (CCl_4) o infectados con esquistosomas, la incorporación de prolina en la colágena está aumentada (14-18). La actividad colagenolítica puede encontrarse normal o incluso aumentada (29, 30).

Existen numerosas evidencias en la literatura que muestran que en el hígado cirrótico se presentan alteraciones no sólo en el metabolismo del tejido conjuntivo sino también en las células parenquimatosas (28).

Se ha visto que el hígado es un órgano que muy frecuentemente se ve afectado por una gran variedad de patologías entre las que pueden citarse los trastornos vasculares, metabólicos, tóxicos, obstructivos y neoplásicos y en algunos países como el nuestro, por las parasitosis y micosis. Resulta comunmente dañado debido a que es el principal componente del cuerpo humano responsable del metabolismo de una gran diversidad de agentes químicos y biológicos. Estos agentes pueden ser tanto endógenos como exógenos y pueden actuar directamente o después de ser transformados metabólicamente para alterar las estructuras y funciones normales de las células hepáticas (30).

El hígado juega un papel central en el control de la homeostasis metabólica y consecuentemente cualquier lesión hepática alterará los procesos celulares normales y conducirá

a varios grados de disfunción hepatocelular. De ahí que las enfermedades hepáticas constituyan un problema de salud muy importante que incapacita o lleva a la muerte a un gran número de personas en edad productiva (31).

El Modelo de Daño Hepático Producido por la Ligadura del Conducto Biliar Común en la Rata.

Por la importancia de las enfermedades hepáticas surgió la necesidad de crear modelos experimentales de daño hepático en los cuales se pudieran reproducir las alteraciones que se observan en estos padecimientos. Existen algunos modelos experimentales para producir daño hepático, uno de los cuales consiste en producir una obstrucción biliar completa mediante la ligadura del conducto biliar común. Este modelo llega a producir un daño muy similar al que producen las obstrucciones biliares extrahepáticas, su mecanismo de acción se basa en que los ácidos biliares sufren regurgitación hacia el hígado en donde al acumularse y por su acción detergente provocan daño en la membrana de los hepatocitos (32).

El modelo experimental de ligadura del conducto biliar común (LCBC) en la rata ha dado muy buenos resultados para reproducir tanto la fase aguda como la fase crónica de la enfermedad.

Evaluación del Daño Hepático.

La diversa naturaleza de la actividad funcional del hígado y su variedad de respuestas al daño, hace de la selección de los marcadores de daño hepático, una labor difícil.

Ninguna de las pruebas de función hepática es contundente para el análisis clínico de la

mayoría de los problemas hepáticos. Una enfermedad leve, aunque difusa, tal como la hepatitis viral o la cirrosis hepática inicial, causa cambios en varias pruebas de función del hígado. Las pruebas de funcionamiento hepático, y especialmente las alteraciones de las actividades enzimáticas en suero, proporcionan en gran número de casos, la primera sospecha de algún trastorno del hígado (33).

La determinación de la actividad de las enzimas hepáticas liberadas a la sangre debido al daño hepático, se ha vuelto una de las herramientas más útiles en los estudios de hepatotoxicidad. La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para determinar el daño hepático fue introducida en 1933 y 1940 al demostrar la actividad sérica anormal de la fosfatasa alcalina (FA) y colinesterasa en el daño hepático (34).

Sin embargo, el descubrimiento en 1950 de que la actividad de las diferentes transaminasas séricas estaban aumentadas por destrucción de los tejidos (35), representó un verdadero avance en el diagnóstico por métodos enzimáticos séricos. Subsecuentemente se han identificado en la sangre, otras enzimas con actividad anormal en presencia de daño hepático.

Zimmerman (36) ha clasificado a las principales enzimas séricas basándose en su especificidad y sensibilidad a diferentes tipos de daño hepático.

- 1º. Enzimas cuya elevada actividad sérica refleja más sensiblemente daño colestático que daño parenquimatoso, como la FA, 5'nucleotidasa y la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP). Esta última enzima como es una transferasa también es conocida como γ -glutamyl transferasa.
- 2º. Un grupo de enzimas que se encuentran principalmente en el hígado que son útiles en el diagnóstico de enfermedades hepáticas y que su aumento en suero nos indica daño en el

parénquima hepático, aunque también se pueden encontrar en tejidos extrahepáticos. En este grupo se encuentran la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), la transaminasa glutámico pirúvica (TGP), también llamada alanina aminotransferasa (ALAT) y la lactato deshidrogenasa, ornitil carbamil transferasa y la sorbitol deshidrogenasa. Estas enzimas pueden ser usadas particularmente en el estudio de agentes que puedan causar daño hepático.

3º. Enzimas que son insensibles al daño hepático, pero que se encuentran elevadas por daño a tejidos extrahepáticos, como la creatina fosfocinasa (CPK).

4º. Enzimas con actividad sérica deprimida por daño hepático, como la colinesterasa (CHE).

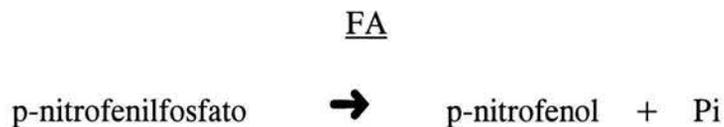
El hígado tiene la función normal de secretar la bilirrubina en la bilis. Esto ha dado motivo para medir la capacidad que tiene el hígado para remover la bilirrubina de la sangre y excretarla en la bilis y de esta manera considerarla como otra prueba de funcionamiento hepático (37).

La actividad total de la FA sérica corresponde a la que poseen diferentes isoenzimas cuya especificidad para el sustrato es baja y cuya acción característica consiste en catalizar a pH alcalino la hidrólisis de muy diferentes ésteres de fosfato. En el hombre se ha demostrado la presencia de fosfatasa alcalina en los huesos, en el epitelio de los canalículos biliares del hígado, en la placenta y en las células blancas. En el hepatocito se localiza en la membrana sinusoidal, canalicular y en el citosol (2). Su actividad específica es de dos a cinco veces mayor en la región canalicular que en la sinusoidal de la membrana (37, 38).

El hígado contiene relativamente poca fosfatasa alcalina en comparación con órganos tales como el intestino delgado y el riñón (38). La distribución de la FA en la rata presenta algunas

discrepancias. Watchein (35) no encontró actividad de la enzima en la porción sinusoidal y solamente vió una distribución irregular en el canalículo biliar. Sandstrom (37), también encontró mucha actividad de fosfatasa alcalina en el canalículo biliar. La FA se distribuye en el lobulillo hepático principalmente en la porción sinusoidal.

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



La función de la FA no está bien entendida. En general se considera que está encargada de la hidrólisis de ésteres de fosfato. Se ha visto que todas las fosfatasas alcalinas son capaces de transferir grupos fosfato de un alcohol a otro (38). Se ha sugerido que esta enzima ayuda a mantener el estado intracelular estacionario de los metabolitos fosforilados (39).

La FA es una ectoenzima y se localiza en la superficie externa de la membrana plasmática del hepatocito. Su actividad específica es de dos a cinco veces mayor en el dominio canalicular que en el sinusoidal de la membrana de dicho tipo celular (39). En el mismo se han reportado niveles elevados de FA en individuos alcohólicos (40), en ratas tratadas con etanol (41), con CCl₄, con galactosamina, con alcohol alílico, con faloidina, con amanitina y en la hepatitis reactiva inespecífica (42-44).

Teschke y colaboradores (45) han reportado que el hígado graso en humanos está asociado con niveles hepáticos altos de FA; sin embargo, el mecanismo por el cual se modifica

la actividad de la FA permanece oscuro.

La γ -GTP cataliza la transferencia de un resto glutámico de un péptido a un L-aminoácido o a otro péptido. El glutatión es el péptido más conocido y constituye probablemente el sustrato natural de la reacción (46). Está ampliamente distribuida en los tejidos de los mamíferos y se ha encontrado en un gran número de estructuras epiteliales generalmente involucradas en procesos de absorción o secreción tales como el epitelio del túbulo proximal renal, las vellosidades del yeyuno, los plexos coroideos, los conductos biliares y las vesículas seminales, etc.

En el hombre se encuentra en los siguientes órganos: riñones, vesícula seminal, páncreas, hígado, bazo, corazón y cerebro (18). Gran parte de la actividad sérica normal de la γ -GTP es de origen hepático (46). Presenta relativamente baja especificidad con respecto al donador gamma-glutámico, lo que permite su cuantificación mediante métodos colorimétricos sencillos (47). Dicha enzima se encuentra en mayor abundancia en el dominio canalicular de la membrana plasmática del hepatocito; es producida a lo largo del tracto biliar íntegro, desde el canalículo biliar hasta en conducto biliar común (46, 47) y se ve modificada por el daño hepático (45) por lo que sirve como indicador del mismo.

La actividad sérica de la FA y de la γ -GTP aumenta durante la colestasis o daño hepatobiliar en humanos (48). La actividad sérica aumentada de estas enzimas además de originarse por la regurgitación de la bilis (49) como ocurre con otras enzimas, también se debe a que su síntesis se estimula durante la colestasis. La síntesis de FA se estimula en la célula hepática (46, 50, 51), mientras que en las células del epitelio biliar se induce la síntesis de la γ -GTP (52).

Otro de los sistemas enzimáticos importantes para la célula hepática es el de la adenilato ciclasa. Esta enzima regula múltiples funciones celulares a través del producto de su catálisis: el AMPc. Reportes de estudios previos demostraron que en la cirrosis hepática, la actividad de esta enzima se encuentra elevada y también el nivel intracelular de AMPc se encuentra elevado (53). De la misma manera el glucógeno que constituye una fuente de energía para la célula hepática se halla muy disminuído (54).

La TGP, ahora llamada alanino aminotransferasa (ALAT) es una de las enzimas más usadas para identificar la presencia de daño hepatocelular en animales. A pesar de que la TGP puede estar presente en varios tejidos, su mayor concentración está dentro de los hepatocitos. Esta enzima se localiza en mitocondria y predominantemente en el citosol y su concentración dentro de la célula es 10,000 veces más grande que en el suero. En presencia de una obstrucción biliar el aumento de la presión o la acción de la bilis puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular ocasionando la salida de las transaminasas de la célula hacia la circulación general (48, 55). Por lo tanto, la degradación de los lípidos de membrana es considerado un factor crítico que conduce a la muerte celular (17).

Por otra parte, sabemos que la glucosa aporta la energía necesaria para los procesos metabólicos que ocurren en el organismo. La glucosa se almacena en forma de glucógeno en el hígado, de tal manera que cuando es requerida en el organismo, se lleva a cabo la glucogenólisis y así se tiene la glucosa necesaria en circulación para los procesos metabólicos. Cuando el almacenamiento del glucógeno se ve afectado, esto puede traer como consecuencia alteraciones a nivel del metabolismo o falta del aporte necesario de energía (4).

La peroxidación lipídica refleja la interacción entre el oxígeno molecular y los ácidos

grasos poliinsaturados hasta un deterioro oxidativo de estos últimos. El lugar donde se realizan dichas reacciones son las membranas biológicas; por lo tanto se puede asumir que un daño a este nivel desacoplaría una serie de funciones celulares y subcelulares. De hecho, la peroxidación lipídica se ha asociado con procesos fisiológicos, patofisiológicos y tóxicos graves incluyendo la biosíntesis de prostaglandinas y principalmente reacciones tóxicas en varios órganos. También se ha sufrido que la peroxidación puede ser una consecuencia del daño celular (56).

El análisis del potencial hepatotóxico de un agente químico se completa con la descripción histológica de la lesión producida. La microscopía de luz es un método tradicional para demostrar y definir el tipo de daño hepático. Las anormalidades bioquímicas observadas en este tipo de daño pueden apoyarse con la evidencia de esteatosis o necrosis demostrable por medio de la microscopía óptica y electrónica.

Antecedentes

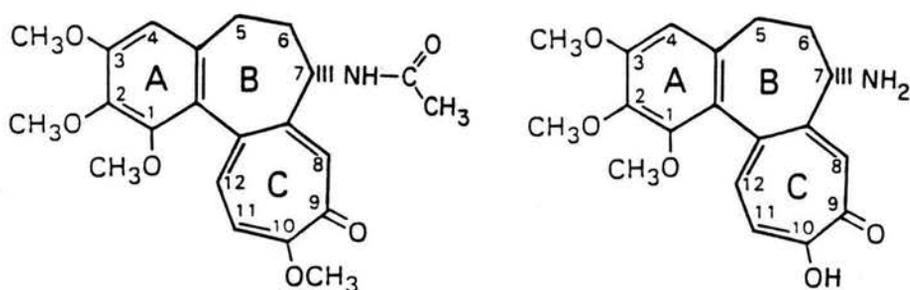
Se han reportado numerosos fármacos que protegen al hígado después de una intoxicación con tetracloruros compuestos (CCl_4), por el empleo de otros fármacos como la galcatosamina y el acetaminofén o por manipulaciones fisiológicas (LCBC); destacando entre ellos la silimarina (57), colchicina (58) y la colchiceína (59).

La colchicina es un alcaloide derivado del *Colchicum autumnale*, el cual ha tenido efectos benéficos en pacientes cirróticos (60), así como en los trastornos agudos de gota (61). De igual manera Warnes y cols. (62) demostraron efectos benéficos de la colchicina en la cirrosis biliar primaria. Dicho fármaco inhibe la secreción de las moléculas de procolágena en la matriz extracelular (63); no obstante, los efectos benéficos de la colchicina sobre la cirrosis hepática

han sido modestos ya que sólo se aplica una pequeña dosis (1 mg por día durante cinco días por semana) debido a que produce efectos secundarios y posee alta toxicidad (63-66); dicha toxicidad ha sido atribuída a su habilidad para unirse a proteínas de los microtúbulos (65-66).

Se ha observado que algunas moléculas derivadas de la colchicina poseen la capacidad de unirse a proteínas microtubulares, lo que les confiere una función de antimitóticos y en el caso de la colchicina le confiere efectos antigota; algunas de estas moléculas son la colchiceinamida y demecolcina entre otros. Existen también otros análogos de colchicina que no tienen efecto antimitótico, entre éstos figuran la isocolchicina, isocolchiceinamida, colchiceína y el ácido trimetilcolchicínico (ATMC) (67).

El ATMC es un derivado de la colchicina que es menos tóxico y se ha probado en pacientes con gota aguda, en los cuales se observaron efectos benéficos parciales (68). Este fármaco difiere de la colchicina en que el radical acetilo de la cadena lateral del segundo anillo es removido y el grupo hidroxilo substituído por el grupo metoxilo del lado de la cadena lateral del tercer anillo.



Colchicina

Acido trimetilcolchicínico

Es importante mencionar que el ATMC metil-éter (también llamado ATMC erróneamente por algunos autores) tiene efectos benéficos sobre diversas enfermedades, principalmente de origen tumoral; sin embargo, también se ha observado que es muy tóxico y posee un efecto antimitótico (69).

En el laboratorio se realizaron algunas pruebas con diferentes dosis de ATMC (10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$) para determinar una dosis adecuada para proteger al hígado del daño por obstrucción biliar. Se observó que a la dosis de 100 μg se obtuvo un mejor resultado.

En base a lo anterior, el presente estudio se realizó con la finalidad de conocer la capacidad del ATMC para prevenir el daño hepático crónico en el modelo de ligadura del conducto biliar común en ratas, así como determinar su efecto sobre la acumulación de colágena hepática (fibrosis). Ya que si los procesos fibrogénicos se detectaran tempranamente y fueran frenados, el desarrollo de las hepatopatías crónicas del hígado (cirrosis) se podrían prevenir en un alto porcentaje, así como la alta tasa de mortalidad que existe debido a este tipo de enfermedades.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad de prevención del ATMC a nivel bioquímico histológico y ultraestructural, sobre el daño hepático crónico inducido por la obstrucción biliar en la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para la evaluación del efecto hepatoprotector del ATMC sobre el daño crónico se llevarán a cabo los siguientes objetivos:

1. Determinar bioquímicamente (a nivel de enzimas séricas y bilirrubinas) la capacidad hepatoprotectora del ATMC en la rata.
2. Evaluar histopatológica y ultraestructuralmente el efecto del tratamiento con ATMC sobre el daño producido por la obstrucción biliar.
3. Evaluar la respuesta fibrogénica en el tratamiento con ATMC sobre el modelo de daño hepático utilizado.

METODOLOGIA

Diseño Experimental.

Se utilizaron 4 grupos de 6 ratas Wistar machos de 200-300 gramos. Se formó un grupo de ratas para realizar operaciones falsas que consistieron en la manipulación de tejidos y órganos sin ligar el conducto biliar común. Se utilizó un grupo de ratas que fueron ligadas del conducto biliar común (LCBC) durante 8 semanas, a otro grupo se le administró el ATMC durante el daño crónico provocado por la LCBC y por último se formó un grupo de ratas que se trataron con ATMC solamente. El fármaco se administró a una dosis de 100 μg / rata/ día por vía intragástrica.

Procedimiento para ligar el conducto biliar común.

1. Las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a una dosis de 25.2 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal.
2. Una vez anestesiadas las ratas, se procede a eliminar el pelo de la región abdominal para facilitar la manipulación de los tejidos.
3. Posteriormente se realiza la antisepsia de la región quirúrgica con torundas de gasa remojadas con benzalconio al 1%.
4. Se procede a incidir los tejidos de la región abdominal, iniciando con la piel y continuando con el peritoneo. Esta incisión se hace de una longitud de 2-3 cm.
5. Visualizada la cavidad abdominal, se procede a sacar cuidadosamente el hígado, puesto que el conducto biliar común se encuentra por debajo de éste.
6. Localizado el conducto biliar común, se desprende de las membranas que lo unen a la

vena porta y al intestino delgado.

7. Con la ayuda de las pinzas y procurando no causar ningún daño a la vena porta, se liga el conducto biliar común en dos diferentes partes, con hilo de seda (material de tipo no absorbible).
8. Una vez ligado el conducto biliar común, el hígado se introduce nuevamente a la cavidad abdominal y se procede a unir los tejidos incididos por medio de suturas, que se hacen de la siguiente manera:
 - a). El peritoneo se une por medio de suturas continuas por el procedimiento llamado surgete anclado o entrelazado utilizando para esto hilo absorbible (Catgut crómico 4-0).
 - b). Para unir la piel se utilizan suturas aisladas por medio del procedimiento llamado puntos separados, para lo cual se utiliza material no absorbible como lo es el nylon de monofilamento.
9. Una vez unidos los tejidos incididos se hace nuevamente la antisepsia a la región quirúrgica, para que después las ratas se recuperen del efecto de la anestesia.
10. Una vez recuperadas, se colocan en condominios de jaulas de acero inoxidable con el fin de evitar infecciones.

Las ratas tratadas de esta manera permanecieron ligadas durante ocho semanas para provocar la cirrosis biliar. Cada grupo de ratas fue operado y sacrificado en conjunto.

Procedimiento para el sacrificio de las ratas.

El sacrificio de las ratas se realiza de la siguiente manera:

1. Las ratas se colocan en una cámara que contiene éter concentrado para inducir la

anestesia.

2. Con la ayuda de material quirúrgico se procede a abrir a la rata en sus cavidades abdominal y torácica para obtener de esta forma la muestra de sangre y la muestra de hígado, las cuales siempre se mantienen en hielo.
3. La muestra de sangre se obtiene por punción cardiaca, colocando la sangre en tubos de ensayo, se centrifuga (Centrífuga Beckman Modelo TJ-6) a una temperatura de 4°C y a 3000g. De esta manera se obtiene el suero que es mantenido en hielo para sus posteriores determinaciones bioquímicas.

Se extrae el hígado, el cual se pasa por solución salina fisiológica para limpiarlo de impurezas. Las muestras se mantienen en hielo para las determinaciones bioquímicas, cortes histológicos para microscopía óptica y electrónica, así como para determinación de colágena hepática.

Determinaciones Bioquímicas.

Determinación del Grado de Lipoperoxidación por el Método del Acido Tiobarbitúrico (TBA).

El método se fundamenta en que dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un pigmento rojo, el cuál tiene un máximo de absorción en solución ácida a 532 nm. El coeficiente de extinción molar del complejo colorido a 535 nm es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (71).

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM pH = 7.4
- Acido Tricloroacético (TCA) al 15%.
- Acido Tiobarbitúrico 0.375% en TCA al 15%.

Técnica:

1. Se homogeneizan 0.5 g. de hígado con 5 ml de agua tridestilada con lo cual se obtiene un homogenado al 10% P/V.
2. Se toman 300 μ l del homogenado y se completa a 1 ml con Tris-HCl 150 mM pH 7.4.
3. Se incuba a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Al término de este tiempo a cada muestra se le adicionan 2 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.375% disuelto en TCA al 15%.
4. Los tubos se incuban en baño maría de agua hirviendo durante 15 min.
5. Se centrifugan a 4000 g durante 10 minutos.
6. El sobrenadante se lee a 532 nm de absorbancia.

Clculos:

$$C = \frac{A}{\xi l}$$

Donde:

A es la absorbancia de la muestra.

l es la longitud de la celda.

ξ es el coeficiente de extinción del MDA = 1.56×10^5 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

Nota: Se hace una dilución 1:10 del homogenado y se toman 20 μ l para determinar proteínas. El resultado se expresa como nmoles de MDA/mg de proteína.

Determinación del contenido total de proteínas.

La determinación del contenido de proteínas totales se llevó a cabo utilizando el método de Bradford que se basa en la unión de azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. El azul brillante de Coomassie G-250 muestra dos formas de coloración, azul y rojo. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas.

El complejo colorante-proteína presenta una absorción máxima a 595 nm. El proceso de formación del complejo colorante-proteínas es virtualmente completo, rápido y permanece en solución por un tiempo relativamente largo (aproximadamente una hora) (72).

Método de Bradford

Reactivo de Bradford:

Acido fosfórico 85%.....	100 ml.
Alcohol etílico 95%.....	50 ml.
Azul de Coomassie G-250.....	100 ml
H ₂ O cbp.....	1000 ml

Técnica:

1. Se toman 100 μ l de homogenado de hígado utilizado para la determinación del grado de lipoperoxidación y se lleva a 1 ml con agua tridestilada.
2. De la dilución anterior se toman 20 μ l y se agregan 80 μ l de agua tridestilada.
3. Se prepara un blanco que consiste en 100 μ l de agua tridestilada.
4. Se añade tanto a los tubos con muestra como al blanco 2.5 ml del reactivo de Bradford.

5. Se agitan y se lee la absorbancia a 595 nm.
6. La concentración de la muestra se determina utilizando la media de la ecuación de la recta de nuestra curva estándar.

Determinación de bilirrubina total y bilirrubina directa.

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado un colorante azoico, que en solución neutra es rojo y azul en solución alcalina. El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente, mientras que la bilirrubina indirecta libre reacciona sólo en presencia de un acelerador.

Bilirrubina total.

La bilirrubina total en suero o plasma se determina por copulación con el ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución de Fehling se forma azobilirrubina azul, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (coloración mixta verde) de manera selectiva por fotometría a 578 nm (73).

Técnica: (Kit Merck-México)

	Problema	Blanco
Acido sulfanílico	0.2 ml	0.2 ml
Nitrito de sodio	1 gota	-----

Acelerador	1.0 ml	1.0 ml
Suero	0.2 ml	0.2 ml

Mezclar y dejar reposar de 10 a 60 minutos a temperatura entre 15°C --- 25°C.

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

Mezclar, medir a 578 nm de absorbancia los problemas al cabo de 5 a 30 minutos contra agua destilada y, en caso necesario, contra el blanco.

Cálculo:

Medición frente a un blanco:

Concentración de bilirrubina total = Abs. x 180 μ mol/l.

Bilirrubina directa.

La bilirrubina directa se mide sin añadir álcali como colorante azoico rojo a 546 nm.

(73).

Técnica: (Kit Merck-México)

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

Mezclar inmediatamente, dejar reposar a temperatura entre 15°C y 25°C. A los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, medir a 546 nm las extinciones de los problemas contra el blanco.

Cálculo:

Concentración de bilirrubina directa = Abs. x 240 $\mu\text{mol/l}$.

La bilirrubina indirecta se obtiene de la diferencia entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa.

Determinación de la actividad de la alanina amino transferasa sérica (Transaminasa glutámico pirúvica -TGP).

La actividad de la TGP se determinó por el método de Reitman-Frankel (74), en el que se mide el complejo formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la alanina y el alfa-oxoglutarato, complejo colorido que absorbe a 515 nm.

Método de Reitman-Frankel .

Reactivos:

1. Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Se prepara mezclando 840 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.
2. Solución de sustrato. Se disuelven 1.78 g de D-1-alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añaden 0.5 ml de hidróxido de sodio 1N. y se completa hasta 100 ml con la solución buffer. Se conserva a 4°C.
3. Reactivo cromógeno (2-4-dinitrofenilhidrazina). Se disuelven 200 mg de 2,4-

dinitrofenilhidrazina en HCl 1 N. caliente y se completa hasta un litro con HCl 1N. La solución que se prepara es 1 mM.

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

Técnica:

Reactivos		Blanco
Problema		
Solución sustrato D-1-alanina	250 μl	250 μl
Suero problema	-----	50 μl
Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 60 minutos.		
Reactivo cromógeno	250 μl	250 μl
Incubar 5 min. a 37°C		
Suero problema	50 μl	-----
Incubar 15 min. a 37°C		
Agregar NaOH 0.4 N para detener la reacción	2.5 ml	2.5 ml

Leer a 515 nm calibrando con blanco de agua. Se resta la absorbancia del blanco de muestra a la respectiva absorbancia del suero problema, posteriormente interpolando en la curva estándar de piruvato se determina la actividad de la enzima.

Determinación de la Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa.

En este método se utiliza como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la

enzima γ -glutamil transpeptidasa y de un receptor del grupo γ -1-glutamil (como es la glicil glicina), produce γ -1-glutamilglicil-glicina y p-nitroanilina que puede ser cuantificada espectrofotométricamente (75).

Técnica:

1. En un tubo de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm se agregan los siguientes reactivos:
 - 400 μ l de tris-HCl 200 mM (pH 8.2)
 - 100 μ l de $MgCl_2$ 200 mM
 - 100 μ l de glicil-glicina 40 mM. pH 8.2
 - 200 μ l de γ -glutamil-p-nitroanilida 10 mM.
2. La mezcla de reacción se incuba en un baño maría a 37°C durante 10 min, y se inicia la reacción agregando 200 μ l de suero. Se agita bien la mezcla y se introduce en el baño maría a 37°C.
3. La reacción enzimática se detiene a los 30 minutos después de haberse iniciado, agregando 2 ml de ácido acético 1.5 M.
4. La absorbancia de cada tubo se lee a 410 nm en el espectrofotómetro, determinandose la p-nitroanilina producida. La concentración de enzima se determina utilizando la media de la curva estándar.

Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y p-nitrophenol, el cual se lee a 410 nm (76).

Técnica:

1. En un tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 se agregan los siguientes reactivos:
 - 0.25 ml de buffer de glicina 0.1 M y $MgCl_2$ 1 mM pH 10.5
 - 0.25 ml de sustrato de p-nitrofenilfosfato el cual se prepara disolviendo 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 ml de agua destilada.
2. Esta mezcla se incuba en un baño maría a 37°C por 5 min.
3. Posteriormente se añaden 50 μ l de suero, se agita suavemente y se incuba a 37°C por 30 min.
4. La reacción se detiene adicionando 5 ml de NaOH 0.02N.
5. Se determina la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro.

La concentración de enzima se determina utilizando la media de la curva estándar de p-nitrofenol. La actividad enzimática se reporta en μ moles de p-nitrofenol por litro de suero por minuto.

Determinación del contenido de glucógeno hepático.

Este procedimiento consiste en la digestión en caliente de una muestra de hígado conteniendo glucógeno, el cual es hidrolizado con KOH 30% dando como resultado glucosa, la cual se cuantifica colorimétricamente con el reactivo de la antrona (77).

Técnica:

1. Se pesan 0.5 g de muestra de hígado y se colocan en tubos de ensayo de 150 x 15 mm, se añaden 1.5 ml de una solución de KOH al 30% a cada uno de ellos, se hierve en un baño de agua durante 30 minutos.
2. Después de enfriar los tubos, la muestra digerida se coloca en un matraz de aforación de 25 ml y se diluye la muestra a ese volúmen con agua tridestilada.
3. Del matraz anterior se toma 1 ml de la dilución y se coloca en otro matraz de aforación de 25 ml para diluir la muestra nuevamente a ese volúmen con agua tridestilada. Esto se realiza con el objeto de que la glucosa en esta dilución, este en un rango de concentración de 3 a 300 $\mu\text{g/ml}$.
4. De la última dilución se coloca 1 ml en tubos de la misma medida, se prepara además un blanco que contenga 1 ml de H_2O , también se requiere un estándar que contenga 20 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa .
5. Se prepara la solución de antrona al 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Los tubos de muestras problemas así como el estándar y el blanco se colocan en hielo en donde se les añade 2 ml de reactivo de antrona y se agitan suavemente.
6. Los tubos se tapan con canicas, se sellan con cinta adhesiva y se colocan en un baño maría de agua hirviendo durante 15 min.
7. Se enfrían sobre agua de hielo y se leen a 620 nm.

Determinación de Colágena.

La concentración de colágena se determina por medición del contenido de hidroxiprolina

en muestras de tejido de hígado fresco, después de la digestión con ácido. El producto de la oxidación de la prolina se extrae con tolueno. La capa acuosa fue pasada a tubos de ensaye. El producto de la oxidación de la hidroxiprolina se convirtió a pirrol después de calentar las muestras.

Las muestras que contienen el pirrol se incuban con el reactivo de Ehrlich durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 560 nm (78).

Reactivos:

1. Solución amortiguadora. (Relación para un litro de buffer).

Buffer acetato de sodio-ácido cítrico, pH 6.

50 g de ácido cítrico.

120 g de acetato de sodio ($3H_2O$).

34 g de hidróxido de sodio.

15 ml de ácido acético glacial.

El buffer se mantiene en refrigeración y dura estable por meses.

2. Solución de cloramina T.

0.141 g de Cloramina T se mezclan con 2 ml de agua destilada, 3 ml de Etilen Glicol y 5 ml de solución amortiguadora. Esta solución debe prepararse en el momento de ser usada.

3. Reactivo de Ehrlich.

a). Se toman 27.4 de H_2SO_4 concentrado y se agregan lentamente a 200 ml de alcohol absoluto en otro vaso en hielo.

b). Se pesan 120 g de p-dimetilaminibenzaldehído y se agregan a 200 ml de alcohol absoluto.

La mezcla ácido-etanol (A) se agregan lentamente y con agitación a la solución (B) en hielo.

La solución puede almacenarse en el refrigerador por varias semanas. Los cristales que precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando y agitando la solución.

Técnica

1. De un trozo de hígado de rata previamente secado con papel filtro se pesa 0.1 g y se coloca en una ampolleta.
2. A la ampolleta se le agregan 2 ml de HCl 6N y se sella con el soplete.
3. Una vez sellada, se colocan en el horno a 100°C durante 20 hrs.
4. Después de la hidrólisis se rompe la ampolleta y se ponen nuevamente en el horno a secar a una temperatura de (40°C - 50°C) aproximadamente 20 hrs.
5. La muestra seca se resuspende con solución amortiguadora (Sol. 1). Inicialmente con 2 ml, se agita en el vortex y se vacía en tubo de ensaye. Después se agregan 2 ml nuevamente a la ampolleta para lavarla completamente, se vacía nuevamente en el mismo tubo de ensaye. Los tubos se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min.
6. El sobrenadante se retira con una pipeta pasteur y se deposita en tubo de ensaye. Se le agrega una pequeña porción de anorita, se agita durante un minuto, se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min y nuevamente con una pipeta pasteur se extrae el sobrenadante a otro tubo de ensaye y se observa, si no queda claro se vuelve a colocar anorita y se

centrífuga.

7. Se toma 1 ml de este sobrenadante mas 1 ml de agua, se colocan en un tubo con rosca y tapón, se le adiciona 1 ml de cloramina T. Se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Después de los 20 min se detiene la reacción por la adición de 500 μ l de tiosulfato de sodio 2 M, con 1 ml de NaOH 1N y con aproximadamente 2 g de NaCl. Agitar inmediatamente (de esto depende que se detenga la reacción).
9. Agregar 6 ml de tolueno a cada muestra y agitar durante 1 minuto.
10. Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se cubre con su respectivo tapón y se coloca en un baño hirviendo durante 20 min.
11. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agregan 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
12. Tomar una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno y mezclarla con 4 ml del reactivo de Ehrlich y agitar vigorosamente.
13. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para que desarrollen el color.

Leer en espectro a 560 nm.

Histología.

Para observar la acumulación de colágena en el tejido hepático, pequeñas muestras de hígado de aproximadamente 1 cm³ fueron fijadas en Bouin, incluidas en parafina y teñidas con tinción tricrómica. Posteriormente los cortes de aproximadamente 6 μ m se observaron bajo

microscopía de luz en un microscopio Leitz Wetzlar Germany. Las fotografías se tomaron con un equipo automatizado Wild MPS 55 con una amplificación de 100x.

Microscopía electrónica.

Para el análisis ultraestructural se cortaron bloques del lóbulo derecho del hígado de aproximadamente 0.5 a 0.7 mm³, éstos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.2) durante 1 hora, se adicionó OsO₄ al 1% para continuar la fijación (30 minutos a 27°C y 30 minutos a 4°C). Después de la deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol, los bloques se incluyeron en resina Epon. Los cortes finos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-2000 EX con una aceleración de voltaje de 80 kv.

Análisis Estadístico.

A los resultados obtenidos de las determinaciones de cada grupo de ratas se obtuvo la media (M) y el error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) y t de Tukey para comparar los grupos (79). En todos los casos se consideró significativa la diferencia cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto del ATMC sobre la fibrosis hepática.

Como se observa en la figura 6; en el daño al hígado inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCBC) durante ocho semanas en un modelo murino (ratas wistar machos), se observó un incremento de aproximadamente cinco veces más en el contenido de colágena hepática en comparación con el grupo control de operación falsa (OF). No obstante, el ATMC previno la acumulación excesiva de colágena hasta aproximadamente un 50% ($p < 0.05$). En cuanto al grupo que recibió únicamente el fármaco no se observa ningún efecto significativo sobre el contenido de colágena en el tejido hepático. Lo anterior coincidió con los resultados histológicos analizados en microscopía de luz en donde se observó la tinción de colágena hepática de los diversos grupos experimentales; en el grupo de ratas ligadas se observa una gran área del tejido hepático que contiene colágena acumulada, así como una alteración en el ordenamiento celular (Fig. 7). En contraste, el ATMC fue capaz de evitar la acumulación excesiva de colágena durante el período de la obstrucción biliar, en donde solo se observa colágena alrededor de una vena (Fig. 8). En las tinciones correspondientes al grupo que recibió sólo el fármaco y al grupo control (OF) no se observó una acumulación de colágena hepática, solamente se observó alrededor de la vena central (Fig. 9 y 10).

En cuanto al contenido de glucógeno hepático (Fig.11), éste disminuyó aproximadamente un 100% consecuente a la obstrucción biliar (Fig. 11-B). En este caso se observó una prevención total del ATMC sobre la pérdida de glucógeno en el hígado ($p < 0.05$).

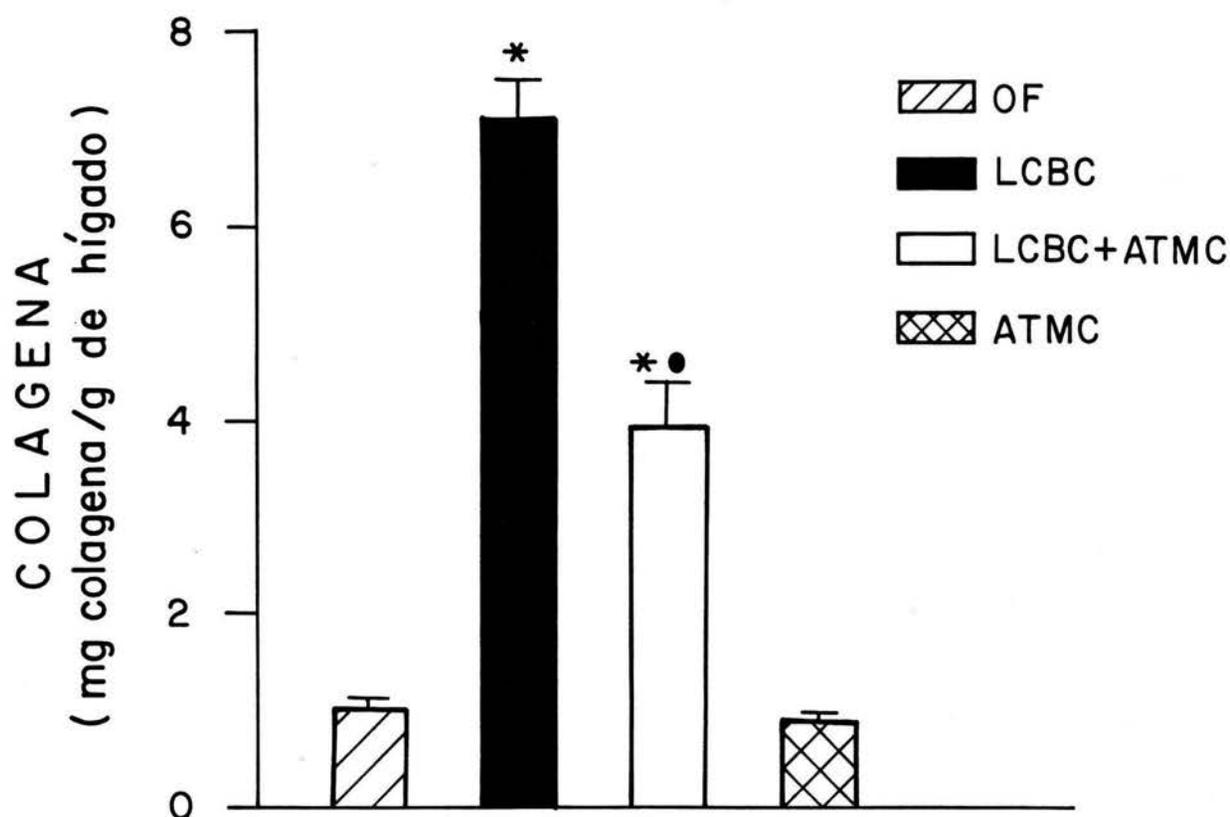


Figura 6. Cantidad de colágena hepática de los cuatro grupos experimentales: grupo control de operación falsa (OF), ratas ligadas del conducto biliar común (LCBC), ratas que recibieron un tratamiento previo a la ligadura (LCBC + ATMC) y el grupo que recibió el fármaco solamente (control de ATMC).

El ATMC se administró por vía oral ($100 \mu\text{g} / \text{kg}$ de peso).

Las ratas fueron sacrificadas 8 semanas después de iniciados los diferentes tratamientos.

* Indica $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

*• Indica $p < 0.05$ con respecto a ambos grupos (OF y de LCBC).

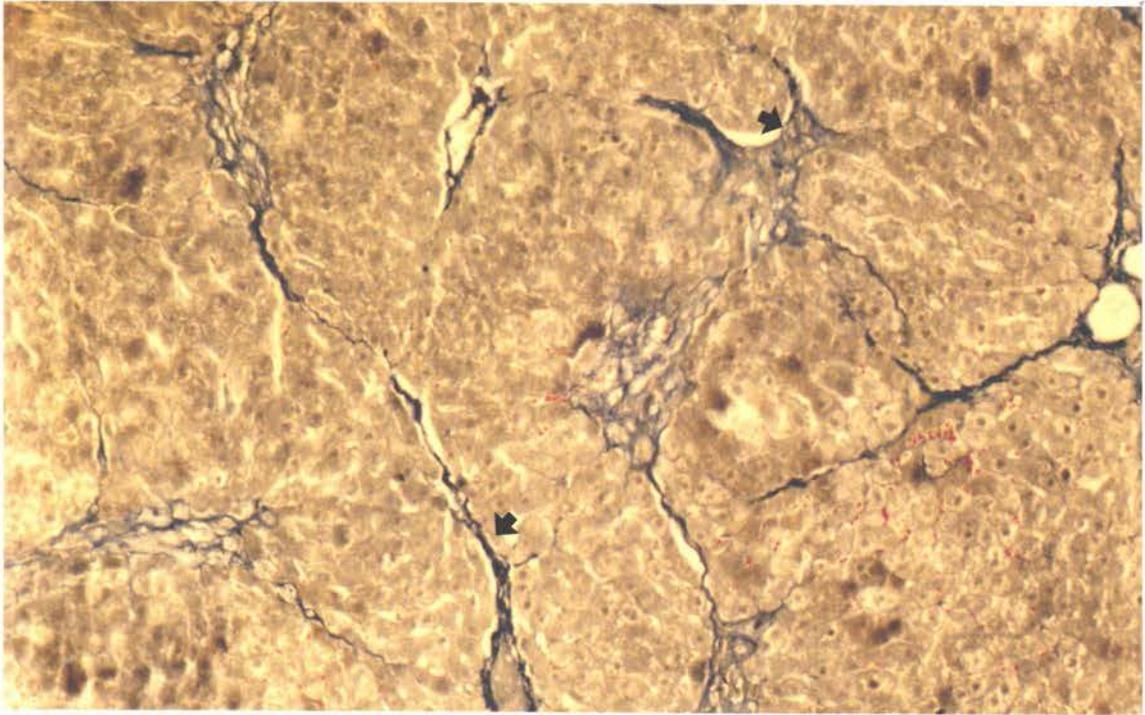


Figura 7. Tinción (tricrómica) para colágena en un corte de hígado de una rata ligada del conducto biliar común observada en microscopía de luz con una amplificación de 100x. La colágena se tiñe de color azul (→).

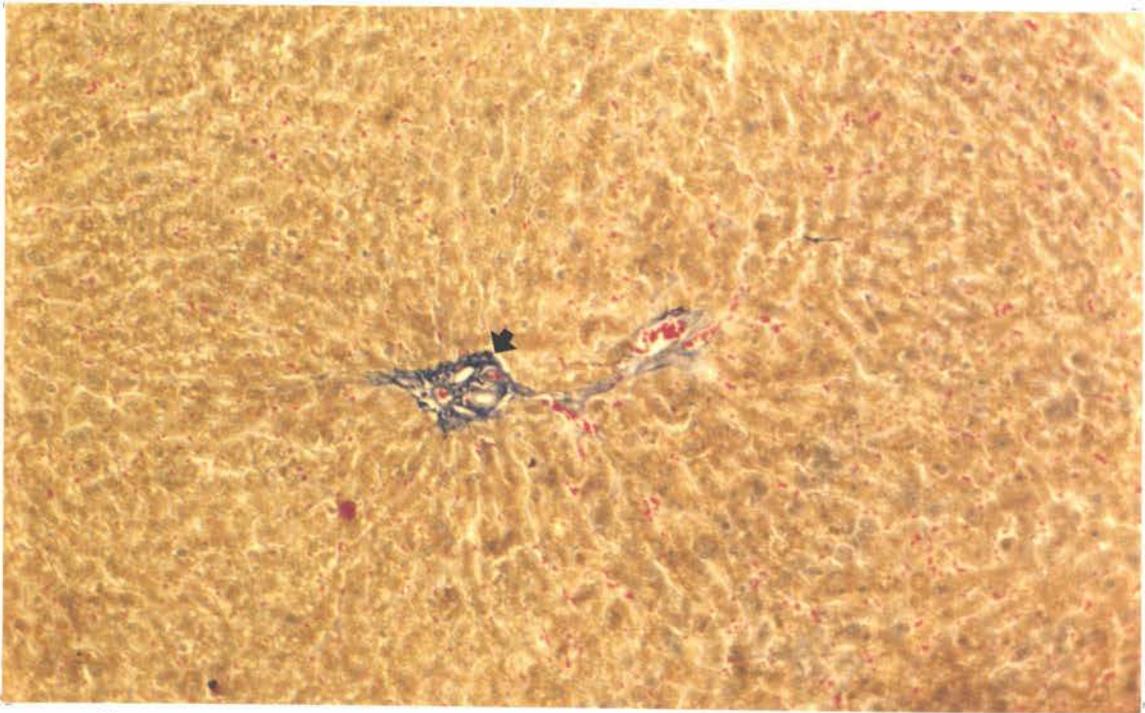


Figura 8. Tinción para colágena (tricrómica) en un corte de hígado de una rata que recibió el ATMC durante el daño provocado por la ligadura del conducto del conducto biliar común. Microscopía de luz con amplificación de 100x. → indica presencia de colágena.

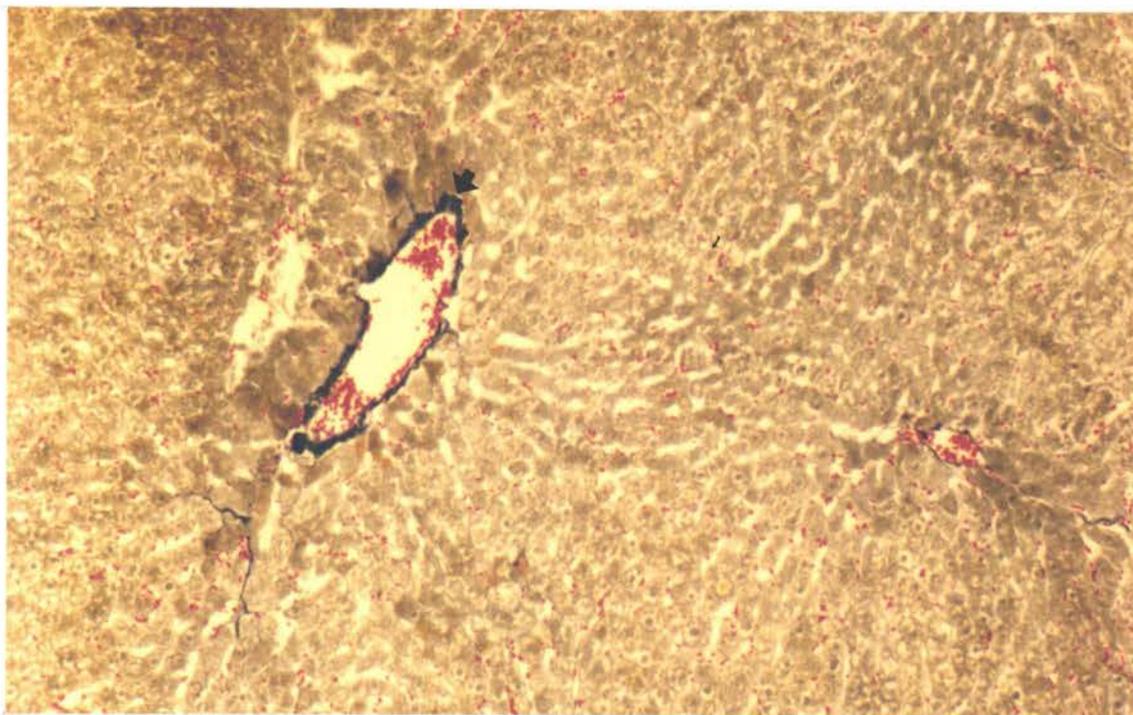


Figura 9. Tinción para colágena en un corte de hígado de rata que recibió únicamente el ATMC. La colágena se encuentra alrededor de la vena central (→). Microscopía de luz a 100x.

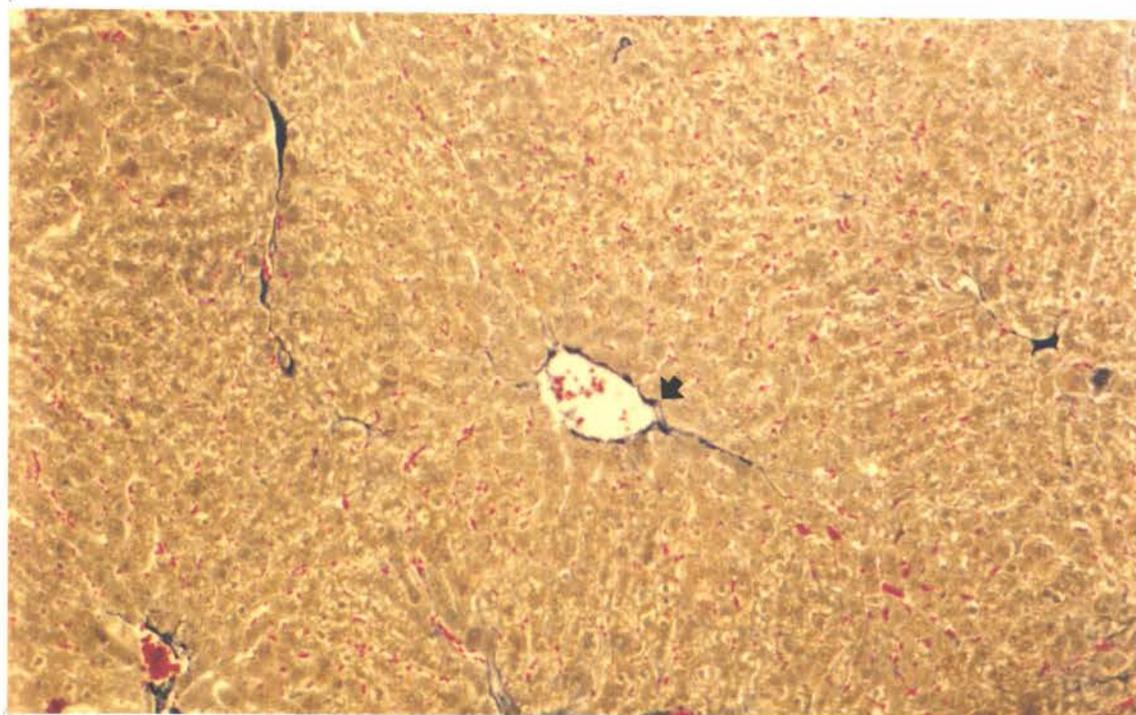


Figura 10. Tinción para colágena en un corte de hígado de rata con operación falsa (control). Se observa poca cantidad de colágena alrededor de una vénula (→). Microscopía de luz con amplificación de 100x.

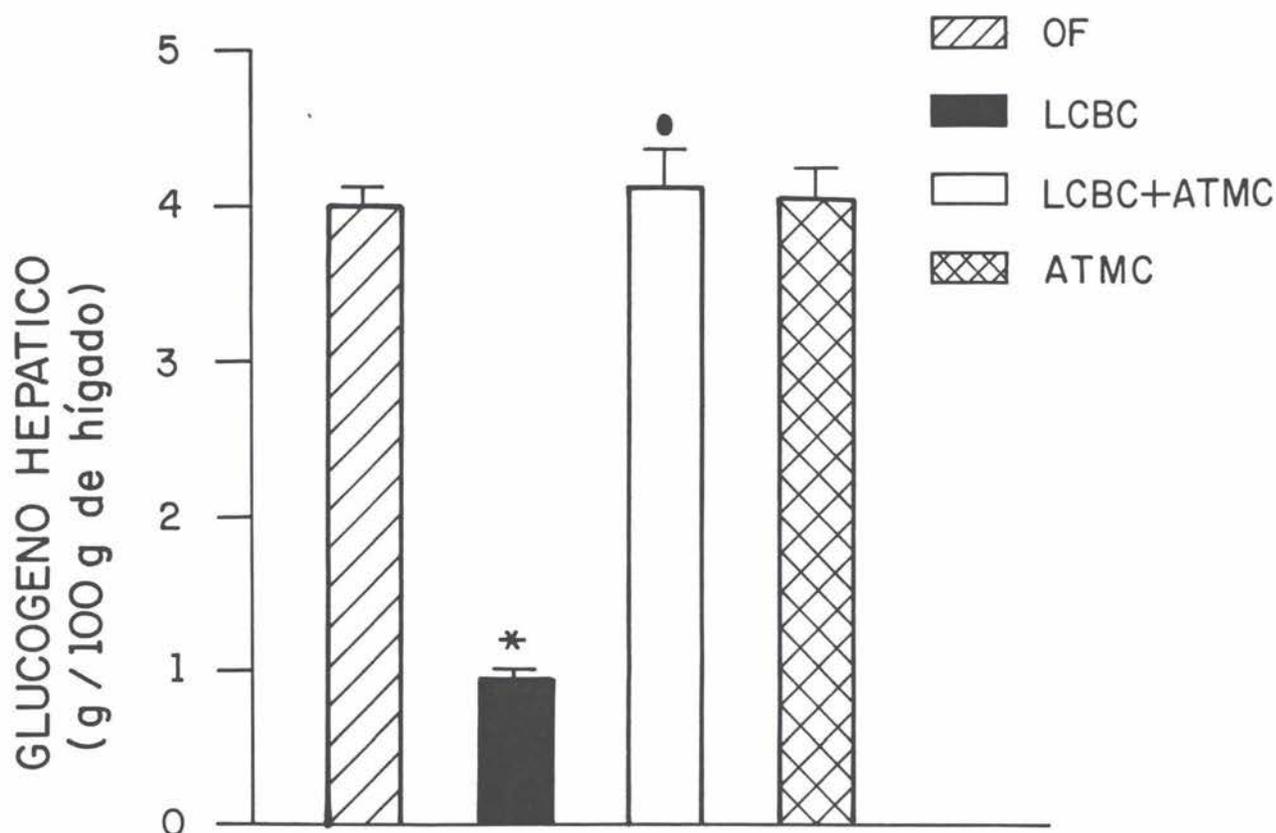


Figura 11. Contenido de glucógeno hepático(g/100g de hígado) en los diferentes grupos experimentales: control (OF), grupo de ratas ligadas (LCBC), el grupo que recibió el fármaco simultáneamente al daño producido por la ligadura (LCBC + ATMC) y el grupo control de ATMC.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de iniciado el tratamiento en los diferentes grupos.

El ATMC se administró por vía oral (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso).

* Significa $p < 0.05$ con respecto al grupo de OF.

• Significa $p < 0.05$ en comparación con el grupo de LCBC.

Resultados bioquímicos.

La obstrucción biliar en la rata provocó una acumulación excesiva del contenido de bilirrubinas en la sangre, la cual fue de más de 100 veces (Fig.12). Se observó que el tratamiento con ATMC previno la excesiva acumulación de bilirrubinas hasta cerca de un 50% en la sangre ($p < 0.05$), lo anterior se observa tanto en la bilirrubina total como en la directa; por otra parte, en el grupo que sólo recibió el fármaco y el grupo control no se elevaron estos pigmentos biliares (Fig. 12).

La lipoperoxidación hepática incrementó aproximadamente un 50% en las ratas ligadas comparándolas con el grupo control (Fig. 13) y El ATMC no previno la presencia de un alto grado de lipoperoxidación hepática para este modelo de daño.

Con respecto a la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, se presentó un incremento debido a la ligadura del conducto biliar común el cual no se previno con la administración del fármaco (Fig.14).

La actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica se elevó cerca de un 30% en el grupo de ratas ligadas del conducto biliar común (Fig.15); sin embargo, el ATMC evitó favorablemente tal elevación al administrarse en los organismos en estudio ($p < 0.05$).

En la figura 16 se muestra la actividad de la γ -glutamyl-transpeptidasa, la cual se incrementó (aproximadamente tres veces más que el valor del grupo control de operación falsa) en el modelo de daño utilizado y se previno aproximadamente en un 50% ($p < 0.05$) con la administración del ATMC (Fig. 16).

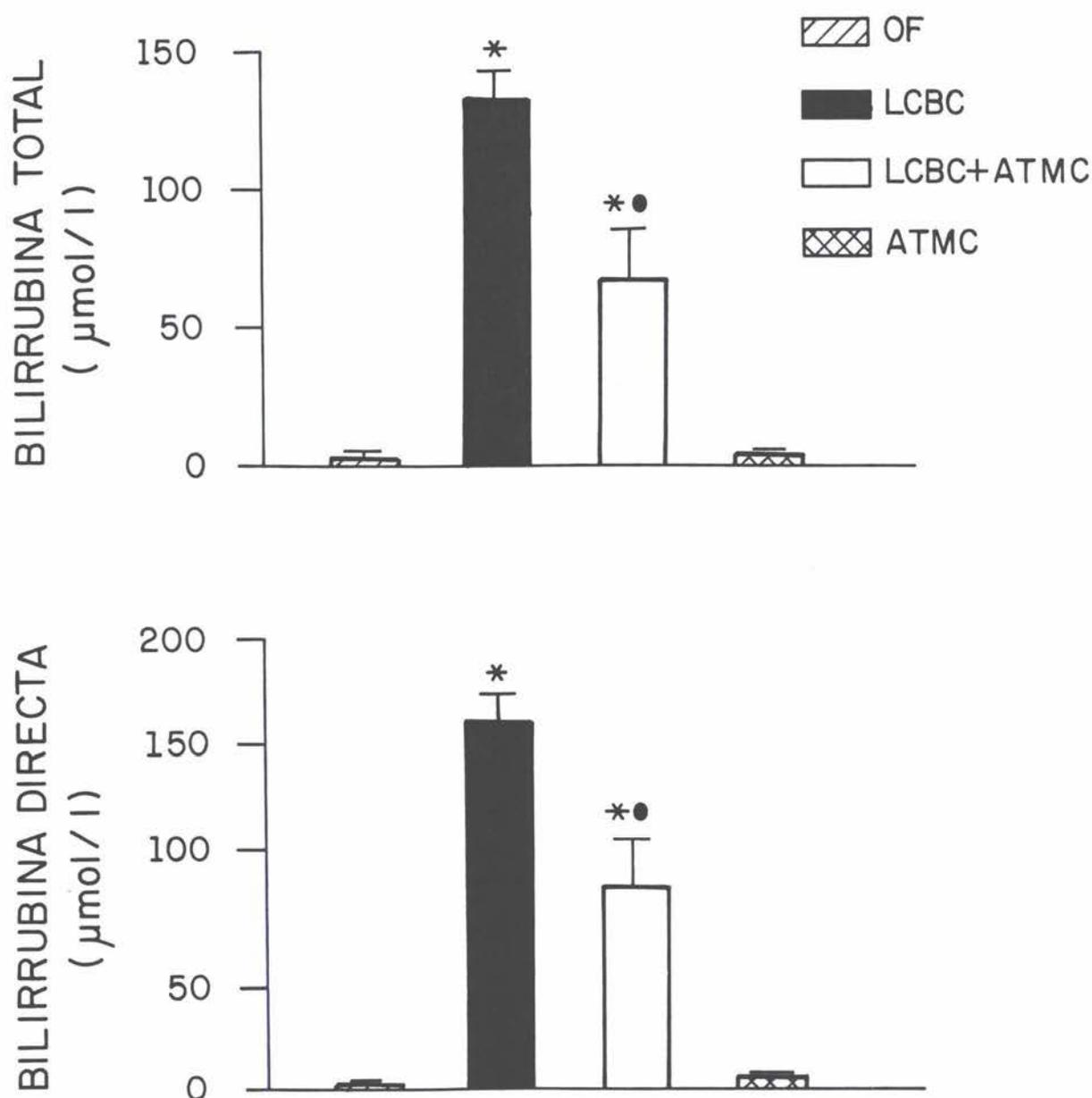


Figura 12. Concentración de bilirrubinas (total y directa, expresada en $\mu\text{mol/l}$) de suero de los diferentes grupos experimentales: el grupo control OF, ratas ligadas LCBC, ratas ligadas con tratamiento previo de ATMC (LCBC + ATMC) y el grupo control del fármaco (ATMC).

El ATMC se administró por vía oral ($100 \mu\text{g/kg}$ de peso).

Las ratas fueron sacrificadas a las 8 semanas de los diferentes tratamientos.

* Significa $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

*● Significa $p < 0.05$ con respecto a los grupos control y experimental.

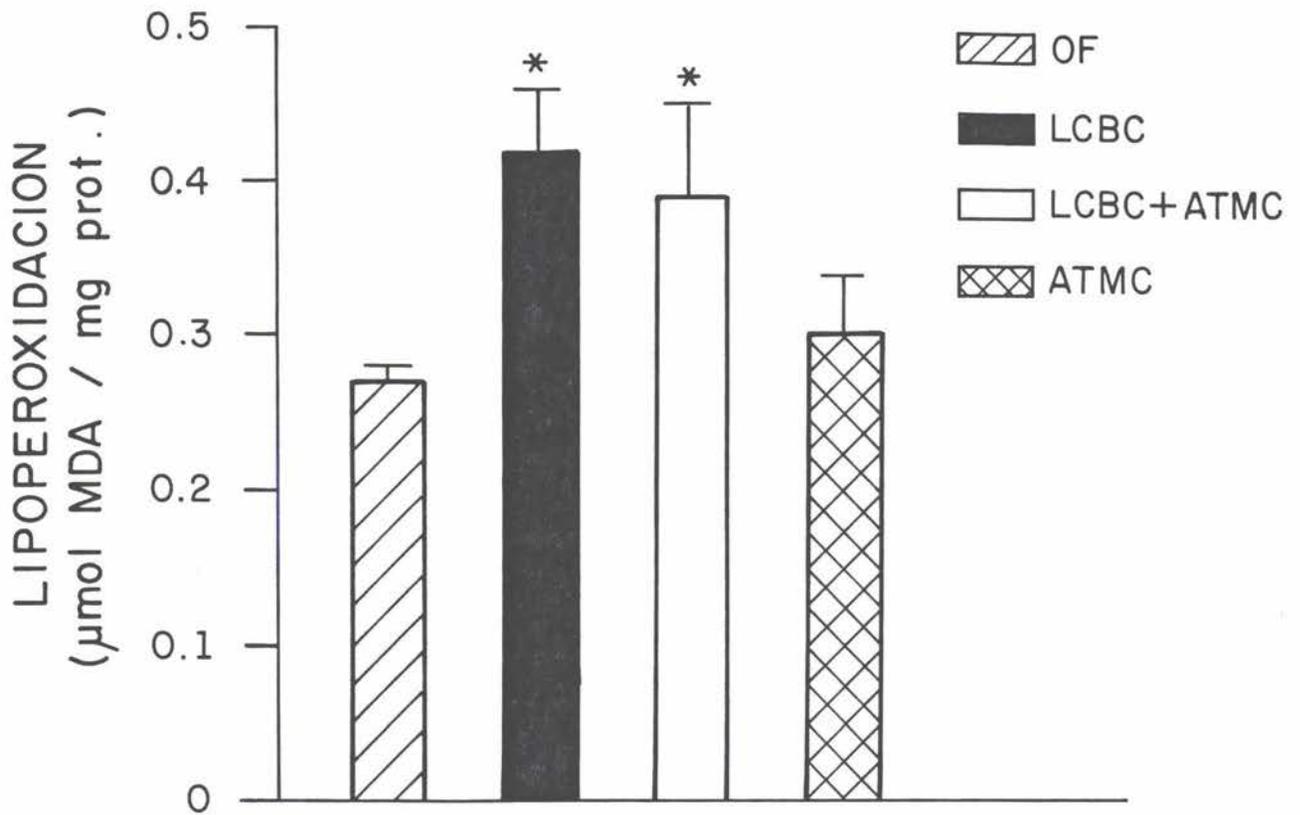


Figura 13. Grado de lipoxidación hepática de los grupos experimentales: control (OF), ligadura del conducto biliar común (LCBC), ligadura + el fármaco (LCBC + ATMC) y el control de ATMC. El ATMC se administró por vía oral a una dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso.

Las ratas fueron sacrificadas después de 8 semanas de tratamiento.

* Significa $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

Faltan páginas

N° 50

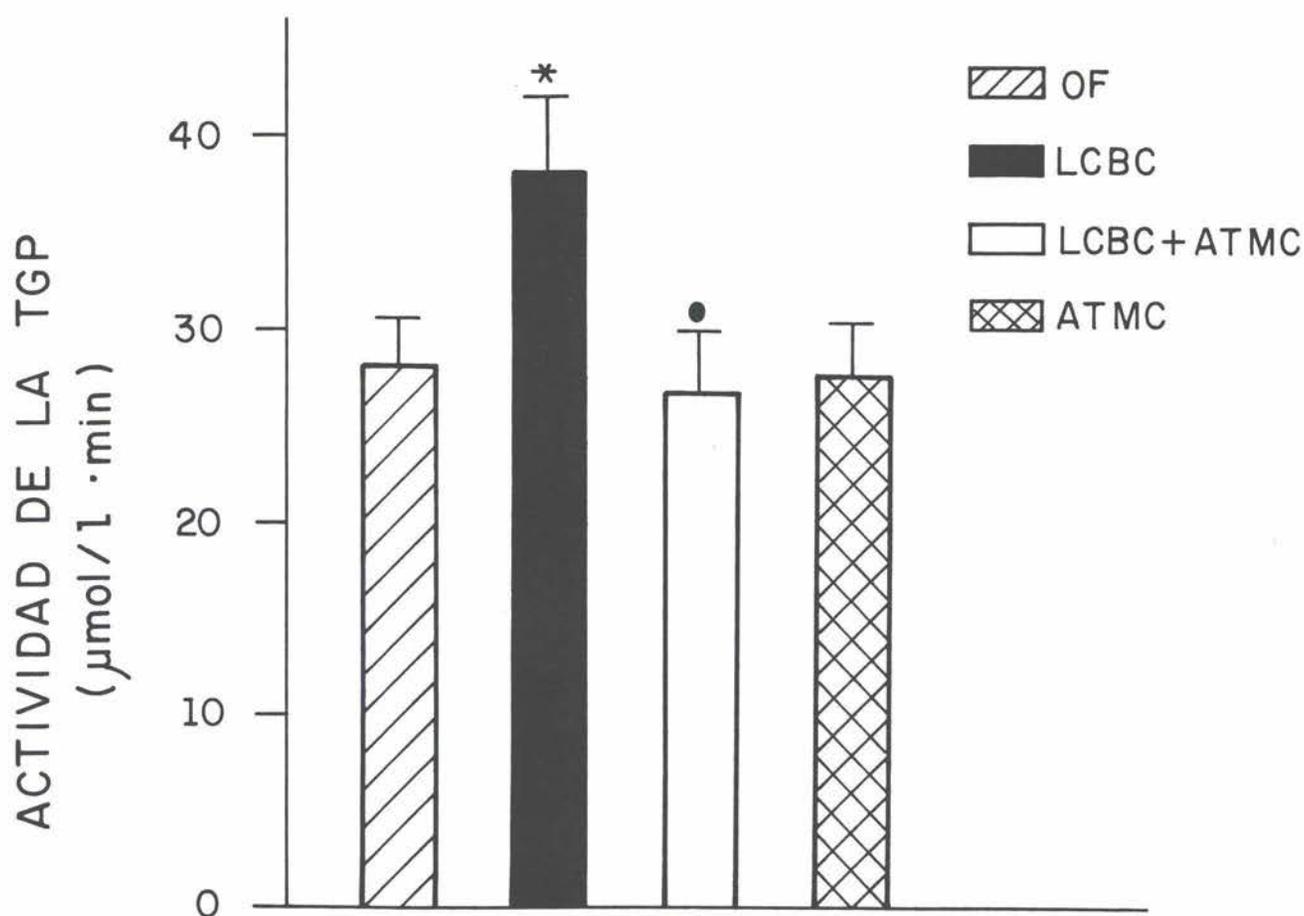


Figura 15. Actividad de la TGP ($\mu\text{mol}/\text{l}\cdot\text{min}$) en suero de ratas de los diferentes grupos: controles (OF) y de ATMC, el grupo de ratas ligadas (LCBC) y el grupo de ligadura + ATMC.

Las ratas se sacrificaron a la 8a. semana de tratamiento.

El ATMC se administró a una dosis de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por vía oral.

* Significa $p < 0.05$ con respecto al control de OF.

● Significa $p < 0.05$ con respecto al grupo de ratas ligadas.

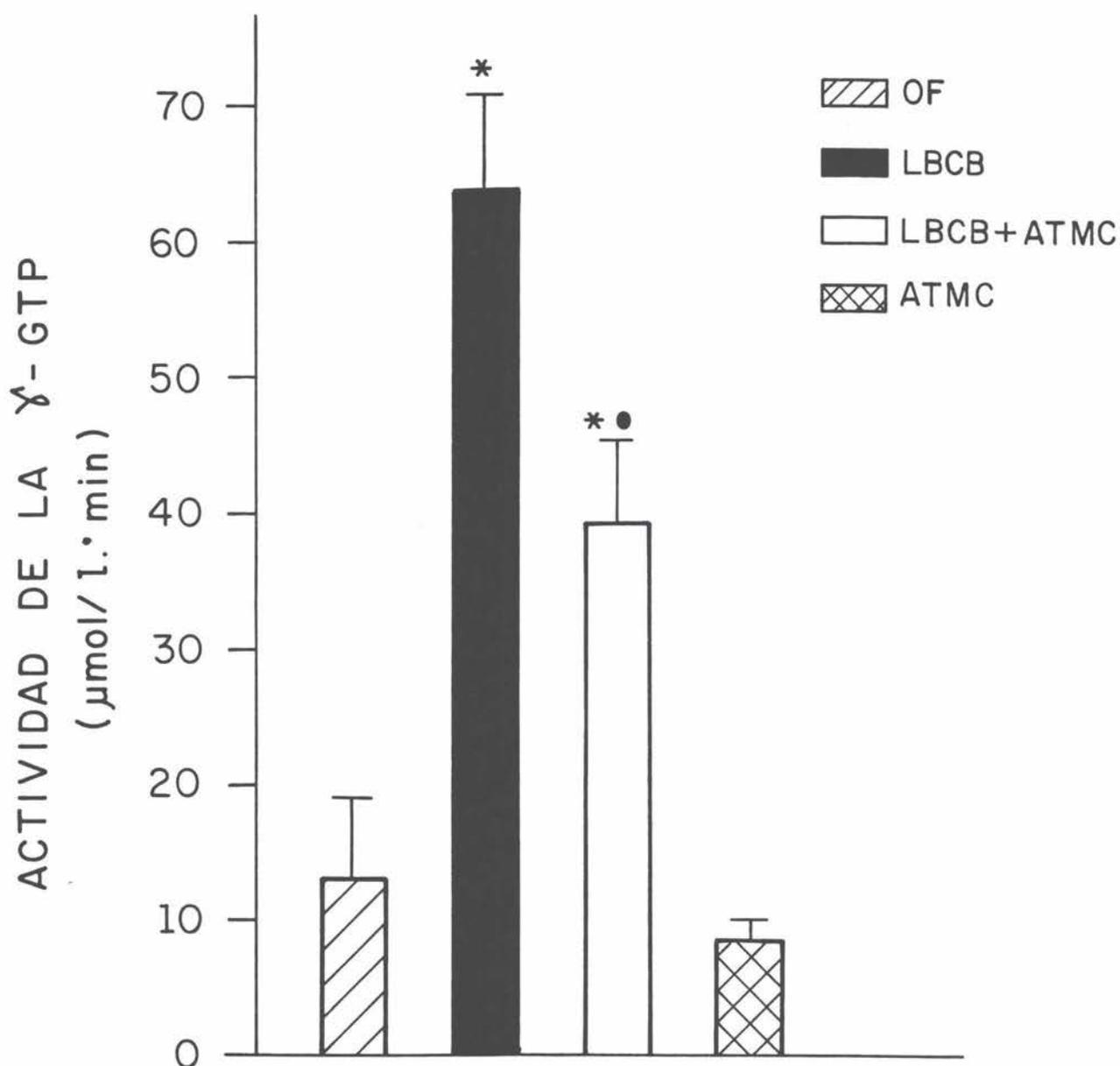


Figura 16. Actividad de la γ -GTP ($\mu\text{mol/l} \cdot \text{min}$) después de 8 semanas de tratamiento en los diferentes grupos: controles (OF Y ATMC), grupo con ligadura del conducto biliar (LCBC), grupo con ligadura + ATMC y el de ATMC solo.

El fármaco se administró por vía oral ($100\mu\text{g/kg}$ de peso).

* Significa $p < 0.05$ con respecto al control de OF.

*● Significa $p < 0.05$ con respecto a los grupos de OF y LCBC.

Resultados ultraestructurales.

En las muestras de histología hepática observadas a través de un microscopio electrónico de transmisión, tanto en el grupo control (OF) como en el grupo tratado únicamente con el fármaco (Fig. 17-A y 18-A) se presentó una arquitectura normal, el canalículo biliar, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso se encontraron de un tamaño adecuado y el núcleo que se muestra en la figura 18-A presentó una estructura normal, la membrana citoplasmática pareció estar bien delimitada tanto en el núcleo como en el canalículo biliar.

Posterior a la ligadura del conducto biliar común en la rata, se observó un desarreglo en la ultraestructura hepática, el canalículo biliar se encuentra dilatado, presentando una forma irregular de la superficie luminal y además se perdió la estructura de la membrana canalicular. Las mitocondrias se encontraron hinchadas, así como el retículo endoplásmico rugoso y liso. También se llega a observar el núcleo de una célula inflamatoria (fig. 18-B).

El ATMC previno parcialmente la alteración del canalículo biliar en el modelo de daño empleado, ya que no se observa la membrana alterada y las microvellosidades morfológicamente están en buenas condiciones (Fig. 17-C). Con respecto a las mitocondrias, éstas se encontraron menos hinchadas y su estructura interna se observa más ordenada en comparación con el grupo de ratas ligadas del conducto biliar común (Fig. 18-C),.

En el grupo control (O.F) y el grupo que recibió el ATMC sin ligadura (Fig. 17-A, D y 18-A, D) se observó una estructura normal tanto del canalículo biliar, mitocondrias, así como del retículo endoplásmico rugoso y liso.

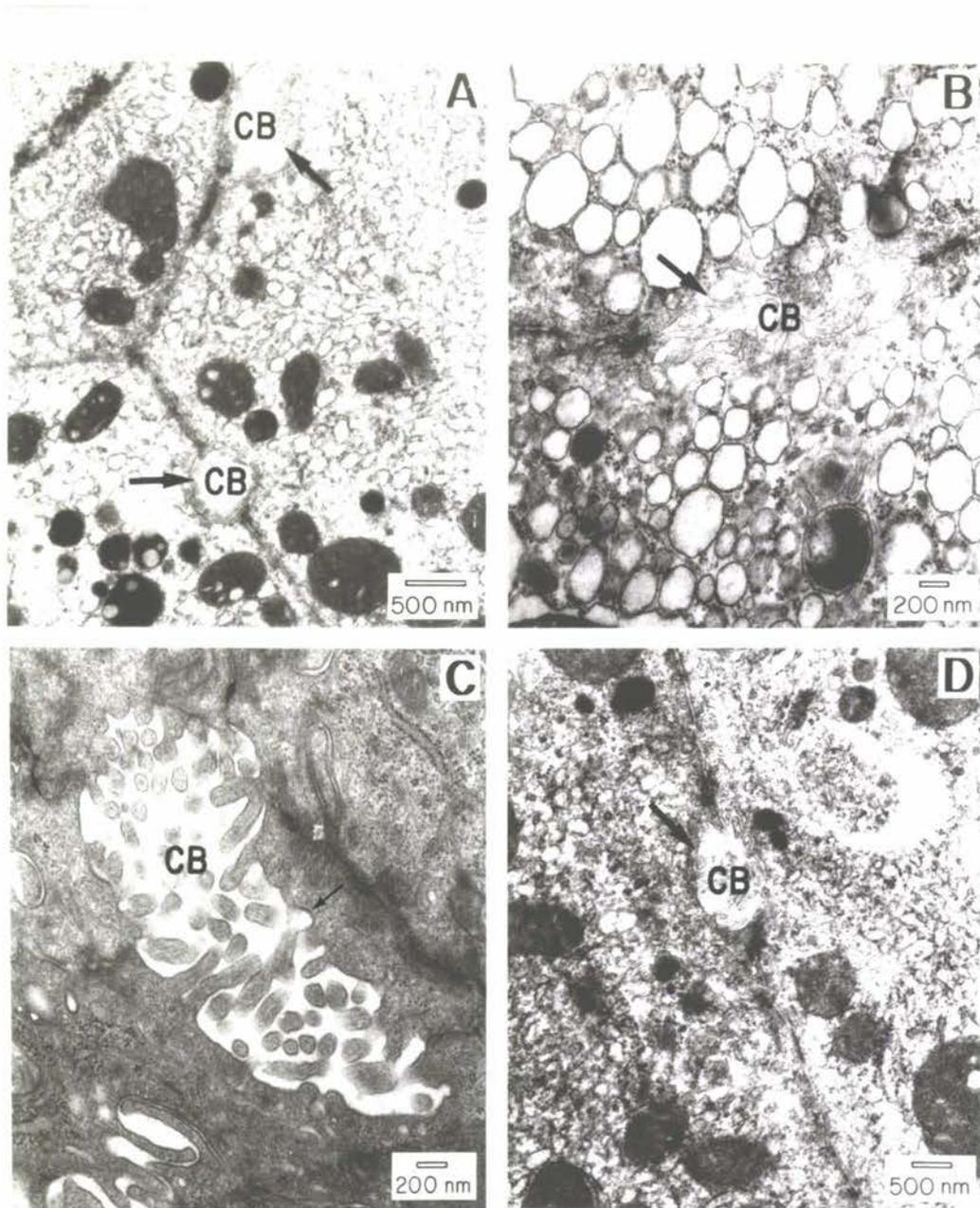


Figura 17. Micrografía electrónica de un corte de hígado de rata de los diferentes grupos experimentales: A indica el control de operación falsa, B corresponde al grupo de ratas que fueron ligadas del conducto biliar común, C representa al grupo de ratas ligadas + el ácido trimetilcolchicínico (ATMC) y D al grupo de ATMC solamente. En el grupo B se observa el canalículo biliar dilatado.

CB: canalículo biliar, →: muestra el contorno de la membrana canalicular, el cual se pierde con la ligadura del conducto biliar y con la administración del ATMC parece prevenirse.

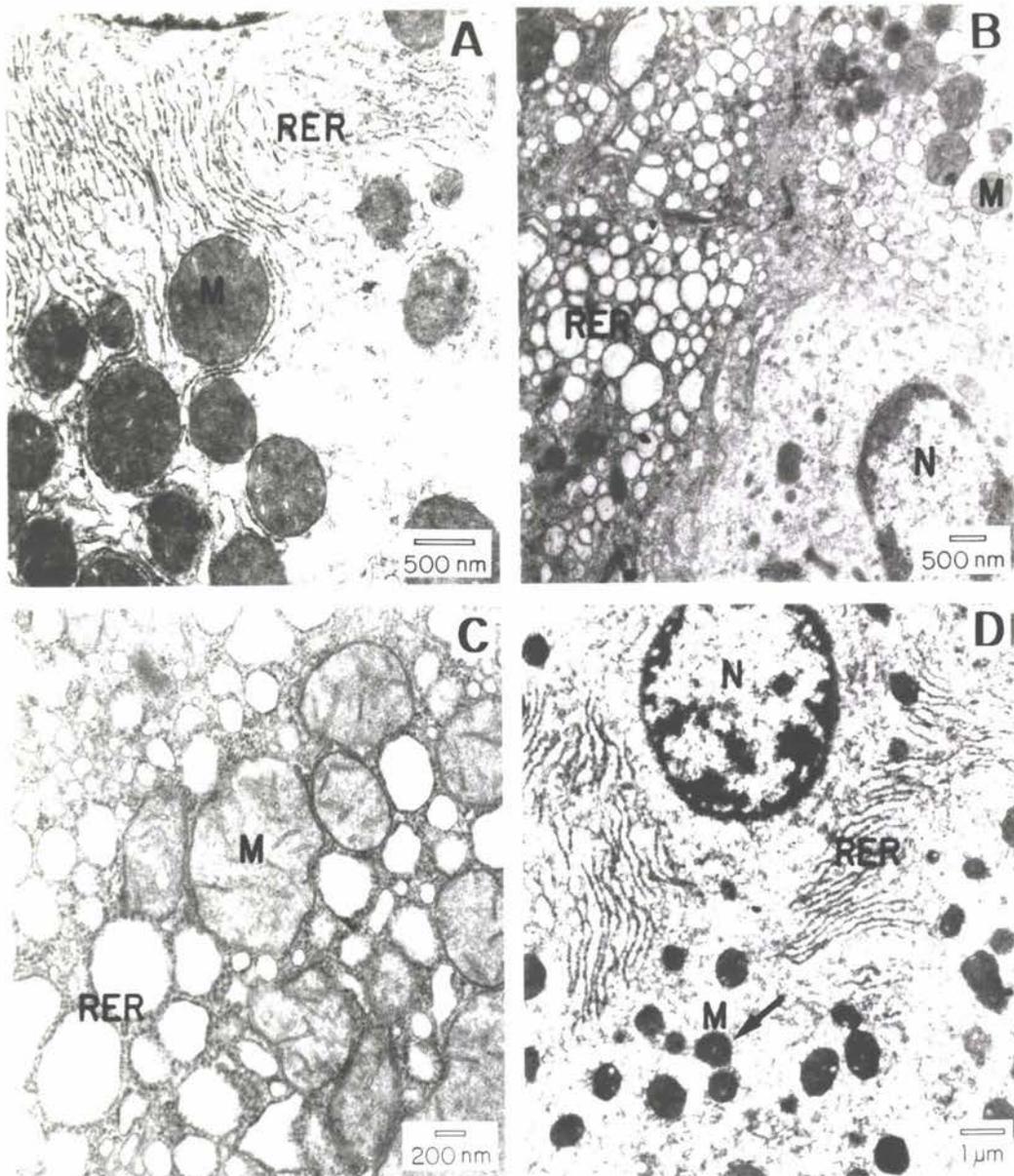


Figura 18. Micrografía electrónica que muestra cortes de hígado de rata de los diferentes grupos experimentales: A corresponde al grupo control de operación falsa, B al grupo de ratas ligadas del conducto biliar común, C al grupo de ligadura + el ácido trimetilcolchicínico (ATMC) y D al grupo de ATMC solamente. El retículo endoplásmico y mitocondrias se encuentran dilatados en el grupo B así como en el grupo C; sin embargo el desarreglo mitocondrial interno en éste último es menor.

M: mitocondria, N: núcleo, RER: retículo endoplásmico rugoso, →: señala a la mitocondria sin las vesículas hinchadas que aparecen en los grupos de LCBC y LCBC+ATMC.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos muestran la capacidad del ATMC para prevenir parcialmente el daño crónico por obstrucción biliar en la rata. La prevención fue de casi un 100% con respecto al contenido de glucógeno hepático. En cuanto a la acumulación de colágena hepática (fibrosis biliar), acumulación de pigmentos biliares (bilirrubinas) y algunos parámetros bioquímicos (γ -GTP y la TGP) se observó un efecto benéfico de aproximadamente un 50%.

En el presente estudio en el modelo de daño por obstrucción del conducto biliar común, se observó daño celular generalizado, principalmente el aumento de uno de los elementos importantes de la matriz extracelular (colágena) alrededor de las células parenquimatosas y sinusoidales, hubo formación de nódulos de hepatocitos rodeados por bandas de colágena y distorsión de la arquitectura lobular; también se observaron cambios hemodinámicos y alteraciones funcionales enzimáticas, esto ha sido reportado anteriormente por Rojkind y Kersenovich como importantes características de la fibrosis hepática (80), por lo que este modelo se considera bueno para estudiar este tipo de enfermedades hepáticas.

Cuando un daño hepático es único y el paciente sobrevive debido al buen funcionamiento de las células hepáticas remanentes, ó por las medidas médicas utilizadas, el hígado regenera rápidamente y en pocas semanas se establece su integridad anatómica funcional (81). Si el daño es de menor intensidad y el número de células destruidas es pequeño, es probable que no se estimule la regeneración hepática y sólo se produzca una pequeña cicatriz. Sin embargo, cuando la lesión se vuelve a producir, ya sea porque el agente inductor esté presente (obstrucción biliar,

CCl₄, alcohol, virus, Fe, Cu, etc.) o porque se estimulen mecanismos inmunológicos que perpetúan la enfermedad, tales como la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de la membrana de los hepatocitos, antígenos virales, proteínas contráctiles del citoplasma, etc., el proceso cicatricial continúa produciéndose desde una fibrosis hasta la cirrosis hepática (24).

El aumento del tejido conjuntivo hepático (fibrosis), es responsable al menos en parte de las alteraciones funcionales y hemodinámicas observadas. Se ha postulado que la inhibición de la síntesis y del depósito del tejido conjuntivo en el hígado podría acompañarse de una mejoría en la evolución de la enfermedad (82). El aumento en la cantidad de colágena presente en el hígado cirrótico coincidió con las altas actividades de las enzimas encontradas en suero de ratas con obstrucción biliar y cuando se administró el ATMC anterior a la ligadura, la cantidad de colágena por gramo de hígado fué menor y en el glucógeno hepático así como en algunos parámetros enzimáticos se observó una respuesta positiva hacia la prevención del daño provocado por la obstrucción.

La fibrosis hepática es un importante parámetro de evaluación del daño crónico. Una importante consecuencia de la fibrosis hepática es la acumulación de tejido conectivo alrededor de los sinusoides hepáticos hasta formar barreras en el flujo de sangre sinusoidal, la hipertensión portal resultante y el claro aumento de metabolitos exógenos y endógenos contribuyen a la disfunción hepática (83, 84). En humanos, parece ser que la descompresión biliar puede disminuir la hipertensión portal (85).

En la fibrosis hepática, la producción de cada uno de los componentes de la matriz extracelular se ve incrementada. Debido a que la colágena es el mayor componente de la misma, las estrategias antifibróticas se han centrado sobre la alteración del metabolismo de la colágena

hepática. Se ha observado que el hígado cirrótico contiene varias veces el contenido de colágena que un hígado normal (86). Lo cual coincide con lo reportado en nuestra investigación. Por otra parte, se observó que el fármaco actúa sobre el metabolismo de la colágena; sin embargo, sería interesante saber más acerca del posible papel que desempeña en ATMC en la respuesta celular con respecto a la síntesis ó degradación de este importante componente de la matriz extracelular.

La terapia antifibrogénica en humanos ha sido dirigida hacia 4 problemas hepáticos:

1. La squistosomiasis, un daño parasítico que afecta a más de 200 millones de personas; está asociado con el desarrollo de fibrosis hepática periportal. Los huevos de *Squistosoma* son depositados en la vena mesentérica y son dirigidos a través del flujo sanguíneo hacia el hígado vía la vena porta, en donde los antígenos parasíticos provocan el desarrollo de granulomas hepáticos periportales. La formación de granulomas es mediada principalmente por citocinas del linfocito-T.

2. El virus de la hepatitis tipo B. La infección progresa hacia una hepatitis crónica y finaliza en cirrosis. Existen millones de personas con infección de hepatitis crónica tipo B.

3. La ingestión crónica de alcohol causa un espectro de cambios patológicos en el hígado, comenzando con lipidosis y pasando por hepatitis alcohólica hasta terminar en cirrosis.

4. La cirrosis biliar primaria es un daño caracterizado por destrucción del conducto biliar intrahepático que envuelve un número de reacciones inmunes, muchas de las cuales son mediadas por linfocitos-T.

5. La cirrosis biliar secundaria que se origina por la obstrucción biliar extrahepática, comenzando desde fibrosis hasta producir un daño crónico mayor.

Se han propuesto terapias antifibrogénicas que consisten en alterar el estímulo de la

deposición del tejido conectivo. Existe una amplia evidencia de que los factores solubles liberados durante el daño hepático y la subsecuente respuesta inflamatoria proporcionan dicho estímulo (86, 87, 88). Algunos ejemplos de antifibrógenos son los corticosteroides, que tienen propiedades antiinflamatorias entre otras; la ciclosporina que es un péptido producido por el hongo *Tohyopocladium inflatum*, el cual ya se ha utilizado en la clínica en pacientes con cirrosis biliar primaria; sin embargo su tratamiento es muy caro y produce efectos secundarios, de la misma manera que la colchicina (61, 63). Esta última es un fármaco se ha probado en pacientes con gota aguda, como ya se mencionó anteriormente, así como en pacientes con cirrosis hepática y ha dado buenos resultados; no obstante, debido a los efectos secundarios que produce no resulta muy conveniente su uso a nivel clínico (59-66). Por otra parte, se ha observado que algunos derivados de la colchicina poseen sus propiedades farmacológicas pero sin poseer sus características tóxicas, uno de ellos el el ácido trimetilcolchicinico (ATMC), fármaco utilizado en el presente estudio, el cual no produce efectos secundarios en pacientes y se ha utilizado a nivel clínico en pacientes con gota aguda (67,68).El interés que nos motivó a su estudio es para saber si en un futuro se podría utilizar con pacientes cirróticos.

El ATMC administrado a una dosis oral de 100 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ no produjo efectos contrarios en los animales tratados y mostró una respuesta antifibrótica de casi un 50% en ratas que fueron ligadas del conducto biliar común por un período de tiempo prolongado (8 semanas), dicho efecto podría atribuirse a la reducción en la síntesis de colágena hepática (efecto antifibrogénico), a incrementar la degradación (efecto fibrolítico) ó a ambos casos; sin embargo, como se sabe que la colchicina (molécula de la cual se deriva el ATMC) inhibe la síntesis de colágena (89-91) y también aumenta la actividad de colagenasa (89, 92), esto podría indicar que el ATMC

de la misma manera que la colchicina, module las respuestas inflamatorias, las cuales estimulan la producción de colágena hepática (25, 26, 90, 91). Otra posibilidad es que pueda estar actuando sobre la degradación de colágena hepática de la misma manera que como se propone con la colchicina.

Durante la producción del daño hepático crónico se presentan múltiples alteraciones metabólicas, algunas de las cuales están directamente ligadas al proceso de fibrogénesis. Entre ellas se encuentran modificaciones en los niveles de AMP cíclico, el pool de aminoácidos (principalmente de prolina), el ácido ribonucléico de transferencia y algunas enzimas involucradas en las modificaciones postraduccionales de la colágena (90).

El primer paso en la biosíntesis de colágena (después que los genes son transcritos y se forman moléculas de pro-colágena) es la hidroxilación de prolina y residuos de lisina. En la cirrosis hepática, el pool de prolina se encuentra aumentado hasta valores semejantes a los que se requieren in vitro para la máxima síntesis de colágena. En los diferentes estudios realizados se ha observado que muchas de las enzimas que participan en las modificaciones postraduccionales de la colágena se encuentran aumentadas en el hígado o en la sangre de humanos o animales con cirrosis. Esto quiere decir que al aumentar la biosíntesis de la colágena en el hígado, aumentan también las enzimas que se requieren para la maduración y el transporte de la proteína al espacio extracelular, así como las que se necesitan para formar los enlaces covalentes que le dan su resistencia característica a la proteína. Los datos encontrados hasta la fecha sugieren que en las fases iniciales de la fibrosis hepática, el aumento en el contenido de colágena hepática se debe a un aumento en su biosíntesis. En las fases avanzadas, la falta de degradación por una disminución en la producción de colagenasa o por inaccesibilidad del

sustrato a la enzima puede ser el factor determinante (90). Puede ser que el ATMC así como la colchicina tengan un efecto sobre el movimiento transcelular y la deposición de colágena. Todo lo anterior son puntos a esclarecer o que apoyan ciertas opciones en las cuales puede estar involucrado el ATMC. No obstante, es necesario hacer estudios posteriores dirigidos hacia estos puntos para conocer el mecanismo de acción del fármaco.

En cuanto al contenido de glucógeno hepático, el ATMC mostró un efecto protector en su totalidad, ya que evitó la pérdida de glucógeno en las ratas con obstrucción biliar. Se ha observado que el AMPc juega un papel muy importante en el metabolismo del glucógeno. En la cirrosis, el incremento en la actividad de la adenilato ciclasa podría relacionarse con un incremento en los niveles de catecolaminas o a alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática (26). También se ha propuesto que el AMPc actúa como un control en los niveles de colágena hepática (25). Por otra parte, la colchicina previene las alteraciones en la actividad de la adenilato ciclasa, AMPc y contenido de glucógeno hepático (26). El ATMC como análogo de la colchicina podría estar actuando también sobre el metabolismo del glucógeno hepático y más específicamente sobre los niveles de AMPc, ya que en cuanto al contenido de glucógeno hepático se observó un efecto hepatoprotector muy bueno.

La microscopía electrónica ha contribuido en forma sustancial al conocimiento del hígado y una gran parte de la literatura se refiere a la descripción y caracterización morfológica y funcional del tipo celular más común en el hígado (las células parenquimatosas o hepatocitos), que se han considerado como la "célula ideal" por los microscopistas electrónicos debido a su gran riqueza en componentes citoplasmáticos y por el papel fundamental que tienen los hepatocitos en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y muchos otros

compuestos. Además de ser también una herramienta para conocer mejor las alteraciones producidas por agentes tóxicos para la célula o algunos efectos benéficos de otras sustancias.

En el presente estudio se observaron alteraciones ultraestructurales importantes. La alteración observada en el canalículo biliar puede deberse a presiones mecánicas y se ha visto acompañada por cambios en la barrera de permeabilidad (interpuesta entre el canalículo y el espacio intercelular, que bloquea la difusión libre de peroxidasas), lo cual puede explicar los procesos envueltos en la regurgitación de la bilis a la circulación sanguínea (93).

La regurgitación de los constituyentes biliares se confirmó por el incremento de más de 100 veces en el contenido de bilirrubinas en el suero sanguíneo. Bajo la suposición de una secreción continua de bilis, el exceso de regurgitación debería ser dependiente de la salida del flujo biliar hacia el canalículo biliar. Las alteraciones morfológicas, tales como la dilatación e irregularidad en la superficie luminal del ducto biliar podrían deberse a un incremento en la presión intracanalicular. También confirmamos que después de ligar el conducto biliar, se desarregla la forma del canalículo biliar, de la misma manera que Metz y colaboradores (93).

Se han reportado alteraciones a nivel del control respiratorio (consumo de oxígeno y síntesis de ATP) en la estructura de la membrana interna mitocondrial e hinchamiento de dicho organelo en el grupo de ratas con cirrosis biliar (94). En nuestro estudio, el hinchamiento de las mitocondrias y el desarreglo de su estructura puede ser un indicador de la alteración de la función mitocondrial y de todos los procesos metabólicos involucrados. Un aspecto de gran interés es que la disfunción a nivel respiratorio mitocondrial puede ser debido a la acción de las bilirrubinas, cuya elevación en la circulación sanguínea podría facilitar su papel como desacoplantes de la fosforilación oxidativa y como consecuencia disminuya la función energética

de las células, como lo expresa Zetterström y Ernester (95); también puede ser que se presente un daño no específico en la membrana mitocondrial (94).

En cuanto a las bilirrubinas, se conocen las diversas fases en su metabolismo (conjugación en el hígado, excreción en la bilis y circulación enterohepática), por lo que se utilizaron como marcadores de daño hepatobiliar. Estos marcadores, junto con las enzimas fosfatasa alcalina y γ -GTP se encontraron elevados en suero. Esto es común principalmente en el daño extrahepático. De ésta última, se ha demostrado que el incremento de su actividad sérica en la colestasis extrahepática es resultado de la síntesis *de novo* de la enzima (96).

Se ha encontrado que la actividad de la fosfatasa alcalina está confinada a la membrana del canalículo biliar de células parenquimales en ratas (97). Por lo que se cree que el incremento en su actividad podría estar relacionada con una inducción hepatocelular (52). También se sabe que la regurgitación biliar contribuye al incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina en suero. Se asume que la fosfatasa alcalina que se une a la superficie celular es liberada a la bilis por la acción detergente de los ácidos biliares y que la bilis, con la actividad elevada de la fosfatasa alcalina, entra al torrente sanguíneo debido a la obstrucción del flujo biliar (98).

En el presente estudio, la actividad de la fosfatasa alcalina en suero se elevó al obstruir el conducto biliar, y el tratamiento con el ATMC solo produjo una ligera disminución de la actividad de dicha enzima durante la obstrucción biliar. Podría pensarse que este fenómeno esté estrechamente relacionado con el aumento en las sales biliares presentes por la obstrucción y más claramente por las bilirrubinas, que también se encontraron elevadas en ambos grupos experimentales, ya que se ha visto que el aumento en estas sustancias provoca una mayor síntesis y actividad de la enzima (99).

En cuanto al incremento en la lipoperoxidación inducida por la cirrosis biliar. La serie de reacciones peroxidativas en la membrana celular producen cambios en sus propiedades físicas y químicas debido a la pérdida de ácidos grasos insaturados, a la formación de dímeros entre las moléculas lipídicas y a la inserción de grupos polares en las regiones hidrofóbicas de la bicapa. Se cree que estos cambios son importantes y contribuyen a la inhibición de diversas enzimas localizadas en el retículo endoplásmico y membrana plasmática (100). Podría ser que el hinchamiento del retículo endoplásmico observado en este trabajo sea una consecuencia de estos procesos lipoperoxidativos en la célula. También se ha mostrado que los eventos peroxidativos provocan un incremento de calcio en el citosol y es acumulado en el retículo endoplásmico y la mitocondria. Se ha propuesto que las propiedades ionofóricas de los ácidos grasos y de los componentes parecidos a las prostaglandinas pueden explicar el incremento de la permeabilidad al calcio de las membranas peroxidadas (100). Recientemente se hizo una investigación del papel de la lipoperoxidación en el daño por obstrucción biliar, en el que se propone que la lipoperoxidación puede ser una consecuencia más que una causa del daño celular y, por lo tanto, de la muerte celular (101). En dicho trabajo también se probó el efecto de la vitamina E sobre la lipoperoxidación hepática, así como su capacidad para prevenir el daño hepático por obstrucción del conducto biliar común, lo que se obtuvo fue la capacidad de prevenir la lipoperoxidación en hígado; sin embargo no fue capaz de prevenir el daño al hígado. También podría ser que el ATMC no esté actuando como captador de radicales libres y que la lipoperoxidación está presente como una consecuencia del daño por la obstrucción biliar (100).

El ATMC es un análogo colchicinoide que no posee algunas propiedades tóxicas de la colchicina, tales como inhibir microtúbulos, así como producir efectos adversos en humanos y

a nivel experimental, lo cual es bueno para su uso en terapias antifibrogénicas y de protección al hígado, por lo que podría ser un buen candidato para ser usado a nivel clínico en pacientes con daño hepático. No obstante, es necesario hacer mayores estudios para esclarecer el mecanismo de acción del ATMC y conocer sus efectos no sólo a nivel de prevención de la fibrosis y cirrosis biliar, sino también sobre la reversión del daño, de tal manera que esto contribuya para solucionar a la problemática de las enfermedades crónicas del hígado.

CONCLUSIONES.

1. El ATMC mostró un efecto benéfico parcial pero significativo para prevenir el daño crónico biliar en un modelo murino (rata Wistar) a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Cabe señalar que a esta dosis el fármaco por sí solo no provocó reacciones secundarias en el modelo utilizado.
2. Se observaron alteraciones histológicas y ultraestructurales importantes en el daño por obstrucción biliar, que coinciden con los resultados bioquímicos analizados en los modelos con cirrosis biliar, así como una importante protección del daño con la administración del fármaco.
3. A pesar de que se obtuvo una protección, ésta no fué en una forma total; sin embargo, al obtenerse una protección en general de un 50% se podría pensar en este fármaco como un candidato a ser utilizado a nivel clínico, por lo que es necesario hacer mas investigación utilizando una dosis un poco más alta, así como analizar otros parámetros que también son importantes para esclarecer el mecanismo de acción del fármaco, el cual parece actuar sobre la acumulación de colágena hepática (fibrosis).

BIBLIOGRAFIA

1. Crespo X., Curell N. y Curell J. Anatomía. Colombia. Ed. Osiris. 1990; 300.
2. Jones A.L. Anatomy of the Normal Liver. Zakim D., Boyer T.D. (Eds). Hepatology. A textbook of liver disease. U.S.A. Vol. 1 2ª. Ed. W.B. Saunders Company. 1990; 1228.
3. Netter H. Colección ciba de ilustraciones médicas. Tomo III/3. Sistema Digestivo. Hígado, vías biliares y páncreas. Ed. Salvat. 1983; 2.
4. Netter F.H., Bodansky O. y Popper H. Fisiología y fisiopatología del hígado, vías hepáticas y páncreas, incluyendo pruebas hepáticas y pancreáticas. Netter, F.H. (ed.). Colección ciba de ilustraciones médicas. Sistema digestivo, hígado, vías biliares y páncreas. Tomo 3. España. Ed. Salvat. 1981; 35.
5. Ham A.W. Textbook of Histology I.B. Lippincott Company, Filadelfia 1965; 109.
6. Gumucio J.J. Transporte Hepático. Kelly W.N. (ed.). Medicina Interna. Tomo I. Argentina. Ed. Médica Panamericana. 1990; 486.
7. Horton A.A. Lipid Peroxidation and Mechanisms of Toxicity. Department of Biochemistry, University of Birmingham. Birmingham, England. Volume 18, Issue 1. 1987; 34.
8. Jones A.L. y Mills E.S. Hígado y vesícula biliar. R.D. Greep and J. Weiss. Histología, Ed. El Ateneo, tercera edición. 1978; 230.
9. Rogers A.E. Nutrition. Baker H.J., Russell J. Weisbroth S.H. (eds.). The Laboratory Rat. Biology and Diseases. U.S.A. Vol. 1. Ed. Academic Press Inc. 1979; 129.
10. Kao Y.S., y Scheer D.W. Malabsorción, diarrea y examen de las heces. Bernard Henry, J. (ed.). Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio.

- México. Tomo I. 8a. Ed. Salvat. 1988; 701.
11. Schwartz C.C. Metabolismo Hepático. Kelly W.N. (ed.). Medicina Interna. Argentina. Tomo I. Ed. Médica Panamericana. 1990; 495.
 12. Méndez N., Jessurun J., Aguilar R., Cote C. y Uribe M. Litiasis biliar de colesterol (Factores de Riesgo). Revista de Gastroenterología de México. **56(3)**:125. 1991.
 13. Centonze S. y Misciagna G. Relationships between environmental and genetic risk factors in the aetiology of diseases and problems in the interpretation of case-control and cohort studies. Cholelithiasis as a model. The Italian Journal of Gastroenterology. **22(1)**:59. 1990.
 14. Reichen J. y Simon R.F. Cholestasis. y Arias I.M., et al. The Liver. Biology and Pathobiology. U.S.A. 6a. Ed. Raven Press. 1988.
 15. Larusso N.F. Litiasis Biliar y Colecistitis. Kelly W.N. (ed.). Medicina Interna. Argentina. Tomo I. Ed. Médica Panamericana. 1990; 615.
 16. Litter M. Compendio de Farmacología. Argentina. 4a. Ed. El Ateneo. 1988.
 17. Nishimura D., Imoto M., Satake T., Sugiyama S., y Ozawa T. Mechanism of liver mitochondrial dysfunction associated with bile duct obstruction. Arzneimittel Forschung/Drug Research **35(2)**:1427. 1985.
 18. Schmucker D.L., Ohta M., Kanai S., Sato Y. y Kitani, K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. Hepatology, **12**:1216. 1990.
 19. Moselely R.H., Gumucio J.J. Síndromes colestáticos. Kelly W.N. (ed.). Medicina Interna. Argentina. Ed. Médica Paramericana. 1990. 198.
 20. Zermeño, M. Fisiopatogenia de la Litiasis Biliar. Revista del Hospital Juárez de México.

- 59(2):51.** 1992.
21. Castillo L., Alonso M., Olvera F. y Castro A. Paciente con ictericia obstructiva y cirugía. *Revista de Gastroenterología de México.* **55(4):340.** 1990.
 22. Rabes H.M. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. *Prog. Liv. Dis.* **5:83.** 1976.
 23. Rojkind M. y Kershenobich D. Fibrosis and cirrhosis. In: *The Liver Annual I.* Ed. by Arias, I.M., Frenker, M., y Wilson, J.H.P. Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton. 1981.
 24. Rojkind M. y Kershenobich D. Hepatic Fibrosis. *Clin. Gastroenterol.* **10:737.** 1981.
 25. Baum B.J., Moss J., Breul S.D., Berg R.A. y Crystal R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* **255:2843.** 1980.
 26. Mourelle M., Rojkind M. y Rubalcava B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology.* **21:213.** 1981.
 27. Dunn M.A. y Kamel I.A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. *Gastroenterology.* **76:978.** 1979.
 28. Fujiwara K., Sakai T., Oda T. The presence of collagenase in kupffer cells of the rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **54:531.** 1973.
 29. Maruyama K., Feinman L., Okazaki I. y Lieber C.S. Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and human liver. *Biochim. Biophys. Acta* **658:124.** 1981.
 30. Zimmerman H.J. Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemical on the liver. New York. Ed. Appleton Century-Crafts. 1978; 32.
 31. Todd S.D. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. John Bernard Henry. Tomo

- I, 8a. Ed. Salvat. 1988; 270.
32. Kountaras J., Billing B.H. y Scheuer P.J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British J. Exp. Pathol.* **65**:305. 1984.
 33. Roberts W.M. Blood phosphatase and the Van Den Bergh reaction in the differentiation of the several types of jaundice. *Br. Med. J.* **1**:134. 1933.
 34. DeBroe M.E., Roels F. y Numen E.J. Liver plasma membrane The source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. *Hepatology.* **5**:118. 1985.
 35. Watchein M. Enzymatic histochemistry of the liver. *Gastroenterology.* **57**:525. 1959.
 36. Zimmerman H.J. Hepatic injury caused by therapeutic agents. The liver normal and abnormal functions part. New York. A. Marcel Dekker, I.N.C. 1974.
 37. Sandstrom B. On the specificity of histochemically demonstrable bile canalicular phosphate activities. *Histochemistry.* **22**:316, 1970.
 38. Fernely H.N. Kinetic behavior of calf intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphatase. *J. Biochem.* **25**:95. 1965.
 39. Sela B.A. y Sachs L. Alkaline phosphatase activity and the regulation of growth in transformed mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* **83**:17, 1974.
 40. De Broe M.E., Roels F. y Noumen E.J. Liver plasma membrane: the source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. *Hepatology.* **5**:118, 1985.
 41. Alves P.S. Correia J.P. y D'Agua C.B. Alcoholic liver diseases in Portugal. Clinical and Laboratory Picture, Mortality and Survival. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **6**:216, 1982.
 42. Nishimura, M. y Teschke, R. Effect of chronic alcohol gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase. *Biochem. Pharmacol.* **31**:377. 1982

43. Candel A.V. y Gómez R. Estudio experimental de la lesión hepática (hepatitis reactiva inespecífica) en procesos supurativos y necróticos renales. Efecto hepatoprotector de la silimarina. Cátedra de Patología Médica de la Facultad de Medicina de Valencia. *MMW*, No. **10**. 1978.
44. Vogel G. Protection by silybin against amanita phalloides in beagles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**:355. 1984.
45. Teschke R., Neufeind M., Nishimura M. and Strohmeyer G. Hepatic gamma-glutamyltransferase activity in alcoholic fatty liver: comparison with other liver enzymes in man and rats. *Gut.* **24**:625. 1983.
46. Szenczuk A. A soluble form of gamma-glutamyl transpeptidase in human tissues. *Clin. Chim. Acta.* **14**:608. 1966.
47. Woodman D.D. Assessment of hepatic function and damage in animal species. *J. Appl. Toxicol.* **8**(4):249. 1988.
48. Hall R.L. Laboratory Evaluation of Liver Disease. *Veterinary Clinics of North America Small Animals Practice.* **15**(1):3. 1985.
49. Toda G., Ikeda Y., Kako M., Oka H., Oda T. Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: an experimental study. *Clin. Chim. Acta.* **107**:85. 1980.
50. Hatoff D.E., Katz R.E., Ringard A.A. Induction of hepatic alkaline phosphatase by colchicine: role of cholestasis and bile acids. *Proceedings of the Society for Exp. Biol. and Med.* **173**:227. 1983.
51. Kaplan M.M. Serum alkaline phosphatase-another piece is added to the puzzle. *Hepatology.*

- 6(3):526. 1986.
52. Bulle F., Mavier P. y Serge Z.E. Mechanism of γ -glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology* **11**:545. 1990.
 53. Mourelle M. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology*. **21**:213. 1981.
 54. Mourelle M., Rojkind M. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. *J. Biol. Chem.* **256**:1656. 1981.
 55. Poley R.J. Practical approaches to assessing liver function. *Pediat. Ann.* **14**(6):423. 1985.
 56. Younes M. y Siegers C.P. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.* **33**(13): 2001. 1984.
 57. Muriel P. y Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute liver damage *J. Appl. Toxicol.* **10**(4): 281. 1990.
 58. Mourelle M., Villalón C. y Amezcua J.L. Protective effects of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* **6**:337. 1988.
 59. Mourelle M., Friginals R. y Rodriguez L. Protective effects of colchicine against acute liver damage. *Life Sci.* **45**:891. 1989.
 60. Kershenovich D., Vargas F. y García-Tsao G. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. J. Med.* **318**:1709. 1988.
 61. Brown W. O., Seed L. Effect of colchicine on human tissues. *Amer. J. Clin. Path.* **15**: 189. 1945.
 62. Warnes T., Smith A., Lee F., Haboubi N Y., Johnson P. y Hunt L. A controlled trials of

- colchicine in primary biliary cirrhosis: treatment design and preliminary report. *J. Hepatol.* **5**:1. 1987.
63. Chojkier M. y Brenner D A. Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. *Hepatology.* **8**: 176. 1989.
64. Wallace S., Omokoku B. y Ertel N. Colchicine plasma levels: implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am. J. Med.* **48**:443. 1970.
65. Hoang C., Lavergne A. y Bismuth C. Lesions vicerales histologiques des intoxication aigues mortelles par la colchicine: A propos de 12 observations. *Ann. Pathol.* **2**(3): 229. 1982.
66. Marchand Y. y Singh A. A role for the microtubular system in the release of very low density lipoproteins by perfuse mouse livers. *J. Biol. Chem.* **218**(19): 6862. 1973.
67. Stein O. y Stein Y. Colchicine induced inhibition of very low density lipoprotein released by rat liver in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **306**:142. 1973.
68. Zweig M. y Chignell C. Interactions of some colchicine analogues, vinblastine and podophyllotoxin with rat brain microtubule. *Protein Biochem. Pharmacol.* **22**:2141. 1973.
69. Wallace S. L. Trimethylcolchicinic acid in the treatment of acute gout. *Ann. Intern. Med.* **54**(2): 274. 1961.
70. Lessner H., Jonsson V., Loeb V. y Larsen W. Preliminary clinical experience with trimethylcolchicinic acid methyl ether d-tartrate (TMCA) in various malignancies. *Cancer Chemotherapy Reports.* **27**: 33-38. 1963.
71. Buege J. y Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzimol.* **30**:302. 1978.
72. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* **72**:248. 1976.

73. Jendrassik L. y Gróf P. Vereinfachte photometrische methoden zur Bestimmung des .Blutbilirubins. *Biochem. Z.* **297**:81. 1938.
74. Reitman S. y Frankel S. A colorimetric method for determination of serum oxalacetic and glutamic piruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**:56. 1957.
75. Dragosici B., Ferenci P., Pesendorfer F. y Welwaka F. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP): Relationship to other enzymes for diagnosis of liver disease. *Prog. Liv. Dis.* **5**:536. 1976.
76. Somer A J. The determination of acid and alkaline phosphatase using p-nitrophenilphosphate as substrate. *Am. J. Med. Tech.* **20**: 244. 1954
77. Seifter S., Seymour B. y Novic B. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.* **25**:191. 1950.
78. Rojkind M. y González E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C in collagen and in non collagenous proteins. *Ann. Biochem.* **57**:1. 1974.
79. Zar J. H. *Biostatistical analysis*. New Jersey. Prentice-Hall. 1984: 485.
80. Rojkind M. y Kersenovich D. Hepatic fibrosis. *Prog. Liv. Dis.* **5**: 294. 1976.
81. Rabes H M. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. *Prog. Liv. Dis.* **5**: 83. 1976.
82. Rojkind M. y Kersenovich D. Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis en la cirrosis hepática. *Gastroenterología y hepatología.* **5**(1): 37. 1982.
83. Zimmermann H., Reichen J., Zimmermann A., Sagässer H., Thenisch B. y Höflin F. Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. *Gastroenterology.* **103**: 579. 1992.

84. Leveille C. e Irwin M. Pathophysiology and pharmacologic modulation of hepatic fibrosis. *J. Vet. Int. Med.* **7**(2): 73. 1993.
85. Rojkind M., Giambrone M A. y Biemdicca L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology.* **76**: 710. 1979.
86. Bissell D., Friedman S. y Maher J. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology.* **11**: 488. 1990.
87. Schuppan D. Structure of the intracellular matrix in normal and fibrotic collagens and glycoproteins. *Semin. Liv. Dis.* **10**: 1. 1990.
88. Arthur M J. Matrix degradation in the liver. *Semin. Liv. Dis.* **10**: 47. 1990.
89. Rojkind M. y Kersenovich D. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferin synthesis by cirrothotic rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta.* **378**: 415. 1975.
90. Kersenovich D., Vargas F., García-Tsao G., Pérez T R., Gent M. y Rojkind M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1709. 1988.
91. Rojkind M., Mourelle M. y Kersenovich D. Antiinflammatory and antifibrogenic activities of colchicine: tratment of liver cirrhosis in myelofibrosis and the biology of connective tissue. *Liss. Ar. eds. N.Y.* 1984.
92. Gordon S. y Werb Z. Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**(3): 872. 1976.
93. Metz J., Ahoki A., Merlo M. y Forssmann W. Morphological alterations of interhepatocellular junctions induced by bile duct ligation. *Cell. Tiss. Res.* **182**: 299. 1977.
94. Koyama K., Ito K., Ouchi K. y Sato T. Mitochondrial function of rat liver in biliary obstruction. *Tohoku J. Exp. Med.* **131**: 59. 1980.

95. Zetterström R. y Ernester L. Bilirrubin an uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. *Nature*. **178**: 1335. 1956.
96. Pasanen P., Pikarainen P., Alhava E., Partanen K. y Penttilä I. Value of serum alkaline phosphatase, aminotransferase, γ -glutamyl transferase, leucine aminopeptidase and bilirrubin in the distinction between benign and malignant diseases causing jaundice and cholestasis: results from a prospective study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **53**: 35. 1993.
97. De Valck V., Geerts A., Schellinck P. y Wisse E. Localization of four phosphatases in rat liver sinusoidal cells. An enzyme cytochemical study. *Histochemistry*. **89**: 357. 1988.
98. Toda G., Ikeda Y., Kako M., Oka H. y Oda T. Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin. Chim. Acta*. **107**:85. 1980.
99. Hatoff D. E., Katz R. F. y Ringard A. A. Induction of hepatic alkaline phosphatase by colchicine: Role of cholestasis and bile acids. *Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine*. **173**: 227. 1983.
100. Albano E., Bellomo G., Parola M., Carini R. y Dianzani M. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1091**: 310. 1991.
101. Muriel P. y Suarez O.R. Role of lipid peroxidation in biliary obstruction in the rat. *J. Appl. Toxicol.* **14**(6): 423. 1994.