



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

BO 1265/96
Ej. 1

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DEL
INTERFERON α_{2b} PARA REVERTIR LA FIBROSIS Y LA
CIRROSIS PRODUCIDA POR LA LIGADURA DEL
CONDUCTO BILIAR COMUN EN LA RATA.

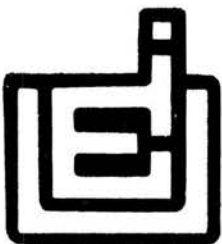
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIO GIL MORENO PEREZ



MEXICO,

1996



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 del Centro de Investigación y de estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del:

Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Agradezco muy especialmente a mi asesor, el Dr. Pablo Muriel de la Torre por haberme apoyado y brindado sus conocimientos, tiempo y paciencia para el feliz término de este trabajo.

Por la ayuda y amistad que me brindaron mis compañeros del laboratorio durante la realización de esta tesis, en especial a Ramón Hernandez, a Patricia Gonzalez y a Benjamín Salinas quiero darles las gracias sinceras.

Quiero hacer patente mi agradecimiento a mis sinodales, M. en C. Eduardo Barrera Escorcía; M. en C. Rafael Jimenez Flores; M. en C. David Segura Cobos; Biol. David Gonzalez Pantaleon y a la Dra. Leticia Moreno Fierros, por sus excelentes sugerencias y comentarios del presente trabajo.

Agradezco también a la Sra. Concepción Avalos por la estupenda asistencia secretarial y al Sr. Alfredo Padilla por el magnífico apoyo fotográfico del que forma parte esta tesis.

ÍNDICE

Índice		i
Página de abreviaturas		iii
Resumen		1
I. Introducción		2
I.1. Generalidades del hígado		2
I.1.1. Funciones del hígado		3
I.1.2. Elementos celulares del hígado		7
I.1.3. Las sales biliares		9
I.1.4. Metabolismo de las grasas		11
I.1.5. El sistema biliar intrahepático		12
I.1.6. El sistema vascular intrahepático		13
I.2. La obstrucción biliar extrahepática en humanos		15
I.2.1. Modelos experimentales de daño hepático		15
I.3. La cirrosis hepática		18
I.4. La fibrosis hepática		21
I.4.1. La colágena		22
I.4.2. Células que sintetizan colágena en el hígado		24
I.4.3. Modulación farmacológica de la síntesis de la colágena		25
I.4.4. Modulación farmacológica de la degradación de la colágena		27
I.5. Los interferones		28
I.5.1. Funciones generales de los interferones		29

I.5.1.1. Efectos antivirales del interferón	29
I.5.1.2. Efectos no antivirales del interferón	29
I.5.2. Antecedentes directos	31
II. Objetivos	33
II.1. Objetivo general	33
II.2. Objetivos particulares	33
Diagrama de trabajo	34
III. Material y métodos	35
III.1. Grupos experimentales	35
III.2. Procedimiento para la ligadura del conducto biliar común	36
III.3. Procedimiento para el sacrificio de las ratas	37
III.4. Determinaciones bioquímicas	38
III.4.1. Determinación del contenido de colágena	38
III.4.2. Determinación del grado de peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA)	41
III.4.3. Determinación del contenido de proteínas totales	42
III.4.4. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA)	44
III.4.5. Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP)	46
III.4.6. Determinación de las bilirrubinas total y directa	48
III.4.6.1. Bilirrubina total	48
III.4.6.2. Bilirrubina conjugada (directa)	49

III.4.7. Determinación del contenido de glucógeno hepático	50
III.5. Análisis estadístico	52
IV. Resultados	53
V. Discusión	65
VI. Conclusiones	70
VII. Bibliografía	72

Página de abreviaturas

AMPc	Adenin-monofosfato cíclico
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
FA	Fosfatasa alcalina
γ-GTP	Gamma-glutamil transpeptidasa
INF-α	Interferón-alfa _{2b}
LCBC	Ligadura del conducto biliar común
MDA	Malondialdehído
OS	Operación simulada
s.c.	Subcutáneo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UI	Unidades internacionales

RESUMEN

La fibrosis es una característica del daño hepático crónico. La invasión de tejido conectivo compromete la capacidad funcional del hígado. Por esta razón las estrategias terapéuticas se han enfocado hacia modular el contenido de colágena hepática. En este sentido, se ha reportado que los interferones, además de sus efectos antivirales, son excelentes agentes antifibrogénicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad del interferón- α_{2b} (INF- α) para revertir la fibrosis y otras alteraciones causadas por la ligadura del conducto biliar común (LCBC) en la rata. Se utilizaron ratas Wistar macho (180-220 gr.), a las cuales después de haberles provocado fibrosis por medio de la obstrucción biliar prolongada se les administró INF- α (100,000 UI/rata/día,s.c.) durante 15 días. Los animales se sacrificaron 30 días después de la operación. La LCBC produjo un aumento significativo de más de 5 veces en el contenido de colágena y más de 3 veces en el grado de peroxidación lipídica (MDA); en cambio el contenido de glucógeno disminuyó 6 veces ($p < 0.05$). Las actividades de la fosfatasa alcalina (FA) y la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) aumentaron 3 y 6 veces respectivamente, y las concentraciones de bilirrubinas aumentaron más de 18 veces en relación a los valores control para una $p < 0.05$. La administración de INF- α revirtió el contenido de colágena y de MDA de manera parcial pero significativa; el tratamiento con INF- α aumentó el contenido de glucógeno a nivel del valor control. De la misma manera, la concentración de bilirrubinas y las actividades de la FA y la γ -GTP disminuyeron a valores similares al control en el grupo con LCBC y tratados con INF- α . El efecto de reversión del INF- α puede estar asociado a sus propiedades antifibrogénicas. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que el uso de los interferones no debe restringirse a las enfermedades hepáticas de origen viral. Estos compuestos pudieran ser de gran utilidad para disminuir la fibrosis hepática de cualquier etiología.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES DEL HÍGADO.

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados, en el hombre comprende del 2 al 3% de peso corporal (1). Se encuentra localizado en el hipocondrio derecho, parte del flanco derecho y en el epigastrio de la cavidad abdominal (Fig. 1), presenta 4 lóbulos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson) (2).

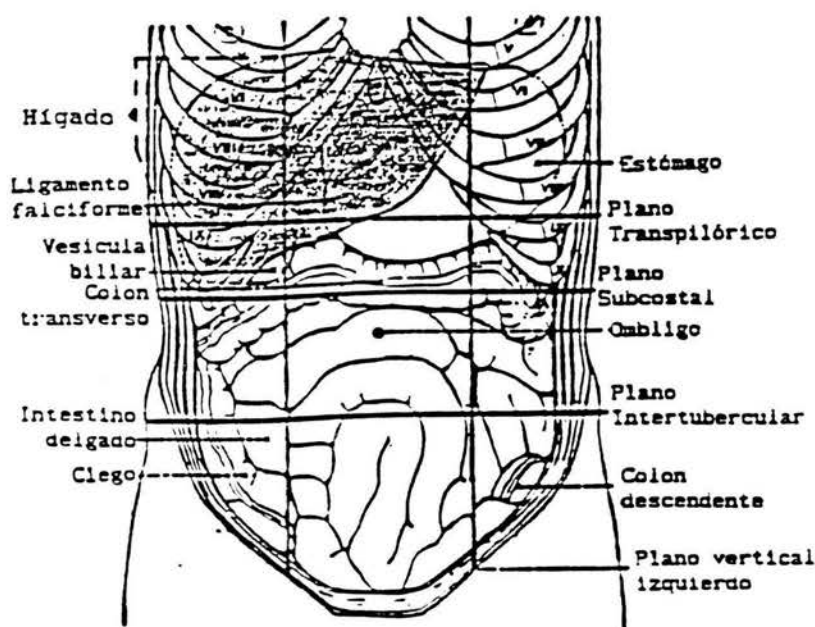


Fig. 1. Localización anatómica del hígado en la cavidad abdominal y su relación con otras estructuras.

I.1.1 FUNCIONES DEL HÍGADO.

El hígado es una glándula endócrina y exócrina con funciones vitales para el organismo, tiene una posición estratégica pues a él llega la circulación sanguínea venosa que proviene de la cavidad abdomino-pelvica, además de recibir irrigación por la arteria hepática (4).

Los hepatocitos poseen una estructura hexagonal y son el sitio de las transformaciones bioquímicas encargadas de elaborar a partir de nutrientes, diversas sustancias que pueden ser aprovechadas por el organismo. Las células hepáticas también funcionan como reservorio metabólico, pues en ellas se almacenan glucógeno, proteínas, grasas y vitaminas; todos ellos son de vital importancia en la economía energética del organismo. El hígado libera glucosa a la sangre proporcionando así la energía para que se lleven a cabo las funciones vitales para éste. En el hepatocito se sintetizan proteínas séricas que proporcionan una adecuada presión oncótica del plasma y que funcionan como vehículos de transporte para compuestos insolubles en agua como factores de coagulación y enzimas (5).

La unidad estructural del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema 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 (6) (Fig. 2).

El hígado es esencial para la vida, y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen extraordinaria capacidad de regeneración y de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas (7).

El animal de laboratorio más frecuentemente usado para estudios de regeneración experimental es la rata, cuyo hígado lobulado permite una remoción fácil y reproducible de una parte

del hígado. El desarrollo de la regeneración más intensa se observa después de la remoción del 65 al 70% del hígado. La estimulación de la síntesis del ADN hepático puede ser vista aproximadamente a las 14 horas después de la operación, con un máximo alrededor de las 24 horas. Un incremento en la actividad mitótica de los hepatocitos se puede observar después de una fase lag de alrededor de 6 horas, con un máximo cercano a las 30 horas posteriores a la operación (7).

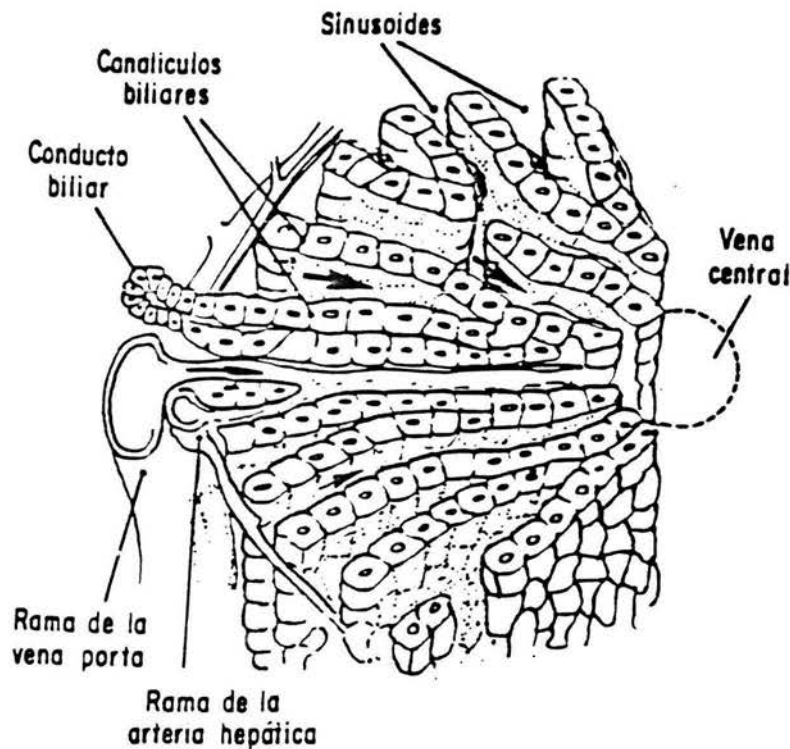


Fig. 2. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las laminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal).

El hígado funciona como una glándula de secreción exócrina porque produce y secreta bilis que fluye hacia el duodeno y que 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 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 hígado y ahí se almacenan carbohidratos (glucógeno), proteínas, vitaminas y algunos lípidos. Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por los hepatocitos 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 partes de una lipoproteína (8). Así mismo, este órgano funciona como una glándula de secreción endócrina: más del 80% de todas las proteínas que se sintetizan en el hepatocito son exportadas hacia el plasma. Dentro de estas proteínas resaltan por su importancia la albúmina, el fibrinógeno (Factor I) y la protrombina (Factor II) (9).

El hígado realiza múltiples funciones metabólicas. Las células hepáticas también sintetizan muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa para la gluconeogénesis, ácidos grasos, para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. El hígado es por excelencia el órgano encargado del metabolismo de fármacos, por su alto contenido de enzimas metabolizantes (9). Además cumple una función primordial en la regulación de los niveles séricos de los substratos que: el encéfalo, el corazón y otros órganos necesitan para funcionar debidamente (Fig. 3). Esta función reguladora se cumple extrayendo substratos de la sangre, a través de la vena porta y la arteria hepática. Además regula el contenido biliar y aporta al intestino las sustancias que éste necesita para absorber los nutrientes (9).

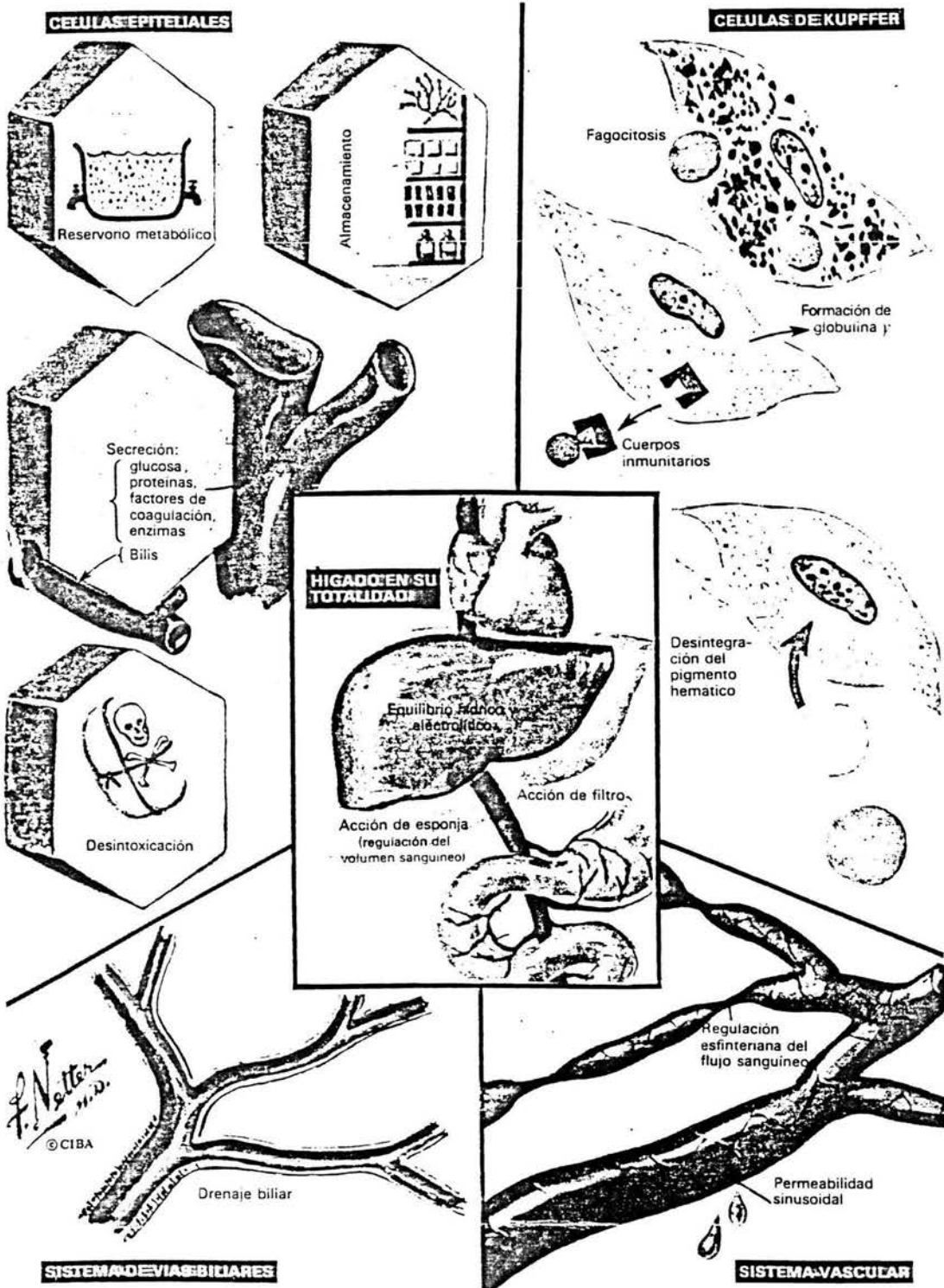


Fig. 3. Representación esquemática de las funciones del hígado, de sus componentes celulares y estructurales.

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Finalmente, la abundancia de macrófagos (representados por las células de Kupffer), hacen del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (8).

I.1.2 ELEMENTOS CELULARES DEL HÍGADO.

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 (10). El hígado contiene diferentes clases de células que cumplen diferentes funciones: las células parenquimatosas (o hepatocitos) forman la masa celular más grande (Fig. 4); sus límites celulares monoestratificados están delimitados por células endoteliales de los vasos capilares especiales del hígado, llamados sinusoides (11). Las células endoteliales están cubiertas por las células de Kupffer, las que a su vez están localizadas dentro de los sinusoides, y por medio de sus proyecciones se extienden y se unen a las células endoteliales que forman los sinusoides (12).

Los hepatocitos predominan en términos de cantidad y aún más de volumen, pues alrededor del 80% de las células hepáticas humanas, son parenquimatosas; el 20% restante lo constituyen las células endoteliales y de Kupffer (13).

La membrana plasmática del hepatocito tiene una región sinusoidal y una región lateral o membrana vasolateral. Las microvellosidades de la membrana basolateral hacen contacto con los sustratos de la sangre sinusoidal en el espacio de Disse. El segmento apical de la membrana plasmática está representado por la membrana canalicular en contacto con el árbol biliar. Las superficies basolateral y canalicular de la membrana plasmática del hepatocito representan un 87%

y un 13% de la superficie total de la membrana del hepatocito, respectivamente. La captación de substratos por los hepatocitos ocurre de preferencia en el segmento basolateral y los procesos secretorios tienen lugar por medio de las membranas canaliculares (secreción biliar) o sinusoidales (secreción endócrina) (14).

El epitelio hexagonal de las células hepáticas tiene múltiples funciones, dentro de las cuales destacan las transformaciones químicas que elaboran los constituyentes a partir de los alimentos o de sus productos (15).

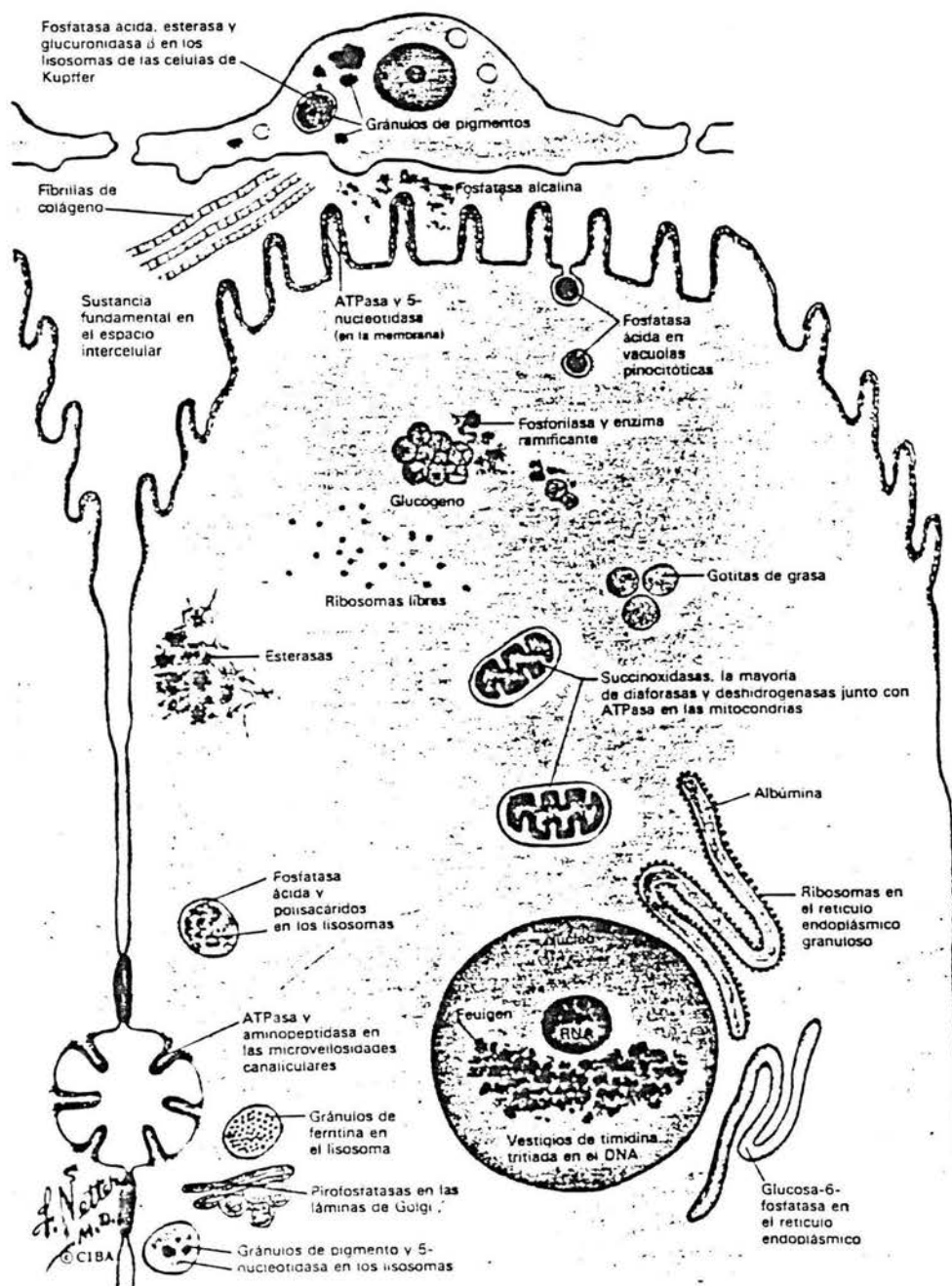


Fig. 4. Representación esquemática de las estructuras subcelulares del hepatocito.

I.1.3 LAS SALES BILIARES.

La bilis de los mamíferos tiene cuatro constituyentes principales: los ácidos biliares, los fosfolípidos, el colesterol y las bilirrubinas (16). Estas se excretan en los capilares biliares, abandonan el hígado a través del sistema de conductos biliares intrahepáticos y llegan al duodeno a través de los conductos biliares extrahepáticos (17).

En el humano se excretan alrededor de 1500 ml diarios de bilis por el colédoco. La bilis es una mezcla del líquido secretado por los hepatocitos (secreción canalicular) y las células de los conductillos (secreción de los conductillos) (18).

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, estos compuestos primarios se secretan con la bilis en el tracto gastrointestinal, donde se forman los ácidos biliares "secundarios" (desoxicólico, litocólico y ursodesoxicólico) como productos del metabolismo bacteriano (Fig. 5). 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 pierde cada día con las heces (19).

Los ácidos biliares tienen una acción digestiva o detergente debido a la presencia en su molécula de una parte hidrofílica o polar (grupos hidroxílicos), 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 (20).

El balance hidrofóbico-hidrofílico determina la capacidad de los ácidos biliares para solubilizar el colesterol, con los fosfolípidos en las micelas. El balance hidrofóbico-hidrofílico disminuye en la siguiente frecuencia: ácido litocólico > ácido desoxicólico > ácido quenodesoxicólico > ácido cólico > ácido ursodesoxicólico (21).

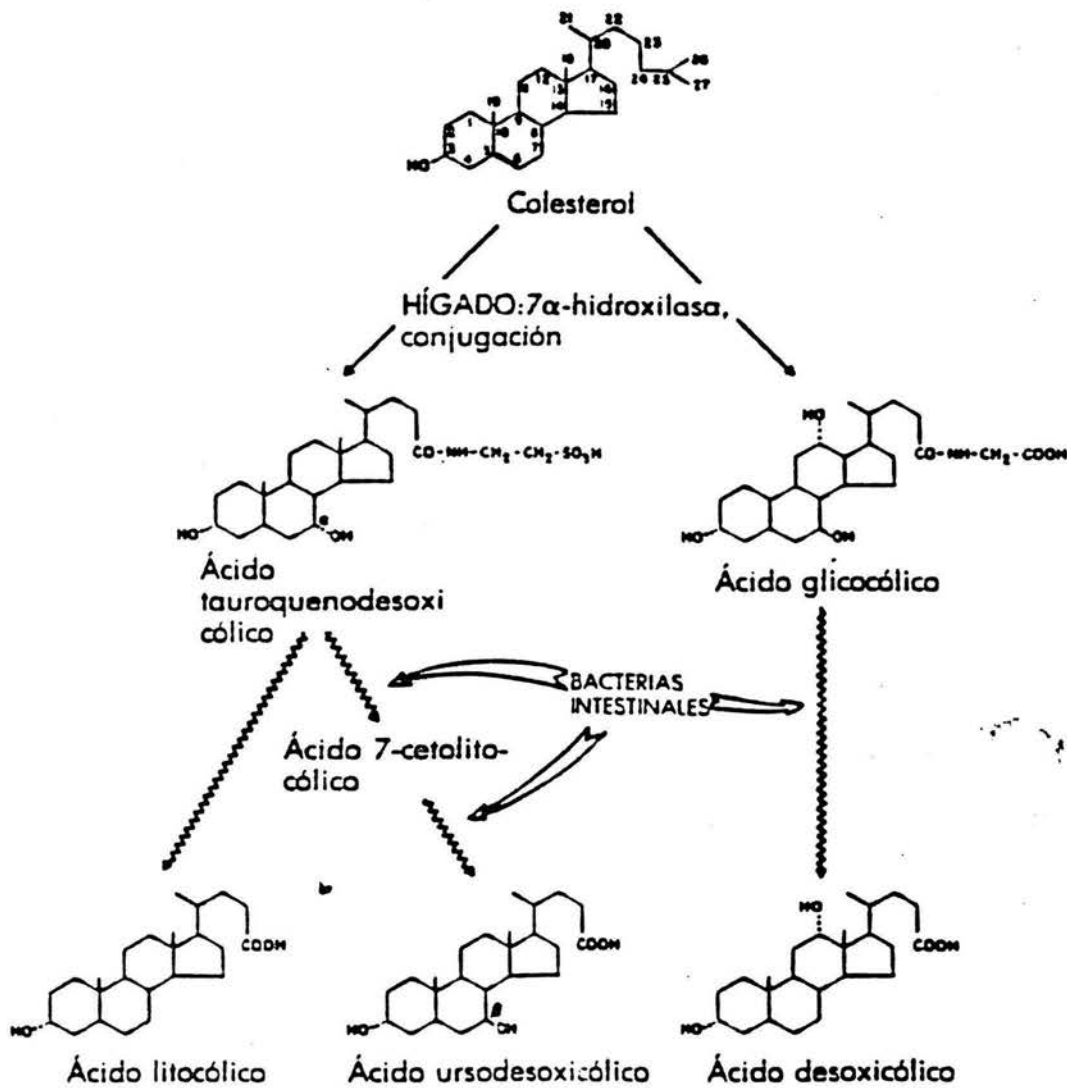


Fig. 5. Ácidos biliares.

I.1.4. METABOLISMO DE LAS GRASAS.

El hígado recibe, procesa y distribuye todos los nutrientes contenidos en la dieta. Entre estos se encuentran las grasas, las cuales aportan los ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los lípidos en 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 (22). La grasa o lípidos de la dieta se digieren y se absorben de acuerdo con la siguiente secuencia: a) 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: b) formación de micelas por agregación de los ácidos grasos y los glicéridos con sales biliares, c) 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 y finalmente d) el transporte de los quilomicrones de las células de la mucosa a los vasos linfáticos intestinales (23-24) (Fig. 6).

El colesterol es un lípido que puede proceder de la dieta de origen animal o puede ser sintetizado en el organismo principalmente en el hígado. El colesterol realiza funciones importantes como es el regular la fluidez y la función de las membranas, servir de sustrato para la formación de hormonas esteroideas en las suprarrenales, también en las gónadas y como sustrato para la síntesis de ácidos biliares (18, 25).

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 aumenta el índice de saturación (26). 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 obstructiva (27), si la obstrucción es completa y prolongada es probable que se presente un daño hepático como la cirrosis biliar secundaria (28).

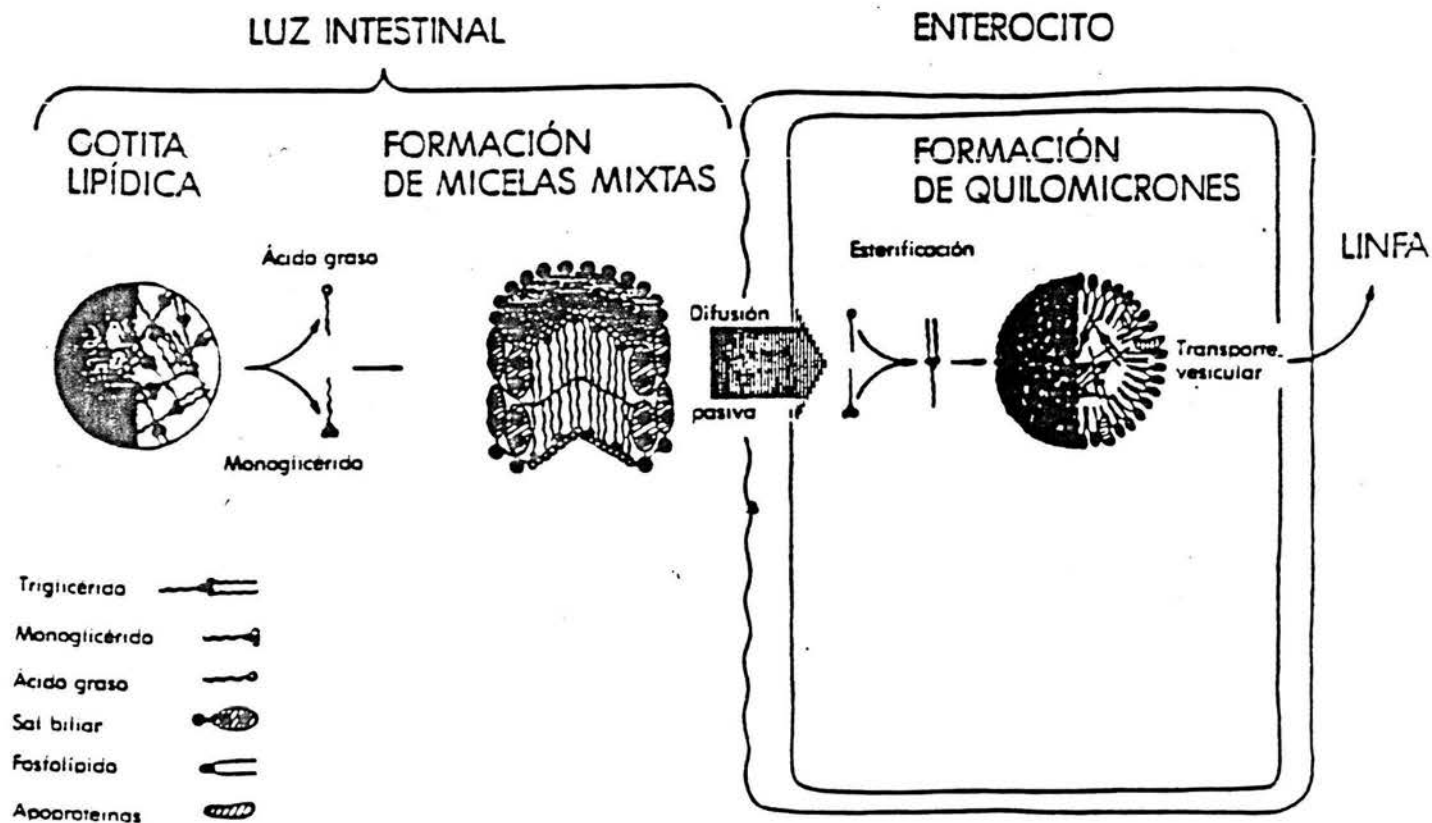


Fig. 6. Digestión y absorción de las grasas.

I.1.5. EL SISTEMA BILIAR INTRAHEPÁTICO.

Las vías biliares se inician con los finos capilares o canalículos bilíferos entre las células hepáticas (Fig. 7). Los capilares biliares forman una especie de red de alambre que constituye un sistema de intercomunicación dentro del centro de las placas de las células hepáticas. Están rodeados por los hepatocitos y parecen estar situados dentro de surcos o hendiduras formados por las propias células, aunque en realidad constituyen una parte de ellas. La bilis producida por las

células parenquimatosas es secretada en el interior de diminutos capilares o canalículos biliares que existen entre las células epiteliales glandulares y que se encuentran principalmente en la zona periportal del parénquima, en donde se designan también con el nombre de canales de Hering (15).

I.1.6. EL SISTEMA VASCULAR INTRAHEPÁTICO.

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea (Fig. 8). La vena porta, lleva la sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo del bazo y del páncreas. Ésta suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al órgano, además, es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno (29).

La vena porta se divide en ramas principales y consecutivamente en otras más pequeñas para finalmente formar las ramas terminales que penetran en el parénquima. Las vénulas de entrada se extienden a través de la placa limitante en los sinusoides periféricos dentro de los lóbulos hepáticos y suministran el volumen necesario de sangre portal al parénquima. La contractilidad de los sinusoides fuerza probablemente a una parte de la sangre a tomar un camino más largo y proporciona entonces un contacto igual de la sangre con todos los puntos de las placas de las células hepáticas (15). La arteria hepática constituye también parte del sistema vascular intrahepático colateral del tronco ciliaco, esta arteria se ramifica paralelamente con la vena porta y proporciona sangre rica en oxígeno a todo el hígado. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos. La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central (29). La vena hepática es otra región del sistema vascular del hígado, ésta resulta de la unión de las venas lobulillares que están formadas por las venas centrales, las cuales están unidas a los sinusoides (15).

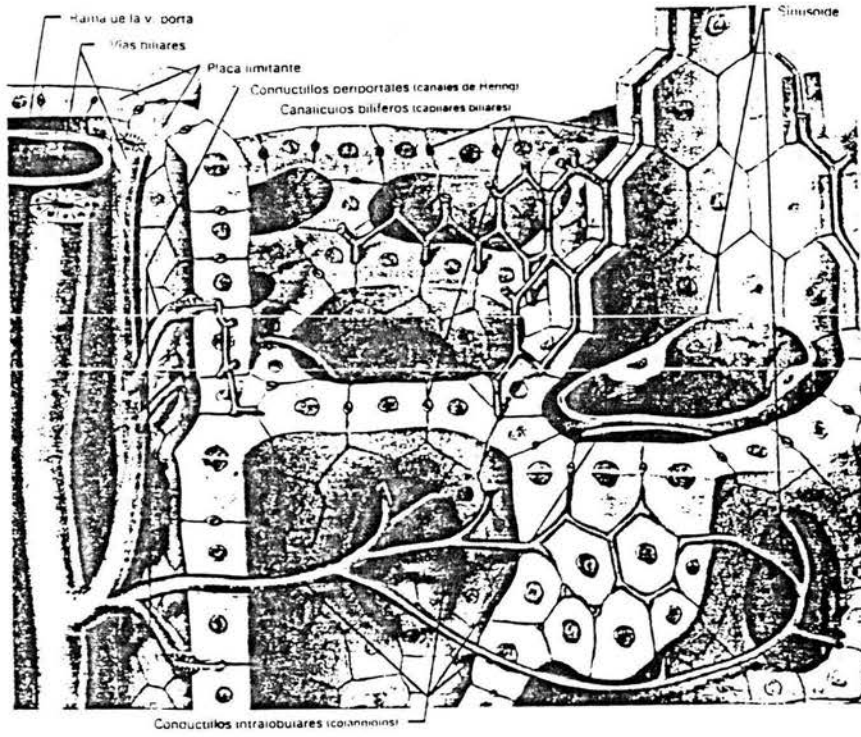


Fig. 7. Esquema tridimensional del sistema biliar intrahepático.

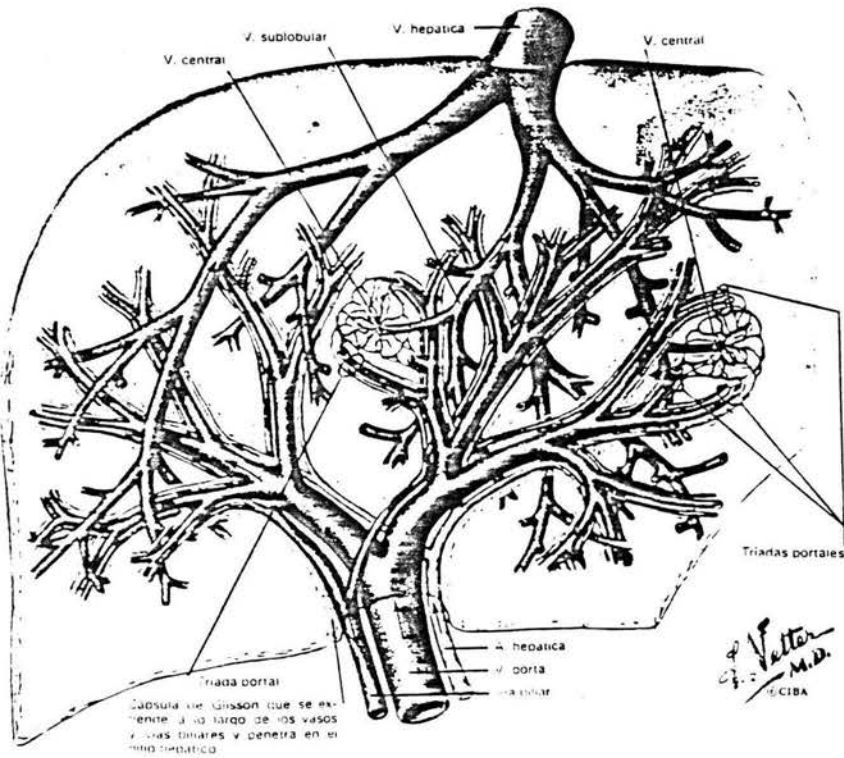


Fig. 8. Representación esquemática vascular y del sistema biliar intrahepático.

I.2. LA OBSTRUCCIÓN BILIAR EXTRAHEPÁTICA EN HUMANOS.

Los efectos de la obstrucción biliar en el hígado se observan mejor en las muestras de biopsia y se desarrollan más rápidamente en la obstrucción biliar 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, mientras que las células hepáticas de las zonas intermedia y periférica permanecen todavía normales. En esta fase, aparecen hiperbilirrubinemia y bilirrubinuria. Después tiene lugar la infiltración 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 en sus paredes, y se observa tejido de granulación alrededor de la bilis, mientras que sus núcleos permanecen sin 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 (15).

I.2.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO.

Actualmente, en la investigación hepatológica es común el empleo de animales de laboratorio, ya que pueden provocarse experimentalmente alteraciones hepáticas reproducibles

similares a las enfermedades hepáticas humanas (30).

Además, la reproducibilidad experimental de dichas alteraciones es económica. Existen varios modelos de daño hepático, dentro de los cuales destacan los siguientes:

- El modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl_4) (31).
- El modelo de daño hepático inducido por la D-galactosamina. (32).
- El modelo de daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCBL) (33).

El daño hepático inducido por CCl_4 es principalmente a nivel de los organelos del hepatocito, con lo cual el hígado se ve preponderantemente afectado, presentandose infiltración grasa, necrosis hepatocelular y por lo tanto alteraciones en los marcadores de daño hepático (ver más adelante) (34-35).

Kepler y col. en 1968, reportaron que la administración repetida de dosis grandes de D-galactosamina induce daño celular hepático severo en animales de laboratorio. Las lesiones observadas fueron necrosis de las células hepáticas e infiltración periportal de células inflamatorias características que se asemejan a la hepatitis viral humana (32).

El modelo de daño hepático inducido por la LCBC en la rata es una obstrucción mecánica extrahepática que se asemeja a la colestasis extrahepática desarrollada de manera natural en algunas patologías del humano (Fig. 9). Debido a que se impide el flujo de bilis hacia el duodeno, se propicia la regurgitación del flujo biliar hacia el hígado y de esta manera se provoca el daño (33).

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

(36). (Fig. 9).

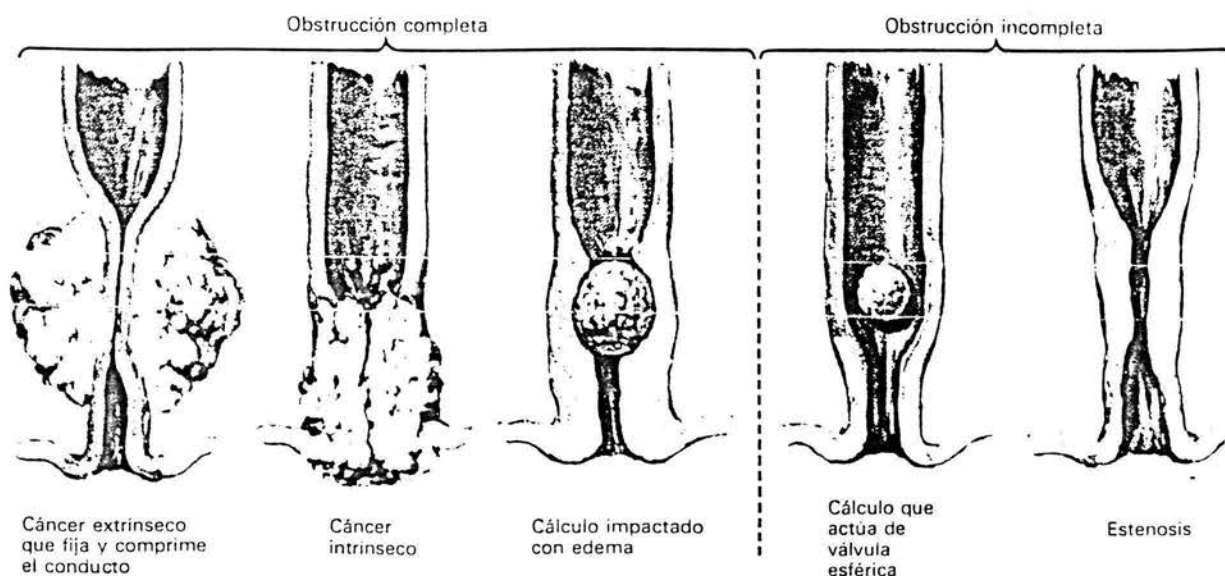


Fig. 9. Representación esquemática de algunos procesos patológicos que pueden dar lugar a la obstrucción biliar común.

Los padecimientos que causan la obstrucción de las vías biliares constituyen un reto para el diagnóstico y el manejo adecuado del individuo, aunado a los problemas agregados que frecuentemente acompañan al enfermo icterico, lo que redunda en una mortalidad que llega hasta el 34% (37).

La utilidad del modelo de la ligadura del conducto biliar común radica en que a corto plazo se pueden evidenciar los efectos devastadores sobre varios tipos celulares del hígado. Es conveniente puntualizar que este modelo experimental reproduce la mayoría de las alteraciones bioquímicas e histológicas observadas en las diversas formas de colestasis. Además, ofrece la posibilidad de evaluar la acción de agentes con actividad farmacológica sobre un proceso en particular y observar la forma en que se traduce su acción sobre otras respuestas celulares.

I.3. LA CIRROSIS HEPÁTICA.

La cirrosis hepática se define como una enfermedad crónica del hígado caracterizada por la presencia de daño celular, fibrosis y nódulos de regeneración. Estas lesiones, que pueden afectar a todo el hígado, involucran la proliferación de tejido conectivo que une las venas centrales y los espacios portales, lo cual condiciona la pérdida de la arquitectura normal y de la función hepática (38).

Cuando en el hígado existe un daño y el número de células destruidas es pequeño, 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 perpetúen 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. 10). Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente, y el proceso cicatricial predomina (39,40).

En el hígado cirrótico se presentan alteraciones no sólo en el metabolismo del tejido conjuntivo, sino también en las células parenquimatosas. Con relación a las alteraciones que se presentan en los hepatocitos, el equipo del Dr. Muriel ha encontrado diversas anomalías en sistemas enzimáticos dentro de la membrana plasmática (41-46). Han observado un aumento en la actividad del adenilato ciclasa y en el contenido de AMP_c y, como consecuencia, una disminución del contenido de glucógeno hepático. También informó de una reducción significativa en las actividades de las ATPasas de Na⁺/K⁺ y de Ca²⁺ que pueden ser responsables de las severas alteraciones en el

transporte de iones y de sustratos (47) que se presentan en los hepatocitos del hígado cirrótico.

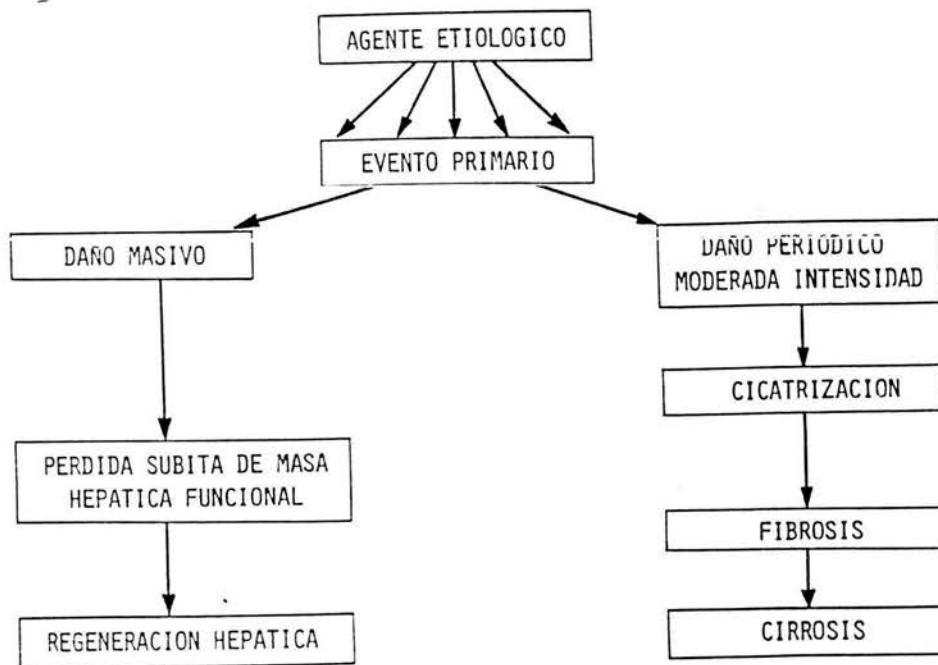


Fig. 10. Efecto de agentes hepatotóxicos.

La cirrosis hepática, en nuestro país, se encuentra entre los primeros lugares de mortalidad en el continente Americano (cuadro I) (3). En 1970, de cada 1000 defunciones 23 fueron atribuidas a la cirrosis hepática mientras que en 1986 se incrementaron a 43 de cada 1000.

Así mismo, la cirrosis hepática representa un problema de salud pública en México, ya que es una de las primeras diez causas de muerte en individuos en las edades más productivas tanto en la población general como separados por sexo (cuadro II) (3).

CUADRO I

Quince países de América con mayores tasas de mortalidad por cirrosis hepática a finales de la década de los años 80.

Hombres	Tasa ajustada (10 ⁵)	Mujeres	Tasa ajustada (10 ⁵)
Guyana Francesa	38.6	Guyana Francesa	20.8
México	35.2	R. Dominicana	11.1
Puerto Rico	24.6	Bahamas	10.0
Chile	21.9	México	9.4
Bahamas	21.1	Surinam	7.9
Guyana	21.0	Guadalupe	7.8
Guadalupe	20.0	Chile	7.3
R. Dominicana	17.9	Guyana	7.2
Guatemala	15.2	Dominicana	6.7
Surinam	14.1	Belice	6.7
Brasil	13.4	Guatemala	5.8
Venezuela	11.5	Puerto Rico	5.2
El salvador	11.3	Costa Rica	4.5
Ecuador	11.3	Cuba	3.9
Costa Rica	10.8	Perú	3.8

Fuente: OPS. *Las condiciones de salud en las Américas, 1990.*

CUADRO II

Lugar que ocupa la mortalidad por cirrosis hepática y otras enfermedades crónicas del hígado como causa de muerte en la población total y por sexo según grupo de edad, en la República Mexicana, 1985.

Edad	Total	Masculino	Femenino
Total	4	4	9
< 1 año	15	16	13
1-4 años	14	15	14
5-14 años	16	16	15
15-24 años	11	10	17
25-34 años	3	3	5
35-44 años	1	1	1
45-54 años	1	1	1
55-64 años	2	1	2
65 y más	6	6	11

Fuente: Secretaría de Salud, Dirección General de Información y Estadística, *Mortalidad por causa, 1985.*

I.4. LA FIBROSIS HEPÁTICA.

La fibrosis hepática es una característica de daño crónico al hígado. Antes de que se presente un estado cirrótico existe un proceso de fibrosis el cual consiste en el remplazamiento del parénquima hepático normal por tejido conectivo que compromete la capacidad funcional del hígado y altera la arquitectura normal relacionada a este órgano. Además, de la acumulación de tejido conectivo alrededor de los sinusoides hepáticos tanto que las barreras de difusión vascular se encuentran alterados al igual que los conductos de flujo sanguíneo sinusoidal (48).

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 (49-50) y del glucógeno en particular (51). Por otra parte, se ha encontrado que la glucoproteína llamada fibronectina, que también es liberada por los hepatocitos, es un agente quimiotáctico que puede dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (52). El cambio en los elementos celulares (aumento de fibroblastos y células inflamatorias), así como la modificación en la matriz extracelular producida localmente, puede estimular la producción de tejido conjuntivo cicatricial.

El aumento del contenido de tejido conjuntivo hepático puede, en principio, deberse a un incremento en su síntesis o 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 CCl_4 o inyectados con esquistosomas. La incorporación de prolina en la colágena está aumentada (39,40,49-52). La actividad colagenolítica puede encontrarse normal o incluso aumentada (53-54).

I.4.1. LA COLÁGENA.

La colágena es una proteína fibrosa que se encuentra en el tejido conectivo de animales superiores; es la más abundante de todas las proteínas de vertebrados superiores y constituye un tercio o más de la proteína total del cuerpo. Las colágenas de diferentes especies difieren en la secuencia de los aminoácidos (55). La estructura secundaria de la colágena es una triple hélice de cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α (56). Cada una de las cadenas se mantienen unidas mediante enlaces de hidrógeno. Los residuos de prolina determinan el tipo distintivo de ordenación helicoidal de la cadena, mientras que los pequeños grupos R de los residuos de glicina, que aparecen en cada tercera posición, permiten que las cadenas se enrosquen entre sí (55). La longitud y disposición de los aminoácidos en la cadena permiten la variabilidad de los diferentes tipos de colágena (57).

La colágena es el mayor componente de la matriz extracelular (MEC), que consiste de una porción insoluble del entorno extracelular del hígado. En el daño crónico al órgano, el contenido de colágena aumenta de 7 a 8 veces por arriba de lo normal (58). Este aumento se encuentra acompañado por cantidades elevadas de enzimas que catalizan las modificaciones postraduccionales de la matriz extra celular (MEC). Estas modificaciones ocurren dentro del retículo endoplásmico rugoso (59).

Se han identificado a la fecha 17 tipos de colágenas (60); en el hígado se encuentran 8 de

ellas (61). Los tipos de colágena más constantes en el hígado son la colágena tipo I y tipo III, también llamadas colágenas intersticiales. Estas comprenden el 80% de la colágena total en el hígado (62-63). Las colágenas tipo IV y V cada una forman alrededor del 5 al 10 % (64-65). La molécula de colágena tipo I usualmente contiene dos cadenas de polipéptidos idénticos, llamadas cadenas α -(I) y una cadena ligeramente diferente la cadena α -2(I). La colágena tipo I es la más abundante de las colágenas en el cuerpo; en el hígado forma largas bandas de fibras que se localizan principalmente en las triadas portales y regiones vasculares; también se han visto pequeñas cantidades en áreas centrolobulares (66). Por medio del microscopio electrónico se ha demostrado que las fibras de colágena tipo I también se encuentran entre las células sinusoidales y las microvellosidades del hepatocito (67). La molécula de colágena tipo III consiste de tres cadenas α -1(III), forma fibras delgadas en las mismas áreas del hígado que la colágena tipo I (66-68). La colágena tipo IV consiste de dos cadenas α 1(IV) y una α 2(IV), forma redes de fibras en la membrana basal, incluyendo los vasos, conductos biliares y axones nerviosos del hígado. También se han encontrado depósitos discontinuos e irregulares a lo largo de los sinusoides (69). La molécula de colágena tipo V, que consiste de una combinación de cadenas α 1(V), α 2(V) y α 3(V), forma bandas delgadas en algunas áreas del hígado preferentemente alrededor de los vasos y células (56).

Durante el proceso fibrótico y en la cirrosis se encuentran paquetes de colágena tipo I dentro de los septos y depósitos que pueden llegar a ser muy prominentes en el espacio de Disse (67). La acumulación de colágena tipo I predomina en el daño fibrótico avanzado (70). Los cambios fibróticos tempranos se deben al aumento de la colágena tipo III (71). En un estado fibrótico los depósitos de colágena tipo IV se hacen continuos en los sinusoides formando una verdadera membrana basal que contiene laminina (67). Esta acumulación transforma a los sinusoides dentro

en capilares verdaderos lo cual interfiere con el intercambio de metabolitos, la función y la arquitectura normal del hígado (69).

El hígado normal de una rata contiene alrededor de 1 mg de colágena por gramo de tejido fresco y en el hígado humano normal el contenido es de 5 mg (72).

I.4.2. CÉLULAS QUE SINTETIZAN COLÁGENA EN EL HÍGADO.

Se ha demostrado que los hepatocitos *in vitro* producen varios tipos de colágena, como la colágena tipo I, III, IV y V (73). Los hepatocitos *in vitro* sintetizan varios tipos de colágena al menos durante la fibrosis (69,74). Debido a que los hepatocitos ocupan el 90% del volumen celular en el hígado, la producción de colágena por estas células es importante. Bajo condiciones normales se mantiene un balance entre la cantidad de colágena sintetizada por fibroblastos y la cantidad de colágena removida por el tejido (75). Las alteraciones en la regulación de la colágena pueden ser responsables de una excesiva y progresiva fibrosis característica de ciertas enfermedades tales como la escleroderma (76).

Otros tipos celulares que son importantes en el desarrollo de la fibrosis son las células de Kupffer, los monocitos, los linfocitos y otras células inflamatorias. Estas producen mediadores biológicos activos que modulan las funciones de las células blanco no inflamatorias. Las linfocinas y monocinas pueden estimular la quimiotaxis, la división celular y la síntesis de matriz extracelular en los fibroblastos del tejido conectivo. Otros derivados de células mononucleares pueden inhibir o suprimir las funciones del fibroblasto, y las alteraciones resultantes en el balance de la producción y/o liberación de agentes que activan la producción de tejido conectivo y pueden llevar a una síntesis excesiva de colágena y por lo tanto a un estado fibrótico (77).

Existen otros tipos celulares que sintetizan colágena en el hígado cirrótico como son las células estelares (antes llamadas células de Ito o células almacenadoras de grasa) y los miofibroblastos no parenquimatosos. En cultivo se ha demostrado que estas células producen colágenas tipo I, III, IV y V (71,66-67,78). También se ha encontrado que los metabolitos del alcohol estimulan la síntesis de colágena en cultivo por parte de los miofibroblastos (79). Los miofibroblastos proliferan en áreas centrolobulares del hígado concomitante con el cambio fibrótico temprano (80).

I.4.3. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA SÍNTESIS DE LA COLÁGENA.

Existe un número de eventos que pueden modificarse farmacológicamente que alteran la síntesis del proceso postraducciona l de la molécula de la colágena . La inhibición de la hidroxilación de prolina y de la lisina resultan en procolágenas no hidroxiladas que no forman moléculas de triple hélice estables. Algunos cationes divalentes, como el zinc, interfieren con la actividad de la 4-hidroxilasa (enzima clave en el proceso postraducciona l de la colágena, esta enzima cataliza la hidroxilación de la unión peptídica de los residuos de prolina a 4-hidroxiprolina. La estabilidad de la triple hélice de la colágena depende de las uniones intramoleculares del hidrógeno involucrando a los grupos hidroxilo. Las colágenas poco hidroxiladas no son capaces de formar moléculas proteicas estables a temperatura fisiológica y son rápidamente degradadas) y al competir con las enzimas cuyos cofactores son el ión férrico (62). Los inhibidores del sitio del 2-oxoglutarato, otro cofactor de la hidrolasa, han sido desarrolladas, y trabajos preliminares indican que suprimen la hidroxilación de la colágena (62,81). Análogos de la prolina, como la 3,4-dihidroxiprolina, cis-4-hidroxiprolina y la L-azetidina-2-carboxilato, son preferentemente incorporados dentro de la

procolágena. Estos análogos no padecen hidroxilación, por lo tanto no se forma la triple hélice y la colágena es fácilmente degradada.

La interferencia con la secreción de las moléculas de la procolágena hacia el medio extracelular evita la acumulación de colágena. Los vinca alcaloides, como la vinblastina, vincristina y la colchicina inhiben la secreción proteica al interferir con la proliferación de los microtubulos, un proceso requerido por la actividad secretora (70,81).

En el medio extracelular, la ruptura de los péptidos en la región amino y carboxilo terminal de la molécula de la procolágena son necesarios para el conveniente alineamiento de las moléculas de colágena dentro de las fibras (61). La proteinasa del grupo carboxilo y la proteinasa del grupo amino que catalizan estas reacciones no han sido caracterizadas biológicamente. Varios aminoácidos, poliaminas y sus análogos inhiben la actividad de la carboxiproteinasa *in vitro* y disminuyen la síntesis de colágena en cultivos celulares (62,63). Debido a que estas proteinasas son extracelulares, los fármacos que modulen su actividad pueden tener una ventaja terapéutica ya que ellos no requerirían de penetrar a las células para llevar a cabo sus acciones. Varios inhibidores de la lisiloxidasa, enzima necesaria para la estabilización de las fibras de colágena por medio de enlaces covalentes entrecruzados, son efectivos al disminuir la acumulación de colágena en modelos animales con fibrosis hepática (62). La penicilamina a altas concentraciones inhibe a la lisiloxidasa al quelar el cobre, un cofactor necesario para la enzima. La penicilamina también altera la formación de la unión cruzada de las colágenas al interferir con el producto de la reacción de la lisiloxidasa, la lisina derivada de aldehídos, no permite la unión cruzada de los péptidos (62,82).

I.4.4. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN DE LA COLÁGENA.

La degradación de la colágena depende de: 1) la síntesis y secreción de procolagenasa, 2) la activación de esta enzima precursora, 3) de las propiedades del substrato de colágena y 4) la modulación de la actividad de la colágenasa por inhibidores proteínicos (83). La modulación de la síntesis de la colágena a varios niveles puede influir en las propiedades de las moléculas substrato o estructuras supramoleculares. Existe poca información respecto a las posibilidades del aumento en la colagenolisis *in vivo*, pero teóricamente tal incremento puede lograrse por el aumento en la tasa de síntesis de la procolagenasa o su activación o al reducir la producción o efectividad de los inhibidores proteicos de esta enzima. No obstante, es posible que en cualquier situación la tasa de síntesis de la procolagenasa puede ser limitada tanto que la modulación de la activación de la proenzima o la inhibición de la producción de los inhibidores proteicos pueden tener poco o ningún efecto. Por lo tanto, la mejor forma para aumentar la colagenolisis puede ser el uso de compuestos que aumenten la producción de procolagenasa.

Un factor mononuclear celular, una proteína de peso molecular de 14 000 a 25 000, similar o idéntica a la interleucina 1, así como la interleucina 1 murina y la interleucina 1 purificada de humano, estimulan la producción de colagenasa por células sinusoidales reumatoides y por fibroblastos dérmicos (84). Este efecto se debe al aumento en la síntesis de la proenzima asociada probablemente con el aumento en los niveles de RNA_m de procolagenasa (85).

Se conocen algunos compuestos químicos que aumentan o reducen la tasa en la producción de colagenasa por células mesenquimatosas en cultivo. El grupo anterior incluye a la citocalasina B, la colchicina y el acetato miristato de forbol (86). La estimulación en la producción de colagenasa

en el caso del éster de forbol está asociada con un aumento del nivel en el RNA_m de procolagenasa traducible (87,88). Se ha reportado que la colchicina es efectiva en el tratamiento de la fibrosis inducida con CCl₄ en ratas y en pacientes con cirrosis alcohólica (71,89) pero no se sabe si este efecto se debe al aumento en la degradación de colágena o a otras acciones de la colchicina como la inhibición de la secreción de procolágena por las células (71) o por la inhibición de la entrada de monocitos en el hígado dañado (89).

1.5. LOS INTERFERONES.

En 1957, Isaacs y Lindenmann describieron una sustancia capaz de prevenir la infección por el virus de la influenza en células de membrana corio-alantóica de embrión de pollo. Ellos denominaron a esta sustancia "Interferón" (IFN) (90). En la actualidad se sabe que los interferones constituyen una familia multigénica de proteínas reguladoras que pueden modificar profundamente una amplia variedad de funciones en las células animales, además de la replicación viral. Estas incluyen la regulación del crecimiento y tasa de división de células normales y neoplásicas, así como control de la respuesta inmune (91).

Existen tres tipos de interferones: α , β y γ . Estos se agrupan en dos clases. La clase I incluye al interferón- α (producido principalmente por los leucocitos) y el interferón- β (producido principalmente por fibroblastos, aunque también los leucocitos pueden producirlos). El interferón- α está constituido por varios "subtipos" (en la actualidad se han encontrado 14) que están antigénicamente muy relacionados. La clase II está formada por un solo tipo de interferón el γ . Este se produce durante la respuesta inmune por los linfocitos T (92).

I.5.1. FUNCIONES GENERALES DE LOS INTERFERONES.

I.5.1.1. Efectos antivirales: Se sabe que los interferones constituyen un mecanismo temprano de defensa muy importante contra las infecciones virales (93). Los interferones producen su efecto antiviral uniéndose a receptores específicos de membrana e inhibiendo la penetración o la pérdida de la cubierta viral; así como suprimiendo la síntesis o metilación de ARN mensajero, la traducción de proteínas virales y/o el montaje y liberación viral (94).

I.5.1.2. Efectos no antivirales: Los interferones pueden inhibir el crecimiento tanto de células normales como neoplásicas, además de tener efectos sobre el citoesqueleto y la membrana celular y modular una variedad de otras funciones celulares, como el control de la respuesta inmune. El primer reporte que describía un efecto celular distinto a las propiedades antivirales de los interferones fue el de Paucker en 1962 (95). Él reportó que el crecimiento de fibroblastos de ratón era inhibido por preparaciones de interferón murino. Hubo cierto escepticismo con este reporte ya que se dudó de la pureza del interferón empleado. Sin embargo, estudios posteriores realizados por Knight en 1976 (96) con muestras altamente purificadas, han demostrado inequívocamente que los interferones por sí mismos pueden inhibir la proliferación celular de los fibroblastos. También se ha demostrado que las células del epitelio mamario humano y del sistema hematopoyético disminuyen su proliferación después de ser tratadas con interferones (97). Existe evidencia de que los interferones también disminuyen la regeneración hepática *in vivo*. El interferón no sólo inhibe el crecimiento de células neoplásicas y normales *in vitro*, sino que también inhibe la división de células normales *in vivo* en ciertas condiciones experimentales, como después de una hepatectomía parcial (2/3 partes de hígado) en ratones, donde se ha visto inhibición del crecimiento hepático (98).

La enzima ornitín-descarboxilasa cataliza la reacción limitante para la síntesis de poliaminas, estas últimas están involucradas en la proliferación celular. En el hígado del embrión en regeneración, en las células tumorales y en muchos otros tejidos y células, se ha encontrado que el aumento en la actividad en la ornitín-descarboxilasa es uno de los primeros eventos en ocurrir tras el estímulo mitogénico; y la inhibición de este incremento de actividad resulta en la consecuente supresión de crecimiento celular. Algunos estudios han demostrado que cuando se añade interferón a una célula junto con un estímulo mitogénico, ocurre una inhibición dramática de la actividad de la ornitín-descarboxilasa a pesar del estímulo mitogénico. Lo anterior muestra que una manera mediante la cual el interferón puede suprimir la proliferación celular consiste en el bloqueo de la activación de la ornitín-descarboxilasa por mitógenos (97).

Se ha comprobado que el interferón promueve la activación de una proteína-cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) que se activa con la presencia de ARN bicatenario, esta proteína-cinasa fosforila a la ornitín-descarboxilasa, inactivando así a esta última. Se sabe también que las poliaminas son capaces de activar esta proteína-cinasa como medida de retroalimentación, inhibiendo la ornitín-descarboxilasa (99). Estas observaciones apoyan la idea de que el interferón inhibe de manera indirecta a la ornitín-descarboxilasa para disminuir la concentración de poliaminas y así suprimir la mitosis.

Se ha demostrado que el AMP_c puede actuar como una señal mitogénica en muchas células, como las del epitelio mamario. En aquellas células capaces de producir PKA, el propio AMP_c será capaz de estimular la fosforilación de la ornitín-descarboxilasa y con esto, disminuir la mitosis. Entonces el interferón será capaz de ejercer sus efectos inhibitorios de reproducción celular mediante la utilización de nucleótidos cíclicos sólo en aquellas células que contengan PKA (97).

El interferón también induce la producción de una oligoadenilato-sintetasa 2-5A, activable por ARN bicatenario. Se sabe que en algunas células, como los linfocitos, el nivel en la actividad de la sintetasa de oligonucleótidos es alto cuando éstas no están proliferando; y la actividad de esta enzima disminuye marcadamente cuando las células han recibido un estímulo mitogénico. Experimentos llevados a cabo con linfocitos han demostrado que la actividad de la 2-5A sintetasa se incrementa después del tratamiento con interferón (99). Lo anterior demuestra que los interferones pueden ejercer su acción antiproliferativa al interactuar con este sistema enzimático. Además, se ha visto que los oligoadenilatos sintetizados por esta enzima activan una ribonucleasa latente que degrada ARN_m viral, y contribuye de manera importante al efecto antiviral de los interferones (94). Es probable que las relaciones de estos efectos entre sí y con otros aún no determinados, provoquen los resultados antiproliferativos característicos del interferón sobre ciertos tipos celulares como los fibroblastos y los hepatocitos.

I.5.2. ANTECEDENTES DIRECTOS.

A principios de la década de los 80's el desarrollo de tecnologías de recombinantes de DNA hizo posible el uso terapéutico de los interferones en un gran número de enfermedades (100). Particularmente aquellas con neoplasia o de etiología viral. Las hepatitis crónicas B, no-A no-B y C rara vez se solucionan espontáneamente, además de que pueden conducir a la cirrosis hepática (101). Este proceso incluye una fibrosis hepática progresiva que es una característica crónica importante de daño al hígado. Los interferones tienen importantes propiedades antivirales y han sido usados en el tratamiento de hepatitis crónicas (102-103). Sin embargo, este grupo de polipéptidos ejercen también sus efectos en la producción de proteínas de matriz, tales como la colágena y la

fibronectina (104-105). Los interferones inhiben la producción *in vitro* de colágena por parte de los fibroblastos y de los condrocitos y disminuyen los niveles de estado estacionario del RNA_m de las procolágenas tipo I, II y III en estas células (106-107). Estudios *in vivo* demostraron que el interferón disminuye la reacción fibrótica alrededor de la bomba osmótica implantada subcutáneamente en el ratón (108), así como al reducir la acumulación de colágena en los pulmones de ratas tratadas con bleomicina (109). Además, el tratamiento con interferón inhibe la acumulación de colágena en la esquistosomiasis murina (110).

Brouty-Boye demostró que los interferones pueden inducir la proliferación de varias líneas celulares fibroblásticas (111). Se sabe que el interferón- α y el interferón- γ causan una inhibición dependiente de la concentración de síntesis de colágena por fibroblastos diploides humanos normales. Estos resultados sugieren que el interferón juega un papel importante en la regulación de la producción de colágena, particularmente en condiciones patológicas caracterizadas por una acumulación de células inflamatorias en tejidos afectados (105).

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL:

-Determinar la capacidad del interferón- α_{2b} para revertir la fibrosis y la cirrosis inducidas por la ligadura del conducto biliar común en ratas Wistar macho.

II.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

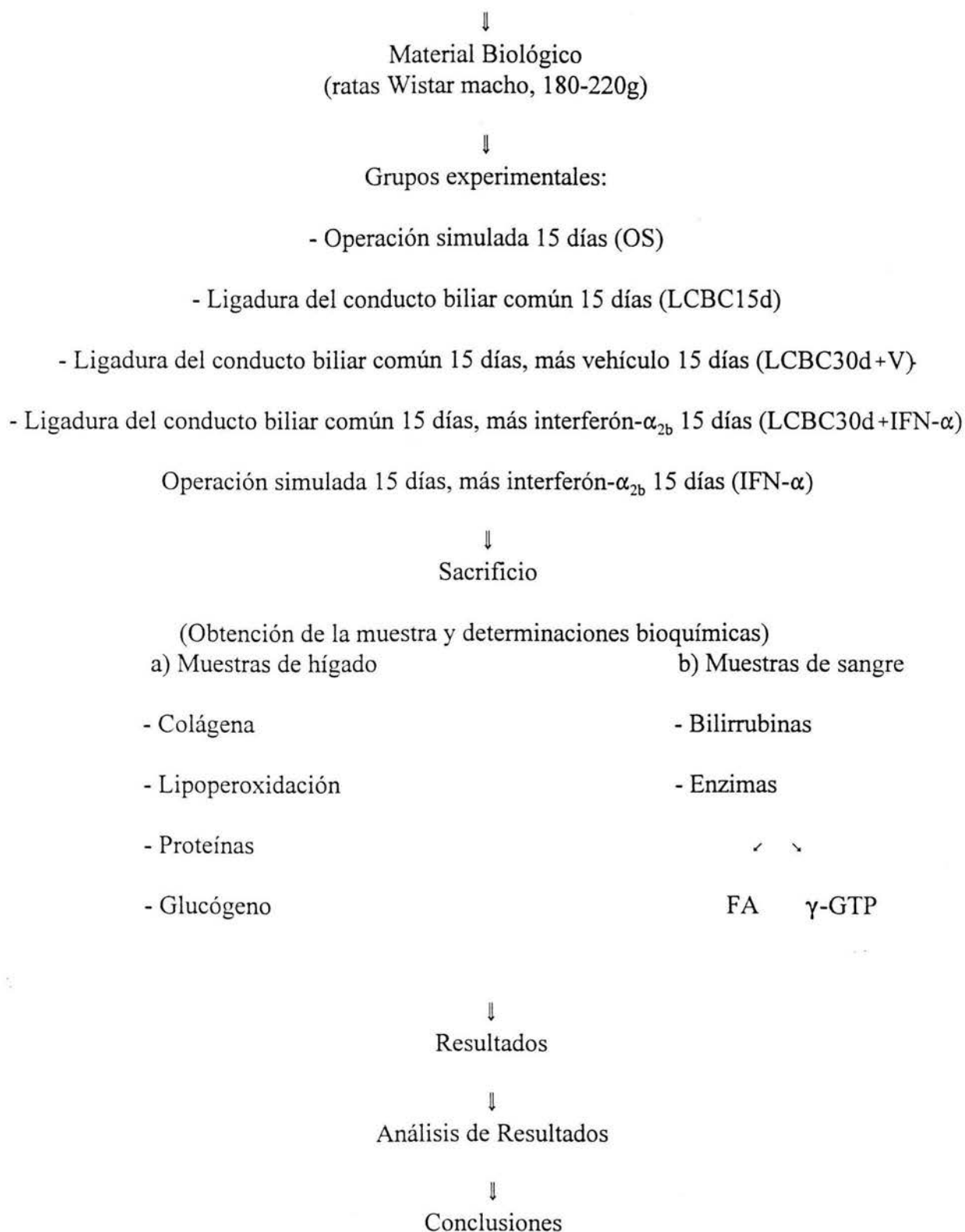
-Evaluar si el tratamiento con interferón- α_{2b} es capaz de reducir el contenido de colágena en ratas con obstrucción biliar prolongada.

-Determinar si el interferón- α_{2b} es capaz de mejorar la arquitectura hepática en ratas ligadas del conducto biliar común.

-Estudiar el efecto que tiene el interferón- α_{2b} en el contenido de glucógeno en ratas con obstrucción biliar prolongada.

-Valorar el efecto de la farmacoterapia con interferón- α_{2b} en la ligadura del conducto biliar común, midiendo marcadores convencionales séricos de daño hepático como son: las actividades enzimáticas de la fosfatasa alcalina y de la γ -glutamiltanspeptidasa; y las concentraciones de bilirrubinas.

DIAGRAMA DE TRABAJO



III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron ratas Wistar macho (180-220gr), con libre acceso a comida y agua.

III.1. GRUPOS EXPERIMENTALES: Se formaron 5 grupos experimentales:

- **Grupo control de operación simulada (OS):** En este grupo se realizó la operación simulada, la cual consiste en la manipulación de tejidos y órganos sin ligar el conducto biliar común. Esto se hace para determinar si el proceso quirúrgico ejerce influencia en los marcadores de daño hepático.

- **Grupo de ligadura del conducto biliar común (LCBC15d):** En este grupo se realizó la ligadura del conducto biliar común. Este grupo así como el grupo de OS fueron sacrificados a los 15 días después del proceso quirúrgico.

- **Grupo de ligadura del conducto biliar común (LCBC30d+V):** A este grupo se les ligó el conducto biliar común por 15 días, tiempo requerido para establecer la fibrosis (33), posteriormente se les administró el vehículo (0.2ml. de agua s.c.). A los 30 días posteriores a su operación se sacrificaron.

- **Grupo de ligadura del conducto biliar común más Interferón- α_{2b}**

(LCBC30d+IFN- α): También a este grupo se les ligó el conducto biliar común; a los 15 días, tiempo requerido para establecer la fibrosis (33), se les administró IFN- α 100,000 UI/rata/día, s.c. durante 15 días más. Los animales se sacrificaron 30 días después de la operación.

- **Grupo de Interferón- α_{2b} (IFN- α):** A este grupo se le realizó la operación simulada, a los 15 días se les administró IFN- α 100,000 UI/rata/día, s.c. durante 15 días más. Los animales se sacrificaron 30 días después de la operación.

III.2. PROCEDIMIENTO PARA LA LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR COMÚN.

- Las ratas se anestesiaron con Pentobarbital Sódico a una dosis de 1 ml. por cada 2 ½ Kg. de peso, por vía intraperitoneal.

- Una vez anestesiadas las ratas, se procedió a rasurar el pelo de la región abdominal para facilitar la manipulación de los tejidos.

- Posteriormente se realizó la asepsia de la región quirúrgica con torundas de gasa impregnadas con benzalconio.

- Limpiada la zona, se procedió a incidir los tejidos de la región abdominal, iniciando con la piel y continuando con el peritoneo. Esta incisión se realizó de una longitud aproximada de 2-3 cm.

- Cuando se visualizó la cavidad abdominal, se procedió a sacar cuidadosamente el hígado, puesto que el conducto biliar común se encuentra por debajo de éste.

- Localizado el conducto biliar común, se disecciona del peritoneo y de los ligamentos que lo unen a la vena porta y al intestino delgado.

- Con la ayuda de las pinzas y procurando no causar ningún daño a la vena porta, se ligó el conducto biliar común en dos diferentes partes, con hilo de seda (Material no absorbible).

- Una vez ligado el conducto biliar común, el hígado se introdujo nuevamente en la cavidad abdominal y se procedió a suturar los tejidos incididos de la siguiente manera:

a). El peritoneo se unió con surgete continuo anclado o entrelazado utilizando hilo catgut crómico 4-0.

b). Para suturar la piel se utilizaron puntos separados, de material no absorbible como el nylon monofilamento 4-0.

- Una vez unidos los tejidos incididos se realizó nuevamente la asepsia de la región quirúrgica. Posteriormente, se permitió que las ratas se recuperen del efecto de la anestesia.

- Una vez recuperadas, se colocaron en condominios de jaulas de acero inoxidable con el fin de evitar infecciones.

- Cada grupo se sacrificó de acuerdo al tiempo programado.

- Cada grupo de ratas fue operado y sacrificado en conjunto.

III.3. PROCEDIMIENTO PARA EL SACRIFICIO DE LAS RATAS.

Una vez cumplidos los períodos de tiempo programados, después de la OS y de ligadura del conducto biliar común, y con sus respectivos tratamientos, se procedió al sacrificio de las ratas, lo cual se realizó de la siguiente manera:

- Las ratas se colocaron en una cámara que contenía éter etílico concentrado para inducir la anestesia.

- Con la ayuda de material quirúrgico se procedió a abrir las cavidades abdominal y torácica para obtener de esta forma las muestras de sangre y de hígado, las cuales siempre se colocaron en hielo.

Las muestras de sangre se extrajeron por punción cardíaca, y se colocaron en tubos de plástico de 85 x 15 mm los cuales se instalaron en un rotor JA-21 para su posterior centrifugación (Centrífuga Beckman Modelo J2-21 o Modelo J-6M), a 4000 x g y temperatura de 4°C. De esta manera se extrajo el suero, el cual se separó en tubos de ensayo que se colocaron en hielo para posteriormente realizar las determinaciones bioquímicas.

El hígado se introdujo en solución salina fisiológica con el fin de eliminar la sangre, se colocó en un recipiente con hielo y posteriormente se pesó la cantidad necesaria para la determinación del contenido de colágena (0.1 g de hígado), de glucógeno (0.5 g de hígado) y el grado de peroxidación lipídica (0.5 g de hígado).

III.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

III.4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COLÁGENA (112).

El método se fundamenta en que la hidroxiprolina se encuentra en la colágena. La determinación de hidroxiprolina involucra la oxidación del ácido imino a ácido pirrol-2-carboxílico o pirrol y éste forma un cromóforo con *p*-dimetilaminobenzaldehído que se lee a 560 nm.

REACTIVOS:

1. Solución amortiguador. Buffer acetato de sodio-ácido cítrico, pH = 6.
2. Solución de cloramina T (Cloramina T).
3. Reactivo de Ehrlich.

CURVA ESTÁNDAR:

Tomar 600 μl de solución estándar 10 $\mu\text{mol/ml}$ y llevarlos a 6 ml de agua. Así se tiene una solución 1 $\mu\text{mol/ml}$ = 1nmol/ μl .

No. Tubo	Solución 1 $\mu\text{mol/ml}$ (μl)	H ₂ O (ml)	Contenido de hidroxiprolina en nmol X abscisas
1	10	1.900	10
2	30	1.970	30
3	50	1.950	50
4	100	1.900	100
5	300	1.700	300
6	500	1.500	500
7	700	1.300	700
8	1000	1.000	1000
9	1500	0.500	1500
10	0.0	2.000	0.0

Se mide la absorbancia de los tubos a 560 nm.

La curva estándar se construye al graficar la concentración de hidroxiprolina vs.

absorbancia.

TÉCNICA:

1. De una muestra 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 selladas, se colocan en el horno a 100°C durante 20 horas.
4. Ya hidrolizadas, se rompe la ampolleta y se colocan nuevamente en el horno a secar a una temperatura de 40°-50°, aproximadamente 20 horas.
5. Las muestras secas se resuspenden con solución amortiguadora. Inicialmente con 2 ml, se agitan en el vortex y se vacía en un tubo de ensaye. Después se agrega 1 ml nuevamente en la ampolleta (para lavarla) y se vacía en el mismo tubo de ensaye. Se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min.
6. El sobrenadante se retira con una pipeta Pasteur y se deposita en un tubo de ensaye. Se le agrega una pequeña porción de anorita, se agita durante 1 min. 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 le vuelve agregar anorita y se centrifuga.
7. Se toma 1 ml de este sobrenadante más 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 min. a temperatura ambiente.
8. Pasados los 20 min. se detiene la reacción con la adición de tiosulfato de sodio 2M 500 µl. 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 min.
10. Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se tapa con su respectivo tapón

y se coloca en un baño de agua hirviendo durante 20 min.

11. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agrega 6 ml de tolueno y se agita durante 1 min.

12. Tomar una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno y mezclar con 4 ml de reactivo de Erlich vigorosamente.

13. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 min. para desarrollar color.

Leer las absorbancias a 560 nm.

III.4.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) (113).

El método se fundamenta en que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de malondialdehido (MDA) formando un pigmento rojo, el cual tiene un máximo de absorción en solución ácida a 532 nm de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

REACTIVOS:

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

TÉCNICA:

1. Se homogenizan 0.5g de hígado con 5 ml de agua tridestilada, con lo cual se obtiene un homogenado al 10% P/V.
2. Se toman 300 μl del homogenado y se completa a 1 ml con Tris-HCl 150 mM pH 7.4.
3. Se incuba a una temperatura de 37° durante 30 min. Al termino de este tiempo, a cada muestra se

le adicionan 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético (TCA) al 15%.

4. Se incuban los tubos en baño maría de agua hirviendo durante 15 min.
5. Se centrifugan a 3000 rpm durante 10 min.
6. Se lee el sobrenadante a 532 nm de absorbancia.

III.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES (114).

La determinación del contenido de proteínas totales se mide 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-proteína es virtualmente completo, rápido y permanece en solución, aproximadamente 1 hora.

REACTIVOS:

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

CURVA ESTÁNDAR: Albumina sérica bovina (1mg/ml)

Tubo	Albumina bovina (μ l)	Cant. de proteínas (μ g)	Agua tridestilada (μ l)	Reactivo de Bradford (ml)
B	0	0	100	2.4
1	5	5	95	2.4
2	10	10	90	2.4
3	15	15	85	2.4
4	20	20	80	2.4
5	30	30	70	2.4
6	40	40	60	2.4
7	50	50	50	2.4
8	60	60	40	2.4
9	70	70	30	2.4
10	80	80	20	2.4

Se gráfica la cantidad de proteínas vs. absorbancia.

TÉCNICA:

1. Se toman 100 μ l del homogenado de hígado utilizado para la determinación 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 (consiste en 100 μ l de agua tridestilada).
4. Se agregan 2.4 ml de reactivo Bradford tanto al blanco como a las muestras.

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

III.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA (FA) (115).

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cual se lee a 410 nm, en un espectrofotómetro .

Se prepara una curva estándar de p-nitrofenol para determinar la actividad de la Fosfatasa Alcalina.

REACTIVOS:

1. Solución estándar de p-nitrofenol de 10 μ moles/ml.
2. NaOH 0.02 N.
3. 0.5 ml de la solución (1) se aforan a 100 ml con NaOH 0.02 N.

CURVA ESTÁNDAR:

Tubo	ml de sol. (2)	ml de sol. (3)	μmoles de sustrato hidrolizado
1	0.5	5.0	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.100
4	3.0	2.5	0.150
5	4.0	1.5	0.200
6	5.0	0.5	0.250

Se mide la absorbancia de los tubos a 410 nm.

La curva estándar se construye graficando la concentración en μmoles de sustrato hidrolizado vs. absorbancia.

TÉCNICA:

- En un tubo de ensayo 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.
- Esta mezcla se incuba en a 37°C por 5 min.
- Posteriormente se añaden 50 μl de suero, se agita suavemente y se incuba a 37°C por 30 min.
- La reacción se detiene adicionando 5 ml de NaOH 0.02 N.

5. Se determina la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro.

La lectura se interpola en la curva estándar de p-nitrofenol. La actividad enzimática se reporta en μ moles de p-nitrofenol/litro de suero por minuto (μ moles/L min.).

III.4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (γ -GTP) (116).

En este método se utiliza como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima (γ -GTP), y de un receptor del grupo γ -l-glutamil (como es la glicil glicina), produce γ -l-glutamilglicil glicina y p-nitroanilina que puede ser cuantificada espectrofotométricamente a 410 nm.

CURVA ESTÁNDAR:

Se prepara una curva estándar de p-nitroanilina de la siguiente manera:

Se pesan 13.81 mg de p-nitroanilina y se afora a 250 ml con ácido acético 1.5 M. Se preparan una serie de tubos de la siguiente manera:

Tubo	γ -glutamyl-p-nitroanilina (nmol/ml)	Solución p-Nitroanilina (μ l)	H ₂ O (μ l)
1	10	50	1950
2	20	100	1900
3	30	150	1850
4	50	250	1750
5	75	375	1625
6	100	500	1500
7	150	750	1250
8	200	1000	1000

La curva estándar se construye graficando la concentración de la p-nitroanilina en μ moles de cada una de las diluciones vs. absorbancia.

TÉCNICA:

1. En un tubo de ensayo se agregan los siguientes reactivos:

- 400 μ l de tris-HCL 200 mM (pH = 8.2)
- 100 μ l de MgCl₂ 200 mM
- 100 μ l de glicil-glicina 40 mM (pH = 8.2)
- 200 μ l de γ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM

2. Previa incubación de 10 min. a 37°C se inicia la reacción agregando 200 μ l de suero. Se agita bien la mezcla y se introduce en un baño a 37°C.

3. La reacción enzimática se detiene a los 30 min. 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. El resultado se interpola en la curva estándar de p-nitroanilina, y la actividad enzimática se reporta en μmoles de p-nitroanilina/litro de suero por minuto ($\mu\text{mol/l.min.}$).

III.4.6. DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA.

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado un colorante azoico que en solución neutra es rojo y en solución alcalina, azul. El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona "Directamente", mientras que la bilirrubina "Indirecta" libre reacciona tan sólo en presencia de un acelerador. Para realizar estas pruebas se utiliza un "kit" comercial Merck.

III.4.6.1. BILIRRUBINA TOTAL (117).

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 aísle, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (Coloración mixta verde), de manera selectiva por fotometría a 578 nm.

REACTIVOS:

- Ácido sulfanílico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ 29 mmol/l en HCl 0.17 N).

-Nitrito de sodio (NaNO_2 29 mmol/l).

-Acelerador (Cafeína 130 mmol/l, benzoato de sodio 156 mmol/l, acetato de sodio 460

mmol/l).

-Solución II de Fehling (Tartrato de potasio y sodio 930 mM/l, hidróxido de sodio 1.9 M/l).

TÉCNICA:

Solución	Problema	Blanco
Ácido 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
Se mezcla y se deja reposar de 10 a 60 minutos a temperatura entre 15°C y 25°C.		
Solución, II de Fehling	1.0 ml	1.0 ml

Se mezcla y se mide la absorbancia de los problemas contra el blanco, a una longitud de onda de 578 nm al cabo de 5 a 30 minutos.

Cálculo:

Medición frente a un blanco:

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

III.4.6.2. BILIRRUBINA CONJUGADA (DIRECTA) (118).

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

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

TÉCNICA:

Solución	Problema	Blanco
Ácido 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

Se mezcla inmediatamente, se deja reposar a temperatura entre 15°C y 25°C. A los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, se miden las absorbancias de los problemas contra el blanco a 546 nm.

Cálculo:

Concentración de bilirrubina directa = Abs. x 240 μ mol/L.

III.4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCÓGENO HEPÁTICO (119).

Este procedimiento consiste en la digestión en caliente de una muestra de hígado, que es hidrolizada con KOH al 30% dando como resultado glucosa, la cual se cuantifica colorimétricamente con el reactivo de la antrona.

TÉCNICA:

1. Se pesan 0.5 g de muestra de hígado y se colocan en tubos de ensayo, se añaden 1.5 ml de una solución de KOH al 30% a cada uno de ellos y se hierve en baño maría durante 30 minutos.
 2. Después de enfriar los tubos, la muestra digerida se coloca en un matraz volumétrico de 25 ml diluyéndose la muestra a ese volumen con agua tridestilada.
 3. Del matraz anterior se toma 1 ml de la dilución y se coloca en otro matraz volumétrico de 25 ml, posteriormente se lleva al volumen con agua tridestilada. Esto se realiza con el objeto de que la glucosa en esta dilución, se encuentre en un rango de concentración de 3 a 30 $\mu\text{g/ml}$.
 4. De la última dilución se coloca 1 ml en tubos de ensayo, se prepara además un blanco que contenga 1 ml de agua y un estándar que contenga glucosa a la concentración de 20 $\mu\text{l/ml}$.
 5. Se prepara la solución de antrona al 0.2% en H_2SO_4 concentrado.
- Los tubos de muestras problema, así como el estándar y el blanco se colocan en hielo, se les añade 2 ml de reactivo de antrona y se agitan suavemente.
6. Los tubos se tapan con canicas y "masking-tape" y se colocan en un baño maría durante 15 min.
 7. Se enfrían sobre hielo y se leen a 620 nm.

Cálculos:

La concentración de glucógeno se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de glucógeno} = \frac{20 \mu\text{g} \times U}{1.11 \times S}$$

en donde:

U = Es la absorbancia de la muestra problema.

S = Es la absorbancia del estándar de glucosa.

1.11 = Es un factor de conversión determinado por Morris (120), para convertir la glucosa a glucógeno.

Los resultados se expresan en gramos de glucógeno/100 g de hígado.

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO (121).

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo de ratas son promediados, obteniéndose la media o promedio aritmético y el error estándar de la media (ESM). Las diferencias entre los grupos se obtienen mediante un análisis de varianza con prueba de Tukey.

IV. RESULTADOS

La figura 1 muestra el curso temporal del contenido de colágena hepática en los diferentes grupos experimentales. Como puede observarse, la acumulación de colágena aumentó 5 veces su contenido en el grupo al que se le ligó el conducto biliar y se sacrificó a los 15 días posteriores a la operación (LCBC15d); y 6 veces más en el grupo al que se ligó por 15 días y durante 15 días más se les administró únicamente vehículo (LCBC30d+V). La acumulación de colágena se revirtió a niveles muy cercanos a los del grupo control de operación simulada (OS), cuando a los animales se les ligó el conducto durante 15 días, y después se les administró el interferón- α durante 15 días más (LCBC+INF- α) encontrándose una diferencia significativa en relación a los grupos de LCBC15d y LCBC30d+V para una $p < 0.05$.

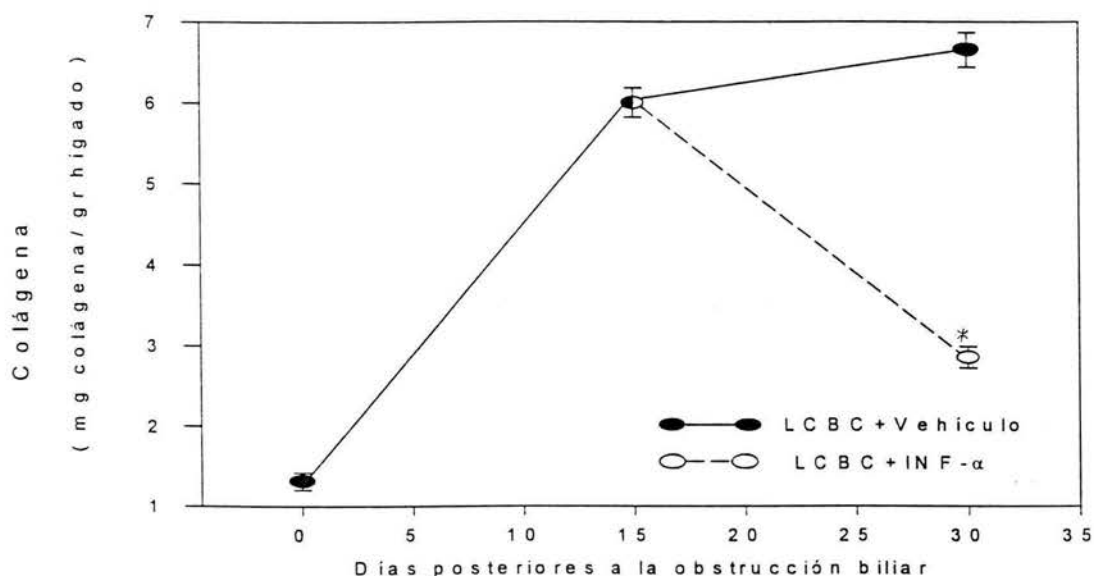


Figura 1. Curso temporal del contenido de colágena hepática después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC) en la rata. El interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. Los resultados se expresan como la media \pm el EEM de 6 ratas. Claves: (*) indica que existe una diferencia significativa del grupo de LCBC comparado con el grupo al que se le administró el INF- α . Con una $p < 0.05$.

La figura 2 muestra el curso temporal del grado de peroxidación lipídica en los diferentes grupos experimentales. El grado de peroxidación lipídica aumentó 2.5 veces en el grupo de LCBC15d y 2.8 veces en el grupo de LCBC30d+V comparados con el grupo OS. La administración de interferón- α provocó la disminución del grado de peroxidación lipídica del grupo de LCBC+INF- α a valores muy cercanos al control, observándose una diferencia significativa de este grupo en relación con los grupos de LCBC15d y 30d+V para una $p < 0.05$.

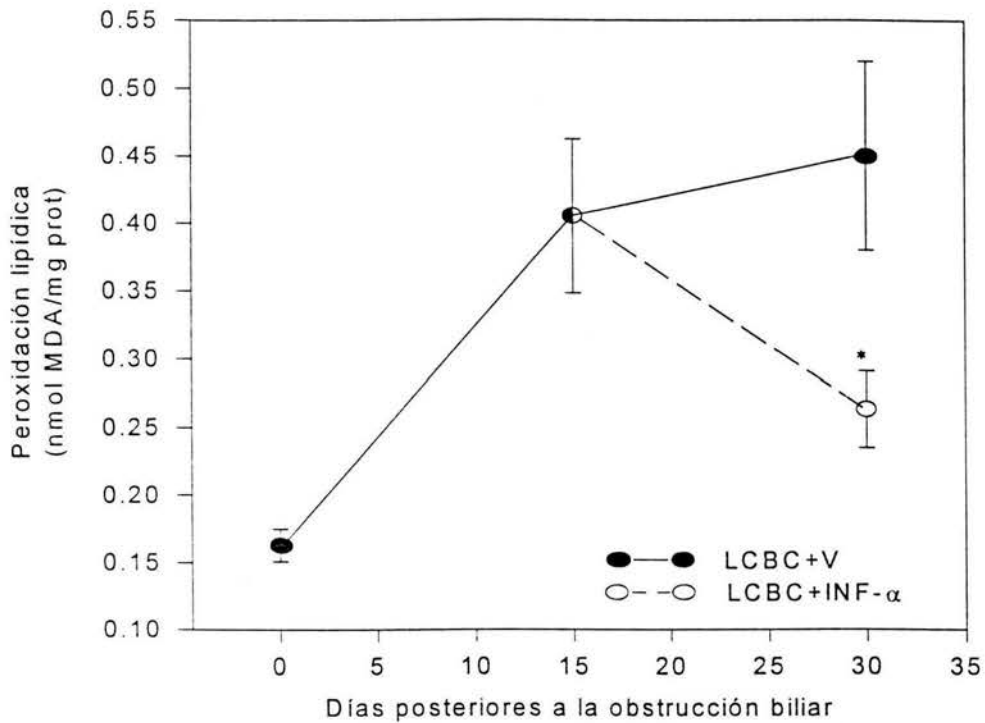


Figura 2. Curso temporal del grado de peroxidación lipídica en hígado después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC) en la rata. El interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. Los resultados se expresan como la media \pm el EEM de 6 ratas. Claves: (*) indica que existe una diferencia significativa del grupo de LCBC comparado con el grupo al que se le administró el INF- α . Con una $p < 0.05$.

El contenido de glucógeno hepático disminuyó marcadamente ; 60% menos en el grupo de LCBC15d y un 84% menos del grupo de LCBC30d+V en relación al grupo control de operación simulada (OS). El tratamiento con INF- α restauró el contenido de glucógeno observado en el grupo de LCBC+INF- α a nivel del valor control, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) de este grupo en relación a los grupos ligados (figura 3).

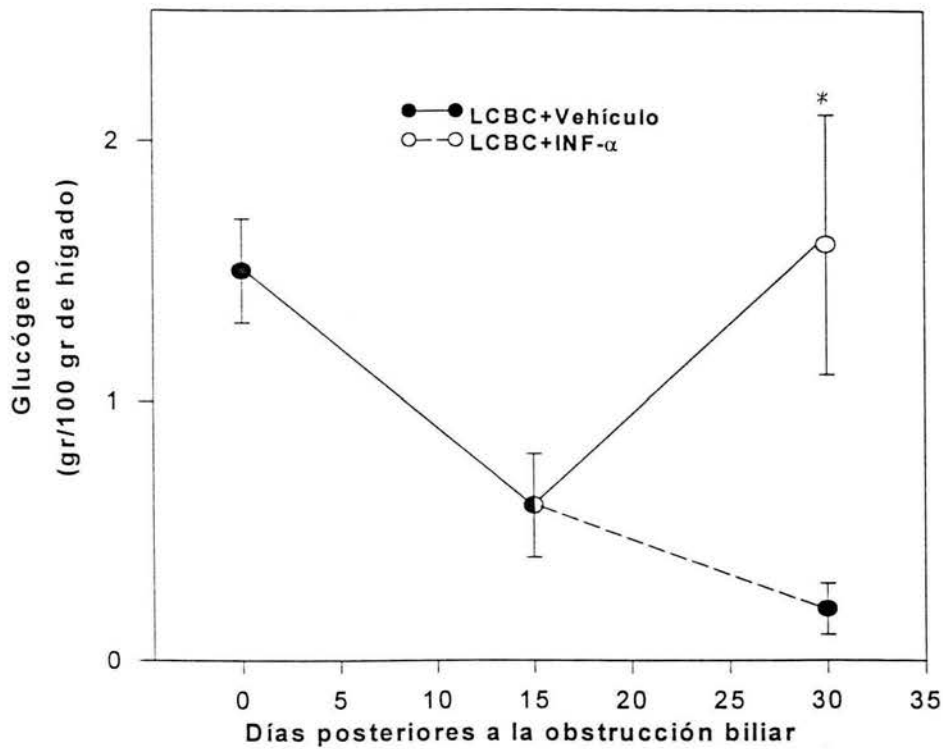


Figura 3. Curso temporal del contenido de glucógeno hepático después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC) en la rata. El Interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. Los resultados se expresan como la media \pm el EEM de 6 ratas. Claves (*) indica que existe una diferencia significativa del grupo de LCBC comparado con el grupo al que se le administró el INF- α . Con una $p < 0.05$.

En relación a la actividad de la fosfatasa alcalina (FA), se observó un aumento de 2.6 veces de la actividad de esta enzima en suero en el grupo de LCBC15d y de 2.52 veces en el grupo de LCBC30d+V comparados con el grupo control. El tratamiento con INF- α provocó que disminuyera la actividad de la FA en suero del grupo de LCBC+INF- α sin llegar al nivel del grupo control, aunque sí existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) de este grupo comparado con los grupos de LCBC15d y 30d+V (figura 4). En cuanto a la actividad de la enzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP), aumentó 2.5 y 2.8 veces en los grupos ligados por 15 y 30 días respectivamente, comparados con el grupo de OS. En contraste, la administración del INF- α provocó la disminución de la actividad de esta enzima en suero a nivel del control de operación simulada como puede observarse en la figura 5; encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) del grupo de LCBC+INF- α en comparación con los grupos ligados.

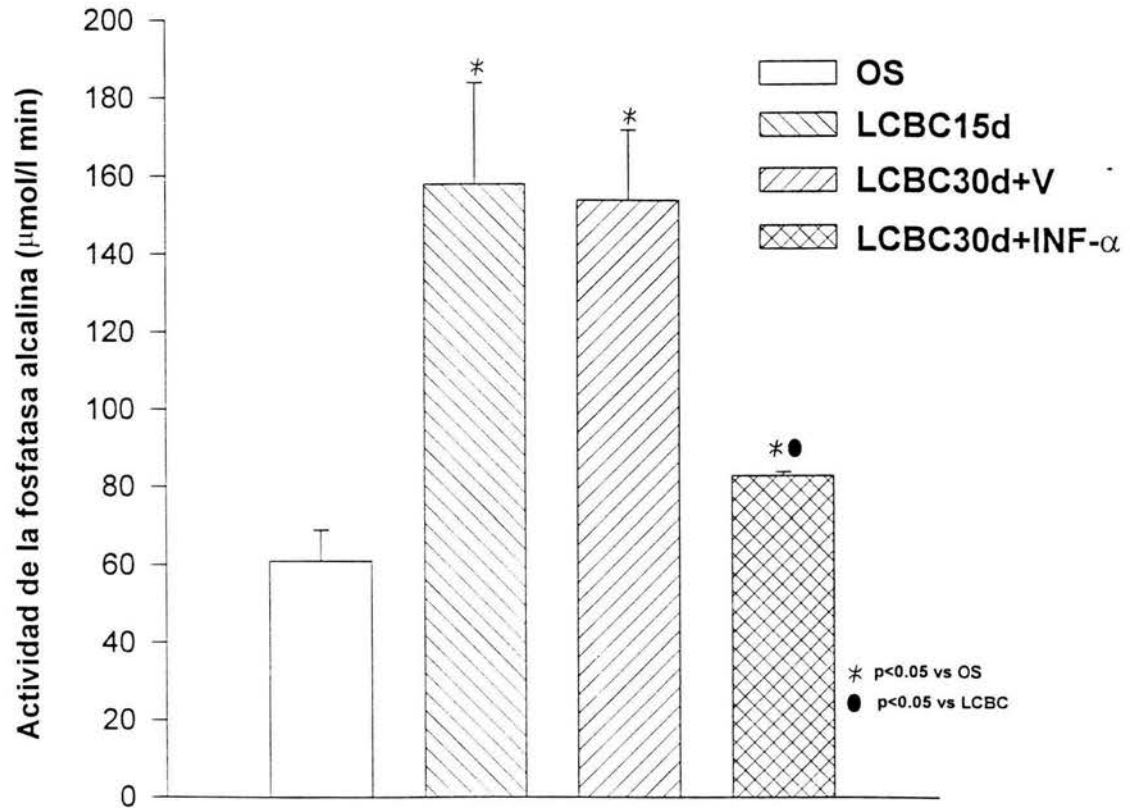


Figura 4. Actividad de la fosfatasa alcalina determinada en sueros de rata después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC). El interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. OS: operación simulada; LCBC15d: ligadura del conducto biliar común a los 15 días; LCBC 30d+V: ligadura del conducto biliar común a los 30 días más vehículo y LCBC+INF- α : ligadura del conducto biliar común a los 30 días más interferón- α . (*) significa una $p<0.05$ vs OS. (●) significa una $p<0.05$ vs LCBC a los 15d y 30d+V.

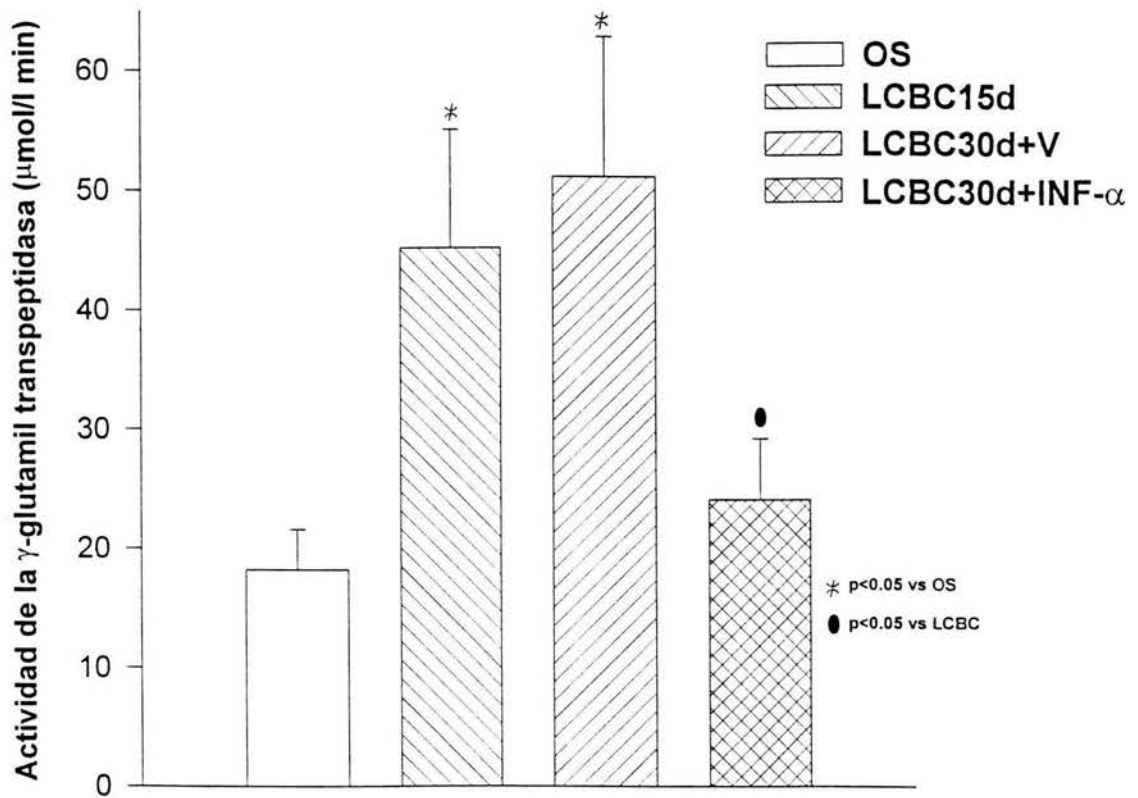


Figura 5. Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa determinada en sueros de ratas después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC). El interferón $-\alpha$ (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. OS: operación simulada; LCBC15d: ligadura del conducto biliar común a los 15 días; LCBC30d+V: ligadura del conducto biliar común a los 30 días más vehículo y LCBC30d+INF- α : ligadura del conducto biliar común a los 30 días más interferón- α .

(*) significa una $p<0.05$ vs OS.

(●) significa una $p<0.05$ vs LCBC15d y 30d+V.

La concentración de bilirrubina total aumentó en 4 y 18 veces en los grupos a los que se les ligó el conducto biliar durante 15 y 30 días; en tanto que la bilirrubina conjugada (directa) aumentó 19 y 20 veces si la ligadura persistió por 15 y 30 días respectivamente, al ser comparados con el grupo que sufrió la operación simulada. Por otro lado, la concentración de ambas bilirrubinas disminuyó marcadamente cuando a las ratas ligadas se les administró interferón- α ($p < 0.05$), como lo demuestran las figuras 6 y 7 (bilirrubina total y bilirrubina conjugada). Los niveles de concentración de ambas bilirrubinas son muy semejantes a los del grupo de operación simulada.

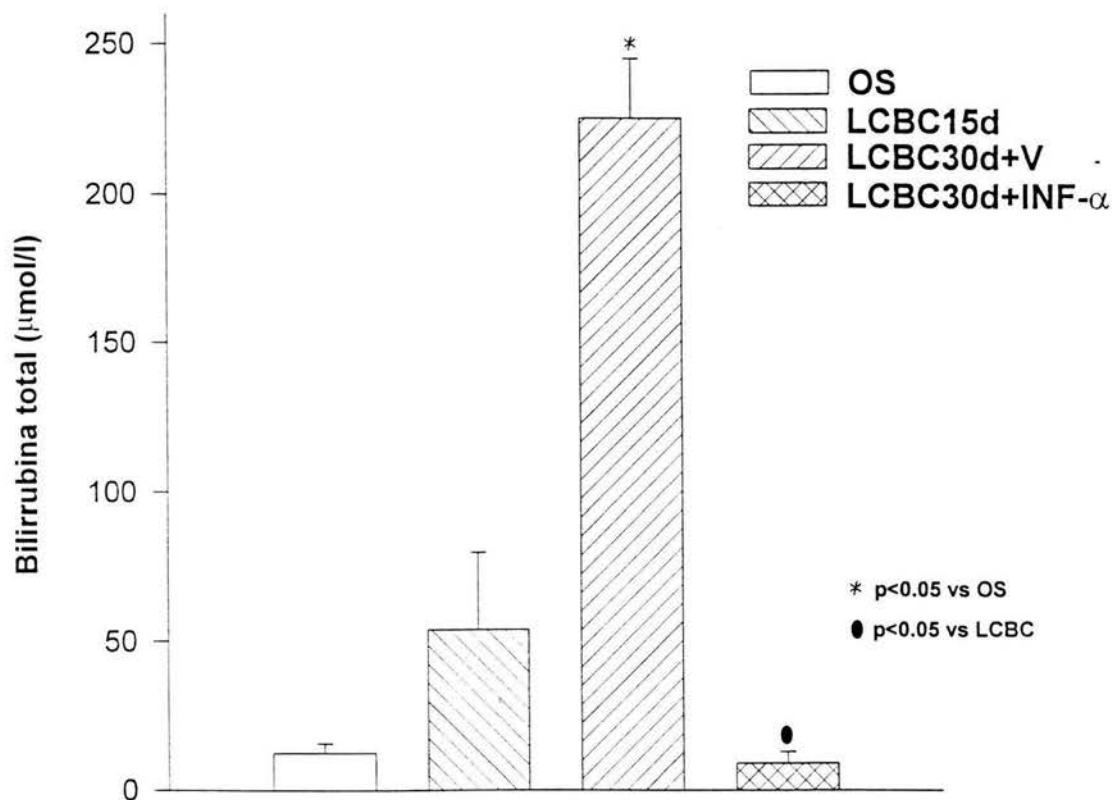


Figura 6. Concentración de bilirrubina total determinada en sueros de ratas después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC). El interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. OS: operación simulada; LCBC15d: Ligadura del conducto biliar común a los 15 días; LCBC30d+V: ligadura del conducto biliar común a los 30 días más vehículo y LCBC+INF- α : ligadura del conducto biliar común a los 30 días más interferón- α .

(*) significa una $p<0.05$ vs OS.

(●) significa una $p<0.05$ vs LCBC a los 15d y 30d+V.

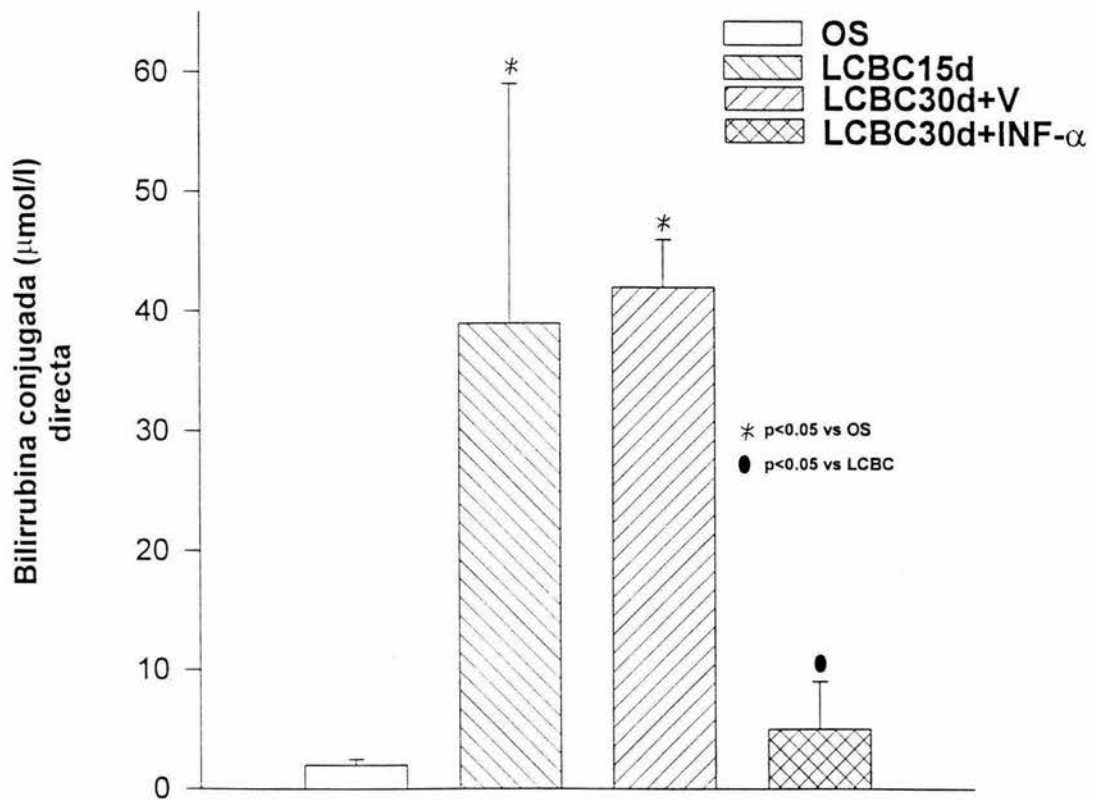


Figura 7. Concentración de bilirrubina conjugada (directa) determinada en sueros de ratas después de la ligadura del conducto biliar común (LCBC). El interferón- α (INF- α) se empezó a administrar a los 15 días posteriores a la LCBC y durante 15 días más. -- OS: operación simulada; LCBC15d: ligadura del conducto biliar común a los 15 días; LCBC30d+V: ligadura del conducto biliar común a los 30 días más vehículo y LCBC+ INF- α : ligadura del conducto biliar común a los 30 días más interferón- α . (*) significa una $p<0.05$ vs OS. (●) significa una $p<0.05$ vs LCBC a los 15d y 30d+V.

El estudio histológico reveló que, la obstrucción prolongada del conducto biliar causó el incremento en el contenido de colágena alrededor de las triadas portales y necrosis celular con pérdida de la arquitectura normal del órgano, sobre todo en el grupo al que se ligó por 30 días (figura 9 y 10). En el grupo control de operación simulada no hubo ningún cambio histológico (figura 8). La administración de interferón- α a ratas a las que se les ligó el conducto biliar, provocó que el acúmulo de colágena no sea tan importante, que las bandas sean más delgadas, que la necrosis celular disminuya y por lo tanto la arquitectura de los hepatocitos se haya normalizado al compararse con los grupos ligados (figura 11); aunque sí existen bandas muy delgadas de colágena y pequeñas zonas con necrosis celular.

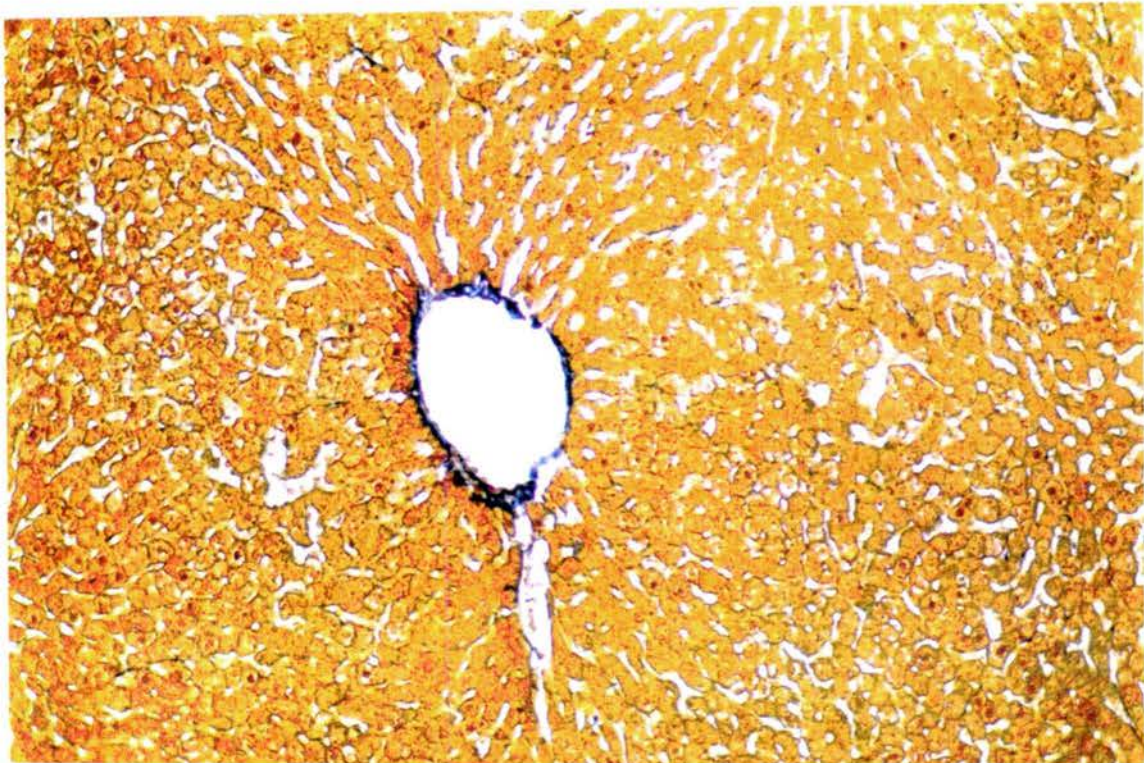


Figura 8. Corte histológico de hígado de rata de operación simulada teñida con la técnica de Mallory. La colágena se tiñe de azul. Amplificación 100 X.

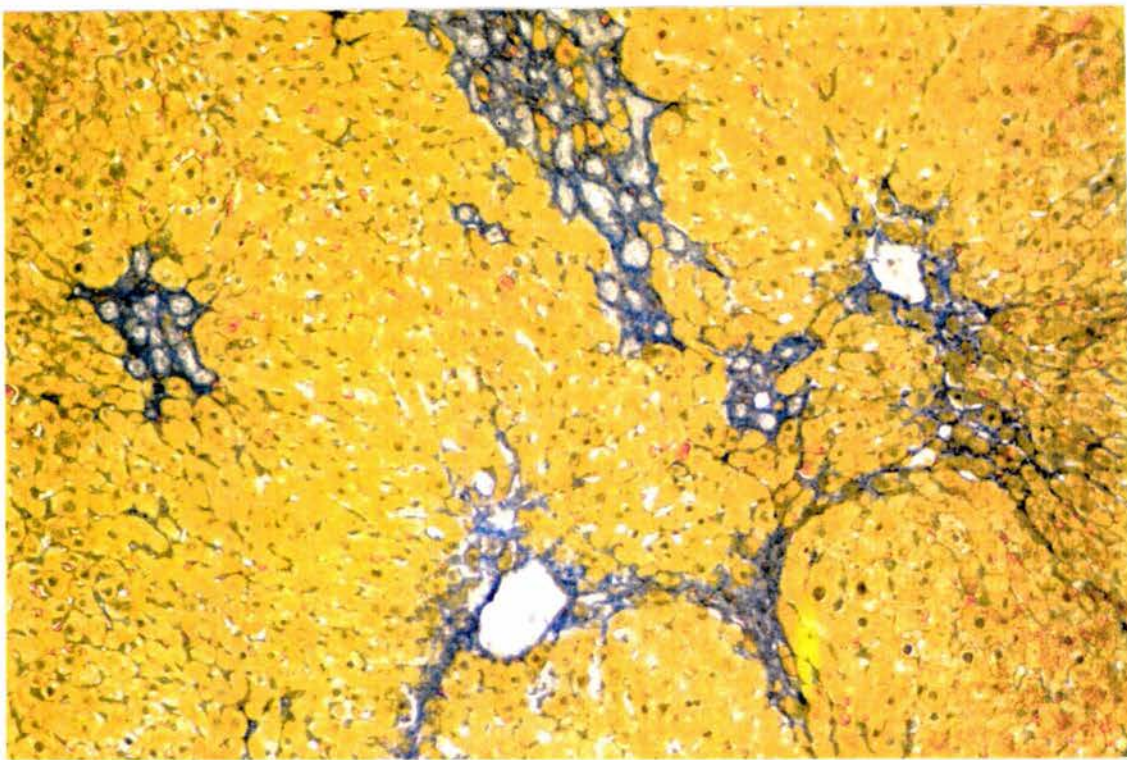


Figura 9. Corte histológico de hígado de rata a las cuales se les ligó el conducto biliar por 15 días. Técnica tricrómica de Mallory - La colágena se tiñe de azul. Amplificación 100 X.

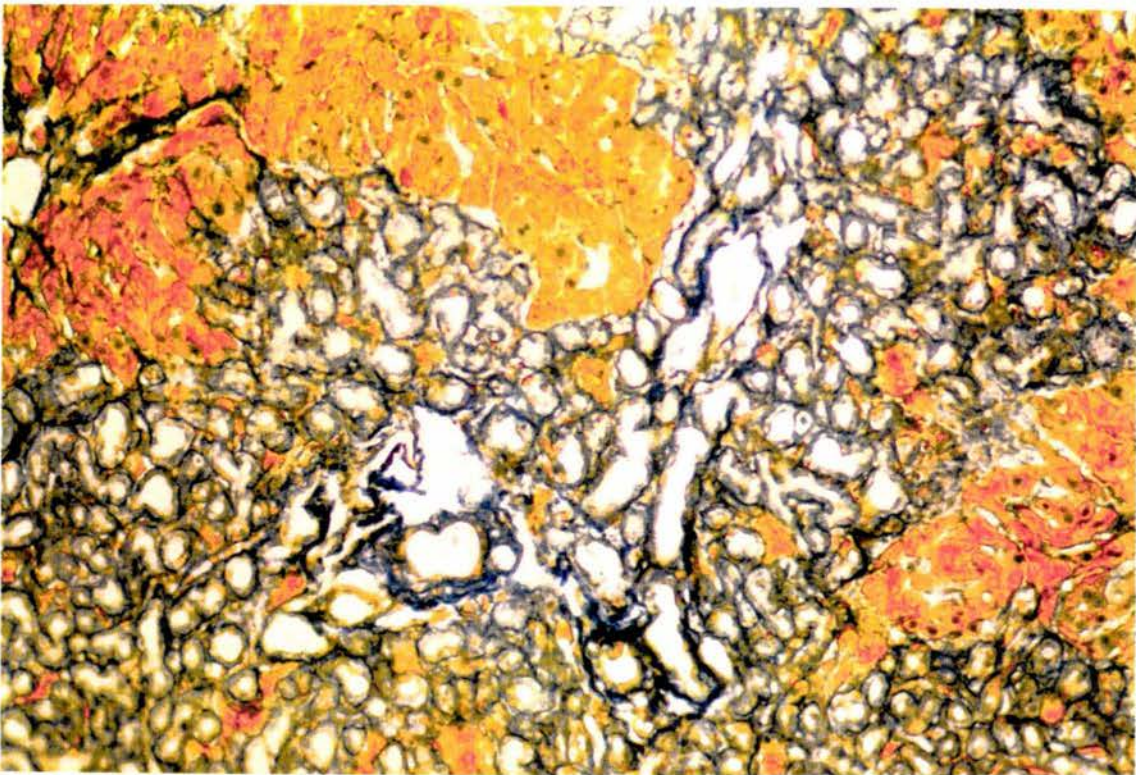


Figura 10. Corte histológico de hígado de rata a las cuales se les ligó el conducto biliar por 15 días y se les administró el vehículo por 15 días más. Técnica tricrómica de Mallory. La colágena se tiñe de azul. Amplificación 100 X.

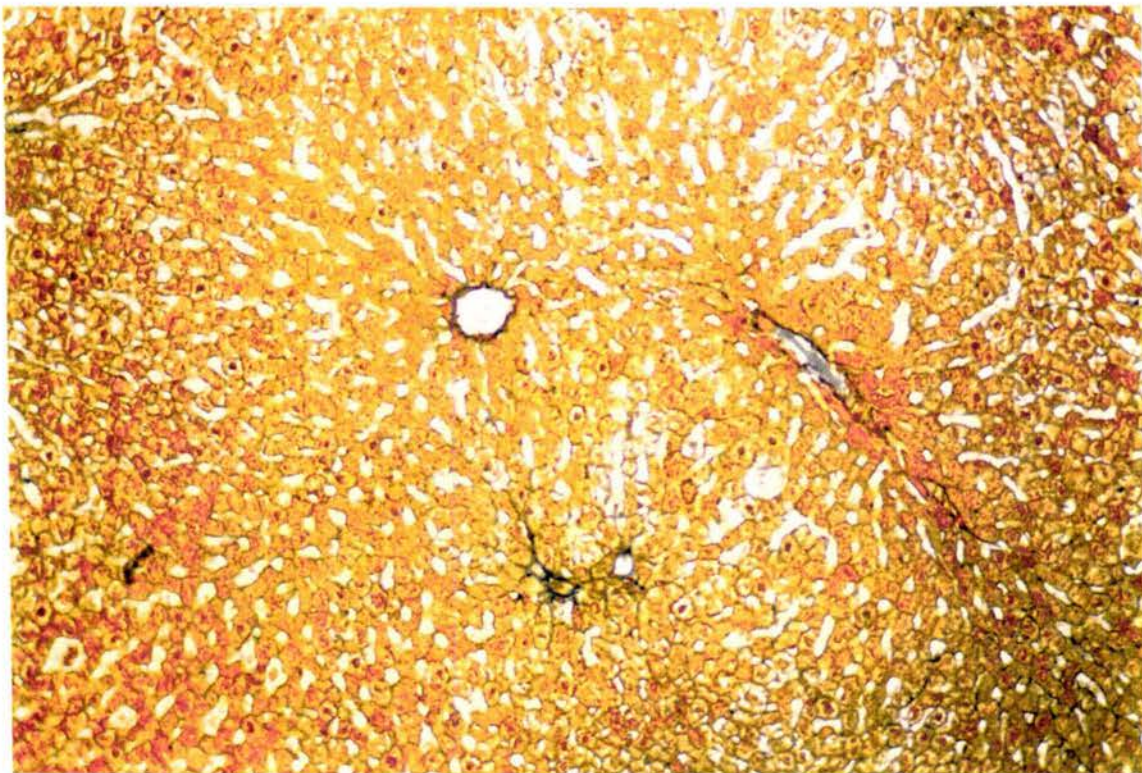


Figura 11. Corte histológico de hígado de rata a las cuales se les ligó el conducto biliar por 15 días y se les administró interferón- α por 15 días más. Técnica tricrómica de Mallory. La colágena se tiñe de azul. Amplificación 100 X.

V. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que el interferón- α_{2b} (INF- α) es capaz de revertir la fibrosis y el daño al hígado (colestasis) provocados por la obstrucción del conducto biliar común en la rata.

Varios trabajos han demostrado que los interferones disminuyen los niveles estacionarios del RNAm de procolágenas (104,106-110). Estos antecedentes podrían explicar el efecto del interferón- α sobre la disminución de la colágena en este estudio. Sin embargo, es posible que esta sustancia también estimule el catabolismo de la colágena, como lo sugieren Rodríguez-Fragoso y col. (59) y Duncan y Berman (122), quienes encontraron que el interferón aumenta marcadamente la producción de colagenasa. Sin embargo, con los datos presentados en este trabajo, no se puede discriminar si el efecto de este compuesto en la fibrosis hepática se debe a una disminución en la síntesis de la colágena (efecto antifibrogénico) o al incremento en la degradación de esta proteína (efecto fibrolítico) o a una combinación de ambos factores.

Czaja y col. (110) reportaron que al administrar 100, 000 UI/rata/día de interferón- α tiene un mejor efecto antifibrogénico que 50, 000 UI/rata/día. Por lo cual para este trabajo se decidió administrar la primera dosis.

Una característica importante de la fibrosis en el hígado es la acumulación de tejido conectivo alrededor de los sinusoides hepáticos tanto que las barreras de difusión vascular se encuentran alteradas y el flujo sanguíneo sinusoidal está obstruido. La hipertensión portal resultante y el empeoramiento de la eliminación de los metabolitos endógenos y exógenos contribuyen a una disfunción hepática (48). La hipertensión portal también lleva a la acumulación de sangre en la circulación esplécnica, disminuyendo el volumen arterial efectivo y así activando los receptores de

volumen tanto que el sodio y el agua son ávidamente retenidos y en consecuencia se propicia el desarrollo de la ascitis (123). La fibrogénesis hepática deriva en cirrosis, una marcada condición de la fibrosis lobular difusa y en la alteración de la arquitectura normal del hígado hacia nódulos estructuralmente anormales.

La colágena es el mayor componente de la matriz extracelular, esta proteína es la que se deposita principalmente durante la fibrosis hepática. La mayoría de las estrategias antifibróticas se han dirigido hacia el control del metabolismo de esta proteína. Existe una gran variedad de fármacos que pueden modular específicamente la biosíntesis de la colágena a nivel transcripcional o a varios estadios postraduccionales. Dentro de estos fármacos antifibróticos que pueden modular la acumulación de la colágena se incluyen a: los corticoides, la azatioprina, la penicilamina, la colchicina, el zinc, las prostanglandinas, la ciclosporina y a los interferones (124).

El mecanismo de acción de los interferones en el daño al hígado es poco conocido, sobre todo en la cirrosis inducida por la LCBC y en la cirrosis provocada por el CCl_4 en la rata (41). Sin embargo, los interferones pueden actuar al reducir el contenido de colágena hepática. De hecho, se ha demostrado que los interferones inhiben la cantidad de colágena producida por los fibroblastos y los condrocitos *in vitro*, además de la disminución de los niveles estacionarios del RNAm de las procolágenas tipo I, II y III por parte de estas células (104,106 y 107). También se ha observado que los interferones disminuyen el proceso fibrótico *in vivo* provocado por una bomba osmótica implantada en ratones (109), así también reducen la acumulación de colágena en pulmones de ratas tratadas con bleomicina (108), y la acumulación de colágena en la esquistosomiasis murina (110). Sin embargo, es necesario realizar futuras investigaciones para evaluar la importancia terapéutica que puedan tener los interferones en la fibrosis hepática y por lo tanto en el tratamiento de la cirrosis.

Omata y colaboradores (125) encontraron una mejora importante en la histología hepática de pacientes con hepatitis no-A no-B, después de ser tratados con interferón- α . Sin embargo, ellos supusieron que esta mejoría se debía a un efecto antiviral. Por el contrario, no hubo ninguna mejoría en la histología del hígado en pacientes con hepatitis crónica viral-B de 4 semanas, tratados con interferón recombinante de leucocitos (125). La fibrosis humana de cualquier etiología, requiere de algunos años para establecerse. Por lo tanto, es posible que cualquier tratamiento antifibrótico requiera de un período de tiempo similar. Por lo cual, es necesario llevar a cabo tratamientos con interferones durante largos períodos para evaluar su efecto antifibrogénico en la cirrosis hepática. De hecho, Hoofnagle y col. (126) demostraron que después de un año de tratamiento con interferón en la hepatitis no-A no-B, las biopsias mostraron una gran mejoría sobre todo en la histología, y principalmente en la inflamación portal y en la necrosis de los hepatocitos; desafortunadamente, la fibrosis no fue evaluada.

En varios estudios clínicos (126-129), los marcadores histopatológicos de la fibrosis hepática cambiaron poco durante el tratamiento con interferón, aunque los marcadores de hipertensión portal y del daño lobular disminuyeron. Quizás la degradación o reabsorción de tejido fibroso requiera de un tratamiento mayor a 12 meses, como ocurre en los pacientes con cirrosis tratados con colchicina (130).

Investigaciones recientes (131) han demostrado la capacidad de varias citocinas para modular la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Se ha sugerido (127) que el efecto del interferón sobre el RNAm de la procolágena tipo II puede ser una consecuencia de su acción sobre la expresión del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1, según sus siglas en inglés). En ratas a las cuales se les ligó el conducto biliar común, el efecto antiviral del INF- α no es importante. De esta forma, los

efectos del interferón sobre el TGF β 1 pueden deberse a que este factor juega un papel muy importante en la fibrogénesis (127).

La activación de los linfocitos hepáticos es una característica fundamental de daño al hígado. En estudios *in vivo*, esta activación está caracterizada por la transición de células almacenadoras de vitamina-A hacia miofibroblastos que se encuentran en una etapa de alta proliferación y de alta acción fibrogénica (132-136). Recientemente, se ha demostrado que algunos interferones son potentes inhibidores de la activación de los linfocitos (136). Estas propiedades hacen que los interferones sean atractivos para el tratamiento del daño al hígado y a otros órganos provocados por la fibrosis, en el cual estén involucradas la proliferación celular mesenquimatosa y la fibrogénesis sea prominente.

Capra y col. (137) demostraron que la administración de interferón- α durante 6 meses a pacientes con hepatitis viral crónica o con cirrosis activada como resultado una disminución en el estímulo de la fibrogénesis, al disminuir la inflamación y la necrosis del hígado, de este modo se detiene el desarrollo de la cirrosis.

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica, así que un aumento en los niveles de MDA indican un incremento en el grado de peroxidación lipídica; éste es un mecanismo bastante conocido de daño al hígado (138). Los resultados de este estudio muestran un aumento en los niveles de MDA después de que se obstruyó el conducto biliar común, como lo han reportado Sokol y col. (139). Sin embargo, Muriel y col. demostraron que, particularmente en el daño provocado por la LCBC, la peroxidación lipídica no juega un papel importante (140). De esta forma, el efecto del INF- α en los niveles de MDA se interpreta como una consecuencia de la acción antifibrogénica y hepatoprotectora del INF- α .

El glucógeno, es la principal fuente de energía en el hígado; sin una suficiente cantidad de glucógeno, el hígado no puede tener la energía necesaria para realizar sus funciones. De esta forma, el que el interferón lleve a niveles normales el contenido de glucógeno demuestra el efecto benéfico que tiene esta citocina.

La fosfatasa alcalina es una ectoenzima presente en la membrana plasmática del hepatocito: un incremento en la enzima fosfatasa alcalina en suero, se ha relacionado con daño en la membrana de las células del hígado (141). La γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP), es una enzima que se encuentra inmersa en la membrana plasmática del hepatocito, principalmente en la zona canalicular; la liberación de esta enzima en suero indica un daño celular. Es importante reconocer el incremento, observado en este estudio, de la γ -GTP en suero en el grupo de LCBC ya que esta enzima es considerada uno de los mejores indicadores de daño al hígado (particularmente de colestasis) (142 y 143). El efecto benéfico que tiene el $\text{INF-}\alpha$ sobre la fosfatasa alcalina y la γ -GTP así como en los niveles de bilirrubinas, indican que esta citocina es un fármaco prometedor para el tratamiento de las enfermedades crónicas del hígado que involucren a la fibrosis.

VI. CONCLUSIONES

- VI.1. La obstrucción biliar prolongada del conducto biliar común en la rata, provocó:
- Un estado fibrótico al hígado, el cual se caracterizó por un aumento significativo en el contenido de colágena.
 - Aumento significativo en los niveles de MDA hepático, lo que indica un mayor grado en el nivel de peroxidación lipídica.
 - Disminución en el contenido de glucógeno hepático.
 - Incremento significativo en las actividades de las enzimas fosfatasa alcalina y γ -glutamyl transpeptidasa en suero.
 - Aumento significativo en las concentraciones de bilirrubinas total y conjugada (directa) en suero.
- VI.2. - La administración de INF- α a ratas a las cuales se les ligó el conducto biliar común, provocó:
- Reversión parcial pero significativa en el contenido de colágena hepática.
 - Disminución en los niveles de MDA.
 - Incremento en el contenido de glucógeno hepático a valores normales.
 - Disminución en las actividades en suero de las enzimas fosfatasa alcalina y γ -glutamyl transpeptidasa a niveles normales.
 - Disminución en las concentraciones de bilirrubinas total y conjugada (directa) en suero a niveles muy cercanos al grupo control.

- VI.3. - Se observaron cambios y alteraciones histológicas importantes debido al daño provocado por la obstrucción biliar prolongada, que coinciden con las mediciones bioquímicas analizadas en los modelos de fibrosis hepática; así como una importante mejoría debido a la administración del INF- α .
- VI.4. - El INF- α puede ser un fármaco prometedor en el tratamiento de enfermedades crónicas del hígado que involucren a la fibrosis y que no sean necesariamente de origen viral.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hans, E., Sherrick, J. Morphology of the liver. Academic Press, New York, 1969.
2. Bucher, N.L.R., Swaffield, M.N. The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res.* 24:1611, 1964.
3. Narro-Robles, J. et al. La mortalidad por cirrosis hepática en México. I. Características epidemiológicas relevantes. *Salud Pública. México.* 34:378, 1992.
4. Cormak, H.D. *Histología de Ham.* 9a. Ed. Editorial Karla. México, D.F., 1987.
5. Guyton, A.C. *Tratado de Fisiología Médica,* 8a. Ed. Editorial Interamericana. México, D.F., 1992.
6. Charles, L., Witte, M.D., Marlys, H. Hepatic circulation. *The Liver. Normal and abnormal functions.* Part A. Edited by Frederick, F. Becker, 1974.
7. Bucher, N.L.R., Swaffield, M.N. Rate of incorporation of labeled thymidina into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to amount of liver excised. *Cancer Res.* 24:1611, 1964.
8. Jones, A.L. and Mills, E.S. Hígado y vesícula biliar. Greep. R.D. y Weiss, J. En: *Histología.* Ed. El Ateneo, tercera edición, 1978.
9. Kelley, W:N. *Metabolismo Hepático en: Medicina Interna I.* Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1990.
10. Jones, A.L., Mills, E.S. Hígado y vesícula biliar. R.D. Greep y J. Weiss. *Histología.* Ed. El Ateneo, tercera edición, 1978.

11. Wisse, E., De Zanger, R.B., Jacobs, R., et al. Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver. *Scan. Electron. Micros.* 3:1441, 1983.
12. Jones, E.A., Summerfield, J.A. Kupffer cells. In: *The Liver Biology and Pathobiology*. Arias, I.M., Popper, H., Schachter, D., et al. Eds. Raven Press, New York, p. 507, 1982.
13. Schmidt, F.W. Recientes aspectos bioquímicos de las enfermedades hepáticas. *Curso de Hepatología Médica y Bioquímica*. Mar del Plata, 1979.
14. Kelley, W.N. *Medicina Interna. I*. Editorial Médica Panamericana, 1990.
15. Netter, F.H. *Colección Ciba de Ilustraciones Médicas. Tomo III/3. Sistema Digestivo. Hígado, Vías Biliares y Páncreas*. Ed. Salvat, 1983.
16. Erlinger, S. Bile Flow. In: *The Liver, Biology and Pathobiology*. Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. Eds. Raven Press, USA, P. 644, 1988.
17. Netter, F.H., Bodansky, O., Popper, H. *Fisiología y fisiopatología del hígado, vías hepáticas y páncreas, incluyendo pruebas hepáticas y pancreáticas*. Colección Ciba de Ilustraciones Médicas. Sistema Digestivo, Hígado, Vías Biliares y Páncreas. Netter, F.H. Ed. Tomo III. Parte 3. España. Editorial Salvat. p. 35, 1981.
18. Schwartz, C.C. *Metabolismo Hepático*. Medicina Interna. Kelly, W.N. Ed. Tomo I. 1a. Reimp. Argentina. Ed. Médica Panamericana. p. 495, 1990.
19. Larusso, N.F. *Litiasis Biliar y Colecistitis*. Medicina Interna. Kelly, W.N. Ed. Tomo I. 1a. Reimp. Argentina. Ed. Médica Panamericana. p. 615, 1990.
20. Litter, M. *Compendio de Farmacología*. 4a. Ed. Argentina. Ed. El Ateneo. p. 419, 1988.
21. Heller, F.R., Martinet, J.P., Henrion, J., Schapira, M., Gallez, J.F. The rationale for using

- ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Acta Gastro-Enterológica*.
22. Rogers, A.E. Nutrition. In: *The Laboratory Rat. Biology and Diseases*. Baker, H.J., Russell Lindsey, J., Weisbroth, S:H. Eds. Vol. I, U.S.A. Ed. Academic Press Inc. p. 129, 1979.
 23. Kao, Y.S., Douglas S.W. Malabsorción, diarrea y examen de las heces. Todd-Sanford-Davidsohn, *Diagnóstico y Tratamientos Clínicos por el Laboratorio*. Bernard H.J. Ed. Tomo I. 8a. ed. 1a. Reimp. México. Ed. Salvat. p. 701, 1988.
 24. Guyton, A.C. *Fisiología Humana*. 6a. Ed. México. Ed. Interamericana. p. 521, 1987.
 25. Murray, R.K., Granner, D.K. Síntesis, transporte y excreción de colesterol. *Bioquímica de Harper*. Mayes, P.A. Ed. 21a. Ed. México. Ed. El Manual Moderno. p. 239, 1988.
 26. Méndez, S.N., Jessurun, J., Aguilar, J.R., Cote, C., Uribe, M. Litiasis biliar de colesterol (Factores de Riesgo). *Revista de Gastroenterología de México* 56(3):125, 1991.
 27. Centonze, S., 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.
 28. Reichen, J., Simon, F.R. Cholestasis. In: *The Liver, Biology and Pathobiology*. Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. Eds. 6a. Ed. U.S.A. eD. Raven Press. p. 1105, 1114, 1988.
 29. Ganong W.F. *Manual de Fisiología Médica*, 5a. edición. Editorial El Manual Moderno, 1976.
 30. Cornelius, L.M., DVM. *Laboratory Evaluation of Liver Disease in Small Animals-Part*

1. Based on a presentation at the Modern Veterinary Practice Seminar on Small Animal Internal Medicine, 1984.
31. Recknagel, R., Glende, E., Ugazio, G., Lock, R., Srinivasan, S. New data in support of the lipoperoxidation theory for carbon tetrachloride liver injury. In: International Symposium on Hepatotoxicity. Eliakim, M., Eslchar, J., Zimmerman, H. Eds. Academic Press, New York. p. 7-17, 1974.
 32. Keppler, D., Lesch, R., et al. Experimental Hepatitis Induced by D-Galactosamine. *Expt. Mol. Pathol.* 9:279, 1968.
 33. Kountaras, J., Billing, B.H., Scheuer, P.J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British J. Experimental Pathology* 65:305, 1984.
 34. Mourelle, M., Muriel, P., Favari, L., Franco, T. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3:183, 1989.
 35. Mourelle, M., Villalón, C., Amezcua, J.L: Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* 6:337, 1988.
 36. Netter, F.H., Popper, H., Sborov, V.M. Enfermedades del Hígado. En: Colección Ciba de Ilustraciones Médicas, Sistema Digestivo, Hígado, Vías Biliares y Páncreas. Netter, F.H. Ed. Tomo III. Parte 3. España. Edit. Salvat. p. 82, 1981.
 37. Castillo, L.L., Alonso, P.M., Olvera, G.F., Castro, C.A. Paciente con ictericia obstructiva y cirugía. *Revista de Gastroenterología de México.* 55(4):340, 1990.
 38. Atterbury, C., Broszman, R. Enfoque del paciente con cirrosis e hipertensión portal. En: *Medicina Interna.* Kelly, W.N. y cols. Vol. I. Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1990.

39. Rojkind, M., Kershenobich, D. Fibrosis and cirrhosis. In: *The Liver Annual I*. Arias, I.M., Frenker, M. y Wilson, J.H.P. Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton, 1981.
40. Rojkind, M., Kershenobich, D. Hepatic Fibrosis. *Clinics in Gastroenterology*. 10:737, 1981.
41. Muriel, P., Bolaños, J. Effect of alpha-interferon on erythrocyte and hepatocyte plasma membranes derived from cirrhotic rats. *Pharmacology* 48:63, 1994.
42. Muriel, P., Mourelle, M. The role of membrane composition in ATPases activities of cirrhotic rats. Effect of silymarin. *J. Appl. Toxicol.* 10:281, 1990.
43. Muriel, P., Mourelle, M. Characterization of silymarin membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. Role of S-adenosyl-L-methionine. *Journal of Hepatology* 14:16-21, 1992.
44. Muriel, P., Favari, L. Soto, C. Erythrocyte alterations correlate with CCl₄ and biliary obstruction induced liver damage in rat. *Lf. Sci.* 52:647, 1993.
45. Muriel, P., Mourelle, M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute liver damage. *J. Appl. Toxicol.* 10(4):275, 1990.
46. Muriel, P., Suarez, O., González, P. Zuñiga, L. Protective effect of s-adenosyl-L-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats. *J. Hepátol.*
47. Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind, M., Mourelle, M. Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. *Lab. Invest.* 53(5):541, 1985.
48. Gressner, A., Bachem, M. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 10: p.30, 1990.

49. Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 255:2843, 1980.
50. Rojkind, M. Fibrogenesis. In: *The Liver, Biology and Pathobiology*. Arias, I., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. Eds. Raven Press, New York, 1982.
51. Mourelle, M., Rojkind, M., Rubalcava, B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology* 21:213, 1981.
52. Dunn, M.A., Kamel, I.A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. *Gastroenterology* 76:978, 1979.
53. Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. The presence of collagenase in kupffer cells of the rats liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 54:531, 1973.
54. Maruyama, K., Feinman, L., Okazaki, I., Lieber, Ch.S. Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and human liver. *Biochim. Biophys. Acta* 658:124, 1981.
55. Lehninger, A. *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. 2a. Ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 872. 1988.
56. Martin, G., Timpl, R., Müller, P., and Kühn, K. The genetically distinct collagens. *Trends Biochem Sci.*, 10: 285, 1985.
57. Bissel, D., Friedman, S., Maher, J. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology*, 11: 488, 1990.
58. Rojkind, M., Giambrone, M., Biemdicca, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 76: 710, 1979.
59. Rodríguez, L., González, P., Muriel, P. Interferon- α_{2b} Increases Fibrolysis in Fibrotic Livers

- from Bile Duct Ligated Rats: Possible Participation of the Plasminogen Activator. *Pharmacology*, 51: 341, 1995.
60. Rojkind, M. And Greenasel. The extracellular matrix of the liver. In: *The liver biology and pathobiology*. Arias, I., Boyer, J., Fausto, N., Jakoby, W., Schachter, D., Shafritz, D. Eds. Raven Press. N.Y. 843, 1994.
 61. Prockop, D., Kivirikko, K., Tuderman, L. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Engl Med*, 301: 13, 1979.
 62. Kivirikko, K., Savolainen, E. Hepatic collagen metabolism. In: *Testa, B., Liver drugs: Experimental pharmacology to therapeutic application*. Florida: CRC Pres Inc., 42, 1989.
 63. Rojkind, M., Kersenovich, D. The extracellular matrix, fibrosis and cirrhosis. In: *Arias, I., Frenkel, M., Wilson, J. Eds. The liver annual G.* 302, 1987.
 64. Seyen, J. Interstitial collagen polymorphism in rat liver with CCl₄-induced cirrhosis. *Biochem biophy S. Acta*, 629,490,1980.
 65. Murata, K., Kudo, M., Onuma, F., Motoyama, T. Changes of collagen types ay various stages of human liver cirrhosis. *Acta Hepato Gastroenterol*, 31: 158, 1984.
 66. Martinez-Hernandez, A. The hepatic extracellular matrix I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab. Invest.* 51: 57, 1984.
 67. Martinez-Hernandez,A. The hepatic extracellular matrix II. Electron immunohistochemical studies in rat with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab. Invest.* 53: 166, 1985.
 68. D'Ardenne, A., Burns, Sykes,B., Kirkpatrick, P. Comparative distribution of fibronectin and type III collagen in human tissues. *J. Pathol.* 141: 55, 1983.
 69. Hahn, E., Schuppan, D. Ethanol and fibrogenesis in the liver, in alcohol related diseases.

- Seitz, H., and Kommerell, B. Eds. Springer-Verlag, Berlin. 124, 1985.
70. Brennar, D., Alcorn, J. Therapy for hepatic fibrosis. *Semin Liver Dis.* 10: 75, 1990.
 71. Rojkind, M., Perez-Tamayo, R. Liver fibrosis. *Int Rev Connect Tissue Res.* 10: 333, 1988.
 72. Rojkind, M., Ponce-Noyola, P. The extracellular matrix of the liver, collagen. *Rel. Res.* 2: 151, 1982.
 73. Tzeng, S., Smucler, E., Stern, R. Types of collagen synthesized by normal rat liver hepatocytes in primary culture. *Hepatology.* 3: 955, 1983.
 74. Sakakibara, K., Igarashi, S. Localization of type III procollagen antigenicity in hepatocytes from cirrhotic human liver. In: *Pathobiology of hepatic fibrosis*, Hirayama, C., Kivirikko, K. Eds. Elsevier, Amsterdam. 37, 1985.
 75. Pinnell, S. Regulation of collagen synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 79 (Suppl. 1) : 73, 1982.
 76. LeRoy, E. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblast in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J. Clin. Invest.* 54: 880, 1974.
 77. Wahl, S. Host immune factors regulating fibrosis, in fibrosis. *Ciba Foundation Symp.* 114, Pitman. London. 175, 1985.
 78. De Leeuw, M., McCarthy, S., Geerts, A., Knook, D. Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology.* 4: 392, 1984.
 79. Savolainen, E., Leo, M., Timpl, R., Lieber, C. Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts. *Gastroenterology.* 87: 777, 1984.
 80. Nakano, M., Lieber, C. Ultrastructure of initial stages of perivenular fibrosis in alcohol-fed baboons. *Am. J. Pathol.* 106: 145, 1982.

81. Chojkier, M., Brenner, D. Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. *Hepatology*. 8: 176, 1989.
82. Kivirikko, K., Majamaha, K. Synthesis of collagen: chemical regulation of post-translation events. In: Ciba Foundation Symposium on Fibrosis. Pitman, London. 34, 1985.
83. Weiner, F., Czaja, M., Jefferson, D. The effects of dexamethasone on in vitro collagen gene expression. *J. Biol-Chem.* 262: 6955, 1987.
84. Postlethwaite, A., Lachman, L., Mainardi, C., Kang, A. Interleuki I stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J. Exp. Med.* 157: 801,1993.
85. Krane, S. The turnover and degradation of collagen in fibrosis. Ciba Foundation Symp. 114, Pitman, London. 97, 1985.
86. Harris, E., Welgus, H., Krane, S. Regulation of the mammalian collagenases. *Collagen Rel. Res.* 4: 493,1984.
87. Brinckerhoff, C., Gross, R., Nagase, H., Sheldon, L., Jackson, R., Harris, E. Increased level of traslatable collagenase messenger ribonucleic acid in rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate or crystals of monosodium urate monohydrate. *Biochemistry.* 21: 2674. 1982.
88. Aggeler, J., Frisch, S., Werb,Z. Collagenase is a major gene product of induced rabbit synovial fibroblasts. *J. Cell Biol.* 98: 1656,1984.
89. Rojkind, M., Valdez, G. Regulation of fibroblasts proliferation Kupffer cells and monocytes, in fibrosis. Ciba Foundation. Symp. 114. Pitman, London. 208, 1985.
90. Isaacs, A. y Lindermann, J. Virus interference. I. The Interferon. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 147:258, 1957.

91. Samuel, C. Molecular mechanism of interferon action. En Stringfellow, D.D. (ed). Clinical application of interferons and their inducers. 2a. ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 1-18, 1986.
92. Oppenheim, J.J., Ruscetti, F. and Faltyneck: Cytokines. En Stites, D.P. y Abba I. Terr.: Basic and Clinical Immunology. 7a. ed. Appleton Lange Co. Norwalk, CT. 78-100. 1991.
93. Content, J. The antiviral effect of interferon on cell. En Billiau, A.: Interferon. Volume I: General and applied aspects. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. 1984.
94. Gordon, D., Agentes antivirales. En Gliman, A. G. (ed): Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8a. ed. Editorial Médica Panamericana. México. 1144-1162. 1991.
95. Paucker, K., Cantell, K. and Henle, W. : Quantitative studies on viral interference in suspended L Cell. III. Effect of Interfering Viruses and Interferon on the Growth Rate of Cells. Virology. 17: 324-334. 1962.
96. Knight, E. Jr.: Antiviral and cell growth inhibitory activities reside en the same glycoprotein in of human fibroblast interferon. Nature. 262: 302-303. 1976.
97. Taylor-Papadimitriou, J. The effects of interferon on the growth and function of normal and malignant cells. En Burke, D. and Morris, A. Interferons: From Molecular Biology to Clinical Application. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1983.
98. Frayssinett, C., Gressner, M. Inhibitory Effect of Potent Interferon Preparations on the regeneration of Mouse Liver After Partial Hepatectomy. Nature. 245: 146-147. 1973.
99. Kimchi, A. Shure, A. Regulation of Lymphocyte Mitogenesis by (2'-5') oligo-isoadenylate. Nature. 282: 849-851. 1979.

100. Perillo, R. Interferon therapy for chronic type B hepatitis: the promise comes of age. *Gastroenterology*. 90: 532, 1989.
101. Willis, C. Chronic hepatitis. In: Zakim, D. Boyer, T. Eds. *Hepatology-A textbook of liver disease*. 2nd.edn.Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1990.
102. Omata, M.,Imazek, F., Yokosuka, O., Ito, Y., Uchiumi, K., Mori, J., Okuda, K.: Recombinant leukocyte a interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 88: 870, 1985.
103. Dusheiko, G., Dibisceglie, A., Bowyer, S., Sachs, E., Ritchie, M., Schoub, B., Kew, M. Recombinant leukocyte interferon treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 5: 556, 1985.
104. Duncan, M., Berman, B. γ -interferon is the lymphokine and β -interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production an late but not early fibroblast proliferation. *J.Exp. Med*. 162: 516, 1985.
105. Jimenez, S., Freundlich, B., Rosenbloom, T. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferon. *J. Clin. Invest*. 74:112, 1984.
106. Stephenson, M., Krane, S., Amento, E., McCroskery, P., Byrne, M.Immune interferon inhibits collagen synthesis by rheumatoid synovial cells associated with decreased levels of procollagen mRNA. *FEBS Lett*. 180:43, 1985.
107. Goldring, M., Sandell, L., Stephenson, M., Krane, S. Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. *J. Biol. Chem*. 261: 9049, 1986.
108. Giri, S., Hyde, M., Marafino, B. Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochem. Med. Metab. Biol*. 36: 194,

- 1986.
109. Granstein, R., Murphy, G., Margulis, R. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *J. Clin. Invest.* 79: 1254, 1987.
 110. Czaja, M., Weiner, F., Takahashi, S., Giambrone, M., VanDer Meide, P., Schellekens, H., Biempica, L., Zern, M. γ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* 10: 795, 1989.
 111. Brouty-Boye, D. Inhibitory effects of interferons on cell multiplication. *Lymphokine Rep.* 1: 99, 1980.
 112. Prockop, D. A specific Method for the Analysis of Hydroxyproline in tissues and urine. *Analytical Biochemistry.* 1: 228, 1960.
 113. Buege, J. and Austin, S. *Meths. Enzimol.* 30, II: 302, 1978.
 114. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248, 1976.
 115. Malher, H. and Cordes, E. *Biological Chemistry.* 2a. Ed. Harper, 1971.
 116. Dragosici, B., Ferenci, P., Pesendorfer, F. and Wewalka, F. Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGTP): Relationship to other Enzymes for Diagnosis of liver Disease *Progress in Liver Disease.* 5: 536, 1976.
 117. Jendrassik, L. and Gróf, P. Uere infachte photometrische Methoden Zur Bestimmung Des Blutbilirubins. *Biochemistry Z.* 297: 81, 1938.
 118. Schellong, G. and Wendem, U. *Arch. Kinderheilk.* 1960.
 119. Hassid, W. and Abrahams, S. *Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharides.*

- Meths. Enzymol. 3: 34, 1957.
120. Morris, D. Quantitative determination of carbohydrates with Drey Wood's anthrone reagent Science. 107: 254, 1948.
 121. Daniel, W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Edit. Limusa, México, 1977.
 122. Duncan, M., and Berman, B. Differential regulation of glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase production in cultured human dermal fibroblasts by interferon-alpha, -beta, and -gamma. Arch Dermatol Res. 281:11, 1989.
 123. Epstein, M. The kidney in liver disease. In: The liver: Biology and Pathobiology (Eds. Arias I., Jacoby, W., Popper, H., Schachter, D. and Shafrits, D.), Raven Press, New York, 1043, 1988.
 124. Leveille, C. and Arias, I. Pathophysiology and pharmacologic modulation of hepatic fibrosis. J Vet Intern Med. 7: 73, 1993.
 125. Omata, M., Ito, Y., Osaka, O., Amnesiac, F., Uchiumi, K., Takano, S. And Hosoda. Histological changes in chronic hepatitis B. Dig Dis Sci. 34: 330, 1989.
 126. Hoofnagle, J., Mullen, K., Jones, D., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J., Park, Y. and Jones, E. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. N Engl J Med. 315: 1575, 1986.
 127. Castilla, A., Prieto, J. and Fausto, N. Transforming growth factors β 1 and α in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. N Engl J Med. 324: 933, 1991.
 128. Davis, G., Balart, L., Schiff, E., Lindsay, K., Bodenheimer, H. Jr., Perrillo, R., Carey, W., Jacobson, I., Payne, J., Dienstag, J., Van Thiel, D., Tamburro, C., Lefkowitz, J.,

- Albrecht, J., Meschievitz, C., Ortego, T., Gibas, A. and the Hepatitis Interventional Therapy Group, Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med.* 321: 1501, 1989.
129. Di Bisceglie, A., Martin, P., Kassianides, C., Lisker-Merman, M., Murray, L., Waggoner, J., Goodman, Z., Banks, S. and Hoofnagle, J. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 321: 1506, 1989.
130. Kershenobich, D., Vargas, F., Garcá-Tsao, G., Pérez-Tamayo, R., Gent, M. and Rojkind, M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med.* 318: 1709, 1988.
131. Kovacs, E. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today.* 12: 17, 1991.
132. Rockey, D., Boyles, J., Gabbiani, G. and Friedman, S. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 24: 193, 1992.
133. Kent, G., Gay, S., Inoué, T., Bahu, R., Minick, O. and Popper, H. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73: 3719, 1976.
134. Enzan, H. Proliferation of Ito cells (fat-storing cells) in acute carbon tetrachloride liver injury: A light and electron microscopic autoradiographic study. *Acta Pathol Jpn.* 35: 1301, 1985.
135. Tanaka, Y., Mak, K. and Lieber, C. Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. *J Pathol.* 160: 129, 1990.
136. Rockey, D., Maher, J., Jamagin, W., Gabbiani, G. and Friedman, S. Inhibition of rat hepatic

- lipocyte activation in culture by interferon- γ . *Hepatology*. 16: 776,1992.
137. Capra, F., Casaril, M., Gabrielli, N., Tognella, P., Rizzi, A., Dolci, L. and Colombardi, R. α -interferon in the treatment of chronic viral hepatitis: Effects on fibrogenesis serum markers. *J Hepatol*. 18: 112, 1993.
138. Tribble, D., Aaw, T. and Jones, D. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*. 7: 377, 1987.
139. Sokol, R., Devereaux, M. and Rashmi, A. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *J Lipid Res*. 32: 1349, 1991.
140. Muriel, P. and Suárez, O. Role of lipid peroxidation in biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol*. 14: 423, 1994.
141. Kaplan, M. Serum alkaline phosphatase-Another piece is added to the puzzle. *Hepatology*. 6: 526, 1986.
142. Plaa, G. and Hewitt, W. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In: *Principles and Methods of Toxicology* (Ed. Hayes W). Raven Press, New York, 407, 1982.
143. Bulle, F., Mavier, P., Zafrani, E., Preaux, A., Lescs, M., Siegrist, S., Dhumeaux, D. and Guellaën, G. 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.