

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**“Efecto benéfico del ácido trimetilcolchicínico y de la colchicina sobre el daño hepático crónico inducido con  $\text{CCl}_4$  en la rata”.**

**Biól. Ma. Aránzazu de la Paz Cedillo Mendieta**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA  
EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**Agosto de 1996**

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa tiene el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio del subsidio: PFPN 66-92 para el fortalecimiento del postgrado nacional.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marisabel Mourelle Mancini el tiempo y apoyo dedicado a esta tesis durante su fase experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca crédito (registro no. 51249) durante mis estudios e investigación de la Maestría en Biología Experimental.

A mis asesores, la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz, y el Dr. Rubén Román Ramos, por sus valiosas sugerencias, comentarios y sobre todo por su comprensión y paciencia en el desarrollo de esta tesis.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio, por su excelente y amable cooperación en la realización del trabajo experimental de esta tesis.

Sinceramente a la Sra. Concepción Avalos Pérez por su valiosa cooperación en la mecanografía del presente trabajo.

Al Sr. Alfredo Padilla Delgado, por la magnífica realización de las figuras que forman parte de esta tesis.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN .....	1
<b>I. INTRODUCCION.</b>	
Morfología hepática .....	2
Función hepática .....	6
Cirrosis hepática .....	8
La cirrosis hepática inducida por CCl <sub>4</sub> .....	9
Detección y evaluación del daño hepático .....	15
Tratamiento de la cirrosis hepática .....	19
Absorción, distribución, metabolismo y eliminación de la colchicina .....	20
Mecanismo de acción de la colchicina .....	23
El ácido trimetilcolchicínico .....	25
<b>II. OBJETIVOS.</b>	
Objetivo general .....	27
Objetivos particulares .....	27
<b>III. MATERIAL Y METODOS.</b>	
Animales y esquemas de tratamiento .....	28
Obtención del suero .....	29

Obtención de la fracción de membranas de hepatocitos .....	29
Determinación de proteínas .....	31
Determinación del grado de lipoperoxidación en homogenado de hígado .....	32
Determinación del contenido de glucógeno hepático .....	33
Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina .....	34
Determinación de la actividad de la $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa .....	35
Determinación de la actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica .....	36
Determinación de la actividad de la ATPasa de $Ca^{2+}$ de alta afinidad .....	36
Tratamiento estadístico .....	38

#### IV. RESULTADOS.

##### Esquema de prevención.

a) Grado de lipoperoxidación .....	39
b) Contenido de glucógeno hepático .....	41
c) Fosfatasa alcalina sérica .....	43
d) $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa sérica .....	45
e) Transaminasa glutámico pirúvica .....	47
f) Fosfatasa alcalina membranal .....	49
g) $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa membranal .....	51
h) ATPasa de $Ca^{2+}$ de alta afinidad .....	53

##### Esquema de reversión.

a) Grado de lipoperoxidación .....	55
b) Contenido de glucógeno hepático .....	57

c) Fosfatasa alcalina sérica .....	59
d) $\gamma$ -glutamil transpeptidasa sérica .....	61
e) Transaminasa glutámico-pirúvica .....	63
f) Fosfatasa alcalina membranal .....	65
g) $\gamma$ -glutamil transpeptidasa membranal .....	67
h) ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de alta afinidad .....	69
V. DISCUSION. ....	71
VI. CONCLUSIONES. ....	75
VII. BIBLIOGRAFIA. ....	76

## ABREVIATURAS

ATMC	ácido trimetilcolchicínico
ATP	adenosín trifosfato
C	colchicina
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
CCl <sub>3</sub> •	radical libre triclorometilo
CCl <sub>4</sub>	tetracloruro de carbono
Cu	cobre
EGTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
FA	fosfatasa alcalina
Fe	hierro
γ-GTP	γ-glutamil transpeptidasa
HCl	ácido clorhídrico
KOH	hidróxido de potasio
MDA	malondialdehído
NaOH	hidróxido de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
TGP	transaminasa glutámico-pirúvica
Pi	fósforo inorgánico
PNA	p-nitroanilina
PNFF	p-nitrofenil fosfato

## RESUMEN

La colchicina es el medicamento más efectivo para el tratamiento de la cirrosis hepática, sin embargo debido a su toxicidad se han evaluado otras sustancias. Las moléculas estructuralmente similares a la colchicina pueden ser buenas alternativas.

El propósito de este trabajo fue comparar los efectos benéficos de la colchicina con los del ácido trimetilcolchicínico (ATMC), un colchicenoide menos tóxico que la colchicina, en la cirrosis inducida por  $\text{CCl}_4$ .

Se utilizaron ratas wistar macho a las que se les administró colchicina o ácido trimetilcolchicínico a una dosis de  $10\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$  junto con el  $\text{CCl}_4$  durante 8 semanas o se les administró primero durante 8 semanas el  $\text{CCl}_4$  y después se les trató durante cuatro semanas más con los medicamentos a la dosis señalada.

Se determinó el contenido de glucógeno hepático y el grado de lipoperoxidación en muestras de hígado. En el suero se midieron las actividades de la fosfatasa alcalina, de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa y de la transaminasa glutámico-pirúvica. Se aislaron membranas plasmáticas de hepatocitos y se determinaron en éstas las actividades de la fosfatasa alcalina, la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa y la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad.

Se encontró que ambos compuestos previenen y revierten parcialmente las actividades de las enzimas séricas y membranales, así como el contenido de glucógeno hepático.

Gracias a su baja toxicidad, el ATMC parece ser una buena opción para el tratamiento de la cirrosis hepática.

## **I. INTRODUCCION**

### **1. Morfología Hepática**

Todos los vertebrados poseen hígado. En los humanos es la glándula más grande del organismo, por lo general pesa de 1.2 a 1.6 kg, comprendiendo del 2 al 3% del peso corporal. Se localiza en las regiones hipocóndrica derecha y epigástrica, pero a veces llega hasta la región hipocóndrica izquierda. Su cara superior se acomoda por debajo del diafragma y se apoya sobre el riñón derecho, la porción superior del colon ascendente y el extremo pilórico del estómago. En el humano se observan cuatro lóbulos unidos parcialmente y está cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson). El hilio está bien definido y por él entran y salen vasos sanguíneos y los conductos hepáticos (Guyton, 1992).

El hígado es un órgano ricamente vascularizado que recibe más o menos un cuarto del gasto cardíaco. Por él pasan aproximadamente 800 a 1000 ml de sangre proveniente de la vena porta a través de los sinusoides hepáticos cada minuto. Dicha sangre, recogida del estómago, del bazo, del páncreas y del intestino, es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno. Hay un flujo adicional de sangre de aproximadamente 400 ml/min en los sinusoides proveniente de la arteria hepática, derivada del tronco celiaco de la aorta, que transporta sangre bien oxigenada. 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 (Guyton, 1992).

Los sinusoides son vasos de paredes delgadas carentes de lámina basal o una pared de células musculares que refuerce a las células endoteliales, las que se sobreponen unas con otras

y no muestran un mecanismo adhesivo intercelular extensivo por lo que aparentemente el contenido del espacio vascular pasa con libertad hacia el espacio perivascular, conocido como espacio de Disse.

La unidad estructural clásica del hígado es el lobulillo hepático ( Fig 1), un prisma poliédrico de tejido de unos cuantos milímetros de longitud y de 0.8 a 2.0 mm de diámetro. El hígado humano contiene 1,000,000 de lobulillos aproximadamente. El lobulillo hepático contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas que se extienden en dirección centrifuga desde una vena central formando un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneos. Cada placa suele tener un espesor de dos células; entre las células vecinas hay pequeños canaliculos biliares que se vacían en conductos biliares terminales situados a lo largo de los bordes del poliedro entre lobulillos vecinos (Jones y Mills, 1978). En dichos bordes también hay pequeñas vénulas portales que se comunican con la red de sinusoides y de allí a la vena central de tal manera que todas las células hepáticas quedan expuestas en uno de sus lados al flujo de sangre portal. En los tabiques interlobulillares también hay arteriolas hepáticas que proporcionan sangre arterial.

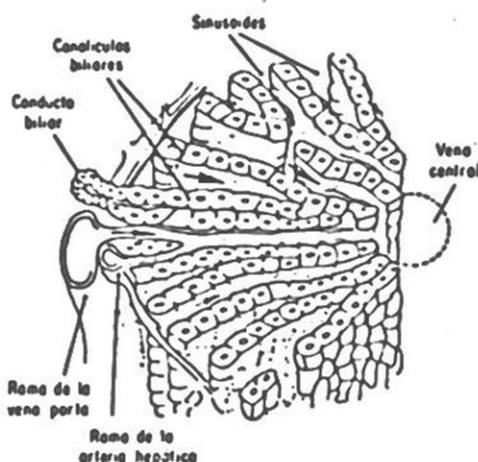


Fig. 1. Segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situadas en los canales portales, fluye a lo largo de los sinusoides y se vacía en la vena central. (Dibujo basado en una ilustración de A.W. Ham. *Textbook of Histology*. I.B. Lippincott Company, Filadelfia, 1965).

La célula hepática parenquimal, o hepatocito es la principal variedad celular en el hígado, representando el 77.8% de las células que constituyen dicho órgano, el resto corresponde a células endoteliales, células de Kupffer y células de Ito. (Blouin et al., 1977; Homma et al., 1982).

Los hepatocitos se disponen formando placas o hileras comprendidas entre dos tipos de espacios: el espacio sinusoidal, por el que circula la sangre y el espacio canalicular, al cual se secreta la bilis.

Los hepatocitos son células poligonales con un gran núcleo central a menudo heteroploide que contiene en su citoplasma diversas enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El hepatocito es la célula responsable de la mayoría de las funciones del hígado. Este es un tipo celular singularmente polarizado, distinguiéndose en él tres superficies o dominios membranales con características estructurales y bioquímicas especializadas muy diferentes: la superficie sinusoidal, de cara al espacio de Disse, en la que se observan numerosas microvellosidades irregulares, es éste el sitio a través del cual se efectúa el intercambio directo y rápido de metabolitos entre el hepatocito y la sangre; la superficie intercelular, especializada en la unión y comunicación entre hepatocitos adyacentes; y la superficie canalicular, en la cual también se observan microvellosidades pero más regulares que las de la superficie sinusoidal, este dominio membranal da luz al canalículo biliar, formado por el espacio existente entre las superficies canaliculares de dos o más hepatocitos adyacentes y que tiene aproximadamente de 1-2  $\mu$  de diámetro. Se ha estimado que dichos dominios membranales representan el 50, 37 y 13% respectivamente del área membranal de los hepatocitos (Loud, 1968; Migai, 1979). Los dominios sinusoidal e intercelular corresponden a la superficie basolateral y el dominio canalicular a la apical o superficie secretoria de las células hepáticas, cuando se aplica la terminología en uso para los

epitelios de transporte en general.

Se han realizado estudios en subfracciones aisladas de hepatocitos que muestran una polarización bioquímica de estas células. La subfracción derivada de la superficie sinusoidal se caracteriza por una alta actividad de la adenilato ciclasa sensible a glucagon, la subfracción correspondiente al dominio canalicular presenta alta actividad de diferentes enzimas como la ATPasa de  $Mg^{2+}$ , la 5'nucleotidasa, la nucleótido pirofosfatasa y la fosfatasa alcalina; por último la subfracción derivada de la superficie de contacto entre hepatocitos muestra baja cantidad de las enzimas mencionadas ( Evans, 1980; Wisher y Evans, 1975).

En los sinusoides se pueden observar otros tipos de células hepáticas. Las células endoteliales recubren las paredes de los sinusoides hepáticos, representando el 2.8% del volumen hepático (Blouin et al., 1977), carecen de una lámina basal que las adhiera fuertemente entre sí, lo que permite la comunicación directa entre los sinusoides y el espacio de Disse y por consecuencia entre el hepatocito y la sangre (Wisse, 1979).

Las células de Kupffer también forman parte del hígado, usualmente reposan sobre el endotelio, pero también pueden estar embebidas en él (Wisse, 1979). Son células voluminosas que muestran las principales características de los macrófagos: contienen numerosas vesículas fagocíticas y abundantes lisosomas (Homma et al. 1982; Törö et al., 1962).

El último tipo celular hepático son las células de Ito, también conocidas como células almacenadoras de grasa, perisinusoidales, lipocitos y más recientemente células estelares. Son parecidas a fibroblastos y en su citoplasma se observa una gran cantidad de gotas lipídicas. Se localizan en el espacio de Disse por debajo de las células endoteliales, su función principal es el almacenamiento de vitamina A, pero también pueden intervenir en la síntesis de colágena en el

hígado (Ito, 1978).

La compleja arquitectura del hígado y las características citológicas y citoquímicas de las diversas células que lo constituyen se reflejan en la gran variedad de funciones altamente especializadas que desempeña dicho órgano.

## **2. Función Hepática**

El hígado tiene una gran diversidad de funciones, de tal forma que resulta imposible separarlas de las de otros sistemas del organismo.

Las funciones básicas del hígado pueden dividirse así:

1. Función secretora para vaciar bilis en el tubo digestivo.
2. Funciones vasculares de almacenamiento y filtración de sangre.
3. Funciones metabólicas relacionadas con la mayor parte de los sistemas metabólicos del organismo.

Los hepatocitos forman continuamente bilis, la cual es secretada a los canalículos biliares, de allí pasa hacia la periferia del lobulillo hepático para continuar por conductos de diámetro progresivamente mayor hasta alcanzar el conducto hepático y el colédoco, desde donde se vacía directamente en el duodeno o se almacena y concentra en la vesícula biliar. La bilis tiene entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina, que es el fosfolípido más importante y el colesterol son insolubles en agua, pero son capaces de formar micelas mixtas con las sales biliares por lo que permiten se lleve a cabo la emulsificación de las grasas antes de su digestión (Jones y Mills, 1978).

Gran parte del gasto cardiaco llega al bazo y al intestino para terminar en el sistema

venoso portal que junto con el flujo de sangre arterial pasa por el hígado recibiendo el nombre de circulación esplácnica. Dicho órgano ayuda a regular el volumen sanguíneo sirviendo como reservorio, gracias a su gran capacidad vascular y de distensión. Durante la embriogénesis y en ciertas enfermedades del adulto tiene actividad hematopoyética. Además, gracias a la abundancia de macrófagos, filtra de la corriente sanguínea materiales de diferentes orígenes y dimensiones, especialmente bacterias y antígenos provenientes del intestino, siendo uno de los principales filtros de partículas extrañas (Jones y Mills, 1978).

Con respecto al metabolismo de carbohidratos, sintetiza y almacena glucógeno y lo desdobra en glucosa dependiendo de las demandas del organismo, o puede mantener el nivel normal de glucosa en la sangre por gluconeogénesis, además de que interviene en la formación de muchos compuestos químicos importantes partiendo de intermediarios del metabolismo glúcido. Específicamente en el metabolismo de lípidos convierte grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasa; forma cantidades considerables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas, además de que efectúa un porcentaje elevado de  $\beta$ -oxidación y formación de ácido acetoacético. Dentro del metabolismo proteínico se encarga de la desaminación de aminoácidos, además los interconvierte regulando así la concentración de éstos en la sangre; convierte el amoníaco derivado del metabolismo proteínico en urea y elabora proteínas plasmáticas, tales como albúmina, globulina y fibrinógeno (Jakoby, 1994).

El hígado tiene la tendencia particular a almacenar vitaminas, sobre todo A, D y B<sub>12</sub>. Forma gran parte de las sustancias que intervienen en el proceso de coagulación sanguínea como fibrinógeno, protrombina, globulina aceleradora, factor VII y otras menos importantes. Elabora heparina, almacena Cu y Fe, regulando la concentración de estos últimos en los líquidos corporales.

Por último, interviene en el metabolismo de sustancias endógenas, como bilirrubinas y hormonas, así como en el de sustancias exógenas como drogas, aniones orgánicos y toxinas (Jakoby, 1994).

En sí el hígado es un órgano indispensable para la vida y el buen funcionamiento de un organismo depende en gran medida de la integridad de él.

### 3. Cirrosis Hepática

En México, la cirrosis hepática está dentro de las cinco primeras causas de muerte de población cuya edad está comprendida entre los 25 y 65 años (Narro-Robles et al., 1992) (Fig. 2).

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	1

Fig. 2. Lugar que ocupa la 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. Secretaría de Salud, Dirección General de Información y Estadística. Tomado de Narro-Robles, J. Salud Pública Mex. 34:378, 1992.

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica generalmente progresiva, siendo el resultado final de una gran diversidad de estados patológicos que van desde los desórdenes genéticos hasta aquellos producidos por la ingestión de un espectro muy amplio de agentes tóxicos.

El hígado cirrótico generalmente aumenta su tamaño y su consistencia es firme,

aunque en los estados avanzados su tamaño puede estar disminuido. La alteración se caracteriza por daño celular generalizado, regeneración del parénquima hepático, incremento del tejido conjuntivo con formación de septos o bandas de colágena que rodean nódulos de hepatocitos y distorsión de la arquitectura hepática que dan como resultado modificaciones estructurales, cambios hemodinámicos y alteraciones funcionales (Becker, 1975; Rojkind y Dunn, 1979).

Las alteraciones observadas en la composición del tejido conectivo del hígado, como ocurre en la cirrosis, pueden modificar el microambiente del hepatocito, lo que puede influir en gran medida en la función y metabolismo celular, explicándose así las alteraciones bioquímicas observadas en los hepatocitos cirróticos (Rojkind y Dunn, 1979).

La cirrosis hepática es una alteración dinámica en la que la síntesis y depósito de tejido conectivo están sujetos a un fino control regulatorio, de tal forma que la inhibición de pasos críticos prevendría su depósito y la formación de la cicatriz, por lo que se necesita investigar para encontrar y definir diferentes estadios de la enfermedad y para desarrollar medicamentos específicos y seguros para el tratamiento de la cirrosis.

#### **4. La Cirrosis Hepática Inducida por CCl<sub>4</sub>**

La cirrosis experimental se puede definir como una lesión crónica del hígado que culmina eventualmente con anomalías en la estructura y función del órgano. Las alteraciones anatómicas incluyen la pérdida del parénquima hepático, el desarrollo de la fibrosis y la distorsión de la arquitectura normal del hígado.

Se dice frecuentemente que cuando una enfermedad humana se puede reproducir en animales de laboratorio, se logra superar uno de los mayores obstáculos que existen para entender

y controlar la misma.

Distintos agentes químicos son capaces de producir daño hepático que culmine en cirrosis. Cuando el daño es de baja intensidad y el número de células destruidas es pequeño, es probable que no se estimule la regeneración de los hepatocitos y solamente se produzca una pequeña cicatriz. Si el estímulo es único existe la posibilidad de reabsorción del tejido cicatricial y remodelación. Cuando la lesión se produce frecuentemente, el proceso cicatricial continúa produciéndose primero una fibrosis y posteriormente una cirrosis hepática. Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente y el fenómeno cicatricial es el predominante (Rojkind y Kersenobich, 1981 a y b) (Fig.3).

El  $\text{CCl}_4$  es uno de los agentes hepatotóxicos que producen cirrosis en animales de laboratorio y provoca alteraciones muy semejantes a las encontradas en la cirrosis del hígado humano. Este agente se puede utilizar como una herramienta valiosa para entender la patogénesis y las lesiones en esta enfermedad. (Pérez Tamayo, 1983).

El  $\text{CCl}_4$  produce cambios bioquímicos detectables en el hígado y además provoca alteraciones en el contenido de glucógeno, ribonucleoproteínas, lípidos hepáticos y sistemas enzimáticos incluidos en la membrana plasmática de los hepatocitos (Mourelle et al. 1981; Muriel y Mourelle, 1992).

El  $\text{CCl}_4$  se usó como agente anestésico (Recknagel, 1967) y desde el siglo pasado se reconoció que su administración producía atrofia aguda del hígado, por lo que su uso fue abandonado. El  $\text{CCl}_4$  como un veneno industrial preocupó a las generaciones de médicos de finales del siglo XIX y principios del XX. En 1921 se usó como antihelmíntico, lo que ocasionó problemas en la población tratada. Durante los primeros años del presente siglo su estudio se enfocó

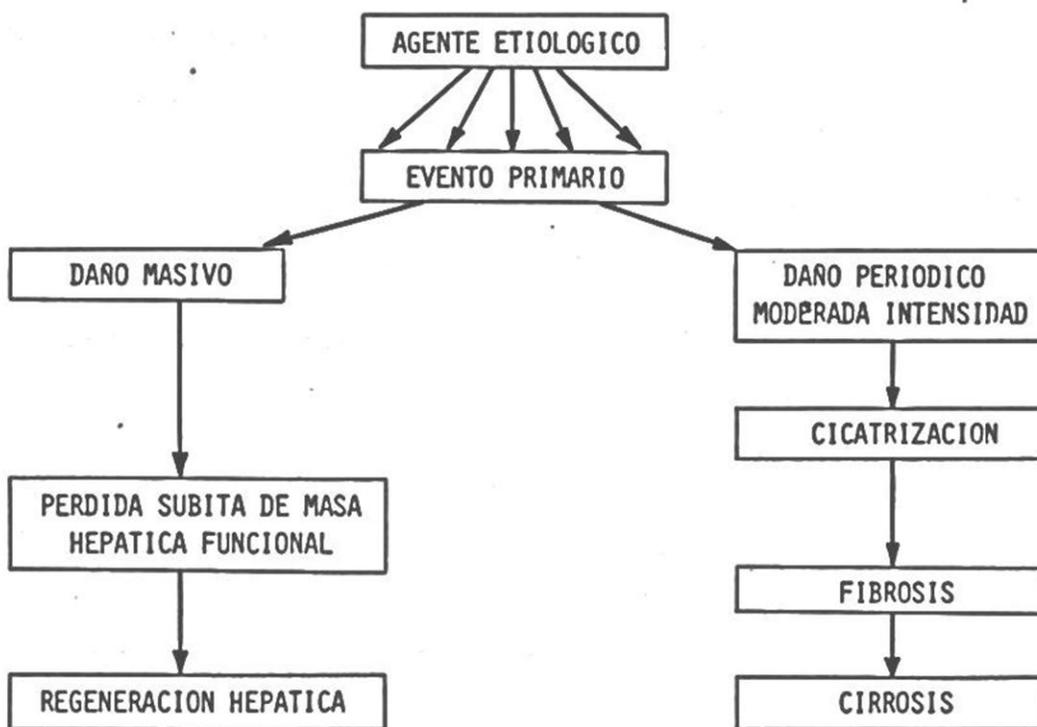


Fig. 3. Efecto de agentes hepatotóxicos.

principalmente a las condiciones dietéticas que disminuían o aumentaban el daño producido por  $\text{CCl}_4$  (Wells, 1925).

El estudio del mecanismo de acción del  $\text{CCl}_4$  ha creado controversias, de tal forma que se han postulado diferentes hipótesis para explicar los efectos observados al administrar dicha sustancia. Calbert y Brody (1960) postularon la hipótesis de las catecolaminas, mas esta hipótesis no es del todo satisfactoria, ya que el bloqueo simpático no protege contra el daño producido por  $\text{CCl}_4$ . Reynolds y Thiers (1962) sugirieron que el  $\text{CCl}_4$  producía toxicidad simplemente por su efecto como solvente de los lípidos membranales. Dianzani et al. (1966) propusieron daño directo y primario sobre la mitocondria (hipótesis mitocondrial) en la que se observa descontrol y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Hay otra hipótesis que menciona que el  $\text{CCl}_4$  disminuye la síntesis de proteínas (Recknagel, 1967) sin embargo se desvalorizó pues otro tipo de agentes que disminuyen la síntesis de proteínas no promueven la infiltración grasa en el hígado como se observa con el  $\text{CCl}_4$  (Seakins y Robinson, 1963).

Los estudios de Butler (1961), de Writschafter y Cronyn (1964) y de Gregory (1966) sobre la formación de radicales libres como producto metabólico del  $\text{CCl}_4$  (por ejemplo el radical libre triclorometilo,  $\text{CCl}_3\cdot$ ) complementados con los conocimientos de la protección proporcionada por los antioxidantes como la vitamina E (Bernheim, 1963; Gallagher, 1962; Hove, 1948), llevaron a Recknagel y Ghoshal (1966) a proponer la hipótesis de la lipoperoxidación, siendo ésta la más aceptada en la actualidad. Dicha hipótesis argumenta que la mayoría de los efectos producidos por el  $\text{CCl}_4$  dependen de su metabolismo previo por un complejo sistema enzimático localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso: las oxidasas de función mixta (Mason et al., 1965) que consta de un conjunto de enzimas involucradas en el metabolismo de drogas y

compuestos exógenos. El  $\text{CCl}_4$  es metabolizado en el citocromo  $\text{P}_{450}$  (Recknagel y Glende, 1973; Sipes et al., 1977; Slatter, 1966) con la consecuente formación del radical libre triclorometilo ( $\text{CCl}_3\bullet$ ) altamente reactivo, el cual oxida los grupos metilénicos adyacentes a carbonos con dobles enlaces en las cadenas de los ácidos grasos poliénoicos de los lípidos membranales del retículo endoplásmico formándose cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y el correspondiente radical libre orgánico (Rao y Recknagel, 1969) que es sensible de reaccionar con el oxígeno (McMillan y Calvert, 1965) formándose rápidamente el radical peróxido ( $\text{R-OO}\bullet$ ) y posteriormente el peróxido orgánico. El  $\text{R-OO}\bullet$  puede también sustraer hidrógenos de las cadenas polinsaturadas y formar un hidroperóxido (Holman, 1954) o endoperóxido (Pryor y Stanley, 1975; Pryor et al. 1976) (Fig. 4).

Los peróxidos orgánicos son en general compuestos muy inestables que experimentan un gran número de reacciones muy complejas que conducen a ruptura de las cadenas hidrocarbonadas con la formación de aldehídos y cetonas (Gardner, 1975), compuestos carbonílicos hidroxinsaturados (Schovenstein, 1967), malondialdehído, hidrocarburos de cadena corta como etano, pentano y otros.

Los peróxidos orgánicos también pueden experimentar ruptura homolítica, conduciendo a la formación de dos nuevos radicales libres, los cuales pueden atacar los puentes metilénicos vecinos. El proceso, una vez iniciado, es autocatalítico.

Estudios metabólicos más recientes realizados *in vitro* (Kubic y Anders, 1980; Mico et al., 1982; Poyer et al., 1978; Shah et al., 1979) proporcionan evidencias de que el  $\text{CCl}_4$  es metabolizado a diversos intermediarios reactivos potencialmente dañinos como el radical  $\text{CCl}_3\bullet$ , fósgeno ( $\text{O=CCl}_2$ ), especies electrofílicas de cloro, el radical peroxitriclorometilo ( $\text{OCCl}_3\bullet$ ), que podría formarse por la acción directa del  $\text{CCl}_3\bullet$  con el  $\text{O}_2$  o del  $\text{CCl}_4$  con el radical aniónico

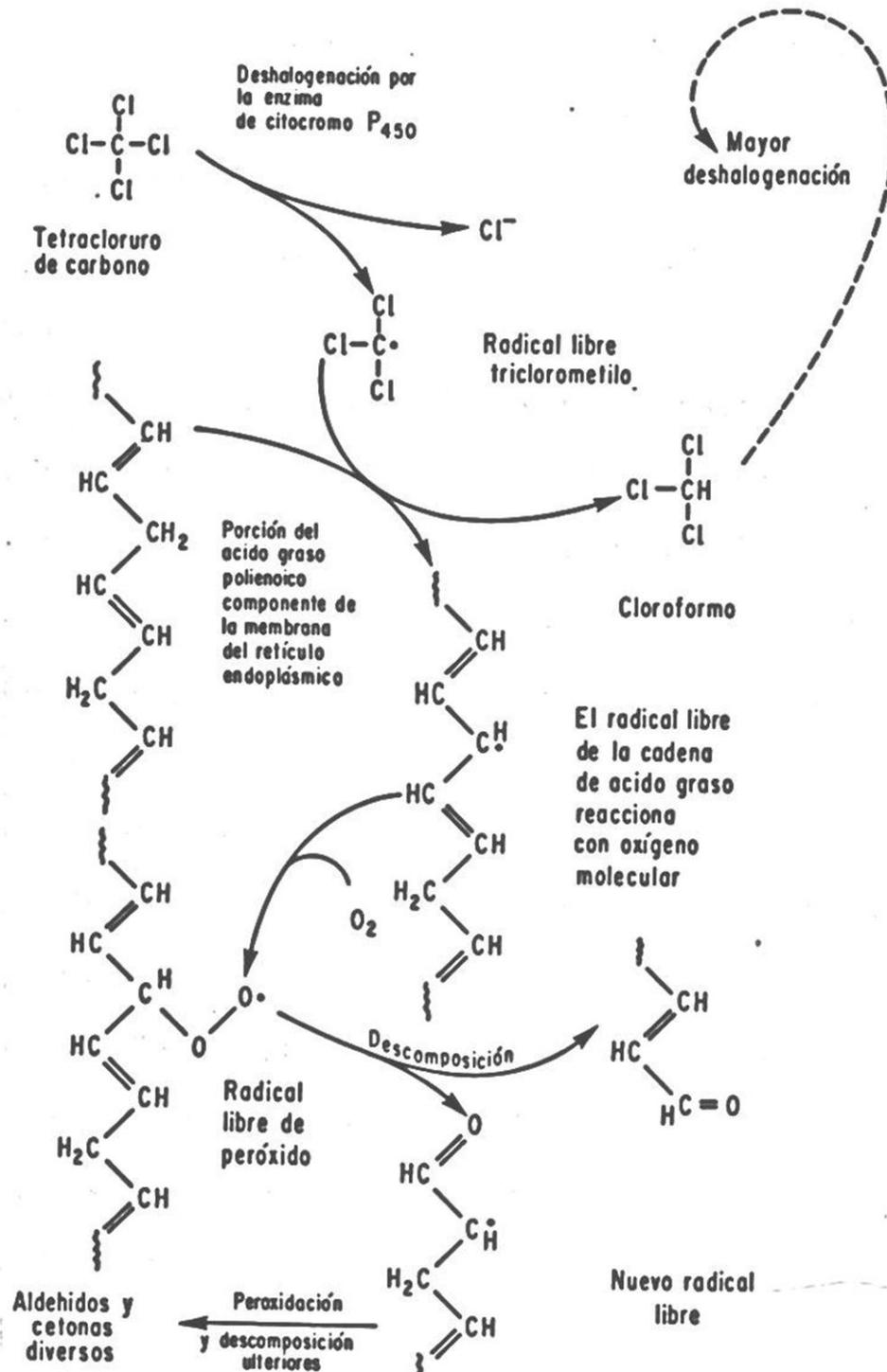


Fig.4. Mecanismo de acción del CCl<sub>4</sub>

superóxido (Packer et al., 1978; Roberts y Sawyer, 1981).

El proceso de lipoperoxidación tiene muy serias consecuencias a nivel de membranas, las cuales son extremadamente complejas e involucran no sólo a lípidos polinsaturados, sino también a un gran número de proteínas integrales de membrana ya que en dicho proceso hay alteraciones lípido-lípido y lípido-proteína, así como la pérdida de la conformación estructural de las proteínas de la membrana.

Existen evidencias de que el radical  $\text{CCl}_3\bullet$  ataca a los grupos -SH de las enzimas (Cleveland y Smuckler, 1965), disminuye la síntesis de proteínas *in vivo* (Smuckler et al., 1962), produce desactivación de los componentes del sistema de oxidasas de función mixta (Reynolds y Ree, 1971) y además, inicia una serie de reacciones autocatalíticas en cadena con los ácidos grasos polinsaturados que integran las membranas (Recknagel y Glende, 1973) produciéndose la descomposición peroxidativa de los mismos. Este evento acarrea graves consecuencias para el hepatocito (Alfin-Slater y Morris, 1963; Tappel, 1962 a y b) tales como la esteatosis hepática (Recknagel, 1967), glucogenólisis (Hickenbottom y Hornbroock, 1971), liberación de enzimas celulares hacia el torrente sanguíneo (Dinman et al., 1962; Rees y Shinha, 1960; Zimmerman et al., 1965), necrosis (Rouiller, 1964), hinchazón y desintegración mitocondrial (Artizzu et al., 1963; Hoffsten et al., 1962; Hunter et al., 1964 a y b, 1969; Lehninger, 1969; Reynolds et al., 1962), así como la descomposición peroxidativa de la membrana lisosomal (Artizzu et al., 1964; Desai et al., 1964; Wills y Wilkinson, 1966).

## 5. Detección y Evaluación del Daño Hepático

La determinación de la actividad de las enzimas hepáticas liberadas a la sangre debido

al daño hepático se ha vuelto una de las herramientas más útiles en los estudios de hepatotoxicidad.

La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para la determinación del daño hepático fue introducida en 1930-1950 con la demostración de la actividad sérica anormal de la fosfatasa alcalina (Roberts, 1933) y la colinesterasa (Brauer y Root, 1946) en el daño hepático.

Zimmerman (1978) clasifica a las principales enzimas séricas en cuatro categorías, basándose en su especificidad y sensibilidad a los diferentes tipos de daño hepático:

1). Enzimas cuya elevada actividad sérica refleja daño colestático más sensible que daño parenquimal, como la fosfatasa alcalina (FA) y la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP).

2). Enzimas que indican daño en el parénquima hepático producido por un agente citotóxico. Este grupo incluye:

a). Enzimas inespecíficas que pueden reflejar daño en tejidos extrahepáticos, como la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

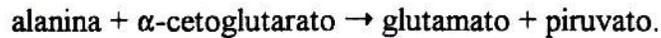
b). Enzimas localizadas principalmente en el hígado como la transaminasa glutámico pirúvica (TGP).

c). Enzimas localizadas casi exclusivamente en el hígado, como la ornitina carbamil-transferasa (OCT) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH).

3). Enzimas insensibles al daño hepático, pero que se elevan cuando hay daño extrahepático, como la creatinina fosfocinasa.

4). Enzimas cuya actividad sérica se deprime en el daño hepático, como la colinesterasa.

La transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) es una enzima que se localiza en el citoplasma del hepatocito que cataliza la siguiente reacción:



Esta misma eleva su actividad en el suero cuando el hepatocito pierde su integridad y se ha establecido que diversos estados necróticos son detectables gracias a ella (Molander et al., 1955), sin embargo también se ha demostrado que la TGP es una medida insensible de esteatosis hepática (Asada, 1958 y Goshal et al., 1969).

La FA y la  $\gamma$ -GTP pueden utilizarse para determinar daño hepático obstructivo. Las actividades en suero de estas enzimas, localizadas en las membranas de los hepatocitos y de las células de los conductos biliares, aumentan durante la colestasis o daño hepatobiliar en humanos (Batsakis et al., 1968; Dajer et al., 1978 y Whitfield et al., 1972).

La  $\gamma$ -GTP es una enzima unida a la membrana, cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamil del glutatión a un aminoácido o a un péptido que actúa como receptor de acuerdo a la siguiente reacción:



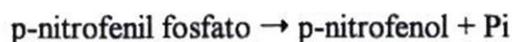
Esta reacción es muy importante en el metabolismo del glutatión y se ha postulado que ésta o reacciones análogas están involucradas en el transporte de aminoácidos a través de la membrana por interacción, tanto con aminoácidos extracelulares, como con glutatión intracelular, así el aminoácido entra a la célula como un  $\gamma$ -glutamilaminoácido.

La  $\gamma$ -GTP presenta relativamente baja especificidad con respecto al donador  $\gamma$ -glutamilo, lo cual permite su cuantificación sencilla a partir de métodos colorimétricos (Meister et al., 1976).

La FA es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza. En los vertebrados se encuentra en diferentes tejidos.

En cuanto a la distribución de la FA, dentro de los lóbulos hepáticos se ha visto que en la rata la actividad predomina principalmente en la porción periportal.

La FA es una enzima no específica, puede hidrolizar muchos compuestos de fósforo, aunque puede haber mayor especificidad para algunos compuestos como los ésteres fenólicos. En muchas de las pruebas químicas se usa como sustrato el p-nitrofenilfosfato:



La función de esta enzima no está bien entendida. En general se considera que está encargada de la hidrólisis de ésteres de fosfato. Se ha visto que todas las fosfatasa alcalinas son capaces de transferir grupos fosfato de un alcohol a otro.

Se ha sugerido que la FA ayuda a mantener el estado estacionario de metabolitos fosforilados intracelulares (Sela y Sachs, 1974).

En los 50's se describió un tipo de transporte de cationes en el hepatocito que requiere energía metabólica (ATP) ya que liberaba ADP y Pi por lo que se concluyó que debía estar involucrada una ATPasa. En la actualidad se sabe que existen en el hepatocito varias ATPasas:  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Uno de los sistemas enzimáticos membranales que juega un papel preponderante en las células es el de las ATPasas. Estas enzimas membranales son muy sensibles a cambios en la estructura de la bicapa lipídica, se ha demostrado que pequeños cambios en el microambiente que los rodea son capaces de modificar sus actividades (Boyer, 1971; Erlinger et al., 1969; Gimon et al., 1977; Hokin y Hesum, 1972; Kimelberg y Papahadjopoulos, 1974; Kyte, 1975; Skou, 1965; Tanaka y Strickland, 1965; Uesugi et al., 1971).

En los hepatocitos estas enzimas son muy importantes ya que además de regular los

gradientes de cationes, controlan el transporte de nutrientes indispensables (aminoácidos y azúcares) y el transporte de ácidos biliares. Debido a la gran actividad metabólica que desempeña el hígado, el papel de las ATPasas es muy importante.

## **6. Tratamiento de la Cirrosis Hepática**

El tratamiento de la cirrosis hepática comprende dos aspectos fundamentales. El primero es el tratamiento sintomático de las complicaciones de la misma, tales como el manejo de la hipertensión portal (sangrado de várices esofágicas y retención de líquidos) y de la insuficiencia hepática (encefalopatía hepática y desnutrición). El segundo consiste en el tratamiento de la enfermedad misma que ha sido posible en años recientes gracias al avance en el conocimiento de la fisiopatología de la cirrosis hepática.

En la actualidad se ha encontrado que es posible influir favorablemente la cirrosis hepática por medios farmacológicos. Se han empleado diversos agentes con probable actividad antifibrogénica, con especial atención en sustancias que alteran el curso de los eventos inflamatorios que preceden a la fibrosis y sobre aquellas que impiden la síntesis, depósito y/o procesamiento de colágena (Rojkind y Kershenobich, 1983).

La colchicina es la droga que ha reportado mayores cualidades benéficas para el tratamiento de la cirrosis, mostrando varios efectos farmacológicos:

### **1). Efecto antifibrogénico:**

a) Inhibe el transporte transmembranal de las proteínas de exportación, tales como la colágena (Ehrlich y Bornstein, 1972 y Olmstead y Borisky, 1973).

b) Inhibe la síntesis de colágena (Ehrlich et al., 1974).

c) Induce *in vitro* la producción de colagenasa y la liberación de procolagenasa activada por proteasa (Harris y Krane, 1971).

2). Efecto antiinflamatorio:

a) Inhibe la citotoxicidad mediada por neutrófilos dependientes de anticuerpos, la movilización, adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos (Malech et al., 1978; Spilberg et al., 1979).

b) Inhibe la liberación de histamina por los leucocitos y la liberación de cininas plasmáticas *in vitro* (Malech et al, 1978; Spilberg et al., 1979).

3). En ratas cirróticas favorece las alteraciones de la actividad del sistema adenilato ciclasa de la membrana plasmática del hepatocito. En consecuencia corrige las alteraciones en el contenido de AMPc y glucógeno (Mourelle et al., 1981).

4). Protege las membranas plasmáticas y estabiliza las enzimas que tienen los grupos -SH en su centro activo (Schnell et al., 1976).

5). Incrementa la permeabilidad en los canalículos biliares (Bajwa y Fujimoto, 1983).

6). Previene alteraciones de las ATPasas (Mourelle et al., 1983).

7). Fármaco seguro cuando se administra oralmente a una dosis diaria de 1.2 mg, sin embargo puede ser tóxico e inclusive mortal a dosis más altas (Kershenobich et al., 1979).

## 7. **Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación de la Colchicina**

En la estructura química de la colchicina se reconocen 3 anillos: el primero es aromático y el segundo y tercero están compuestos por siete átomos. El tercer anillo, de tropolona, le confiere a la molécula cierta acidez entre los fenoles y los ácidos carboxílicos. Se mencionan dos

valores de pka para la colchicina, un valor de 1.7 y otro de 12.3, lo cual sugiere que a pH fisiológico, la colchicina posee cierta polaridad dada por el grupo amido.

Los estudios realizados por Boyland y Mawson (1938) sugieren que la colchicina se absorbe como tal por vía oral y que sólo una pequeña fracción es transformada a colchiceína (O-10-desmetilcolchicina), un derivado aparentemente menos potente que la colchicina en su acción sobre la gota (Wallace, 1959).

Cuando se administra al hombre por vía oral, alcanza niveles máximos en sangre aproximadamente a las dos horas (Wallace y Ertel, 1973). Sin embargo las concentraciones que se observan en el suero son muy pequeñas y han hecho pensar que existen problemas de absorción del compuesto a nivel del tracto digestivo.

Wallace et al. (1970), observaron que cuando se administraba la colchicina al hombre por vía intravenosa rápidamente desaparecía de la sangre, con un tiempo de vida media de 20 minutos si los pacientes tenían el hígado y el riñón sanos. Observaron además que en pacientes con enfermedad hepática crónica, el tiempo de vida media era menor, mientras que en pacientes con enfermedad renal crónica severa, el tiempo de vida media era ligeramente mayor comparado con el calculado en los pacientes usados como control.

Se han señalado al hígado, al bazo, al riñón y al intestino como los órganos donde se acumula más la colchicina (Back y Walaszek, 1952). Algunas células son capaces de concentrar la colchicina en grandes proporciones; se ha encontrado que los leucocitos acumulan la colchicina en concentraciones de 3 a 17 veces más altas que las encontradas en el plasma, por lo que se ha propuesto que estas células juegan un papel importante en la distribución de la colchicina representando un segundo compartimiento en el interior del organismo.

Las vías de eliminación de la colchicina en el hombre son principalmente la orina y las heces.

La toxicidad de la colchicina ha sido reconocida desde la antigüedad; la información acerca de sus efectos proviene principalmente de tres fuentes: casos de pacientes que han ingerido una sobredosis de colchicina durante un tratamiento terapéutico; casos de personas que la han ingerido con intenciones suicidas y finalmente, los estudios de toxicidad en animales.

El uso de la colchicina en el tratamiento de enfermedades como la gota y otras, ha enfrentado al hombre con los efectos tóxicos más comúnmente reconocidos de este compuesto. Es probable que desde su introducción en Europa por Von Storck en el año de 1867 para el tratamiento de la gota, los pacientes afectados por esta enfermedad, regulaban la administración de la colchicina a través de la manifestación de signos tóxicos como la diarrea y el vómito, signos que se han observado se presentan en un 80% de los pacientes inicialmente tratados con la colchicina (Wallace, 1974).

La intoxicación aguda con colchicina en el hombre afecta gran número de órganos y funciones (Carr, 1975; Domínguez et al., 1979). Stapczynski et al., (1981) dividen los síntomas clínicos de la intoxicación aguda con colchicina en 3 etapas de acuerdo al tiempo de aparición. En la primera de ella son evidentes los síntomas gastrointestinales como diarrea y vómito que producen en el individuo un estado de deshidratación severa; durante la segunda etapa se manifiestan cambios en el tejido hemático tales como: trombocitopenia, granulocitopenia y coagulación intravascular; además trastornos de la función renal que pueden desenlazar en insuficiencia renal aguda, que se complica con la aparición de dificultad respiratoria y edema pulmonar, llegando a ocasionar en el sujeto un estado de acidosis metabólica. Finalmente, en la tercera etapa, suele aparecer una

leucocitosis de rebote, alopecia, y en algunos casos aplasia medular y muerte.

Se han descrito el desbalance hidroelectrolítico, el choque séptico, la insuficiencia respiratoria y el daño al sistema nervioso central como causas de muerte de personas intoxicadas con colchicina (Heaney et al., 1976).

Algunos efectos que se observaron entre los pacientes sobrevivientes y los que murieron durante la intoxicación son: la presencia invariable de signos gastrointestinales en ambos grupos, algunos de los síntomas como el estado de choque, dificultad respiratoria y acidosis metabólica, aparecieron en las personas que murieron, en cambio otros, como la alopecia y la citopenia, se presentaron en un porcentaje mayor de las personas sobrevivientes.

#### **8. Mecanismo de Acción de la Colchicina**

En la actualidad se reconoce que la colchicina es una droga antimitótica, actividad que comparte con otros compuestos como la vincristina, la vimblastina, la podofilotoxina y la griseofulvina entre otros. Las primeras observaciones realizadas por Lits (1934) acerca de los efectos de la colchicina sobre la división celular, establecieron que este compuesto detiene a las células en metafase, interaccionando con la tubulina, subunidad proteínica de los microtúbulos, unidades que forman el huso acromático y que bajo los efectos de la colchicina se disgregan (Borisy y Taylor, 1967; Lits, 1934; Shelanski y Taylor, 1967).

Además de su papel en la división celular, los microtúbulos se encuentran implicados en numerosas funciones de las células (Dustin, 1978) y en algunos casos los efectos producidos por la colchicina pueden ser relacionados con su acción sobre ellos. Por ejemplo, la acción que tiene la colchicina en los ataques agudos de la gota se ha explicado en parte por los

efectos que produce la colchicina sobre los polimorfonucleares, (Malawista, 1968) en los que se ha visto que interfiere en funciones como la motilidad (Fruhman, 1960), la fagocitosis (Malawista y Bodel, 1967), la quimiotaxis (Caner, 1965), la adhesividad (Penny et al., 1966) y en la liberación de proteínas inductoras de la quimiotaxis (Phelps, 1970), funciones en las que se ha demostrado la participación de los microtúbulos.

La colchicina aumenta la actividad de la FA en suero ( Wilfred, 1977) y su valor es más alto cuando hay cirrosis. La FA aumenta con colchicina en ratas normales y cirróticas (un poco más alta en cirróticas pero no significativamente). En cuanto a la  $\gamma$ -GTP, en ratas normales con colchicina no hay un cambio significativo, pero en ratas cirróticas con colchicina los valores promedio son más altos comparados con los de las ratas normales (Mourelle et al., 1990).

La colchicina aumenta la esteatosis en ratas normales. En las ratas cirróticas la distribución de la grasa no es definida y no es tan abundante (Mourelle et al., 1990).

Como la colchicina revierte y previene los efectos causados por el  $\text{CCl}_4$  en el hígado (modelo experimental de cirrosis) se le ha usado en el tratamiento de la cirrosis hepática en humanos (Rojkind y Kershenobich, 1975), obteniéndose buenos resultados, sin embargo, la colchicina tiene varios efectos tóxicos que hay que considerar, algunos son: choque séptico, desequilibrio electrolítico y daños en el sistema nervioso central (Kershenobich et al, 1979).

Es importante hacer notar que si bien, algunos efectos que se observan al administrar la colchicina, pueden estar relacionados con su acción con los microtúbulos (Hoang et al., 1982; Liu et al, 1978; Merlin, 1972; Tsuchimoto y Matter, 1979; Race et al., 1970; Temple et al., 1972; Williams y Wolff, 1970) otros efectos, como lo señala Wallace (1961) pueden ser originados por la interferencia de la colchicina en funciones celulares probablemente no relacionadas con los

Microtúbulos (Denko, 1975; Harris y Krane, 1971; Wallace, 1961).

### 9. El Acido Trimetilcolchicínico

El ácido trimetilcolchicínico es un análogo de la colchicina, alterado solamente por sustituciones en las cadenas laterales del segundo y tercer anillos. El grupo N-acetilo del segundo anillo está ausente y en su lugar hay un grupo amino y hay un grupo hidroxilo en lugar del metoxilo en el tercer anillo (N-desacetil colchiceína) (Fig. 5).

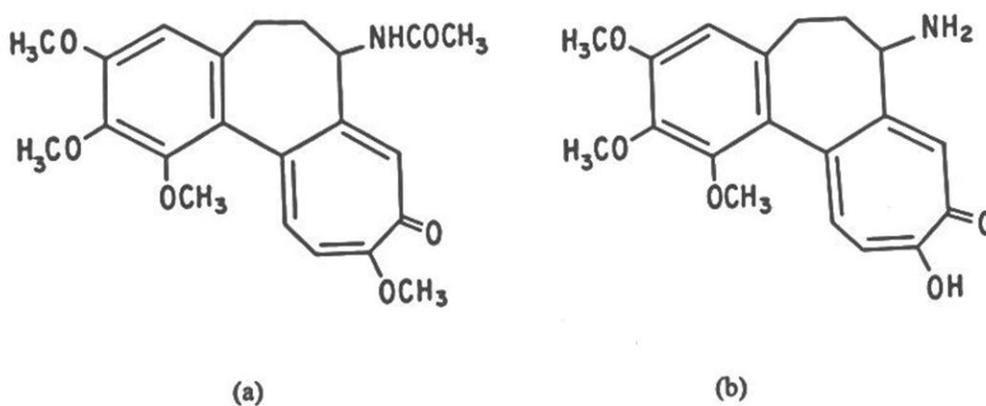


Fig. 5. Estructura de la colchicina (a) y del ácido trimetilcolchicínico (b).

Esta sustancia ha resultado efectiva en el tratamiento de la artritis gotosa aguda, pero no tiene efectos antimicrotubulares, ni muestra los efectos tóxicos de la colchicina, por lo que se espera que sea capaz de revertir y/o prevenir las alteraciones producidas por el CCl<sub>4</sub> en algunos indicadores de daño hepático (Wallace, 1961).

Recientemente se demostró que el ácido trimetilcolchicínico es capaz de prevenir el daño hepático inducido por la obstrucción biliar en la rata (Muriel, 1996). En este trabajo se evalúa

la capacidad del ácido trimetilcolchicínico para prevenir y revertir el daño crónico al hígado inducido con  $\text{CCl}_4$ . Esta investigación se enfoca principalmente a las alteraciones funcionales sobre la membrana plasmática del hepatocito.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la capacidad del ácido trimetilcolchicínico y de la colchicina para prevenir y revertir las alteraciones en algunos de los indicadores de daño hepático en la cirrosis inducida por tetracloruro de carbono en la rata.

### Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del ácido trimetilcolchicínico sobre la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad en membranas plasmáticas de hepatocitos provenientes de ratas cirróticas.
2. Determinar el efecto del ácido trimetilcolchicínico sobre la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa tanto en membranas de hepatocitos como en el suero de ratas intoxicadas crónicamente con  $\text{CCl}_4$ .
3. Estudiar la capacidad del ácido trimetilcolchicínico para prevenir y revertir las alteraciones producidas por el  $\text{CCl}_4$  sobre el grado de lipoperoxidación y el contenido de glucógeno hepáticos, y la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica en suero.
4. Comparar los efectos del ácido trimetilcolchicínico con los de la colchicina.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. Animales y Esquemas de Tratamiento

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de entre 50 y 100 g al inicio del tratamiento. Se mantuvieron con acceso libre a comida (Purina) y agua.

Los animales se trataron de la siguiente manera:

a). Intoxicación crónica con  $\text{CCl}_4$  (inducción de cirrosis). Los animales recibieron 0.25 ml de tetracloruro de carbono disuelto en aceite mineral por vía intraperitoneal 3 veces por semana durante 8 semanas, según el siguiente esquema:

Semanas	$\text{CCl}_4$ /aceite (v/v)
1a.	1:7
2a.	1:6
3a.	1:5
4a.	1:4
5a. - 8a.	1:3

b). Esquema preventivo. Se formó un grupo de ratas que recibió el tratamiento inductor de cirrosis, a estas mismas ratas se les administró por vía oral 10  $\mu\text{g}$  de ATMC 5 días a la semana durante 8 semanas. Se trató un grupo paralelo a éste al que se le administró 10  $\mu\text{g}$  de colchicina por la vía y durante el tiempo señalados.

c). Esquema de reversión. Se tomaron ratas que habían concluido el tratamiento inductor

de cirrosis y a partir de la novena semana se les administraron 10  $\mu\text{g}$  de ATMC o de colchicina, ambos por vía oral durante 4 semanas, sin discontinuar el tratamiento con tetracloruro de carbono.

d). Grupos control. En el estudio se incluyeron ratas que recibieron exclusivamente aceite mineral o éste junto con el ATMC o la colchicina, a la dosis y por las vías señaladas durante 8 semanas. Se utilizaron también como controles, ratas cirróticas de 8 y de 12 semanas.

Después de 72 horas de terminados los tratamientos las ratas fueron anestesiadas con éter, se les extrajo la sangre por punción cardiaca y se les extirpó el hígado.

## **2. Obtención del Suero**

La sangre extraída de cada rata se colocó en tubos de vidrio de 10 ml de capacidad, los cuales se mantuvieron sumergidos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman TJ-6. Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur, se colectó el suero de cada tubo y se colocó en tubos etiquetados, se sellaron con parafilm y se mantuvieron en congelación hasta su estudio.

En el suero se determinaron las actividades de las siguientes enzimas:

- Fosfatasa alcalina.
- $\gamma$ -glutamil transpeptidasa.
- Transaminasa glutámico-pirúvica.

## **3. Obtención de la Fracción de Membranas de Hepatocitos**

Las membranas se prepararon usando el método de Neville con una modificación introducida por Pohl y cols. (Neville, 1960 ). El procedimiento se realizó a temperatura de 0 a 4°C.

Se anestesiaron las ratas y se les extrajo la sangre por punción cardiaca para que el hígado quedara libre de eritrocitos, éste se extirpó rápidamente y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  1 mM frío.

Se sumergieron vasos de precipitados en hielo y en cada uno de ellos se colocaron los hígados y se desmenuzaron lo más finamente posible utilizando unas tijeras de disección (se separó el exceso de grasa cuando lo hubo).

Los fragmentos de cada hígado por separado se pasaron a un homogenizador Dounce grande con émbolo flojo (Blaessing Glass Spec. Co., Rochester, N.Y.) con 25 ml de  $\text{NaHCO}_3$  1mM de los 250 ml que corresponden a cada hígado. Se homogenizó con 8 choques del émbolo y posteriormente se agregó el resto de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM.

Se colocó cada homogenado en vasos de precipitados y se agitaron suavemente durante 3 minutos utilizando una mosca magnética. Transcurrido dicho tiempo se filtró cada homogenado a través de gasa doble y luego a través de gasa cuádruple.

El filtrado se distribuyó en botellas de centrifuga de 250 ml. Se centrifugó a 2500 rpm en una centrifuga Beckman TJ-6 durante 30 minutos. El sobrenadante se desechó con mucho cuidado. El precipitado se colocó en el mismo homogenizador y se homogenizó con 3 choques del émbolo flojo suavemente.

El homogenado se pasó a una probeta de 50 ml y se añadió una solución de sacarosa con una concentración de  $69 \pm 0.5\%$  (p/p), de tal modo que la suspensión resultante quedó ajustada a  $44 \pm 0.1\%$ . Las medidas de refracción se efectuaron en un refractómetro Abbe. Con esta suspensión se llenaron dos tercios de los tubos del rotor Beckman SW-28. El tercio restante se llenó cuidadosamente con una solución de sacarosa que se ajustó previamente a una concentración de  $42 \pm 0.1\%$  (p/p).

Una vez que se hicieron los gradientes de sacarosa, los tubos se centrifugaron a  $105,000 \times g$  durante 150 minutos usando una ultracentrifuga Beckman L8-70. Se colectó la porción flotante, que corresponde a las membranas, con una espátula tipo cuchara y se colocó en un vaso de precipitados con un pequeño volumen de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM y se resuspendió haciéndola pasar 3 veces por una aguja No. 18 y luego 3 veces por una aguja No. 20, la suspensión se colocó en tubos de centrifuga, se completó el volumen de los tubos con  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, se agitaron por inversión y se centrifugaron en una centrifuga Beckman J 2-21 a  $15,000 \times g$  durante 15 minutos.

Se quitó el exceso de sobrenadante utilizando una bomba de vacío, las membranas se resuspendieron en un mínimo de sobrenadante y se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  que se colocaron en viales pequeños, se etiquetaron y se guardaron en un congelador a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su estudio.

En las membranas se determinaron las actividades de las siguientes enzimas:

- Fosfatasa alcalina.
- $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa.
- ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad.

#### 4. **Determinación de Proteínas**

Las proteínas se determinaron siguiendo el método de Bradford (1976) que se basa en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas formándose un complejo colorido cuya absorbancia máxima es a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras, se tomaron alícuotas adecuadas (20-50  $\mu\text{l}$ ), se colocaron en tubos de ensayo de 5 ml y se completó el volumen a 100  $\mu\text{l}$  con agua destilada. A cada tubo, incluyendo el blanco, se le añadieron 2.4 ml del reactivo de

Bradford, se agitaron en el vórtex y se leyeron en un espectrofotómetro a 595 nm. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Los cálculos se elaboraron con base en la interpolación en una curva patrón. Para la elaboración de esta curva se preparó una solución de albúmina bovina sérica en agua con una concentración de 1 mg/ml. Se tomaron alícuotas en el rango de 0 a 75 µg, se colocaron en tubos de ensayo y se llevaron a 100 µl con agua destilada. Posteriormente se les añadieron 2.4 ml del reactivo de Bradford, se agitaron fuertemente y se leyó la absorbancia a la longitud de onda indicada.

#### **5. Determinación del Grado de Lipoperoxidación en Homogenado de Hígado**

Se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico, que se fundamenta en la reacción de dos moléculas de esta sustancia con una molécula de malondialdehído (MDA) produciendo un complejo colorido rosado intenso que posee una absorbancia máxima a 532 nm (Buege, 1978).

Todas las manipulaciones se efectuaron sobre hielo y rápidamente para evitar la lipoperoxidación *post mortem*. De cada rata se tomó 0.5 g de hígado, a estas porciones se les adicionaron 5 ml de agua destilada y se homogenizaron en un homogenizador mecánico de teflón, con 10-15 choques del émbolo. De cada homogenado se tomó 1 ml y a cada uno se les agregaron 5 ml de agua destilada, de estas nuevas diluciones se tomaron alícuotas de 20 µl para determinar proteínas según el método de Bradford.

Posteriormente se tomó un volumen de cada homogenado que contenía 5 mg de proteína, se colocaron en tubos de ensayo de 5 ml y se llevaron a 1 ml con Tris-HCl 150 mM, pH 7.4. Se incluyó un blanco con 500 µl de agua y 500 µl de la solución amortiguadora.

Se incubaron los tubos a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se

añadieron a cada tubo 2 ml de ácido tiobarbitúrico 0.375% en ácido tricloroacético al 15%. Se taparon los tubos con canicas selladas y luego se calentaron en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos, se dejaron enfriar, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 532 nm.

El grado de lipoperoxidación se expresó como nmoles de MDA/mg de proteína.

#### **6. Determinación del Contenido de Glucógeno Hepático**

El método utilizado fue el de Fong y cols. (1953) que se basa en la reacción de glucosa (liberada al hidrolizar el glucógeno con KOH) con antrona, formándose un complejo de color verde cuya absorbancia máxima se detecta a 620 nm.

Se tomaron porciones de hígado de 0.5 g y se colocaron en tubos de ensayo de 20 ml., se agregó 1.5 ml de KOH al 30% a cada tubo, y se cubrió con canicas selladas con cinta adhesiva y se digirió el tejido calentando los tubos en un baño de agua a ebullición durante 30 minutos. Una vez digerida la muestra se colocó el contenido de cada tubo en matraces aforados de 25 ml y el volumen se completó con agua bidestilada, se agitó para disolver bien el contenido y se tomaron alícuotas de 2-5 ml que se colocaron en otros matraces aforados de 25 ml, el volumen se completó nuevamente con agua bidestilada y se agitó. De los segundos matraces se tomaron alícuotas de 5 ml y se colocaron en tubos de ensayo de 20 ml.

Se hicieron dos estándares con 5 ml de solución de glucosa: se disolvieron 5 mg de glucosa en 5 ml de agua, de aquí se tomaron 100  $\mu$ l que se diluyeron en 4.9 ml de agua bidestilada. El blanco se preparó con 5 ml de agua.

Todos los tubos fueron colocados en hielo y a cada uno de ellos se le añadieron

lentamente con una bureta, 10 ml de una solución de antrona al 0.2% en ácido sulfúrico.

Los tubos se agitaron cuidadosamente en el vórtex, se taparon con canicas y se colocaron en baño de agua a ebullición durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo fueron retirados, se les dejó enfriar y se leyó su absorbancia a 620 nm.

Para hacer los cálculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{glucógeno } \mu\text{g} = \frac{100 \times \text{Abs. del tubo problema}}{1.11 \times \text{Abs. del tubo estándar}}$$

El contenido de glucógeno hepático se expresó como g de glucógeno/100 g de hígado.

## 7. **Determinación de la Actividad de la Fosfatasa Alcalina**

La actividad de esta enzima se cuantificó de acuerdo al método descrito por Berger y Rudolph (1963), que se basa en la hidrólisis, por acción de la enzima, de p-nitrofenilfosfato dando como productos fosfato inorgánico y p-nitrofenol. Este último se cuantifica espectrofotométricamente a 410 nm.

Se colocaron en tubos de ensayo de 10 ml, 250  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de glicina 0.1 M,  $\text{MgCl}_2$  0.001 M a pH 7.4 y 250  $\mu\text{l}$  de solución sustrato, que se preparó disolviendo 100 mg de p-nitrofenilfosfato en 25 ml de agua destilada. Se preincubó a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron a cada tubo 50  $\mu\text{l}$  de suero o de membranas diluidas en la solución amortiguadora. El blanco llevó 50  $\mu\text{l}$  de agua en lugar de suero o membranas. Se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego de ese tiempo la reacción se detuvo

agregando a cada tubo 5 ml de NaOH 0.02 N, se agitaron por inversión y se tomaron lecturas a 410 nm.

Las lecturas se interpolaron en una curva patrón de p-nitrofenol.

En el caso del suero, la actividad de la fosfatasa alcalina se reportó como  $\mu$ moles de PNFF/l de suero/min y para las membranas como nmoles de PNFF/mg de proteína por min.

#### **8. Determinación de la Actividad de la $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidasa**

El análisis se basó en el método descrito por Glossmann y Neville (1972) que se fundamenta en la conversión de  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilida a  $\gamma$ -glutamyl-glicil-glicina con liberación de p-nitroanilina debido a la actividad de la enzima. La p-nitroanilina tiene absorbancia máxima a 410 nm.

En tubos de ensayo de 5 ml se depositaron para cada muestra 500  $\mu$ l de Tris-HCl 200 mM a pH 8.2, 100  $\mu$ l de glicil-glicina 40 mM a pH 8.2 y 200  $\mu$ l de  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM. Los tubos se preincubaron a 37°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de suero o de membranas diluídas con la solución amortiguadora y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. El blanco llevó 100  $\mu$ l de agua en lugar de la muestra.

La reacción se detuvo añadiendo a cada tubo 2 ml de ácido acético 1.5 M, se mezclaron por inversión y se leyeron a 410 nm.

Las lecturas tomadas se interpolaron en una curva patrón de p-nitroanilina.

La actividad de la enzima se reportó en el caso de los sueros como  $\mu$ moles de PNA/l de suero/min y para las membranas en nmoles de PNA/mg de proteína por minuto.

### 9. **Determinación de la Actividad de la Transaminasa Glutámico-Pirúvica**

La actividad de esta enzima se cuantificó siguiendo el método reportado por Reitman y Frankel (1957). El método se basa en la formación de piruvato y glutamato a partir de alanina y alfa-cetoglutarato. El piruvato obtenido reacciona a través de su grupo ceto con la 2,4-dinitrofenilhidrazina formando un complejo colorido con absorbancia a 515 nm.

En tubos de ensayo de 5 ml se colocaron 250  $\mu$ l de solución sustrato (1.78 g de D/L alanina, 30 mg de ácido alfa-cetoglutarico y 0.5 ml de NaOH 1 N aforados a 100 ml con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4) y 50  $\mu$ l de suero. Para cada muestra se preparó un blanco al que por el momento no se le adicionó suero. Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo la reacción se detuvo añadiendo a todos los tubos 2.5 ml de NaOH 0.4 N, posteriormente se les adicionaron 250  $\mu$ l de reactivo cromógeno (2,4-dinitrofenilhidrazina) y se incubaron nuevamente a 37°C durante 15 minutos. Después de esto a los blancos preparados se les agregaron 50  $\mu$ l del suero correspondiente, se mezcló y se procedió a leer a 515 nm.

Para calcular la actividad de la enzima se restaron las absorbancias de los blancos a las de sus respectivos tubos problema y el resultado se interpoló en una curva patrón de piruvato complejado con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

La actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica se reportó como  $\mu$ moles de piruvato/L de suero/min.

### 10. **Determinación de la Actividad de la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de Alta Afinidad**

En este método se cuantifica el fosfato inorgánico liberado de la hidrólisis del ATP.

El fosfato que se libera se mide espectrofotométricamente después de hacerlo reaccionar con molibdato de amonio en presencia de ácido ascórbico formándose un complejo colorido con absorbancia máxima a 820 nm (Ames, 1966).

Todos los tubos que se utilizaron en esta determinación fueron libres de fósforo.

Se prepararon dos series paralelas de tubos: a) con calcio y b) sin calcio. A los tubos de la primera serie se les añadieron 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2 mM, 100  $\mu$ l de EGTA 2 mM, y 180  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.4. En los de la segunda serie se agregaron 100  $\mu$ l de EGTA 2 mM y 280  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.4. A ambos grupos se les adicionaron 20  $\mu$ l de membranas diluidas en la solución amortiguadora. El blanco se preparó con 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2 mM, 100  $\mu$ l de EGTA 2 mM y 200  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.4.

Todos los tubos se agitaron y se pusieron a preincubar a 37°C por 15 minutos y al término se les agregaron a cada uno de ellos 100  $\mu$ l de ATP 1.25 mM, se agitaron y se incubaron nuevamente a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 35% frío. De estos tubos se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se depositaron en otros tubos, se les agregaron 400  $\mu$ l de agua bidestilada junto con 200  $\mu$ l de ácido ascórbico al 10% y 1.2 ml de molibdato de amonio al 0.42% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N, se les agitó en el vórtex y se pusieron a incubar a 37°C por espacio de 30 minutos. Al terminar la incubación se leyó inmediatamente la absorbancia a 820 nm.

Para calcular la actividad de esta enzima se restaron las actividades de los tubos sin calcio a las actividades de sus respectivos tubos con calcio.

La actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad se reportó como nmoles de  $\text{P}_i$ /mg de proteína/min.

\* Todas las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman 45, Perkin Elmer.

#### **11. Tratamiento Estadístico**

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se obtuvo la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM) para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento incluidos en este estudio.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable con el fin de estimar diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Las medias de cada grupo se compararon por el método de Tukey, que permite hacer comparaciones estrictas de más de dos grupos diferentes. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ .

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Esquema de Prevención

###### a). Grado de lipoperoxidación.

En la gráfica y la tabla 1 se muestran los valores del grado de lipoperoxidación. En las ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  durante 8 semanas el grado de lipoperoxidación se incrementó 2.6 veces con respecto a las ratas normales. En el grupo que recibió el tratamiento conjunto de  $\text{CCl}_4$  y ATMC hubo un descenso del 15% y en el grupo que recibió  $\text{CCl}_4$  y colchicina el descenso fue del 32%, sin embargo estos valores no representan una diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico.

En los controles de ATMC y colchicina no se observaron diferencias con respecto a las ratas normales.

**TABLA 1**

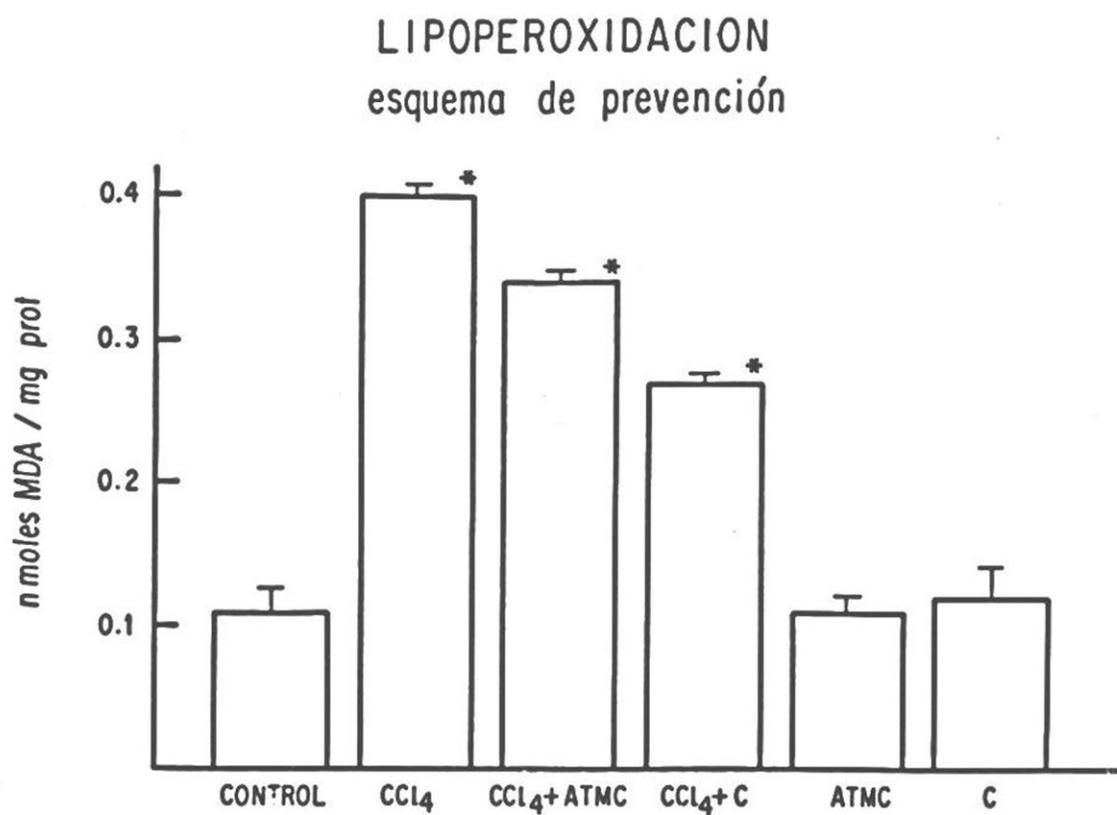
**GRADO DE LIPOPEROXIDACION  
(Esquema de prevención)**

Tratamiento	nmoles MDA/mg prot
Control	0.11 ± 0.006
$\text{CCl}_4$	0.40 ± 0.030*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	0.34 ± 0.040*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	0.27 ± 0.020*
ATMC	0.11 ± 0.004
Colchicina	0.12 ± 0.008

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\*diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 1. Grado de lipoperoxidación en homogenado de hígado en los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C=colchicina, ATMC=ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

b). Contenido de glucógeno hepático.

El contenido de glucógeno hepático disminuyó 92% en el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$ , comparado con el grupo control, lo que se puede apreciar en la tabla y la gráfica 2. En el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  + ATMC el contenido de glucógeno descendió 66% mientras que el tratado con  $\text{CCl}_4$  + colchicina el glucógeno disminuyó sólo 44% ambos comparados con el grupo de ratas normales. La administración conjunta de ATMC o de colchicina y  $\text{CCl}_4$  previnieron parcial pero significativamente la disminución de glucógeno.

En los grupos control de ATMC y colchicina no hubo diferencias con respecto a las ratas normales.

**TABLA 2**

**CONTENIDO DE GLUCOGENO HEPATICO  
(Esquema de prevención)**

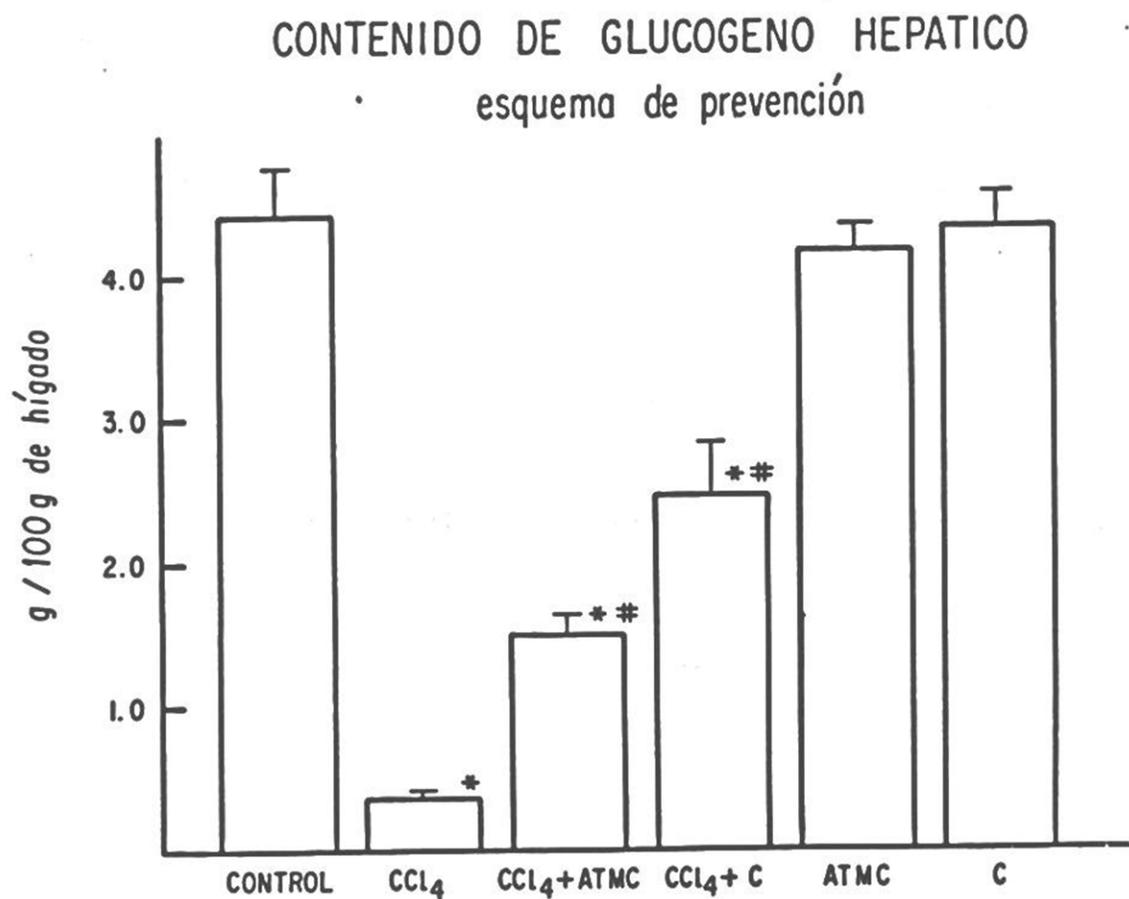
Tratamiento	g glucógeno/100 g hígado
Control	4.45 ± 0.34
$\text{CCl}_4$	0.37 ± 0.04*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	1.52 ± 0.12*#
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	2.48 ± 0.36*#
ATMC	4.20 ± 0.18
Colchicina	4.37 ± 0.25

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por cada grupo.

ATMC= ácido trimetilcolchicínico.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p < 0.05$ )



Gráfica 2. Contenido de glucógeno en el hígado en los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico.

\* diferencia significativa con una  $p < 0.05$  comparado con el grupo control sano

# diferencia significativa con una  $p < 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>

c). Fosfatasa alcalina sérica.

Como se aprecia en la tabla y gráfica 3, la actividad de la fosfatasa alcalina sérica en el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  se incrementó 2 veces con respecto a las ratas normales. Ni la administración simultánea de ATMC o de colchicina con  $\text{CCl}_4$  previnieron el incremento en la actividad de esta enzima en el suero, siendo ésta muy similar a la observada en las ratas cirróticas.

Además en los grupos control de ATMC y de colchicina se observaron incrementos en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica de 48% y 77% respectivamente, sin embargo solamente resultó ser estadísticamente significativo el incremento observado con la colchicina.

**TABLA 3**

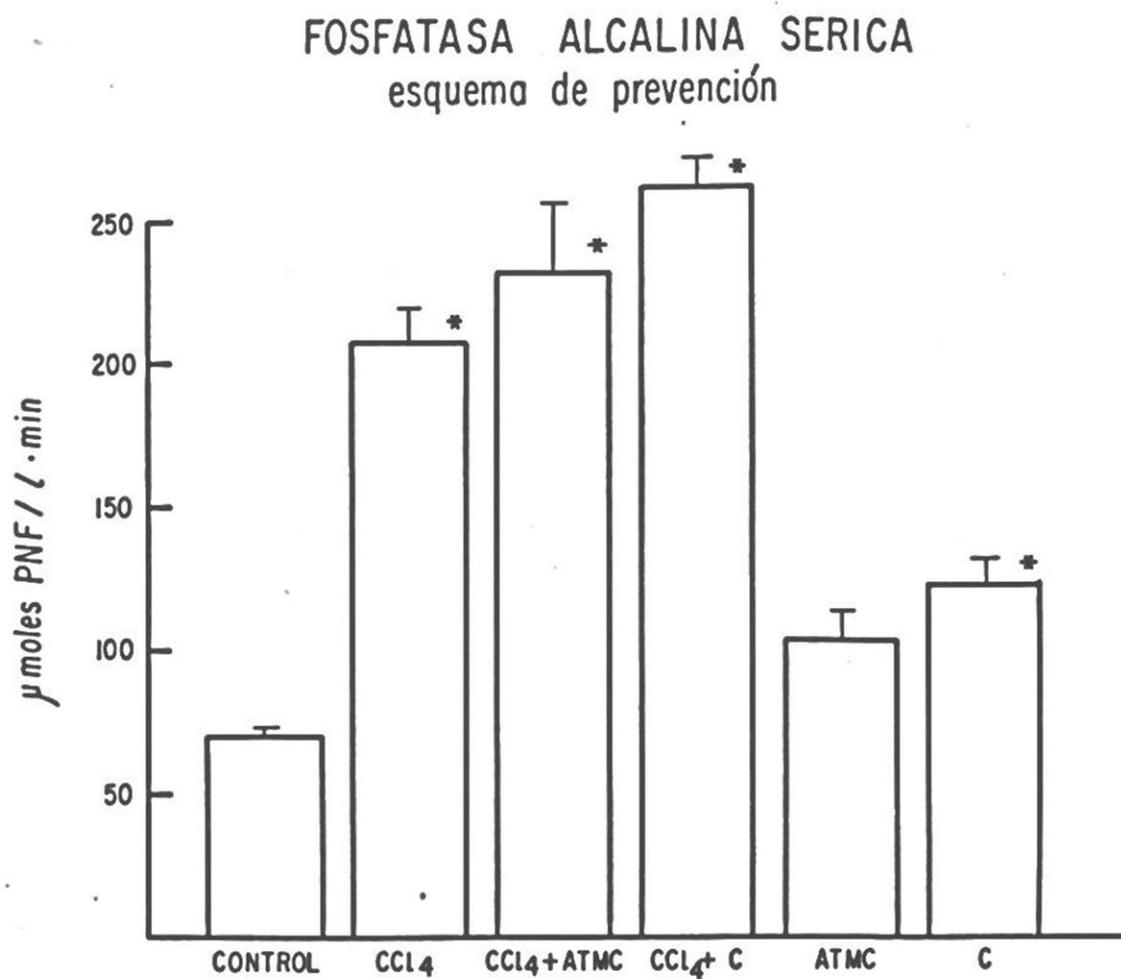
**ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA SERICA  
(Esquema de prevención)**

Tratamiento	$\mu\text{moles de PNF/1 suero min}$
Control	$70.51 \pm 2.14$
$\text{CCl}_4$	$208.80 \pm 10.54^*$
$\text{CCl}_4 + \text{ATMC}$	$233.42 \pm 23.81^*$
$\text{CCl}_4 + \text{Colchicina}$	$263.50 \pm 9.86^*$
ATMC	$104.53 \pm 8.83$
Colchicina	$124.78 \pm 8.13^*$

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 3. Actividad de la fosfatasa alcalina en los sueros de los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano

d).  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa sérica.

En la tabla y en la gráfica 4 se muestran los resultados de la actividad de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa en suero. En las ratas cirróticas hubo un aumento de 1.2 veces con respecto al grupo de ratas normales. Este incremento disminuyó 83% en el grupo tratado simultáneamente con  $\text{CCl}_4$  y ATMC alcanzándose valores similares a los del grupo control. En el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  y colchicina hubo una disminución del 50% comparado con el grupo cirrótico, siendo ésta una prevención parcial pero significativa.

En los grupos controles de ATMC y colchicina no hubo diferencias con respecto a las ratas normales.

TABLA 4

**ACTIVIDAD DE LA  $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA SERICA**  
(Esquema de prevención)

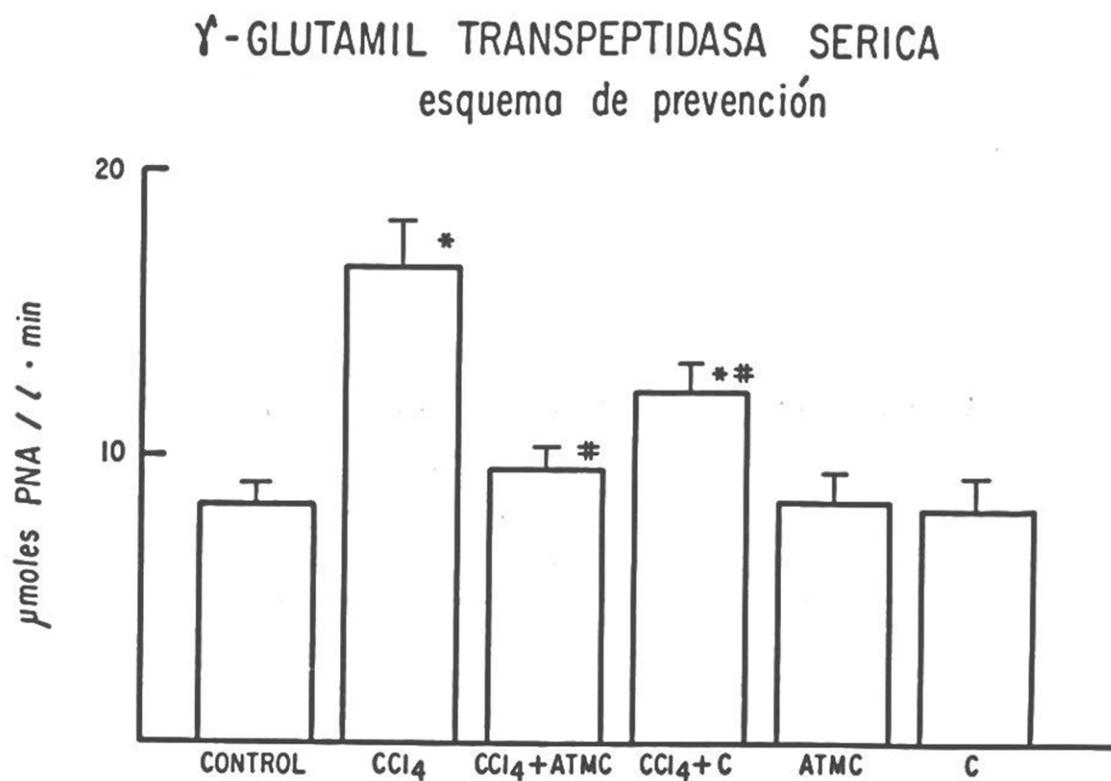
Tratamiento	$\mu\text{moles de PNA/l suero min}$
Control	$8.19 \pm 0.75$
$\text{CCl}_4$	$16.57 \pm 1.60^*$
$\text{CCl}_4 + \text{ATMC}$	$9.58 \pm 0.69^*$
$\text{CCl}_4 + \text{Colchicina}$	$12.30 \pm 1.05^{* \#}$
ATMC	$8.48 \pm 1.01$
Colchicina	$8.18 \pm 0.93$

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 4. Actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa en los sueros de los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

e). Transaminasa glutámico pirúvica.

La actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica, como se aprecia en la tabla y la gráfica 5, se incrementó 1.5 veces con respecto al grupo de ratas normales. Los tratamientos simultáneos con  $\text{CCl}_4$  + ATMC y  $\text{CCl}_4$  + colchicina no modificaron la alteración en este indicador sérico, permaneciendo la actividad de dicha enzima en niveles similares a los observados en las ratas que solamente recibieron  $\text{CCl}_4$ .

Los controles de ATMC y colchicina no mostraron diferencia con respecto a las ratas normales.

**TABLA 5**

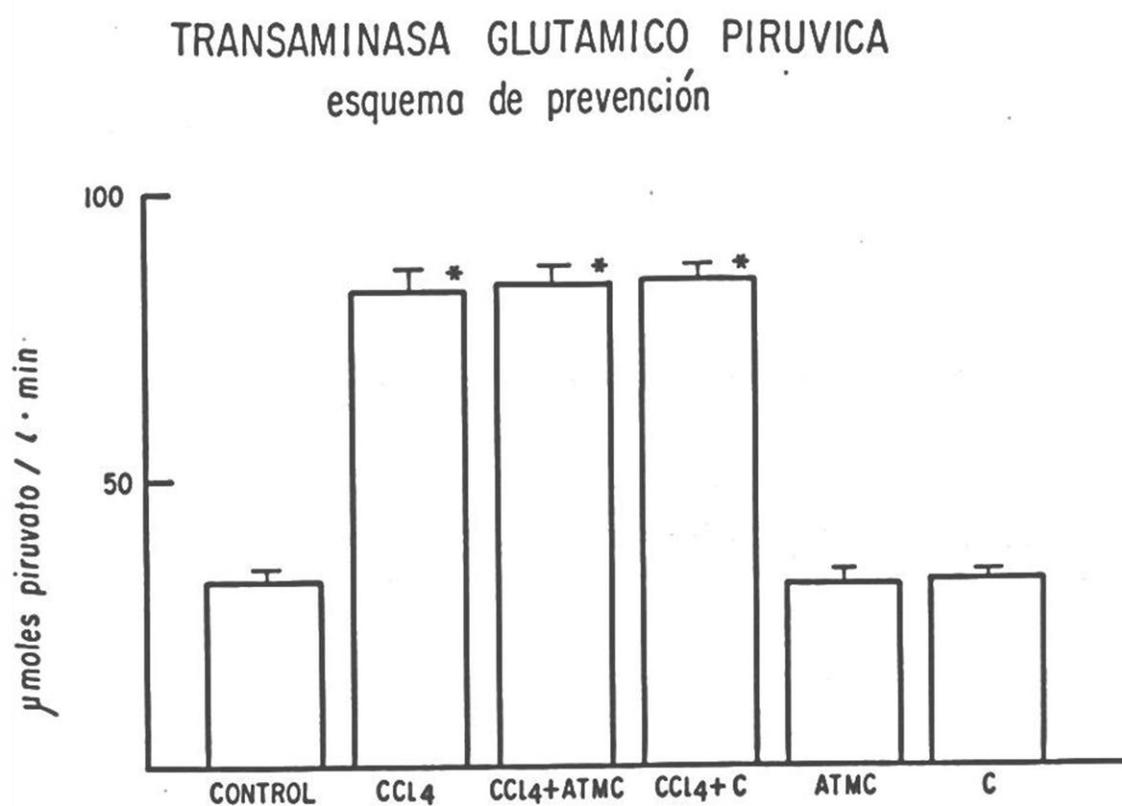
**ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO-PIRUVICA  
(Esquema de prevención)**

<b>Tratamiento</b>	<b><math>\mu\text{moles piruvato/l suero min}</math></b>
Control	32.42 $\pm$ 1.96
$\text{CCl}_4$	80.28 $\pm$ 3.74*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	84.57 $\pm$ 3.34*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	84.81 $\pm$ 2.79*
ATMC	32.21 $\pm$ 1.77
Colchicina	32.52 $\pm$ 1.47

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicinico



Gráfica 5. Actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica en los sueros de las ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p < 0.005$  comparado con el grupo control sano.

f). Fosfatasa alcalina membranal.

La actividad de la fosfatasa alcalina membranal se incrementó 1.3 veces en el grupo de ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  con respecto al grupo control. Los tratamientos con ATMC y colchicina administrados simultáneamente con  $\text{CCl}_4$  disminuyeron significativamente el incremento en la actividad de esta enzima en 61% y 65% respectivamente con respecto al grupo de animales cirróticos. Estos resultados pueden apreciarse en la tabla y la gráfica 6.

En los controles de ATMC y colchicina no se observó diferencia significativa con respecto al grupo de ratas normales.

**TABLA 6**

**ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA MEMBRANAL  
(Esquema de prevención)**

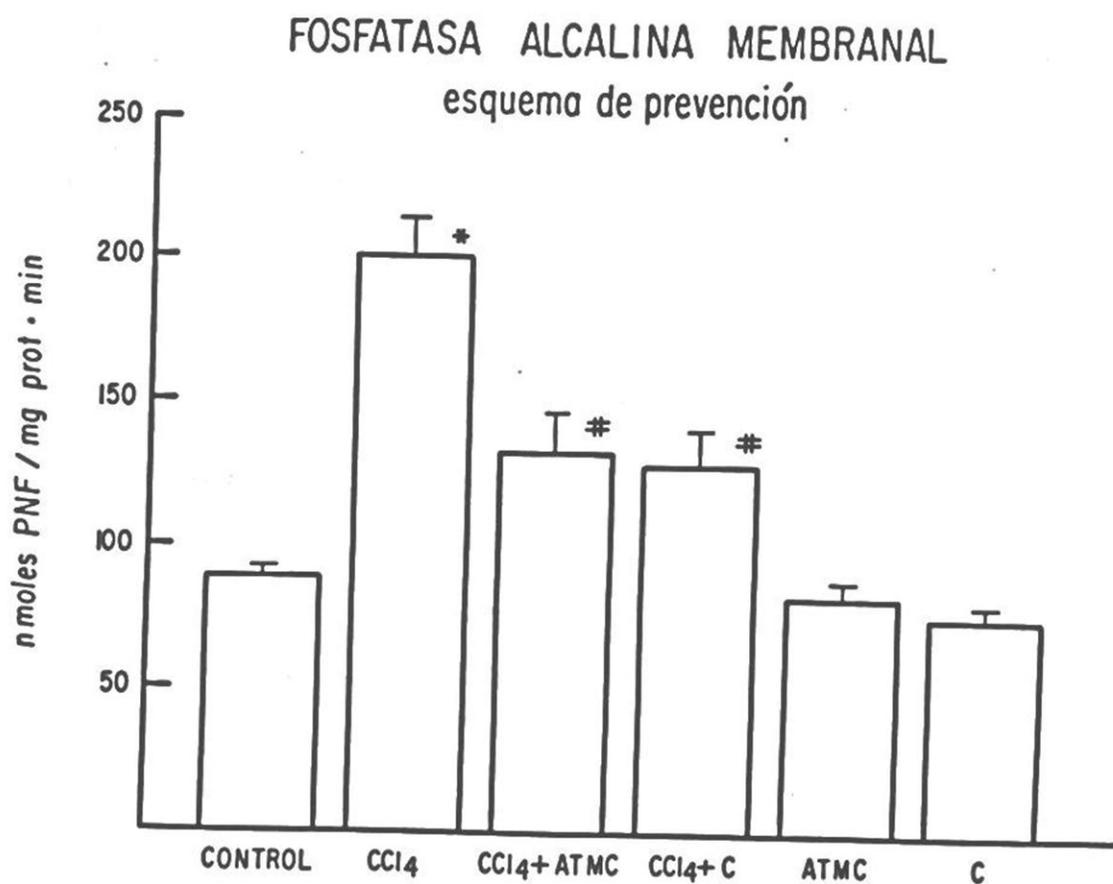
Tratamiento	nmoles PNF/mg prot min
Control	89.20 ± 3.66
$\text{CCl}_4$	201.44 ± 12.91*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	133.27 ± 13.25#
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	128.26 ± 12.44#
ATMC	82.78 ± 4.94
Colchicina	76.75 ± 4.30

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 6. Actividad de la fosfatasa alcalina en las membranas de hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

g).  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa membranal.

En la tabla y la gráfica 7 se muestran los resultados que se obtuvieron para la actividad de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa membranal. En el grupo de ratas cirróticas se observó un incremento de 3.8 veces con respecto al grupo de ratas normales. En los tratamientos con  $\text{CCl}_4$  y ATMC y con  $\text{CCl}_4$  + colchicina el incremento en la actividad de dicha enzima fue de 1.1 y 1.4 veces respectivamente comparados con el control, lo que resultó ser una prevención significativa en la alteración de dicho indicador.

En los grupos control de ATMC y de colchicina no se observaron diferencias con respecto a las ratas normales.

**TABLA 7**

**ACTIVIDAD DE LA  $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPeptIDASA MEMBRANAL**  
(Esquema de prevención)

Tratamiento	nmoles de PNA/mg prot min
Control	12.85 $\pm$ 2.14
$\text{CCl}_4$	61.46 $\pm$ 8.47*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	27.42 $\pm$ 4.30#
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	30.48 $\pm$ 4.18#
ATMC	13.84 $\pm$ 1.75
Colchicina	12.98 $\pm$ 2.02

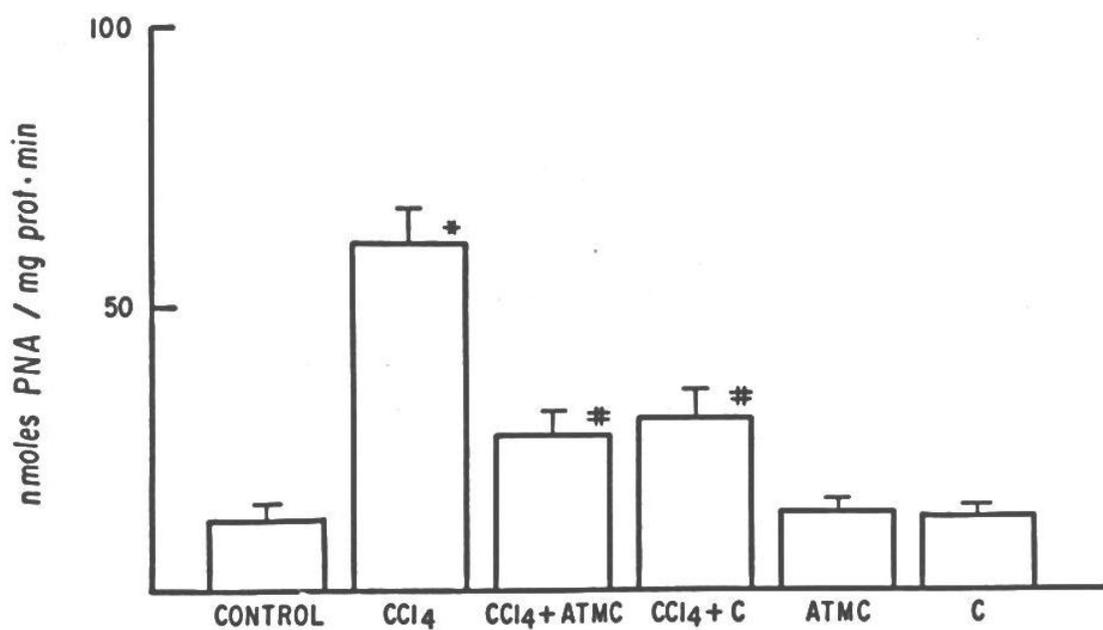
Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales en cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicinico

$\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA MEMBRANAL  
esquema de prevención



Gráfica 7. Actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa en la membrana de hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

h). ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad.

La actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad disminuyó a 33% de su valor normal en las ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$ . En el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  + ATMC hubo una prevención parcial pero significativa, la actividad de la enzima disminuyó a 55% del valor control. En el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  + colchicina la actividad de la enzima fue de 76% comparada con la actividad normal, previniendo significativamente del daño, como se puede apreciar en la tabla y la gráfica 8.

No hubo diferencia de los grupos control de ATMC y de colchicina con respecto a los animales normales.

TABLA 8

**ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE  $\text{Ca}^{2+}$  DE ALTA AFINIDAD**  
(Esquema de prevención)

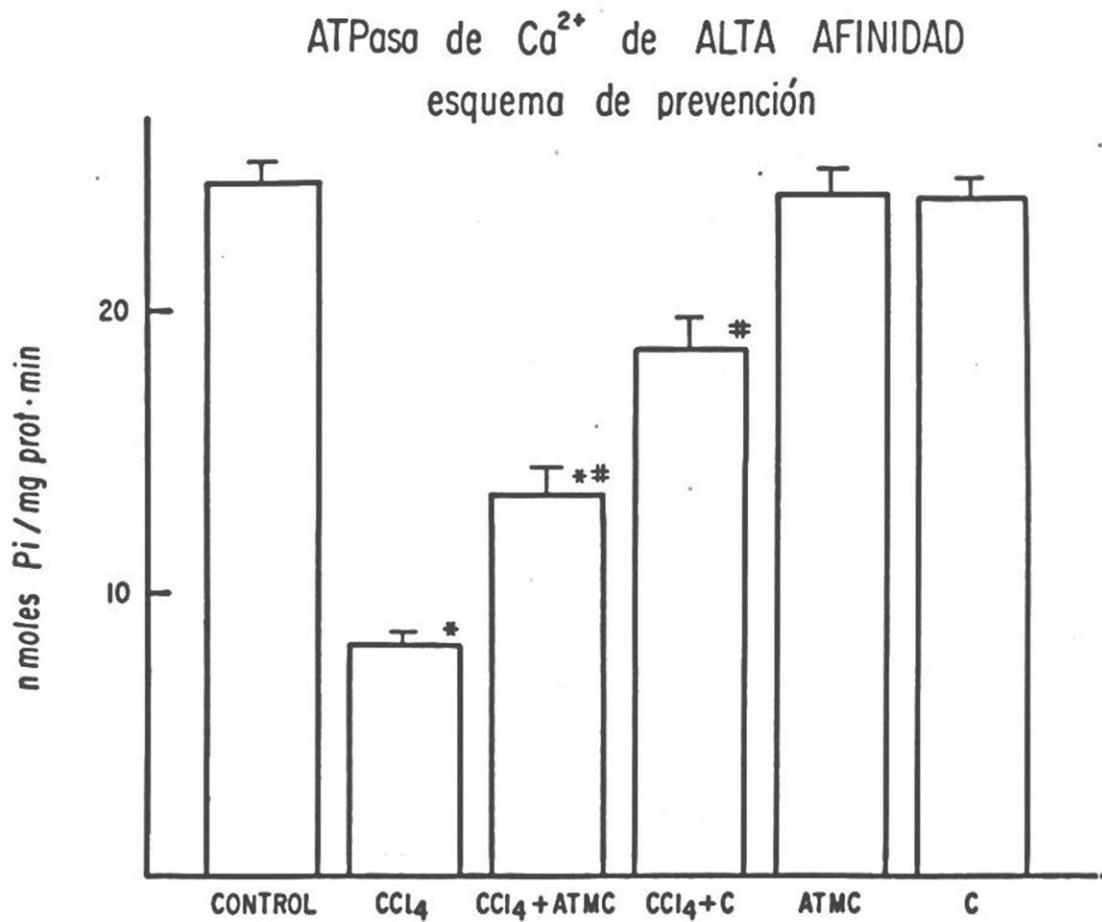
Tratamiento	nmoles Pi/mg prot min
Control	24.70 ± 0.67
$\text{CCl}_4$	8.17 ± 0.45*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	13.53 ± 0.87*#
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	18.42 ± 1.11#
ATMC	24.33 ± 0.92
Colchicina	24.25 ± 0.69

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 8. Actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad en la membrana de hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el esquema de prevención. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p < 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p < 0.05$  comparado con el grupo control  $\text{CCl}_4$ .

## 2. Esquema de Reversión.

### a). Grado de lipoperoxidación.

El tratamiento con  $\text{CCl}_4$  durante 12 semanas elevó el grado de lipoperoxidación 2.9 veces con respecto al grupo control. El grado de lipoperoxidación en homogenado de hígado de ratas cirróticas tratadas con ATMC y con colchicina durante cuatro semanas se incrementaron 2.6 y 2.2 veces respectivamente, no observándose diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico. Los resultados se pueden apreciar en la tabla y la gráfica 9.

En los grupos control de ATMC y colchicina no se observó diferencia con respecto a los animales normales.

**TABLA 9**

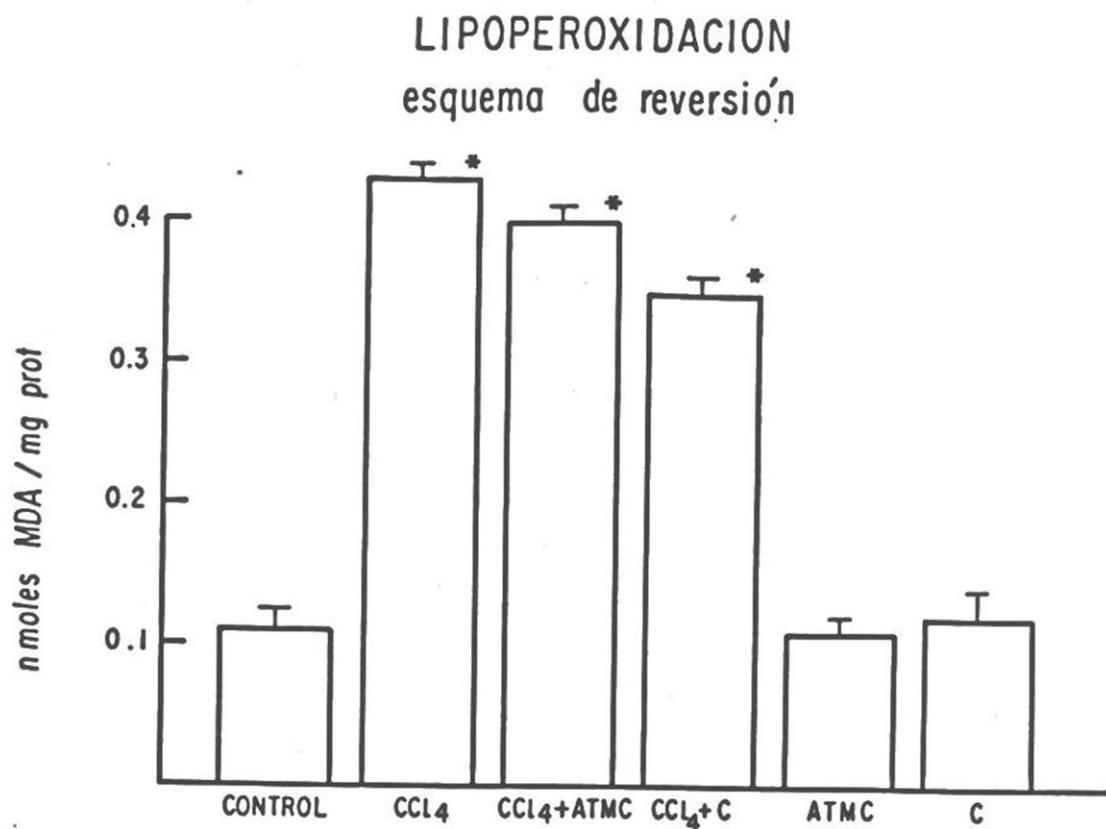
**GRADO DE LIPOPEROXIDACION  
(Esquema de reversión)**

Tratamiento	nmoles MDA/mg prot
Control	0.11 ± 0.006
$\text{CCl}_4$	0.43 ± 0.041*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	0.40 ± 0.33*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	0.35 ± 0.036*
ATMC	0.11 ± 0.004
Colchicina	0.12 ± 0.008

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.005$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicinico



Gráfica 9. Grado de lipoperoxidación en homogenado de hígado en los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

b). Contenido de glucógeno hepático.

En el grupo tratado con  $\text{CCl}_4$  para este esquema de tratamiento, el contenido de glucógeno hepático disminuyó 95% con respecto al grupo normal, lo que se aprecia en la tabla y la gráfica 10. En el grupo cirrótico tratado con ATMC la disminución fue del 77% pero no resultó significativamente diferente del cirrótico. En el caso del tratamiento con colchicina el descenso fue de 70%, lográndose una reversión parcial pero significativa.

No hubo diferencia entre las ratas normales y los grupos control ATMC y colchicina.

**TABLA 10**

**CONTENIDO DE GLUCOGENO HEPATICO  
(Esquema de reversión)**

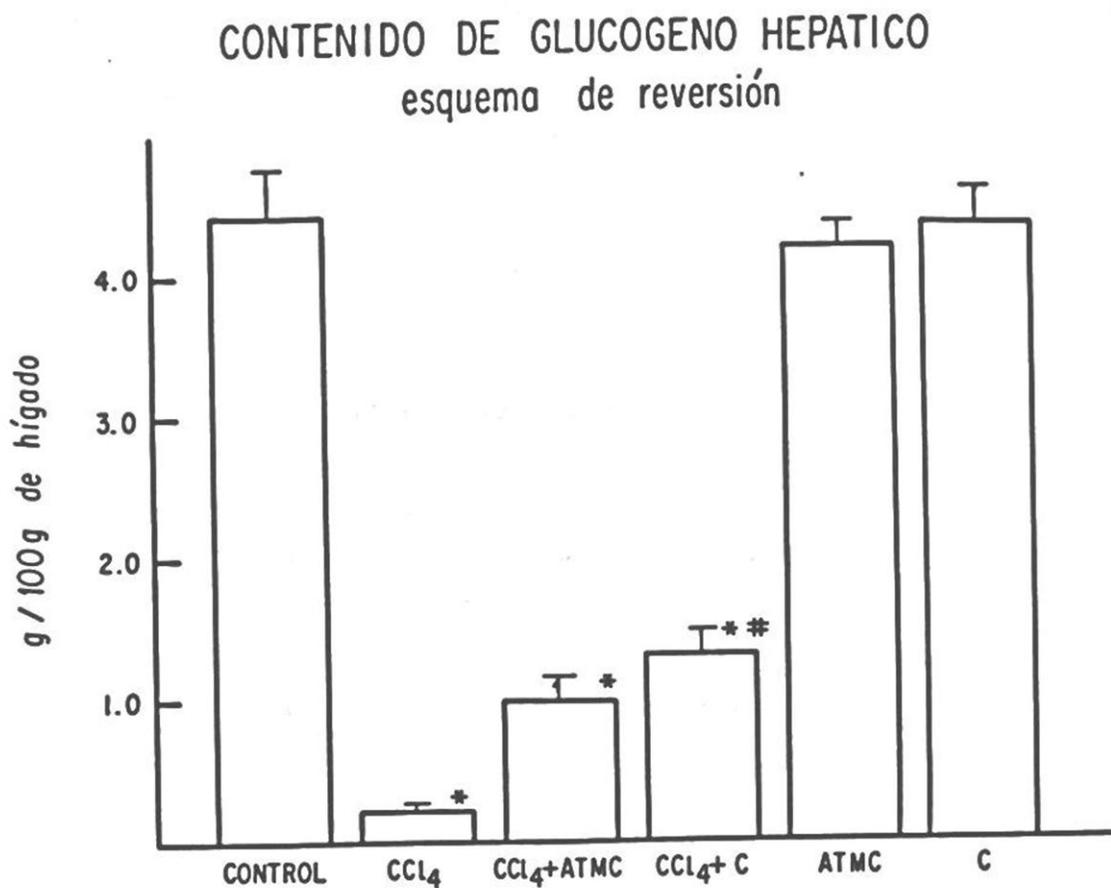
Tratamiento	g glucógeno/100 g hígado
Control	4.45 ± 0.34
$\text{CCl}_4$	0.24 ± 0.036*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	1.02 ± 0.16*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	1.32 ± 0.16*#
ATMC	4.20 ± 0.18
Colchicina	4.37 ± 0.25

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 10. Contenido de glucógeno hepático en los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

## c). Fosfatasa alcalina sérica.

En la gráfica y la tabla 11 se pueden apreciar los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica en los diferentes grupos estudiados. En el grupo cirrótico dicha actividad se incrementó 2.3 veces con respecto al grupo de ratas normales. Los tratamientos de ratas cirróticas con ATMC y con colchicina no revirtieron la alteración observada en este indicador, permaneciendo en niveles similares a los de los animales administrados con  $\text{CCl}_4$ .

TABLA 11

**ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA SERICA**  
(Esquema de reversión)

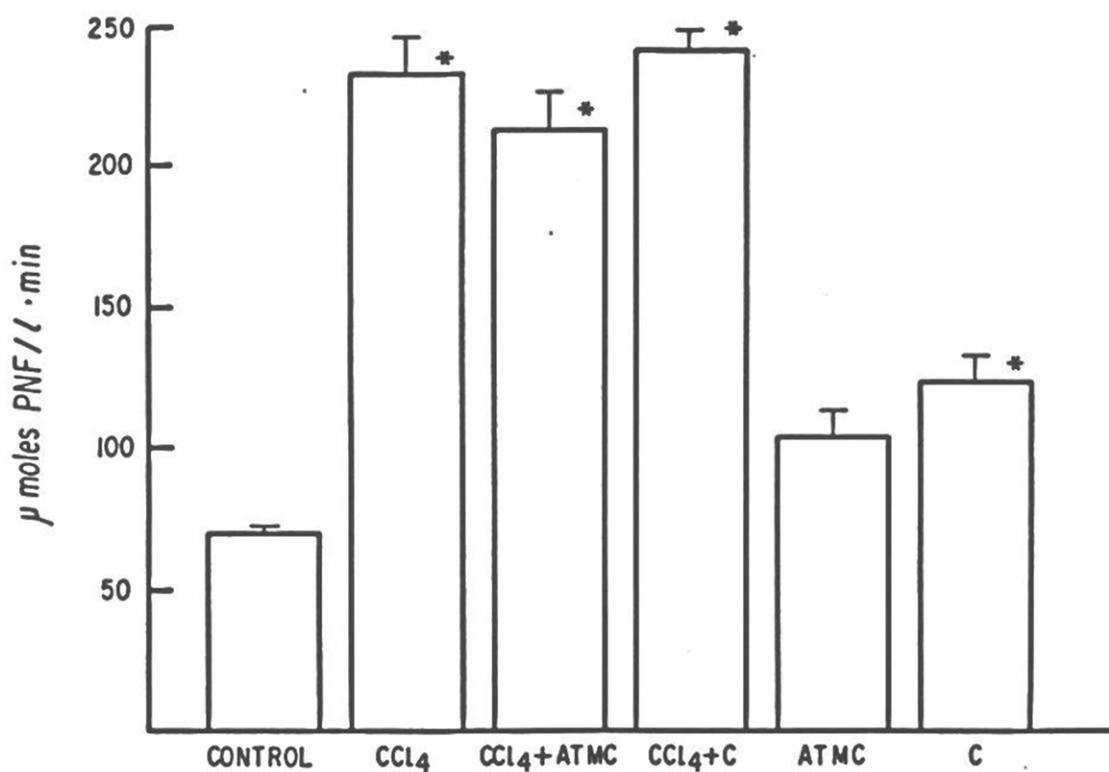
Tratamiento	$\mu\text{moles de PNF/l suero min}$
Control	70.51 $\pm$ 2.14
$\text{CCl}_4$	233.45 $\pm$ 13.16*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	213.91 $\pm$ 13.13*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	242.09 $\pm$ 7.46*
ATMC	104.53 $\pm$ 8.83
Colchicina	124.78 $\pm$ 8.13

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico

### FOSFATASA ALCALINA SERICA esquema de reversión



Gráfica 11. Actividad de la fosfatasa alcalina en el suero de las ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

d).  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa sérica.

Como se puede observar, en la gráfica y la tabla 12 la actividad de esta enzima en suero incrementa en los animales cirróticos con respecto a los normales, alcanzando un valor 1.4 veces mayor. El tratamiento del grupo cirrótico con ATMC disminuyó 63% el valor del grupo cirrótico, siendo ésta una reversión significativa. En el grupo cirrótico tratado con colchicina la actividad disminuyó en 30%, sin embargo esta efecto no fue estadísticamente significativo.

TABLA 12

**ACTIVIDAD DE LA  $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPeptIDASA SERICA  
(Esquema de reversión)**

Tratamiento	$\mu$ moles de PNA/l suero min
Control	8.19 $\pm$ 0.75
CCl <sub>4</sub>	19.88 $\pm$ 1.51*
CCl <sub>4</sub> + ATMC	12.39 $\pm$ 1.33#
CCl <sub>4</sub> + Colchicina	16.34 $\pm$ 1.12*
ATMC	8.48 $\pm$ 1.01
Colchicina	8.18 $\pm$ 0.93

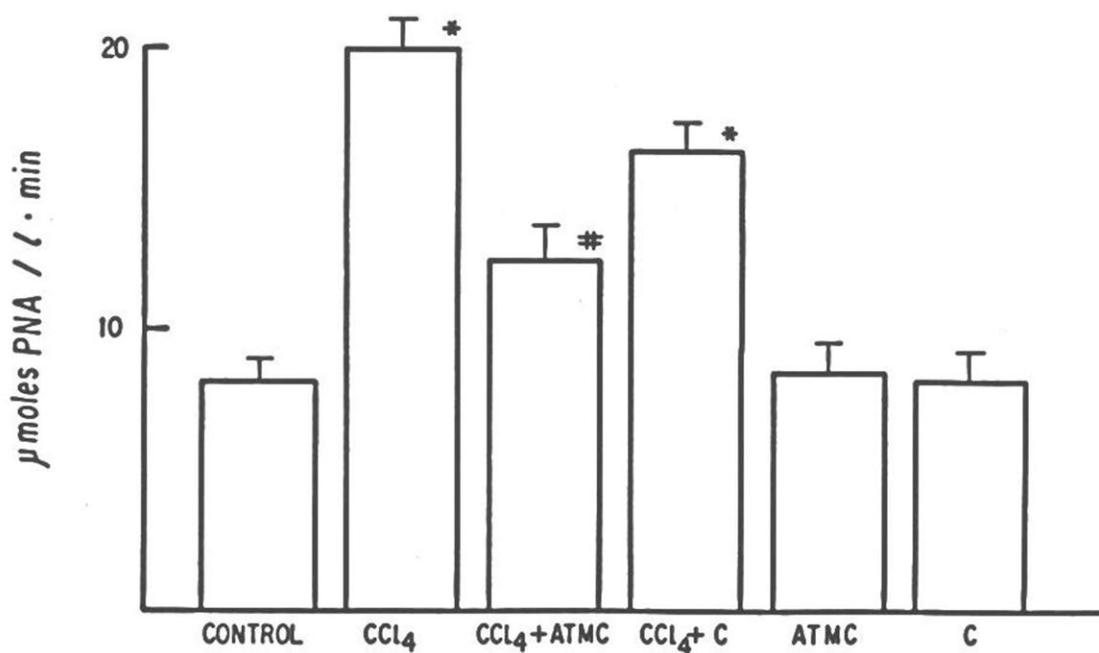
Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico

### $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA SERICA esquema de reversión



Gráfica 12. Actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa en el suero de los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

## e). Transaminasa glutámico-pirúvica.

En la tabla y la gráfica 13 se presentan los resultados de la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica. En el grupo de animales cirróticos se presentó un incremento en la actividad de la enzima de 1.6 veces con respecto al grupo control. No hubo alguna mejoría en las ratas cirróticas tratadas con ATMC o con colchicina, permaneciendo la actividad de la enzima en niveles tan altos como los de las ratas cirróticas.

TABLA 13

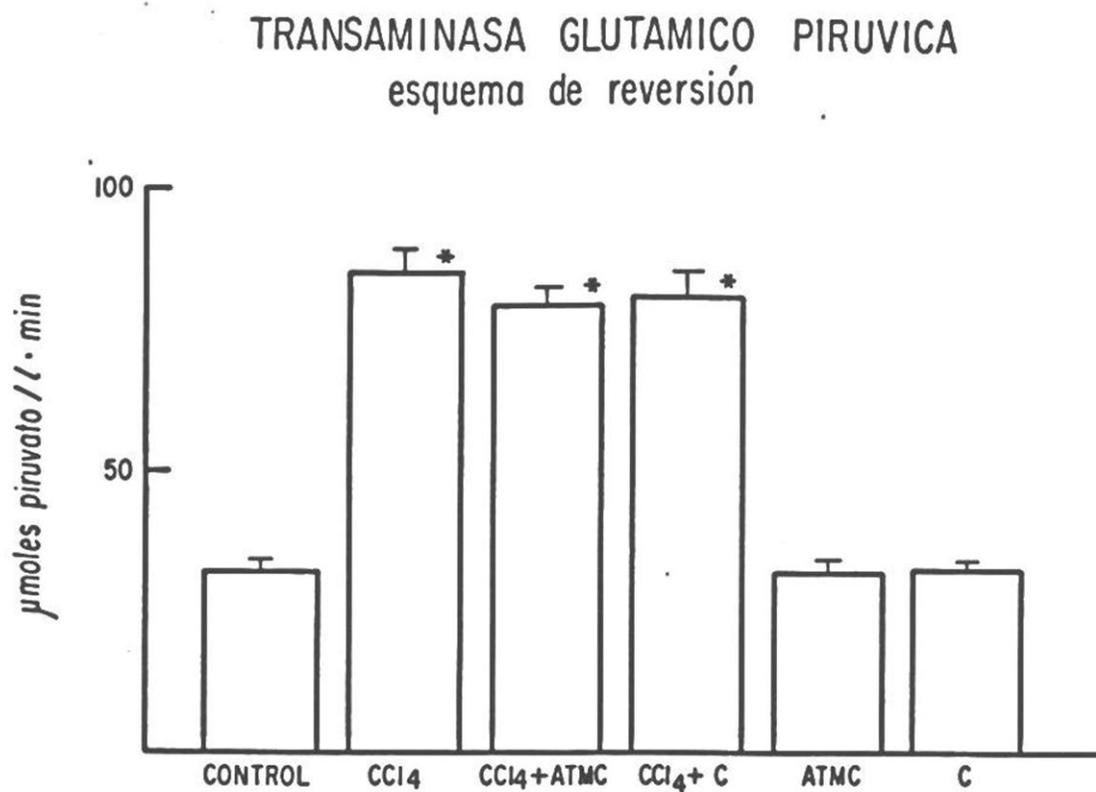
**ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA**  
(Esquema de reversión)

Tratamiento	$\mu\text{moles piruvato/l suero min}$
Control	$32.42 \pm 1.96$
$\text{CCl}_4$	$85.35 \pm 4.13^*$
$\text{CCl}_4 + \text{ATMC}$	$79.49 \pm 2.88^*$
$\text{CCl}_4 + \text{Colchicina}$	$81.03 \pm 3.84^*$
ATMC	$32.21 \pm 1.77$
Colchicina	$32.52 \pm 1.47$

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 13. Actividad de la transaminasa glutámico pirúvica en los sueros de los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

## f). Fosfatasa alcalina membranal.

En la tabla y la gráfica 14 se muestran los resultados que se obtuvieron para la actividad de la fosfatasa alcalina membranal. En las ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  la actividad de la enzima aumentó 1.3 veces comparada con el control. La administración de ATMC a ratas cirróticas produjo un descenso del 57% en la actividad de dicha enzima con respecto a las ratas cirróticas lo que resultó ser una reversión parcial pero significativa. En las ratas cirróticas administradas con colchicina se observó una disminución significativa en la actividad de la enzima de 66% comparada con el grupo cirrótico.

TABLA 14

**ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA MEMBRANAL**  
(Esquema de reversión)

Tratamiento	nmoles de PNF/mg prot min
Control	89.20 ± 3.66
$\text{CCl}_4$	209.59 ± 14.13*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	141.08 ± 7.97#
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	130.15 ± 10.67#
ATMC	82.78 ± 4.94
Colchicina	76.75 ± 4.29

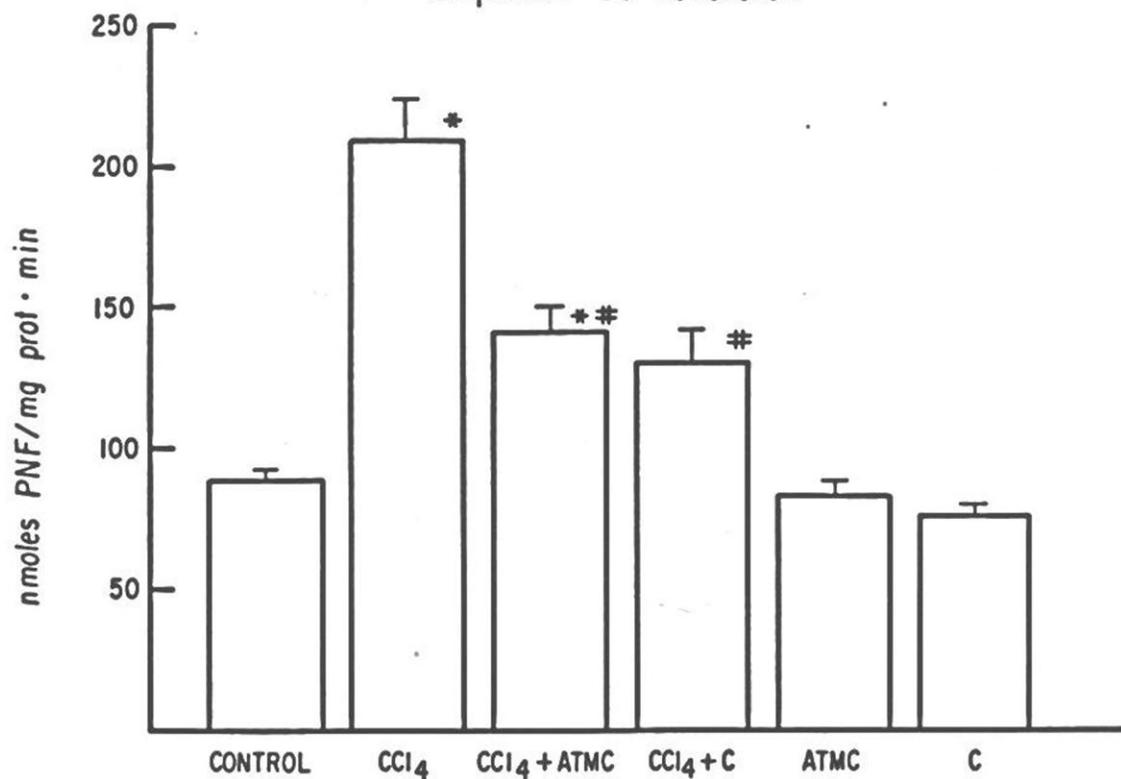
Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico

### FOSFATASA ALCALINA MEMBRANAL esquema de reversión



Gráfica 14. Actividad de la fosfatasa alcalina en la membrana de los hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el tratamiento de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

g).  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa membranal.

La actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa se incrementó 4.4 veces en el grupo cirrótico comparándola con el control, como se puede apreciar en la tabla y la gráfica 15. En los grupos de animales cirróticos tratados con ATMC y colchicina dicha actividad disminuyó en 66% y 63% respectivamente, comparándolos con el grupo cirrótico. Ambas sustancias revirtieron significativamente la actividad de esta enzima.

**TABLA 15**

**ACTIVIDAD DE LA  $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA MEMBRANAL  
(Esquema de reversión)**

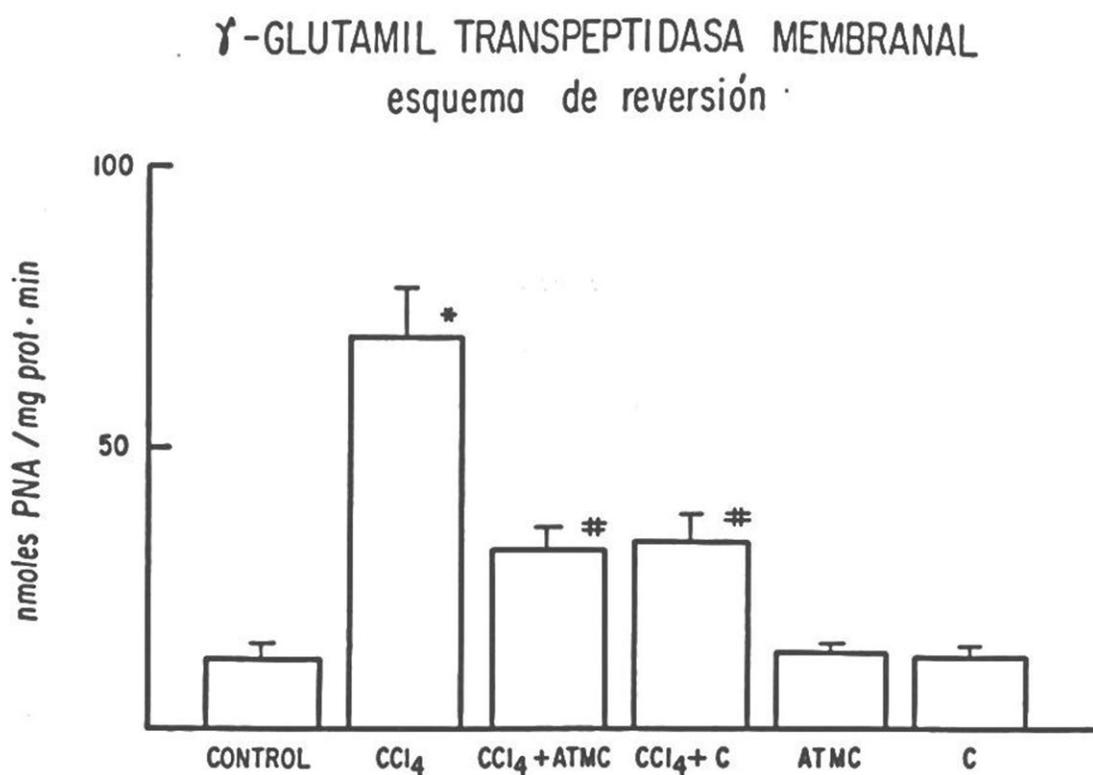
<b>Tratamiento</b>	<b>nmoles de PNA/mg prot min</b>
Control	12.85 $\pm$ 2.14
CCl <sub>4</sub>	69.56 $\pm$ 9.23*
CCl <sub>4</sub> + ATMC	32.20 $\pm$ 3.82#
CCl <sub>4</sub> + Colchicina	33.64 $\pm$ 4.52#
ATMC	13.84 $\pm$ 1.75
Colchicina	12.98 $\pm$ 2.02

Los valores representan la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales en cada grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p \leq 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 15. Actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa en la membrana de hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control CCl<sub>4</sub>.

h). ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad.

En la tabla y la gráfica 16 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el grupo cirrótico dicha actividad disminuye al 29% de la actividad normal. El ATMC administrado a ratas cirróticas disminuye dicha actividad a 41% de la actividad observada en las ratas normales, sin embargo dicho efecto no fue significativo. En las ratas cirróticas tratadas con colchicina la actividad de la enzima se vió disminuida a 64%, siendo ésta una reversión parcial pero significativa.

**TABLA 16**

**ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE  $\text{Ca}^{2+}$  DE ALTA AFINIDAD  
(Esquema de reversión)**

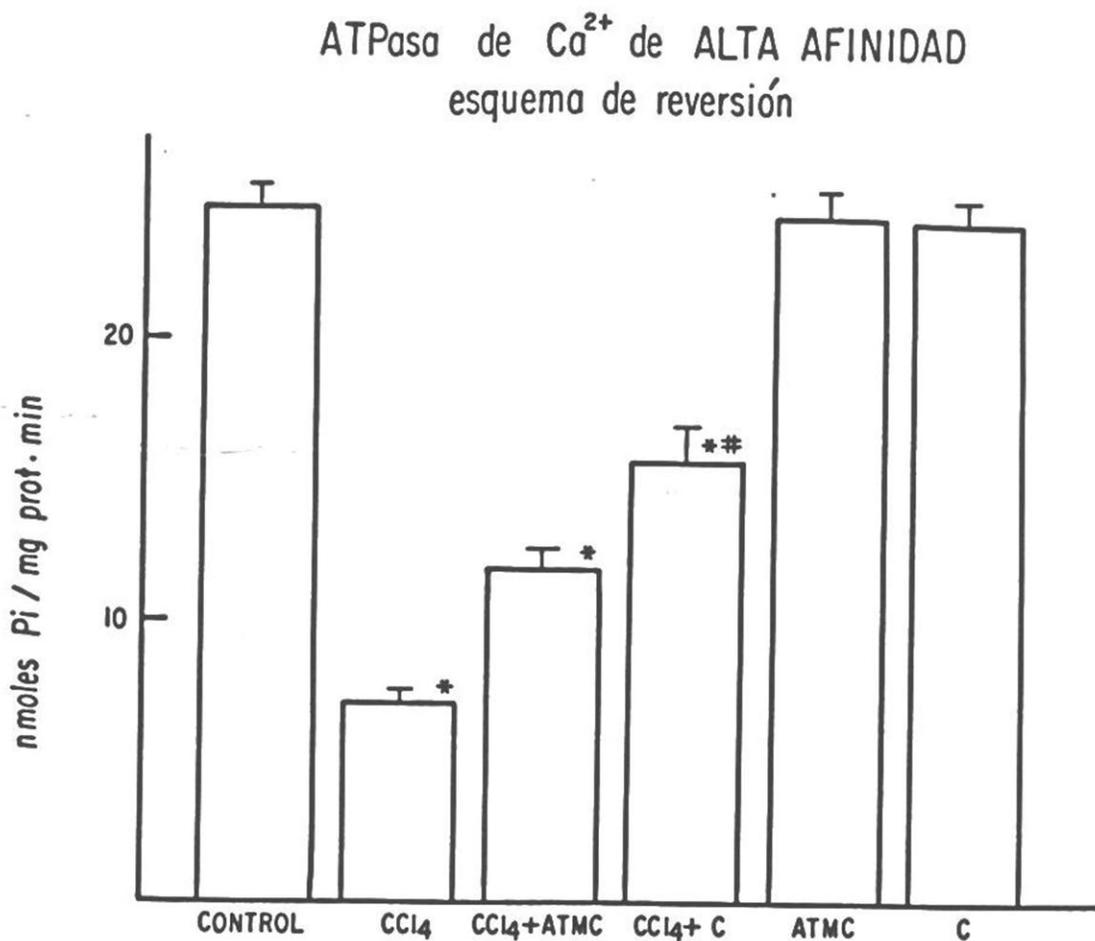
<b>Tratamiento</b>	<b>nmoles Pi/mg prot min</b>
Control	24.70 ± 0.67
$\text{CCl}_4$	7.11 ± 0.36*
$\text{CCl}_4$ + ATMC	11.86 ± 0.82*
$\text{CCl}_4$ + Colchicina	15.72 ± 1.22*#
ATMC	24.33 ± 0.92
Colchicina	24.25 ± 0.69

Los valores representan la media ± EEM de al menos seis animales por grupo.

\* diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ )

# diferencia significativa con respecto al grupo cirrótico ( $p < 0.05$ )

ATMC= ácido trimetilcolchicínico



Gráfica 16. Actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad en la membrana de los hepatocitos de los grupos de ratas incluidos en el esquema de reversión. Los resultados se expresan como la media de al menos 6 ratas  $\pm$  EEM.

C= colchicina, ATMC= ácido trimetilcolchicínico

\* diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control sano.

# diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  comparado con el grupo control  $\text{CCl}_4$ .

## V. DISCUSION

Los resultados muestran que tanto el ácido trimetilcolchicínico como la colchicina pueden prevenir y revertir, parcialmente, algunas alteraciones producidas por la administración crónica de  $\text{CCl}_4$ .

Normalmente se mantiene un gradiente de concentración de calcio a través de la membrana de los hepatocitos (Carafoli, 1987). Sin embargo, la capacidad de estas células para mantener concentraciones intracelulares bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  se pierde cuando se exponen a  $\text{CCl}_4$  (Farber, 1982; Shanne y Moore, 1986). De hecho, uno de los sucesos que eventualmente conduce a la muerte celular es la incapacidad del hepatocito de sacar  $\text{Ca}^{2+}$  del interior celular o del citoplasma (Casini y Farber, 1981; Chien et al., 1977; El-Mofty et al., 1975).

Se han descrito varios mecanismos que contribuyen a la compartimentalización de calcio en los hepatocitos y que mantienen un gradiente de concentración a través de la membrana. Estos son los mecanismos de transporte activo presentes en la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria que han sido relacionados con diferentes ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad que se midió en este estudio ha sido calificada como la bomba de calcio de la membrana plasmática (Martínez-Calva et al., 1984) responsable de la regulación final del contenido total de calcio en el hepatocito (Penniston, 1982).

Penniston (1982) ha señalado que la mitocondria y el retículo endoplásmico pueden ser los responsables de determinar el contenido de calcio intracelular a corto plazo. Sin embargo, estos organelos no pueden acumular calcio indefinidamente; de tal forma, que en última instancia, la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  membranal es la responsable de mantener bajos los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula.

Por lo anterior, es importante mencionar que en este estudio, la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad disminuye alrededor de 3 veces debido a la intoxicación con  $\text{CCl}_4$  y que los tratamientos con colchicina y ácido trimetilcolchicínico previenen completamente y revierten parcialmente este efecto.

La fosfatasa alcalina es una ectoenzima de la membrana plasmática de los hepatocitos cuya actividad se ve incrementada debido al daño en la membrana de la célula hepática (Kaplan, 1986). Su presencia se ha demostrado en mayor proporción en las células en borde de cepillo de los canalículos biliares, la superficie sinusoidal de los hepatocitos y el endotelio de las venas portal y periportal (Broe et al. 1985; Kaplan y Righetti, 1969 y 1978; Kaplan et al., 1983) de donde es susceptible a ser liberada hacia el plasma en procesos obstructivos, por lo que se considera un indicador de colestasis (Kaplan et al., 1986).

La  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa es una enzima embebida en la membrana plasmática del hepatocito, principalmente en el dominio canalicular, cuya liberación al suero indica daño celular y por consiguiente daño hepático. La elevación en la actividad de esta enzima aparece en pacientes con obstrucción biliar de los grandes conductos, colestasis intrahepática y enfermedad infiltrativa del hígado (Huseby y Torstein, 1978). Es importante hacer notar que la actividad de la  $\gamma$ -GTP es considerada como uno de los mejores indicadores de daño hepático (Bulle et al.; 1990 Plaa y Hewitt, 1982;) y que el tratamiento con ácido trimetilcolchicínico previene y revierte completamente a valores normales la actividad sérica y de manera significativa, la actividad membranal de dicha enzima. Esto muestra un importante efecto benéfico del ácido trimetilcolchicínico en el daño hepático inducido por la administración crónica de  $\text{CCl}_4$ .

El malondialdehído es un producto de la peroxidación lipídica. Un incremento en los niveles

de MDA hepático indica un incremento en la lipoperoxidación, un mecanismo de daño hepático muy bien conocido (Trible et al., 1987). Sin embargo, ni el ácido trimetilcolchicínico ni la colchicina pudieron prevenir el incremento en los niveles de MDA, mostrando que estos compuestos no actúan inhibiendo el proceso de lipoperoxidación, por lo que se deben considerar otros efectos citoprotectores (Mourelle y Meza, 1989; Muriel et al., 1993; Muriel, 1994; Muriel et al., 1995; Castro y Muriel, 1996) o antifibrogénicos. De hecho, en nuestro laboratorio hemos observado que el ácido trimetilcolchicínico induce la reversión de la fibrosis por colestasis probablemente por un mecanismo relacionado con la activación de plasminógeno (Muriel et al., 1995).

El glucógeno es el principal recurso de energía en el hígado; sin él el hígado no es capaz de realizar funciones hepáticas acopladas a energía. Tanto el ácido trimetilcolchicínico como la colchicina mostraron efectos benéficos en el hígado preservando y restaurando parcialmente el contenido de glucógeno hepático.

La colchicina, además de otros efectos, inhibe el ensamblaje de microtúbulos (Olmstead y Borisy, 1973), interfiere con el movimiento transcelular de colágeno (Diegellman y Peterkofsky, 1972; Ehrlich y Bornstein, 1972, Ehrlich et al., 1974) e incrementa la producción de colagenasa *in vitro* (Harris y Krane, 1971; Gordon y Werb, 1976). Además, la colchicina posee importantes efectos benéficos como “estabilizador” de la membrana plasmática (Yahuaca et al., 1985) y previene el daño hepático inducido por acetaminofén en la rata (Muriel et al., 1993). Desafortunadamente, los efectos colaterales de la colchicina (Hoang et al., 1982; Merchant y Singh, 1973; Stein y Stein, 1973; Wallace et al., 1970) no permiten que ésta sea administrada a dosis más altas de 10 µg/día en la rata o 1 mg/día en humanos, lo que limita su aplicación clínica. Se ha reportado que el ácido trimetilcolchicínico, un colchicinoide que no se une a la tubulina (Zweig y Chignell, 1973), es menos

tóxico que la colchicina (Muriel, 1994 y 1996). De aquí se extrae la posibilidad de usar dosis mayores de ácido trimetilcolchicínico que permitan obtener un mejor efecto farmacológico sin los efectos colaterales comunes de la colchicina, los que son atribuidos a su capacidad de inhibir el ensamblaje de microtúbulos (Bodenheimer et al., 1988; Kaplan, 1989; Kershenobich et al., 1979; Warnes et al., 1987).

## CONCLUSIONES

1. Tanto el ATMC como la colchicina tuvieron un efecto benéfico parcial pero significativo para prevenir y revertir las alteraciones observadas en la intoxicación crónica con  $\text{CCl}_4$  en la rata a la dosis de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal.
2. No se observaron efectos adversos para ninguna de las dos sustancias a la dosis utilizada.
3. Ambas sustancias tuvieron un efecto similar, más cabe señalar que, según reportes de la literatura, el ATMC es mucho menos tóxico que la colchicina, por lo que se podría probar a dosis más altas y tal vez más efectivas que la dosis utilizada en este trabajo.
4. Debido a que la colchicina, cuyo efecto antimicrotubular es característico, y el ATMC, sin efecto antimicrotubular, tienen efectos similares, puede descartarse que el principal mecanismo de acción de la colchicina como agente hepatoprotector sea a través de la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos, por lo que es necesario realizar más estudios para esclarecer su mecanismo de acción.
5. Es importante destacar el efecto de estas sustancias sobre la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad, ya que probablemente su efecto benéfico se deba, de manera muy importante, a su capacidad para mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, indispensable para la sobrevivencia de la célula frente a un estímulo dañino.
6. A pesar de que se requieren más estudios toxicológicos y farmacológicos, hasta el momento podría considerarse al ATMC como un buen candidato para el tratamiento de la cirrosis hepática en los humanos.

**BIBLIOGRAFIA**

- Ames, B.N. 1981. Detection of phosphatase esters on chromatograms: A improved reagent. *Anal. Biochem.* 117:81-83.
- Alfin-Slater, R.B. y Morris, R.J. 1963. Vitamin E and lipid metabolism. *Adv. Lipid Res.* 1:183-210.
- Artizzu, M., Baccino, F.M. y Dianzani, M.U. 1963. The action of carbon tetrachloride on mitochondria *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 78:1-11.
- Artizzu, M., Pani, P., Satta, G. y Dianzani, M.V. 1964. The action of carbon tetrachloride on lysosomes *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 82:454-562.
- Ariosto, F., Riggio, O., Cantafora, A. Colucci, S., Gaudio, E., Mechelli, C., Merli, M., Seri, S. y Capocaccia, C. 1989. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. *Eur. Surg. Res.* 21:280-286.
- Asada, M. 1958. Tansaminase activity in liver damage. I. Study on experimental liver damage. *Med. J. Osaka U.* 9:45-51.
- Back, A. y Walaszek, E.J. 1952. Studies with radioactive colchicine I. The influence of tumors on the tissue distribution of radioactive colchicine in mice. *Cancer Research* 13:552-555.
- Bajwa, R.S. y Fujimoto, J.M. 1983. Effect of colchicine and S,S,S-Tributyl phosphorotrithioate (DEF) on the biliary excretion of sucrose, manitol and horseradish peroxidase in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 32:85-90.
- Batsakis, J.G., Kremers, B.J., Thiessen, M.M. y Shiling, J.M. 1968. Biliary tract enzymology. A clinical comparison of serun alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase and 5'-nucleotidase. *Am. J. Clin. Pathol.* 50:485-490.
- Becker, F. 1975. Cirrhosis of the liver. Normal and Abnormal Functions. Part B. Frederick Becker

(ed.), N.Y. p. 711-723.

- Berger, L. y Rudolph, G.N. 1963. Alkaline and acid phosphatase. Standard Methods of Clinical Chemistry. Vol. 5. Ed. Meites. New York, Academic Press.
- Bernheim, F. 1963. Biochemical implications of pro-oxidants and oxidants. Radiat. Res. (Suppl. 3) p. 17
- Blouin, A., Bolender, R.P. y Weibel, E.R. 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchima. J. Cell Biol. 72:441-455.
- Bodenheimer, H., Schaffner, F. y Pezzullo, J. 1988 . Evaluation of colchicine therapy in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology, 95:124-129.
- Borisy, G.G. y Taylor, E.W. 1967. The mechanism of action of colchicine: Binding of colchicine-<sup>3</sup>H to cellular protein. J. Cell. Biol. 34:525-533.
- Boyer, J.L. 1971. Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. Am. J. Physiol. 221:1156-1163.
- Boyland, E. y Mawson, E.H. 1938. The conversion of colchicine into colchicine. Biochem. J. 32:1204-1206.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Brauer, R.W. y Root, M.A. 1946. The effect of CCl<sub>4</sub> induced liver injury upon the acetylcholine hydrolyzing activity of blood plasma of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 88:109-118.
- Broe, M. E. , Roels, F., Nouwen, E.J., Claeys, L. y Wiem, R.J. 1985. Liver plasma membrane: The source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. Hepatology 5:118-128.

- Brossi, A., Yeh. H.J.C., Chrzanowska, M., Wolff, J., Hamel, E., Lin, C.M., Quin, F., Suffness, M. y Silverton, J. 1988. Colchicine and its analoges: recent findings. *Med. Res. Rev.* 8(1):77-94.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. En: *Methods in Enzimology*. Eleisher, S., Paker, L. (eds). Academic Press, New York. Vol. 53: 302-310.
- Bulle, F., Mavier, P., Zafrani, E.S., Preaux, A.M., Lescs, M.C., Siegrist, S., Dhumeaux, D. y Guellaën, G. 1990. Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat. A histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology* 11(4):545-550.
- Bushmann, R.J. 1983. Morphometry of the small intestinal enterocytes on the fasted rat and the effects of colchicine. *Cell. Tiss. Res.* 231:289-299.
- Butler, T.C. 1961. Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissue homogenates and tissue constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 134:311-319.
- Calbert, D.N. y Brody, T.M. 1960. Role of the sympathetic nervous system in CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity. *Amer. J. Physiol.* 198:669-676.
- Caner, J.E.Z. 1965. Colchicine inhibition of chemotaxis. *Arth. Rheum.* 8:757-764.
- Castro, V. y Muriel, P. 1996. Comparative study of colchicine and trimethylcolchicinic acid on prolonged bile duct obstruction in the rat. *J. Hepatol.* In press.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433.
- Carr, A.A. 1975. Colchicine toxicity. *Arch. Intern. Med.* 115:29-33.
- Casini, A.F. y Farber, J.L. 1981. Dependence of the tetrachloride-induced death of cultured hepatocytes on the extracellular calcium concentration. *Am. J. Pathol.* 105:132-148.

- Chien, K.R., Abrams, J.A., Pfau, R.G. y Farber, J.L. 1977. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am. J. Pathol.* 88:539-558.
- Cleveland, P.D. y Smuckler, E.A. 1965. Effect of CCl<sub>4</sub>, dimethyl-nitrosamine and thioacetamide on hepatic DPNH and TPNH cytochrome c reductase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120:808-810.
- Dajer, F., Guevara, L., Arosamena, L., Suárez, G.I. y Kershenobich, D. 1978. Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México. *Rev. Invest. Clin.* 30:13-28.
- Denko, C.W. 1975. Antiprostaglandine action of colchicine. *Pharmacology* 13:219-227.
- Desai, I.D., Sawant, P.L. y Tappel, A.L. 1964. Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 86:277-285.
- Diegellman, R.F. y Peterkofsky, B. 1972. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblast by microtubular disruptive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:892-896.
- Dianzani, M.V., Baccino, F.M. y Comporti, M. 1966. The direct effect of carbon tetrachloride on subcellular particles. *Lab. Invest.* 15:149-156.
- Dinman, B.D., Fox, C.F., Frajola, W.J. y Rabor, A. 1962. Serum enzyme and B<sub>12</sub> changes in CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity. *Arch. Environ. Health* 4:168-182.
- Dodds, A.J., Lawrence, P.J. y Biggs, J.C. 1978. Colchicine overdose. *Med. J. Aust.* 2:91-92.
- Domínguez de Villota, E., Galdos, P., Mosquera, J.M. y Tomás, M.L. 1979. Colchicine overdose: An unusual origin of multiorgan failure. *Criti. Care Med.* 7(6):278-279.
- Dustin, P. 1978. *Microtubules*. Spinger-Verlag (eds.) New York.
- Ehrlich, H.P. y Bornstein, P. 1972. Microtubules in transcellular movement of procollagen. *Nature (London)* 238:257-260.
- Ehrlich, H.P., Ross, R. y Bornstein, P. 1974. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of

- collagen. *J. Cell Biol.* 62:390-405.
- El-Mofty, S.K., Scrutton, M.C., Serroni, A., Nicolini, C. y Farber, J.L. 1975. Early reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am. J. Pathol.* 79:579-596.
- Erlinger, E., Dhumeaus, D. y Binhamou, J.P. 1969. Effect on bile formation of inhibitors of sodium transport. *Nature (London)* 223:1276-1277.
- Evans, W.H. 1980. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim. Biophys. Acta.* 604:27-64.
- Farber, J.L. 1982. Calcium and the mechanism of liver necrosis. En: *Progress in Liver Diseases.* Popper H., Schaffner, F. (eds.) Grune & Stratton, New York. 8:347-360.
- Ferguson, F.C. 1952. Colchicine. I. General Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 106:261-270.
- Fong, I., Schoffner, F.C. y Kirk, P. 1953. The ultramicrodetermination of glycogen in liver. A comparison of the anthrone and reducing methods. *Arch. Biochem. Biophys.* 45:319-326.
- Fruhman, G.J. 1960. Inhibition of neutrophil mobilization by colchicine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:284-286.
- Fuller, G.C. 1981. Perspective for the use of collagen synthesis inhibitors as antifibrotic agents. *J. Med. Chem.* 24:651-658.
- Gallagher, C.H. 1962. The effect of antioxidants on poisoning by carbon tetrachloride. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40:241-254.
- Gardner, H.W. 1975. Descomposition of linoleic acid hidroperoxides. Enzymatic reactions compared with nonenzymatic. *J. Agric. Food Chem.* 23:129-136.
- Gimon, F.R., Sutherland, E. y Accatino, L. 1977. Stimulation of hepatic sodium and potassium

- activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital. *J. Clin. Invest.* 59:849-861.
- Glossmann, M. y Neville, D.M. 1972. Gamma-glutamyltransferase in kidney brush border membrane. *Febs Letters* 19(4):340-344.
- Gordon, S. y Werb, Z. 1976. Secretion of macrophage neural proteinase is enhanced by colchicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:872-876.
- Goshal, A.K., Porta, E.A. y Hartroft, W.S. 1969. The role of lipoperoxidation in the pathogenesis of fatty livers induced by phosphorous poisoning in rats. *Am. J. Pathol.* 54:275-291.
- Gregory, N.L. 1966. CCl<sub>4</sub> toxicity and electron capture. *Nature* 212:1460-1461.
- Guyton, A.C. 1992. *Tratado de Fisiología Médica*. 8a. ed. Editorial Interamericana. México.
- Harris, E.D. y Krane, S.M. 1971. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatic synovium. *Arth. Rheum.* 14:669-684.
- Heaney, D., Herghazarian, C.B., Pineo, G.F. y Al, M.A.M. 1976. Masive colchicine overdose: A report on the toxicity. *The Am. J. of Med. Sci.* 271(2):233-238.
- Hickenbottom, R.S. y Hornbroock, K.R. 1971. Effects of CCl<sub>4</sub> on the metabolism of liver glycogen in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178:383-394.
- Hoang, C., Lavergne, A., Bismuth, C., Fournier, P.E., Leclerc, J.P. y LeChar Pentier, Y. 1982. Lesions viscerales histologiques des intoxications aigués mortelles para la colchicine: A propos de 12 observations. *Ann. Phatol.* 2(3):229-237.
- Hoffsten, P.E. Hunter, F.E. Jr., Gebicki, J.M. y Weinstein, J. 1962. Formation of "lipid peroxide" under conditions which lead to swelling and lysis of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 7:276-283.
- Hokin, L.E. y Hesum, J.D. 1972. Studies on the characterization o the sodium potassium transport

- adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 152:453-463.
- Holman, R.T. 1954. Autoxidation of fats and related substances. En: *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Holman, R.T., Liendberg, W.O. y Malkin, T. (eds.) Pergamon Press, London. 2:51-98.
- Homma, S. et al. 1982. The morphological studies on characteristics of isolated parenchimal and non-parenchimal cells of the rat liver. *J. Electron Microsc.* 4:389-396.
- Hove, E.L. 1948. Interrelation between alfa-tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against  $\text{CCl}_4$  poisoning in rats. *Arch. Biochem.* 17:467-471.
- Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Hoffsten, P.E., Gebicki, J.M., Weinstein, J. y Schneider, A. 1964a. Studies of the mechanism of swelling lysis and distintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione. *J. Biol. Chem.* 239:614-621.
- Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Hoffsten, P.E., Guerra, F., Weinstein, J., Schneider, A., Schutz, B., Fink, J., Ford, L. Y Smith, E. 1964b. Studies of the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 239:604-613.
- Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Weinstein, J. y Schneider, A. 1964. Effects of phosphate, arsenate and other substances on swelling and lipid peroxide formation when mitochondria are treated with oxidized and reduced glutathione. *J. Biol. Chem.* 239:622-630.
- Huseby, N.E. y Tornstein, U.K. 1978. The activity of  $\gamma$ -glutamyl transferase after bile duct ligation in guinea pig. *Clin. Chim. Acta* 80:385-392.
- Ito, T. 1978. Recent Advances in the Study of the Fine Structure of the Hepatic Sinusoidal Wall: A review. *Gunna Rep. Med. Sci.* 6:119-163.

- Jakoby, W.B. 1994. The hepatocyte: metabolism. En: The liver: biology and pathobiology. 3a. ed. Arias, I.M; Boyer, J.L.; Fausto, N.; Jakoby, W.B.; Schachter, D. y Shafritz, D.A. (eds). Raven Press , New York. 321-597.
- Jones, A.C. y Mills, E.S. 1978. Hígado y vesícula biliar. R.D. Greep and J. Weiss. Histologia, 3a. ed. Vol. 2. Ed. El Ateneo.
- Kaplan, M.M. 1986. Serum alkaline phosphatase-another piece is added to the puzzle. Hepatology 6(3):226-228.
- Kaplan, M.M. 1989. Medical treatment of primary biliary cirrhosis. Semin. Liver Dis. 9:138-143.
- Kaplan, M.M., Ohkubo, A., Zuaron, E.G. y Sze-Tu, D. 1983. Increased synthesis of rat liver alkaline phosphatase by bile duct ligation. Hepatology, 3:368-376 .
- Kaplan, M.M. y Righetti, A. 1969. Induction of liver alkaline phosphatase by bile duct ligation. Biochem. Biophys. Acta 184:667-669.
- Kaplan, M. M. y Righetti, A. 1978. Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. J. Clin. Invest. 49:508-516.
- Kershenobich, D., Uribe, M., Suárez, G.I., Mata, J.M., Pérez-Tamayo, R. y Rojkind, M. 1979. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double blind randomized trial. Gastroenterology 77:532-536.
- Kimelberg, H.K. y Papahadjopoulos, D. 1974. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transistors, and cholesterol on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 249:1071-1080.
- Kubic, V.L. y Anders, M.W. 1980. Metabolism of carbon tetrachloride to phosgene. Life Sci. 26:2151-2155.

- Kyte, J. 1975. Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250:7443-7449.
- Lehninger, A.L. 1969. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 234:2465-2471.
- Leoni, S., Spagnuolo, S., Conti, L.D., Baldini, P., Incerpi, S. y Luly, P. 1980. Effect of colchicine on rat liver plasma membrane. *Bioch. Biophys. Acta.* 596:451-456.
- Lits, F. 1934. Contribution a l'études des reactions cellulaires provoquées par la colchicine. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 115:1421-1423.
- Liu, Y.K., Hymowitz, R., Carrol, M.G. 1978. Narrow aplasia induced by colchicine. *Arth. Rheum.* 21(6):731-735.
- Loud, A.V. 1968. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 37:27-46.
- Malawista, S.E. 1968. Colchicine. A common mechanism for its anti-inflammatory and anti-mitotic effects. *Arth. Rheum.* 11:191-197.
- Malawista, S.E. y Bodel, P.T. 1967. The dissociation by colchicine of phagocytosis from increased oxygen consumption in human leukocytes. *J. Clin. Invest.* 46:786-796.
- Malawista, S.E. 1975. The action of colchicine in acute gouty arthritis. *Arth. Rheum.* 18(6):835-846
- Malech, H.L., Root, R.K. y Galbin, J. 1978. Structural analysis of human neutrophil migration. *J. Cell Biol.* 75:666-693.
- Martínez-Calva, I., Campos-Apérez, A., Rosales-Vega, E. y Mourelle, M. 1984. Vitamin E improves membrane lipid alterations induced by CCl<sub>4</sub> intoxication. *J. Appl. Toxicol.* 4:270-272.
- Martínez, M., Mourelle, M. y Muriel, P. 1995. Protective effect of colchicine in acute liver damage

- induced by  $\text{CCl}_4$ . Role of cytochrome P-450. *J. Appl. Toxicol.* 15(1):49-52.
- Mason, H.S., North, J.C. y Vanneste, M. 1965. Microsomal mixed function oxidations: The metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.* 24:1172-1180.
- McMillan, G.R. y Calvert, J.G. 1965. Gas phase photo-oxidation. *Oxidation Combustion Rev.* 1:84-135.
- Meister, A., Tate, S.S. y Ross, L.L. 1976. Membrane-bound glutamyl transpeptidase. The enzymes of biological membranes. Anthony Marlonosi (ed.) Vol. 3, pp. 315-343.
- Merchant, Y.L. y Singh, A. 1973. A role for the microtubular system in the release of very low density lipoproteins by perfused mouse livers. *J. Biol. Chem.* 218(19):6862-6970.
- Merlin, H.E. 1972. Azoospermia caused by colchicine: A case report. *Fert and steril* 23(3):181-181.
- Mico, B.A., Branchflower, R.V., Pohl, L.R., Pudzianowski, A.T. y Loew, G.H. 1982. Oxidation of  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{BrCCl}_3$ , and  $\text{CBr}_4$  by rat liver microsomes to electrophilic halogens. *Life Sci.* 30:131-137.
- Migai, K. 1979. Ultrastructural basis for liver injury. Toxic injury of the liver. Part A. Farber, M. Y Ficher, M.M., Marcel Dekker, I.N.C. (eds.) pp. 59-163.
- Molander, D.W., Wroblowski, F. y La Due, J.S. 1955. Serum glutamic oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular injury. *J. Lab. Clin. Med.* 46:831-839.
- Moore, L., Davenport, R. y London. E.J. 1976. Calcium uptake a rate liver microsomal subcellular fraction in response to *in vivo* administration of carbon tetrachloride. *Biol. Chem.* 251:1197-1201.
- Mourelle, M., Rojkind, M. y Rubalcava, B. 1981. Colchicine improves the alteratios in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. *Toxicology* 21:213-222.

- Mourelle, M., Yahuaca, P. Y Rojkind, M. 1983.  $\text{Ca}^{+2}$  and  $(\text{Na}^{+}, \text{K}^{+})$  liver ATPases decrease after treatment with  $\text{CCl}_4$ . *Hepatology* 3(5):303 (resumen)
- Mourelle, M. Amaya, A. y Rojkind, M. 1985. Colchicine lowers serum cholesterol of  $\text{CCl}_4$ -cirrhosis rats in decrease membrane cholesterol exchange *in vitro*. *Hepatology*, 5:10931 (resumen)
- Mourelle, M. y Villalón, C. 1985. Colchicine inhibits lipid peroxidation induced by  $\text{CCl}_4$  but has not effect of cytochrome P-450. *Hepatology* 5:1031 (resumen)
- Mourelle, M., Villalón, C. y Amezcua, J.L. 1988. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* 6:337-342.
- Mourelle, M. y Meza, M.A. 1989. Colchicine prevents D-galactosamine-induced hepatitis. *J. Hepatol.* 8:165-172.
- Mourelle, M., Favari, L., Rodríguez, L., Pérez-Alvarez, V. y Friginals, R. 1990. Colchicine treatment prevents  $\text{CCl}_4$ -induced rat liver cirrhosis. *Biochem. Farmacol.* 9:165-169.
- Muriel, P. y Mourelle, M. 1992. Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. *J. Hepatol.* 14:16-21
- Muriel, P., Quintanar, M.E., Pérez-Alvarez, V. 1993. Effect of colchicine on acetaminophen-induced liver damage. *Liver* 13:217-221.
- Muriel, P. 1994. Trimethylcolchicinic acid: a better and safer hepatoprotective drug than colchicine on prolonged bile duct obstruction in the rat. *Hepatology* 20(4):190A (Resumen).
- Muriel, P., Ostoa-Saloma, P.U., Reyes-Esparsa, J.A. y Rodríguez-Fragoso, L. 1995. Stimulation of fibrosis by trimethylcolchicinic acid in bile duct ligation-induced liver fibrosis in the rat. *Hepatology* 22(4): 460A (Resumen).
- Nakata, R., Tsukamoto, I., Miyoshi, M. y Kojo, S. 1985. Liver regeneration after carbon tetrachloride

intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 34(4):586-588.

- Narro-Robles, J., Gutiérrez-Avila, H., López-Cervantes, M., Phil, M., Borges, G. y Rosovsky, H. 1992. La mortalidad por cirrosis hepática en México. I. Características epidemiológicas relevantes. *Salud Pùb. Méx.* 34:378-387.
- Netter, F.H. 1983. Colección Ciba de Ilustraciones Médicas. Tomo III/3 Sistema digestivo, hígado, vías biliares y páncreas. Editorial Salvat.
- Neville, M.D. 1960. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J.Biophys. Biochem. Cytol.* 8:415-422.
- Olmstead, J.B. y Borisky, G.G. 1973. Microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 42:507-540.
- Packer, J.E., Slater, T.F. y Willson, R.L. 1978. Reactions of the CCl<sub>4</sub>-related peroxy free radical (CCl<sub>3</sub>-OO•) with aminoacids: pulse radiolysis evidence. *Life Sci.* 23:2617-2620.
- Pérez-Tamayo, R. 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of humam cirrhosis? *Hepatology* 3:112-120.
- Phelps, P. 1970. Polimorphonuclear leukocyte mobility in vitro: IV. Colchicine inhibition of the formation of chemotactic activity after phagocytosis of urate cristals. *Arthritis Rheum.* 13:1-9.
- Penniston, J.T. 1982. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 402:296-303.
- Penny, R., Galton, B.A.G. y Scott, J.T. 1966. Studies of neutrophil function: I. Physiological and Pharmacological Aspects. *Br. J. Haematol.* 12:523-528
- Plaa, G.L. y Hewitt, W.R. 1982. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. En: *Principles and Methods of Toxicology.* W. Hayes, (eds.) pp. 407-445. Raven Press, New

York.

- Poyer, J.L., Floyd, R.A., McCay, P.B., Janzen, E.G. y Davis, E.R. 1978. Spin-trapping of the trichloromethyl radical produced during enzymic NADPH oxidation in the presence of carbon tetrachloride or bromotrichloromethane. *Biochim. Biophys. Acta* 539:402-409.
- Pryor, W.A. y Stanley, J.P. 1975. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of poly-unsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* 40:3616-3617.
- Pryor, W.A., Stanley, J.P. y Blair, E. 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like-endoperoxides. *Lipids* 11:370-378.
- Race, T.F., Paes, T.C. y Faloon, W.W. 1970. Intestinal malabsorption induced by oral colchicine. *Ann. J. Med. Sci.* 259:32-41.
- Rao, K.S. y Recknagel, R.O. 1969. Early incorporation of carbon-labeled carbon tetrachloride into rat liver particular lipids and proteins. *Exp. Mol. Pathol.* 10:219-223.
- Recknagel, R.O. y Ghoshal, A.K. 1966. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* 15:132-148.
- Recknagel, R.O. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2:145-200.
- Recknagel, R.O. y Glende, E.A. 1973. En: Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2:263-297.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Ugaziale, R., Koch, R.R. y Srinivasan, S. 1974. New data in support of the lipoperoxidation theory for the carbon tetrachloride liver injury, En: *International Symposium on Hepatotoxicity*. Eliakim, M. Eshchar, J. y Zimmerman, H.J. Academic Press,

New York.

- Recknagel, R.O. 1983. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci.* 33:401-408.
- Rees, K.R. y Sinha, K.P. 1960. Blood enzymes in liver injury. *J. Pathol. Bacteriol.* 80:297-307.
- Reitman, S. y Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum oxaloacetic and glutamic piruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:56-63.
- Reynolds, E.S., Thiers, R.E. y Vallee, B.L. 1962. Mitochondrial function and metal content in CCl<sub>4</sub> poisoning. *J. Biol. Chem.* 237:3546-3551.
- Reynolds, E.S. 1963. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell. Biol.* 19: 139-157.
- Reynolds, E.S. y Ree, H.S. 1971. Liver parenchymal cell injury. VII Membrane denaturation following carbon tetrachloride. *Lab. Invest.* 25:269-278.
- Roberts, W.M. 1933. Blood phosphatase and the Van Den Bergh reaction in the differentiation of the several types of jaundice. *Br. Med. J.* 1:734-738.
- Roberts, J.L. Jr. y Sawyer, D.T. 1981. Facile degradation by superoxide ion of CCl<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> and p,p-DDT in aprotic media. *J. Amer. Chem. Soc.* 103:712-714.
- Rojkind, M. y Dunn, M. 1979. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 76:849-863.
- Rojkind, M. y Kershenobich, D. 1975. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta* 378:415.
- Rojkind, M. y Kershenobich, D. 1981a. Hepatic fibrosis. *Clin. Gastroenterol.* 10:737-754.
- Rojkind, M. y Kershenobich, D. 1981b. Fibrosis and cirrhosis. En: *The Liver Annual I.* Arias, I.M., Frenkel, M., y Wilson J.A.P. (eds.). Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton. Pp.

- 126-148.
- Rojkind, M. y Kershenovich, D. 1983 The extracellular matrix: fibrosis and cirrhosis. En: *The Liver Annual III*. Arias, I.M., Frenkel, M. y Wilson, J.A.P. (eds.) Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton. Pp. 189-205.
- Rouiller, Ch. 1964. Experimental toxic injury of the liver. En: *The Liver*. Rouiller, Ch. (ed.), Academic Press, New York. 2: 335-476.
- Schanne, F.A.X. y Moore, L. 1986. Liver plasma membrane calcium transport. Evidence for a Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> flux. *J. Biol. Chem.* 261:9886-9889.
- Schnell, E., Schonharting, M. y Siebert, G. 1976. Metabolic transformation of colchicine. IV. On the interaction of colchicine and colchicine with sulphhydryl compounds. *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.* 357-567.
- Schovenstein, E. 1967. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: Chemical structure and biological activity of the products. *J. Lipid Res.* 8:417-428.
- Seakins, A. y Robinson, D.S. 1963. The effect of administration of carbon tetrachloride on formation of plasma lipoproteins in the rat. *Biochem. J.* 86:401-407.
- Sela, B.A. y Sachs, L. 1974. Alkaline phosphatase activity and the regulation of growth in transformed mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 83:27-34.
- Shah, H., Hartman, S.P., y Weinhouse, S. 1979. Formation of carbonyl chloride in CCl<sub>4</sub> metabolism by rat liver "in vitro". *Cancer Res.* 39:3942-3947.
- Shelanski, M.L. y Taylor, E.W. 1967. Isolation of protein subunit from microtubules. *J. Cell Biol.* 34:549-554.
- Sipes, I.G., Krishna, G. y Gillette, J.R. 1977. Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform y

- bromotrichloromethane: role of cytochrome P-450. *Life Sci.* 20:1541-1548.
- Skou, J.C. 1965. Enzymatic basis for active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across cell membranes. *Physiol. Rev.* 45:596-617.
- Slatter, T.F. 1966. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. *Nature (London)* 209:36-40.
- Smuckler, E.A., Ioeri, O.A. y Benditt, E.P. 1962. An intracellular defect in protein synthesis induced by CCl<sub>4</sub>. *J. Exp. Med.* 116:55-72.
- Spilberg, I., Mandell, B., y Mehte, I. 1979. Mechanism of action of colchicine in acute urate-crystal-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 64:775-780.
- Stapczynski, J.S., Rothstein, R.J., Gage, W.A. y Niemann, J.T. 1981. Colchicine overdose: Report of two cases and review of the literature. *Ann. Emerg. Med.* 10(9):364-369.
- Stein, O. y Stein, Y. 1973. Colchicine-induced inhibition of very low density lipoprotein released by rat liver *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 306:142-147.
- Stein, O., Sanger, L. y Stein, Y. 1974. Colchicine induced inhibition of the lipoproteins and protein secretion into the serum and lack of interference with secretion of biliary phospholipids and cholesterol by rat liver *in vivo*. *J. Cell. Biol.* 62:90-103.
- Tanaka, R. y Strickland, K.P. 1965. Role of phospholipid in the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase of beef brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:583-592.
- Tappel, A.L. 1962a. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamins Hormones* 20:493-510.
- Tappel, A.L. 1962b. Vitamin E and selenium as inhibitors in "in vivo" lipid peroxidation. En: *Lipids and their Oxidation*. ed. By Schultz, H.W. p. 367-386.
- Temple, R., Williams, J.A., Wilber, J.G., Wolff, J. 1972. Colchicine and hormon secretion.

- Biochem. Biophys. Res. 46:1456-1461.
- Törö, I., Ruzsa, P. y Rölich, P. 1962. Ultrastructure of early phagocytic stage in sinus endothelial and Kupffer cells of the liver. *Exp. Cell Res.* 26:601-603.
- Trible, D.L., Am, T.Y., Jones, D.P. 1987. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 7(2):377-387.
- Tsuchimoto, T. Y Matter, B.E. 1979. In vivo cytogenetic screening methods for mutagens with special reference to the micronucleous test. *Arch. Toxicol.* 42:239-248.
- Uesugi, S., Dulak, N.C., Dixon, J.F., Hufum, T.D., Dahl, J.L., Perdue, J.F. y Hokin, L.E. 1971. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase VI. Large Scale Partial Purification and Properties of a Lubrol-Solubilized Bovine Brain Enzyme. *J. Biol. Chem.* 246:531-543.
- Wallace, S.L. 1959. Colchicine analogs in the treatment of acute gout. *Arthritis Rheum.* 2:389-392.
- Wallace, S.L. 1961. Trimethylcolchicinic acid in the treatment of acute gout. *Ann. Intern. Med.* 54:274-279.
- Wallace, S.L., Omokoku, B. y Ertel, N.H. 1970. Colchicine plasma levels: Implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am. J. Med.* 48:443-448.
- Wallace, S.L. y Ertel, N.H. 1973. Plasma levels of colchicine after oral administration of a single dose. *Metabolism* 22:749-753.
- Wallace, S.L. 1974. Colchicine. *Sem. Arthr. Rheum.* 3(4):369-381.
- Wallace, S.L. 1975. Colchicine and mew antiinflammatory drugs for the treatment of acute gout. *Arth. Rheum.* 18(6):847-851.
- Warnes, T.W., Smith, A., Lee, F.I., Haboubi, N.Y., Johnson, P.J. y Hunt, L. 1987. A controlled trial

- of colchicine in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol*, 5:1-7.
- Wecholer, R., Wallace, S.L., Gerber, D. y Scherrer, J. 1965. Colchicine and trimethylcolchicinic acid: a comparison of their effects on human white blood cells *in vitro*. *Arthr. Rheum.* 8(6):1104-1112.
- Wells, H.G. 1925. *Chemical Pathology*, W.B. Saunders, Philadelphia Ed. 5, 88:623-627.
- Whitfield, J.B., Pounder, R.E., Neale, G. y Moss, D.W. 1972. Serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut*. 13:702-708.
- Wilfred, G. 1977. Colchicine increase hepatic alkaline phosphatase activity. *Bioch. Biophys. Acta.* 500:209-212.
- Williams, J.A. y Wolff, J. 1970. Possible role of microtubules in thyroid secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 67:1901-1908.
- Wills, E.D. y Wilkinson, A.E. 1966. Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem. J.* 99:657-666.
- Wisher, M.N. y Evans, W.H. 1975. Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and characterization of plasma membrane subfractions from the blood sinusoidal, bile canalicular and continuous surfaces of the hepatocyte. *Biochem. J.* 146:375-388.
- Wiss, E.J. 1979. *Ultrastructural Res.* 31:125-150.
- Wisse, C. 1979. *Progress in Liver Diseases*, Vol. 6. Popper H. Schaffner (eds.). Grune and Stratton, N.Y. pp. 153-171.
- Writschafter, Z.T. y Cronyn, M.W. 1964. Relative hepatotoxicity. *Arch. Environ. Health* 9:180-185.
- Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind, M. y Mourelle, M. 1985. Cryptic ATPase activities in plasma membranes of CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid

- ratios. *Lab. Invest.* 53(5):541-545.
- Zimmerman, H.J., Kodera, Y. y West, M. 1965. Rate of increase in plasma level of cytoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 66:315-323.
- Zimmerman, H.J. 1974. Hepatic injury caused by therapeutic agents. The liver normal and abnormal functions. Part A. Marcel Dekker (ed.), I.N.C. New York.
- Zimmerman, H.J. 1978. Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemical on the liver. Appleton Century-Crafts. New York. Pp. 126. p. 97-106, 200-210.
- Zimmerman, H.J. 1982. Toxicology of the liver. Plaa, G. y Hewit, W.P. (eds.). Raven Press, New York.
- Zimmerman, T., Franke, H. y Dargel, R. 1987. Isolation and characterization of parenchymal cells from normal and cirrhotic rat liver. *Cell. Biochim. Funct.* 5:47-54.
- Zweig, M.H. y Chignell, C.V. 1973. Interactions of some colchicine analogues, vinblastine and podophylotoxin with rat brain microtubule. *Protein Biochem. Pharmacol.* 22:2141-2150.

El Jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobó la presente tesis de Maestría a los 23 días del mes de agosto del año de mil novecientos noventa y seis.



Dr. Pablo Muriel de la Torre



Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz



Dr. Rubén Román Ramos