UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

CBS

EFECTO DE LA SILIMARINA EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE HEPATOCITOS DE RATAS TRATADAS AGUDA Y CRONICAMENTE CON CCl4

PABLO MURIEL DE LA TORRE

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Noviembre de 1987.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Marisabel Mourelle Mancini, del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Marisabel Mourelle y con la asesoría del Dr. Rubén Román Ramos y el Dr. Gilberto Castañeda.

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: 002205 PPR 4A-127 AP-84 para el fortalecimiento del postgrado nacional.

A G R A D E C I M I E N T O S

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Marisabel Mourelle Mancini por haber dedicado su tiempo, conocimientos y experiencia en la elaboración de este trabajo y por haber sido no sólo un tutor sino una verdadera amiga.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca-crédito (Registro No. 49106) durante mis estudios e investigación de Maestría en Biología Experimental.

***

Quiero hacer patente también mi agradecimiento a mis asesores, el Dr. Rubén Román Ramos y Dr. Gilberto Castañeda, por sus valiosas sugerencias y comentarios en el desarrollo del presente trabajo.

***

Agradezco sinceramente a la Sra. Concepción Avalos Pérez, por su valiosa e incondicional cooperación en la excelente mecanografía del presente trabajo de Tesis.

***

Mi agradecimiento también al Sr. Alfredo Padilla Delgado, por la magnífica realización de las figuras que forman parte de esta Tesis.

***

Agradezco también a todo el equipo de trabajo del laboratorio, por su excelente y cordial cooperación en la realización de esta investigación y por el excelente ambiente de trabajo y compañerismo que me brindaron.

A MI MADRE

A NERY

INDICE

		Página
	PROLOGO.	1
I.	INTRODUCCION	3
I.1.	Organización de la Microcirculación	5
I.2.	El CCl4 como Agente Hepatotóxico	7
I.3.	Cirrosis y Hepatitis	11
I.4.	Drogas Utilizadas en el Tratamiento del Daño Agudo (Hepatitis)	17
I.5.	Drogas Utilizadas en el Tratamiento del Daño Crónico (Cirrosis)	18
I.6.	Silimarina	23
I.6.1.	Generalidades y Estructura	23
I.6.2.	Estudios Farmacológicos	24
II.	OBJETIVO	29
III.	JUSTIFICACION	30
IV.	MATERIALES Y METODOS	33
IV.1.	Intoxicación Aguda con CCl4	33
IV.2.	Intoxicación Crónica con CCl4	33
IV.3.	Tratamiento con Silimarina	34
IV.3.1.	En el Daño Agudo	34
IV.3.2.	En el Daño Crónico	34
IV.4.	Determinación del Grado de Lipoperoxidación. . .	34
IV.5.	Obtención de las Membranas	35
IV.6.	Extracción de Lípidos	36
IV.7.	Preparación de las Placas para Cromatografía en Capa Fina	36
IV.8.	Cromatografía de Fosfolípidos	37

IV.9. Identificación de las Especies de Lípidos . . . 37
IV.10. Determinación Cuantitativa de los Diferentes Fosfolípidos Separados 38
IV.11. Determinación de Colesterol 39
IV.12. Determinación de Proteínas por el Método de Bradford 41
IV.13. Determinación de Enzimas 41
IV.14. Incorporación de Fosfolípidos a Membranas Plasmáticas 41
IV.15. Tratamiento Estadístico de los Datos y Significancia de las Diferencias 42
V. RESULTADOS 44
V.1. Daño Agudo 44
V.2. Daño Crónico 48
V.2.1. Capacidad de la Silimarina para Prevenir el Daño Crónico con CCl4 48
V.2.2. Estudio de la Capacidad de la Silimarina para Revertir las Alteraciones ya Producidas por la Administración Crónica de CCl4 50
VI. DISCUSION 53
VI.1. Hepatitis Tóxica 53
VI.2. Cirrosis Hepática 57
VII. CONCLUSIONES 61
VII.1. Hepatitis Tóxica 61
VII.2. Cirrosis Hepática 62
VIII. BIBLIOGRAFIA 63

PROLOGO

El CCl4 es un agente hepatotóxico que produce lipoperoxidación modificando la función de organelos celulares incluyendo la membrana plasmática.

En el pasado se han reportado varios agentes capaces de prevenir el daño hepático inducido aguda o crónicamente con CCl4 en ratas, entre otros la vitamina E, la adenosina, la clorpromacina y la colchicina.

La silimarina es una droga considerada hepatoprotectora que se ha usado principalmente en intoxicación con faloidina en donde resulta muy eficaz, sin embargo, no existe suficiente información acerca de su uso en intoxicaciones con CCl4.

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar los cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática del hepatocito producidos por el CCl4, y su modificación por la silimarina, correlacionándolas con la actividad de algunas enzimas de membrana, tanto en la intoxicación aguda como crónica con CCl4.

Los resultados demostraron que la administración aguda de CCl4 incrementó el grado de lipoperoxidación en hígado y que la silimarina previno este incremento. Además el CCl4 disminuyó la relación colesterol/fosfolípidos en la membrana plasmática. El análisis de los fosfolípidos membranales reveló un incremento en el contenido de fosfatidilinositol y una disminución en el de fosfatidiletanolamina (FEA) y que la silimarina previno estas alteraciones. En relación a las actividades de la GGTP y FA membranales se observó un decremento por efecto del CCl4 que

también fue prevenido por la droga. La actividad de la FA correlacionó copn el contenido de FEA en los experimentos " in vivo", esta correlación fue corroborada con experimentos "in vitro".

En el estudio crónico el CCl4 incrementó la lipoperoxidación y el contenido de colesterol en las membranas plasmáticas, el grupo protegido con silimarina no mostró cambios comparado con el grupo control. El análisis de los fosfolípidos membranales mostró que el CCl4 administrado crónicamente disminuye significativamente el contenido de FEA en la membrana plasmática, siendo este cambio prevenido por la silimarina. Por otra parte, las actividades de la FA y GGTP membranales aumentaron por efecto del tratamiento crónico con CCl4, la silimarina sólo previno parcialmente el incremento en la GGTP sin ejercer ningún efecto sobre la actividad de la FA. La actividad de la ATPasa de Na+/K+ correlacionó con el contenido de colesterol y con el cociente colestero/fosfolípidos. Experimentos "in vitro" corroboraron estas correlaciones.

Los resultados obtenidos indican que la silimarina previene varias de las alteraciones causadas por el CCl4 actuando probablemente a nivel de la membrana plasmática.

I. INTRODUCCION

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados.

En el hombre el hígado comprende del 2 al 3% del peso corporal (51). Se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma. En el ser humano presenta cuatro lóbulos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson). El hilio está bien definido y por él entran los vasos y salen los conductos hepáticos (60).

El hígado tiene un doble sistema de irrigación sanguínea. La vena porta, que transporta sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas. Esta suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo (42), es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno. Por otra parte la arteria hepática transporta sangre bien oxigenada. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos (Fig. 1). La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central.

El hígado recibe cerca de una cuarta parte del gasto cardíaco en los adultos en reposo (1,500 ml/min) (22, 42). La unidad estructural clásica del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido, que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro

y la vena central pasa por el centro de éste (Fig. 1) (60).

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

El hígado es esencial para la vida y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen extraordinaria capacidad de regeneración y la facultad de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas. El hígado funciona como una glándula exócrina y como una glándula endocrina. Secreta bilis que fluye hacia el duodeno y que tiene, entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina, que es el fosfolípido más importante y el colesterol son insolubles en agua, pero son capaces de formar micelas mixtas con las sales biliares, por lo cual permiten que se lleve a cabo la emulsificación de las grasas antes de su digestión (60). La sangre portal lleva los alimentos digeridos y ahí se almacenan carbohidratos (glucógeno) proteínas, vitaminas y algunos lípidos.

Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatocito pueden ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa o bien, ligadas a un transportador como los triglicéridos que salen formando parte de una lipoproteína.

El hígado también sintetiza muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa (para la gluconeogénesis), ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Metaboliza compuestos exógenos como drogas e insecticidas y compuestos endógenos como esteroides.

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Durante la embriogénesis y en ciertas enfermedades del adulto tiene actividad hematopoyética. Finalmente, la abundancia de macrófagos hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente las bacterias y antígenos provenientes del intestino (60).

I.1. Organización de la Microcirculación

La organización de las unidades microcirculatorias del hígado influye en el mecanismo de muchos cambios patológicos (60). Rappaport (104) menciona que el hepatocito no está organizado alrededor de la vena central, (lobulillo clásico) sino que la unidad estructural y funcional del hígado es el acino hepático.

En ciertos aspectos esta unidad es semejante al lobulillo portal y a menudo se describe como la unidad funcional más pequeña del hígado.

El acino hepático simple se define como una masa irregular de tejido parenquimatoso no encapsulado que se encuentra entre dos o más vénulas hepáticas terminales (venas centrales). El eje de esta unidad llamado espacio portal,

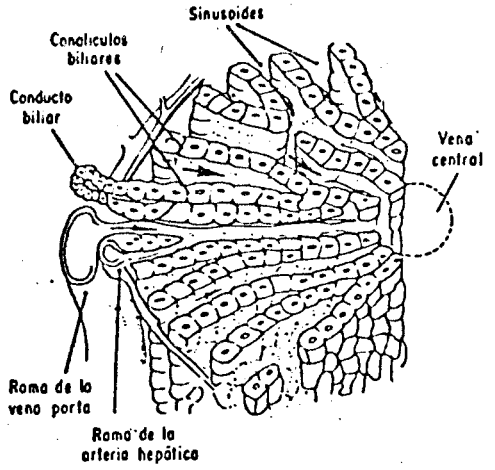


Fig. 1. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situadas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

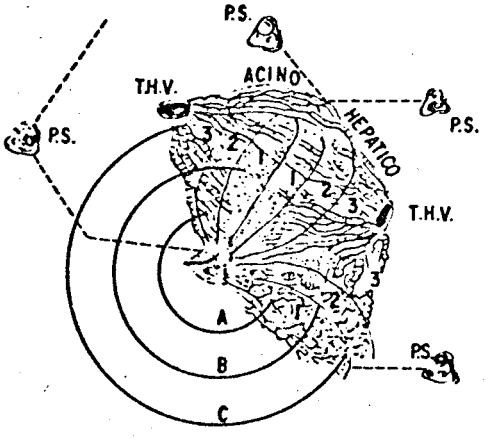


Fig. 2. Irrigación de una acino hepático simple. La tensión de oxígeno y el nivel de los principales nutrientes de la sangre disminuyen en los sinusoides desde la zona 1 hasta la 3. Las zonas 1', 2' y 3' indican volumenes correspondientes de una porción de una unidad acinosa inmediata. El círculo A encierra la zona comunmente conocida como "periportal", mientras que la zona B y la C representan las zonas más periféricas al espacio porta (P.S.). T.H.V. vénulas hepáticas terminales. Fig. 1 de Rappaport et. al. Anat. Record. 119:11, 1954.

contiene una raíz del canal portal principal, una vénula portal terminal, una arteriola hepática, un conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios (Fig. 2) (104).

Rappaport y cols. (103) encontraron que el tejido dentro de cada acino recibe sangre de los vasos de su propio espacio portal. Dentro de cada acino, las células parecen agruparse en zonas concéntricas alrededor de su eje. Las células más próximas al eje y a los vasos aferentes y terminales (zona 1) son las primeras que reciben sangre y sustancias nutritivas, las últimas que mueren y las primeras en regenerarse.

Las células en la zona 3 están situadas en la periferia del acino y reciben sangre que ha intercambiado gases y metabolitos con las células en las zonas 1 y 2. Este anillo parenquimal es mas sensible al daño por disturbios circulatorios (isquemia, anoxia o congestión) y deficiencias nutricionales. El concepto de zonas circulatorias acinosas ha sido extendido por Rappaport para explicar la apariencia histológica de muchas alteraciones patológicas en el hígado.

Los cambios en la microcirculación hepática que se observan "in vivo" después de una intoxicación son debidos principalmente al daño de los hepatocitos producidos por una sustancia endógena o exógena.

Las sustancias tóxicas se empiezan a metabolizar en la zona 1 dañando los microvasos aferentes, produciendo un incremento en la permeabilidad y, en ocasiones microhemorragia.

La distribución inicial del daño a partir del espacio portal a las zonas 1, 2 y 3 parece confirmar la correlación

funcional de la estructura acinar propuesta por Rappaport.

El daño hepático inducido por sustancias químicas es un problema de gran importancia en toxicología. Las lesiones observadas en hígado no solamente dependen del agente químico sino también del período de exposición. Por ejemplo después de una exposición aguda se pueden observar ya sea acumulación de lípidos, necrosis celular o disfunción hepatobiliar, mientras que en la exposición crónica se observan generalmente cirrosis o cambios neoplásicos. Las diferentes alteraciones bioquímicas nos pueden ayudar a entender los posibles cambios patológicos que ocurren en el hígado. No se ha visto que haya un mecanismo único que gobierne la aparición de cambios degenerativos en el hepatocito.

I.2. El Tetracloruro de Carbono como Agente Hepatotóxico

El estudio del CCl_4 como agente hepatotóxico ha despertado desde hace mucho tiempo gran interés en los laboratorios de patología. Esto se debe a que con este agente se pueden estudiar a corto plazo los efectos desvastadores sobre varios tipos de células.

El CCl_4 se usó como agente anestésico (106) y desde el siglo pasado se reconoció que su administración producía atrofia aguda del hígado. Por este motivo, el uso del CCl_4 fue abandonado. El CCl_4 como un veneno industrial preocupó a las generaciones de médicos de finales del siglo XIX y principios del XX. En el año 1921 se empezó a usar como antihelmíntico y ésto ocasionó problemas en la población así tratada. Durante los primeros años del presente siglo los estudios estuvieron

enfocados principalmente a las condiciones dietéticas que aminoraban o aumentaban el daño producido por el CCl4 (154). Sin embargo, los estudiosos del problema se han preguntado ¿por qué es el hígado el órgano preponderantemente afectado?, ¿cuál es la lesión inicial?, ¿a qué se deben la infiltración grasa y la necrosis hepatocelular con su peculiar distribución centrolobulillar y mediozonal?

Se ha establecido que la infiltración grasa del hígado de animales de experimentación tratados con CCl4, resulta de una serie de procesos muy complejos, que esquemáticamente pueden analizarse considerando las siguientes posibilidades:

1. Aumento en la llegada al hepatocito de sustratos capaces de convertirse en lípidos.

2. Disminución de la exocitosis de lípidos del hepatocito.

3. Incremento en la biosíntesis de lípidos.

4. Disminución de la oxidación intrahepática de los lípidos.

El estudio del mecanismo de acción del CCl4 ha creado controversias. Dianzani (28) estudio el daño producido por el CCl4 y propuso que se debía a una lesión en las mitocondrias (hipótesis mitocondrial). Se observó una desorganización del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria desde los 10 a 15 minutos, después de la intoxicación por CCl4. El mismo autor demostró que la fosforilación oxidativa se encontraba desacoplada. Estos resultados parecen deberse a la pérdida de los nucleotidos de nicotinamida, citocromo C, fosfato y otros

componentes. Estas mitocondrias tienen poco control respiratorio y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, así como pérdida del control de la activación de la ATPasa. Morfológicamente, las mitocondrias tratadas con CCl4 se encuentran hinchadas como se demostró por microscopía electrónica.

La validez de la hipótesis mitocondrial fue cuestionada por otros trabajos. Calver y Brody (14) confirmaron la activación de la ATPasa dependiente de magnesio de las mitocondrias hepáticas, como un fenómeno tardío en la intoxicación por CCl4. Así también se encontró en algunos experimentos que la acumulación lipídica en el hepatocito precede el daño mitocondrial, lo cual descartaría a la hipótesis mitocondrial como una alteración primaria en el mecanismo de acción del CCl4.

Otra de las hipótesis enunciadas es la de las catecolaminas (14), que atribuye los fenómenos subsecuentes a la intoxicación por CCl4, a la descarga simpática ocasionada por un efecto sobre el sistema nervioso central, de índole no determinado.

Se supone que esta descarga produciría:

a). Disminución en el flujo arterial hepático.

b). Hipoxia centrolobulillar.

c). Incremento en la movilización de ácidos grasos periféricos.

Por lo descrito anteriormente resultó lógico pensar que el bloqueo medular producido al seccionar la médula disminuiría el daño, pero no resulto así. Los bloqueadores simpáticos del

tipo de la reserpina no protegen como se esperaría contra el daño producido por CCl4, existiendo aún infiltración grasa. Por todo esto se encontró que esta hipótesis no era del todo satisfactoria.

Hay otra hipótesis que menciona que el CCl4 disminuye la síntesis de proteínas. Muchos estudios indicaron que el retículo endoplásmico es afectado en las primeras horas después de la administración del CCl4 (106). Otros estudios efectuados con isótopos radioactivos han demostrado la disminución en la captación de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La disminución en la síntesis de proteínas produciría incapacidad para que los triglicéridos salieran de la célula hepática, ya que estos componentes dejan la célula unidos a proteínas como lipoproteínas de baja densidad (121). Esta hipótesis se desvalorizó por el hecho de que otro tipo de agentes que también disminuyen la síntesis de proteínas no producen alteraciones del tipo de la infiltración grasa. Por lo tanto la disminución de la síntesis de proteínas no es por sí sola la causante de la acumulación de lípidos.

En la actualidad la teoría de la lipoperoxidación (158) ha tomado gran impulso. Se ha demostrado la formación de radicales libres ($CCl3.$) a partir de las moléculas de CCl4 en el retículo endoplásmico liso, los que actuarían sobre las cadenas de ácidos grasos poliendicos destruyéndolos. La reacción producida por los radicales libres es autocatalítica una vez iniciada (Fig. 3).

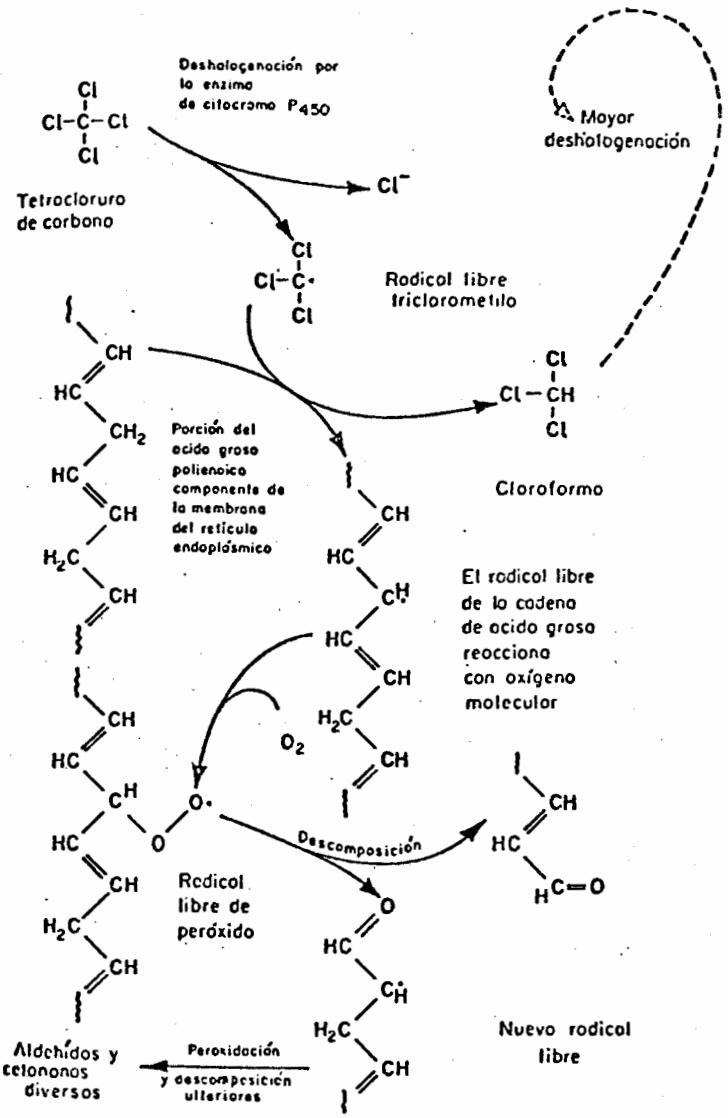


Fig. 3. Mecanismos de acción del tetracloruro de carbono.

I.3. Cirrosis y Hepatitis

Cuando el daño producido es masivo con destrucción de un número grande de hepatocitos, la pérdida subita del parénquima funcional estimula la regeneración hepática (40) (Fig. 4), la cuál es un proceso coordinado que incluye regeneración celular, síntesis y degradación de colágena, lo que da lugar a la remodelación del tejido. Si el daño es único y el paciente sobrevive debido al buen funcionamiento de las células hepáticas remanentes o por las medidas médicas utilizadas, el hígado regenera rápidamente y en pocas semanas se reestablece su integridad anatómica y funcional (12, 102). En estos casos no es posible encontrar una cicatriz en el hígado, indicando que la regeneración ha predominado sobre el proceso cicatricial.

Cuando el daño es de menor intensidad y el número de células destruídas es pequeño, es probable que no se estimule la regeneración del órgano y sólo se produzca una pequeña cicatriz. Si el estímulo es único, existe remodelación y reabsorción del tejido cicatricial. Cuando la lesión se vuelve a producir, ya sea porque el agente inductor este presente o porque se estimulen mecanismos inmunológicos que perpetúan la enfermedad, tales como la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de la membrana de los hepatocitos, antígenos virales, proteínas contráctiles del citoplasma, etc., el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero una fibrosis y posteriormente la cirrosis hepática (Fig. 4). Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente, y el fenómeno cicatricial es el predominante (112, 113).

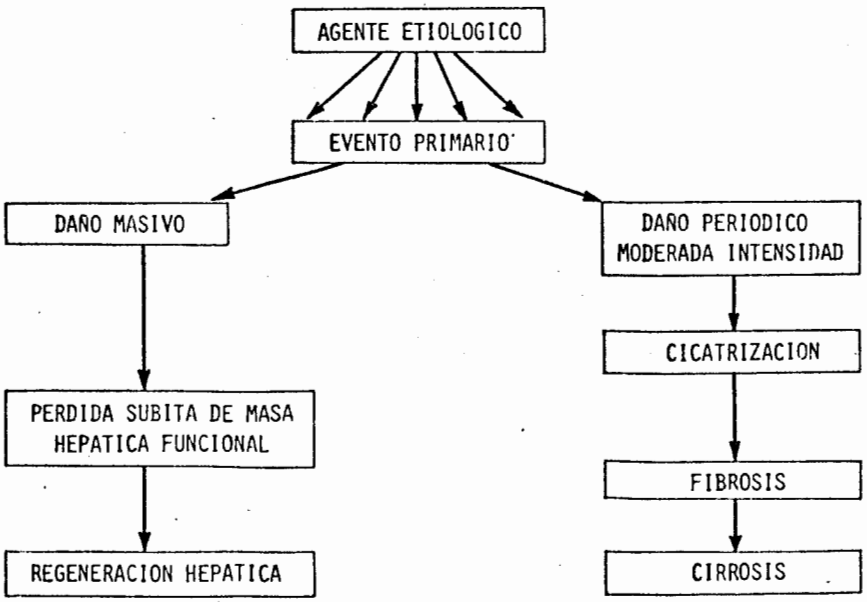


Fig. 4. Efecto de agentes hepatotóxicos.

El mecanismo exacto de la estimulación de la respuesta fibrogénica se desconoce; sin embargo hay datos experimentales que sugieren que los macrófagos desempeñan un papel preponderante en el proceso. Los agentes etiológicos actuando directamente, o a través de sustancias liberadas por los hepatocitos dañados son capaces de producir una serie de compuestos químicos de diversa naturaleza, que estimulan la producción de colágena, produciendo cambios importantes en el metabolismo del tejido conjuntivo en general (4, 5) y del glucógeno hepático en particular (89). Por otra parte, se ha encontrado que la glucoproteína llamada fibronectina que también se libera de los hepatocitos es un agente quimiotáctico que puede dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (99). El cambio en los elementos celulares (aumento de fibroblastos y células inflamatorias), así como la modificación en la matriz extracelular producida localmente, pueden estimular la producción de tejido conjuntivo cicatricial.

En la cirrosis hepática, los diversos componentes que forman el tejido conjuntivo están aumentados en la cirrosis y su distribución está alterada.

Todos los tipos de colágena hepáticos se encuentran aumentados en la cirrosis. En cuanto a su distribución, se ha observado que todos los tipos se encuentran mezclados en prácticamente todos los sitios. En especial, en las bandas de tejido conjuntivo que rodean a los hepatocitos se han demostrado todas las variedades genéticas propias del hígado.

El aumento en el tejido conjuntivo del hígado puede ser debido a un incremento en su síntesis, o a una disminución en su

degradación, o una combinación de ambos factores. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que durante las fases iniciales del proceso, la acumulación de colágena se debe preferentemente a un aumento en su biosíntesis. Tanto en hígados humanos como en hígados de animales tratados con CCl4 o infectados con esquistosomiasis, la incorporación de prolina en la colágena (31, 109, 112, 113) está aumentada. La actividad colagenolítica puede encontrarse normal o inclusive aumentada (39, 84).

Existen numerosas evidencias en la literatura que muestran que en el hígado cirrótico se presentan alteraciones a diferentes niveles; entre otros en el metabolismo del tejido conjuntivo y en las células parenquimatosas. En relación a las alteraciones que se presentan en los hepatocitos se han reportado diversas anomalías en sistemas enzimáticos incluídos en la membrana plasmática. Se ha visto que la actividad de la adenilato ciclasa se encuentra incrementada así como los niveles de AMP cíclico y como consecuencia una reducción en el contenido de glucógeno hepático, también se han reportado reducciones significativas en las actividades de las ATPasas de sodio-potasio y de calcio, que pueden conducir a severas alteraciones en el transporte de iones y de sustratos.

El problema de la regeneración hepática (intoxicación aguda con tetracloruro de carbono) se ha centrado en la búsqueda de factores que regulen dicha respuesta hepática, y en los cambios que puedan ser usados como un patrón del estado proliferativo.

Seis o quizá siete hormonas y algunos aminoácidos

parecen regular la proliferación hepática (74). Entre estas hormonas están la insulina, glucagon, factor de crecimiento epidérmico, hormona paratiroidea, calcitonina, iodotironinas y los gluco-corticoides.

Son conocidos los efectos opuestos de la insulina y del glucagon sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos en el hígado. El glucagon presenta efectos catabólicos y la insulina anabólicos; sin embargo, ambas tienen efectos sinergísticos favoreciendo la proliferación hepática.

El glucagon parece ser importante en la síntesis de fosfatidilcolina puesto que esta hormona estimula la actividad de una metiltransferasa que cataliza la transformación de fosfatidil etanolamina a fosfatidilcolina (16). Esta estimulación no se sabe si es causada por el glucagon a través de AMPc o por una acción más directa. Lo interesante es que los cambios en la acción del glucagon sobre el hepatocito pueden modificar las relaciones entre los lípidos de la membrana.

En el caso de la insulina, hasta hace muy poco tiempo, su mecanismo de acción era incierto. Experimentos recientes (64, 117, 122) parecen haber encontrado un segundo mensajero para la insulina, el cual parece ser un péptido cuyo peso molecular es aproximadamente 1000-2000 y que se genera cuando la insulina se une a su receptor; el péptido mimetiza algunas funciones de la insulina. Sin embargo hay muchas otras explicaciones acerca del mecanismo de acción de insulina y al presente se requieren más experimentos para aclarar este problema.

Con respecto a los cambios inducidos por insulina en la

composición de la membrana plasmática se conoce muy poco.

Lipoperoxidación y Alteraciones Membranales

Como ya mencionamos, la teoría moderna más aceptada para explicar la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono se basa en la facilidad de este compuesto para biotransformarse en radicales libres, por ejemplo CCl_3., por lo tanto posee una alta capacidad de reaccionar con moléculas orgánicas, tales como lípidos y provocar reacciones en cadena autocatalíticas. A este proceso se le llama lipoperoxidación.

El proceso de lipoperoxidación tiene serias consecuencias a nivel de las membranas, las cuales son extremadamente complejas e involucran no solamente a los lípidos poliinsaturados, sino también a un gran número de proteínas integrales de la membrana. Las membranas de la mitocondria y del RE tienen una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (30), tales como el ácido araquidónico (50). En consecuencia, estas membranas son extraordinariamente susceptibles al daño por lipoperoxidación. Las alteraciones en la actividad de la NADH-citocromo c reductasa y el sistema succino-oxidasa de las mitocondrias de corazón e hígado se han asociado con el daño lipoperoxidativo.

Observamos que después de la lipoperoxidación hay alteraciones en la interacción lípido-lípido y lípido-proteína, así como pérdida de la conformación estructural de las proteínas de la membrana.

Los fosfolípidos son esenciales para el normal funcionamiento de una gran variedad de enzimas microsomales como la glucosa-6-fosfatasa (32), las ATPasas (83), la UDP-

glucuroniltransferasa (47) y el sistema metabolizante de drogas (21, 45, 131, 156), por lo que resulta obvio que desde el punto de vista de daño hepático producido por CCl4, la actividad de estos sistemas enzimáticos se verá abatida, no solo por el daño lipoperoxidativo de los fosfolípidos y la alteración de la conformación estrucctural de las proteínas de la membrana, sino también por el hecho de que en la intoxicación con CCl4 se modifica la proporción de determinados fosfolípidos, lo cual trae como consecuencia un abatimiento en la actividad de diversos sistemas enzimáticos incluídos en la membrana y cambios en la microviscosidad de la misma.

Se ha demostrado (131) que una disminución en la relación colesterol a fosfolípidos disminuye la microviscosidad de la membrana y que un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos disminuye la microviscosidad. Asimismo, un incremento en la relación de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina incrementa la microviscosidad (36) y que la remodelación de las proteínas de las bicapas de fosfolípidos disminuye la microviscosidad (59).

Weddle y Hornbrook (152) han comprobado que el CCl4 disminuye el contenido relativo de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos del hígado. También se ha demostrado (130) que el CCl4 aumenta la relación de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina en homogenado de hígado.

Lamb y Schwartz (71), recientemente demostraron que el CCl4 también activa a la fosfolipasa C, conduciendo al deterioro de los fosfolípidos. Por otra parte, Moore (87) comprobó que el

CCl_4 aumenta el contenido de calcio citosólico, asociado con la pérdida de calcio del RE, con lo cuál podría entonces activarse la metilación de fosfolípidos, contribuyendo de esta manera al aumento en la fluidez de las membranas.

I.4. Drogas Utilizadas en el Tratamiento del Daño Agudo (Hepatitis)

El hecho de que el radical CCl_3. y demás radicales libres secundarios consuman las defensas endógenas e inicien el proceso de lipoperoxidación destructiva ha motivado profundas investigaciones que han conducido al descubrimiento de sustancias que aportan protección contra el proceso de lipoperoxidación destructiva. Se han descubierto una gran variedad de sustancias que no guardan relación química alguna entre sí y que protegen del proceso de lipoperoxidación por diversos mecanismos. Entre otras, destacan las siguientes:

1. Tocoferoles (vitamina E) (19, 41).
2. Etilendiaminotetra-acetato (EDTA) (136).
3. SKF-525A (44, 81).
4. Propilgalato (138).
5. Cistamina (18).
6. Dietilditiocarbamato (DEDTC) (77).
7. Selenio (30, 85).
8. Metionina (58).
9. Adenosina (54).
10. Teofilina (58).
11. Prometazina (118).

12. Difenil-p-fenilendiamina (DPPD) (29, 118).

13. Acido ascórbico (161).

14. Cimetidina (57, 80).

15. Dietilen-triamino-penta-acetato (DETAPAC) (34).

16. Glutatión (48).

17. Colchicina (111, 142).

I.5 Drogas Utilizadas en el Tratamiento del Daño Crónico (Cirrosis)

En la actualidad se ha encontrado que es posible influír favorablemente la cirrosis hepática por medios farmacológicos. Estos se basan fundamentalmente en la observación descrita en la literatura de los resultados obtenidos en estudios experimentales en animales y en humanos (62, 110, 111, 128).

Al demostrarse que, uno de los mecanismos comunes a través del cual diversos agentes etiológicos pueden dar lugar a una cirrosis, es la producción aumentada de tejido fibroso, se han empleado diversos agentes con probable actividad antifibrogénica en el manejo terapéutico de los pacientes con cirrosis (112, 113). Los agentes terapéuticos empleados incluyen:

1. Análogos de Prolina

Estos compuestos compiten con la prolina por el RNAt incorporándose así en la molécula de la colágena. La incorporación de este compuesto extraño en la moléula cambia el eje de su hélice con lo que interfieren con las reacciones de

hidroxilación. Como consecuencia no se forma la triple hélice y la colágena no se transporta a velocidad normal hacia el espacio extracelular, sino que se degrada intracelularmente.

2. Agentes Quelantes de Hierro

Estos agentes inhiben la hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina de la colágena, impiden la formación de la triple hélice y el movimiento transcelular de procolágena. No hay glucosilación.

3. Agentes Latirogénicos

Son agentes que inhiben a la enzima lisiloxidasa y por lo tanto no se forman los enlaces intra ni intermoleculares en la molécula de colágena.

4. Penicilamina

Esta droga se combina con los grupos aldehído de la molécula de colágena por lo que no se forman los enlaces intra e intermoleculares. A grandes concentraciones también inhibe a la lisil-oxidasa.

5. Corticosteroides

Los corticosteroides tienen un efecto antiinflamatorio general y también son capaces de inhibir a la enzima prolilhidroxilasa.

6. Colchicina

Entre los distintos compuestos con actividad

antifibrogénica, la colchicina es la que en la actualidad se considera con mayores posibilidades de éxito. Este compuesto es un alcaloide neutral derivado de la planta Colchicum autumnale y ha sido usado desde hace varios siglos en el tratamiento de varios padecimientos, principalmente en el de la gota. Se ha visto que el uso durante tiempo prolongado no se ha acompañado de efectos adversos serios (62).

La colchicina posee varios efectos farmacológicos que resultan benéficos para el tratamiento de la cirrosis hepática. Tiene la propiedad de impedir la polimerización de la tubulina para formar los microtúbulos y como consecuencia inhibe el transporte transmembranal de las proteínas de exportación, en especial de la colágena (33, 94). Aumenta "in vitro" la producción de colagenasa, enzima responsable de la degradación extracelular de la colágena (52). Incrementa la liberación de procolagenasa activada por proteasa.

Como consecuencia de su efecto antiinflamatorio la colchicina estabiliza las membranas lisosomales, inhibe la movilización, adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos; inhibe la citotoxicidad mediada por neutrófilos dependiente de anticuerpos, inhibe la liberación de histamina de los leucocitos e inhibe "in vitro" la liberación de cininas plasmáticas (79, 129). Se ha visto que la colchicina protege las membranas plasmáticas y estabiliza las enzimas con grupos -SH, en su centro activo (79, 129).

Se ha reportado que esta droga es capaz de modificar el sistema de adenilato ciclasa del hígado y como consecuencia los

niveles de AMPc (75, 89, 92). Otro efecto de la droga sobre la membrana es el que probablemente explica la elevación de la fosfatasa alcalina que se observa cuando se administra colchicina crónicamente (67, 89, 111).

De los datos reportados por Mourelle en 1981 (89), se observa que en el modelo de cirrosis experimental con CCl4 en ratas, el tratamiento con la colchicina regresa a valores normales los niveles de glucagon, de T3, de T4 y de AMPc que se encuentran alterados en la cirrosis, además el glucógeno hepático que está disminuido como consecuencia de la elevación del AMPc también recupera los valores normales (89).

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, se ha demostrado que pequeños cambios en el microambiente que las rodea son capaces de modificar sus actividades (8, 35, 43, 56, 61, 65, 69, 70, 127, 133, 137).

En las células hepáticas estas enzimas tienen gran importancia ya que además de regular los gradientes de cationes también controlan el transporte de nutrientes indispensables para el hepatocito (aminoácidos y azúcares) y el transporte de ácidos biliares, pues estos últimos se acoplan al transporte de sodio. Dada la gran actividad metabólica que desarrolla el hígado ésto es de gran importancia.

La ATPasa de Na^+, K^+ es una proteína incorporada a la membrana celular con una orientación asimétrica fija. El transporte activo de Na^+ y de K^+ involucra cambios conformacionales protéicos asociados con movimiento de los sitios

que unen los cationes, cambiando la accesibilidad a los sitios de la superficie opuesta de la membrana (92). Esta enzima acopla la hidrólisis de ATP a un flujo de cationes en contra de gradientes electroquímicos. La enzima actúa entonces como transductor que convierte reversiblemente energía química en gradientes electroquímicos para cationes (126). La estequiometría de la reacción es de 2 K+ introducidos por cada 3 Na+ liberados de la célula y una molécula de ATP hidrolizada.

A pesar de que el Ca+2 entra continuamente en forma pasiva a la célula, la concentración intracelular de calcio (0.1 a 1 M) se mantiene en una concentración de 3 a 4 órdenes de magnitud más baja que la del medio externo. Este hecho involucra la existencia de sistemas activos para la salida de calcio. Como la ATPasa de calcio de la membrana (76). Mediante estudios cinéticos se ha demostrado la existencia de 2 sitios catalíticos para esta enzima (95).

Es evidente que el exceso de Ca++ intracelular puede ser muy dañino para cualquier célula y que los mecanismos de defensa frente a la entrada masiva de Ca++ incluyen la baja permeabilidad de la membrana al Ca++ y la actividad de la ATPasa que bombea Ca++ hacia el exterior celular (76). En las membranas plasmáticas de los hepatocitos se ha aislado un activador diferente de la calmodulina que parece ser una proteína de la membrana (95).

La fosfatasa alcalina (F.A.) es una ectoenzima a la que no se le conoce exactamente la función biológica (160), se localiza en la superficie externa de la membrana plasmática del

hepatocito. Su actividad específica es de dos o 5 veces mayor en el dominio canalicular que en el sinusoidal de la membrana plasmática (37). Se han reportado (2) niveles elevados de F.A. en alcohólicos, en ratas tratadas con etanol (93), CCl4, D-galactosamina, alcohol alílico, faloidina, amanitina y en la hepatitis reactiva inespecífica (15, 33, 105, 135, 148).

Teschke et al (105) han reportado que el hígado graso en humanos está asociado con niveles hepáticos altos de F.A. Sin embargo el mecanismo por el cual se modifica la actividad de la F.A. permanece oscuro.

Se han observado alteraciones estructurales y funcionales en las membranas plasmáticas de los hepatocitos durante el tratamiento con alcohol (108, 157) y con CCl4 (33, 82). Estas alteraciones podrían estar relacionadas de alguna manera con la actividad de la F.A.

La gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP) es otra enzima de membrana que se encuentra en mayor abundancia en el dominio canalicular de la membrana plasmática del hepatocito. Al igual que la F.A., la GGTP se ve modificada en el daño hepático (134) por lo que sirve como indicador del mismo.

I.6. Silimarina

I.6.1. Generalidades y Estructura

La silimarina es una mezcla de sustancias extraídas del cardo mariano, Silybum marianum (L.) Gaertn. cuyo uso se remonta a la antiguedad. Esta planta pertenece a la familia asteraceae, es decir al grupo de las compuestas. El

cardo mariano no debe confundirse con los representantes del género Cardus, ya que no tiene nada en común con estas plantas, es por esto que se le prefiere llamar S. marianum (72).

El S. marianum es natural del sur de Europa, Africa del Norte y Asia Occidental y Central.

El extracto obtenido a partir de los granos de la planta es una mezcla de sustancias activas que consta de tres especies moleculares distintas (Fig. 5): silibina, silidianina y silicristina. Estas sustancias se caracterizan por poseer flavonoides y ser muy poco hidrosolubles.

La silibina representa el compuesto más activo de la silimarina aunque la silidianina y la silicristina presentan actividades cualitativas similares pero son menos potentes.

La fórmula de la silibina está representada por dos estructuras isoméricas (Fig. 5a y b), con un grupo hidroxi-2-fenil-cromanon. Se distinguen de otros flavonoides, en particular de los dihidroflavonoides por la condensación con un alcohol coniferílico (149).

I.6.2. Estudios Farmacológicos

La silibina y los otros constituyentes de la silimarina son rápidamente conjugados en el hígado con sulfatos y ácido glucurónico. Los conjugados pasan al plasma y a la bilis con una recuperación mayor al 80% de la dosis administrada I.V. Esto nos señala la existencia de un ciclo enterohepático: absorción intestinal, conjugación hepática, excreción por la bilis, receptación por el intestino, hidrólisis por la flora intestinal

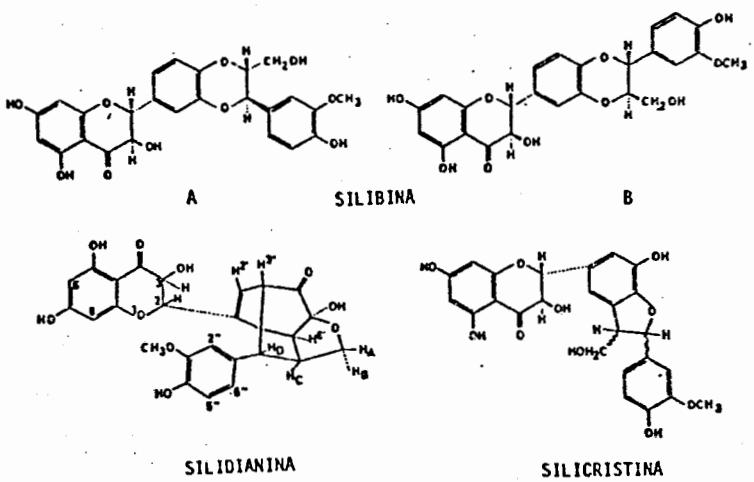


Fig. 5. Especies moleculares presentes en la silimarina.

y se repite el ciclo (72).

Los estudios de las propiedades farmacológicas de la silimarina pueden dividirse en tres partes: los ensayos de toxicidad, las características generales y los aspectos particulares.

a). Ensayos de Toxicidad.

La dosis letal 50 de la silimarina (solubilizado en forma de hemisuccinato de Na) por vía intravenosa es de 400 mg/kg para el ratón, de 385 mg/kg para la rata y de 140 mg/kg para el perro. Estas dosis no son fijas, ya que dependen del período de infusión, si esta es lenta se pueden administrar 2 g/kg a la rata en 2-3 hrs. (72). Por vía intragástrica la tolerancia es mayor, la DL 50 en la rata por esta vía está alrededor de los 450 mg/kg.

El perro y la rata reaccionan a dosis de hasta 30 mg/kg con hipotensión arterial y bradicardia que pueden suprimirse, en gran medida, con atropina aunque nada hace suponer que la silimarina tenga un componente de acción simpaticomimética. La causa primaria (aunque no la única) de muerte tras la administración de dosis letales de silimarina debe verse en una acción inotrópica negativa sobre el miocardio, como se deduce de los experimentos in situ y de los realizados en preparaciones de Langendorff de corazón aislado (147).

b). Propiedades Generales.

La silimarina protege in vivo a los mastocitos contra la acción degranulante del 48/80. Por lo mismo la silibina no se comporta como un aminoliberador a diferencia de ciertos bioflavonoides. Suprime la liberación de serotonina debido a su efecto "estabilizador de membranas". Su efecto sobre

la liberación de aminas podría explicar su acción parasimpaticomimética.

c). Propiedades Particulares.

Las propiedades particulares de la silimarina se refieren a su efecto hepatoprotector. Vogel fue el primero en demostrar el efecto hepatoprotector de la silimarina en daño hepático experimental provocado por faloidina (143-146).

Posteriormente su efecto protector y curativo fue confirmado en animales intoxicados con tetracloruro de carbono (147), tioacetamida (49), D-galactosamina (120), etanol (96), fenilhidrazina (139), halotano (125), praseodynium y otros lantánidos (132). También ha sido utilizada en la hepatectomía parcial quirúrgica (78) y en la clínica en diferentes tipos de esteatosis y otros tipos de enfermedades hepáticas (38).

En el caso de la regeneración hepática (hepatectomía parcial quirúrgica) la silimarina aumenta desde el segundo y tercer día el peso del hígado con relación a los controles (78). El incremento es pequeño pero significativo. La silimarina previene considerablemente el aumento de la actividad de enzimas séricas causado por la D-galactosamina. Incrementa la conversión de UDP-hexosamina a UDP-acetylhexosamina en el hígado y facilita la normalización del contenido del ácido UDP-glucurónico en el hígado de las ratas (135).

La silimarina y la silibina (el compuesto más activo de la silimarina) son eficaces en prevenir la muerte de perros intoxicados con faloidina (148). Estos son los animales que más

se asemejan al hombre en la intoxicación con faloidina.

En el caso de la intoxicación con alcohol la silimarina normaliza los niveles de glutatión reducido, glutatión oxidado y el cociente entre ambos (140).

El halotano aumenta la actividad de varias enzimas séricas características de daño hepático. Entre estas enzimas se encuentra la sorbitol deshidrogenasa, la alanina amino transferasa. La silibina es capaz de revertir este efecto (125).

La administración en ratas, de praseodimiun, cerium y lanthanum produce un aumento dosis dependiente en la actividad de las enzimas séricas: transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y sorbitol deshidrogenasa (SDH). La silibina disminuyó considerablemente (aunque no totalmente) la anormalidad en las actividades enzimáticas antes mencionadas. También atenuó el incremento en la retención de la bromosulphtaleina y previno la acumulación de triglicéridos hepáticos inducida por el praseodimiun (132).

En cuanto al mecanismo de acción de la silimarina se sabe poco, sin embargo la mayoría de los autores están de acuerdo en que por lo menos uno de los efectos de la silimarina es a nivel de membrana (27) (147).

La acelerada renovación de la membrana (durante la administración de silimarina) se acompaña de un incremento en la actividad fosfatasa alcalina. La hipótesis más probable según Desplaces (27) indica que el cambio en la actividad de la F.A. se debe a un cambio provocado por la silimarina en la membrana, modificando su estado, posiblemente "estabilizándola". Esto podría llevarse a cabo modificando la composición lipídica, tal

vez disminuyendo el cociente colesterol/fosfolípidos, como lo hace la colchicina (159). Sin embargo, esto no está aún aclarado y hacen falta más estudios para proponer un mecanismo de acción.

II. OBJETIVO

Como se mencionó en el punto I.4., las membranas y sus lípidos son primordialmente afectados frente a los agentes hepatotóxicos. También sabemos la importancia de la integridad de la membrana y de la proporción que deben guardar los diferentes lípidos para el óptimo funcionamiento de las enzimas membranales, sistemas de transporte, receptores para hormonas, sistemas de mensaje y muchos procesos más, involucrados en el daño hepático.

La silimarina es una droga considerada hepatoprotectora, se ha usado principalmente en intoxicación con faloidina (143-146) en donde resulta muy eficaz. Sin embargo no existe suficiente información acerca de su uso en intoxicaciones con CCl4 y no existe ningún estudio acerca de la influencia de la silimarina en el daño agudo y crónico con CCl4 en la composición lipídica de la membrana.

El objetivo del presente trabajo consistió precisamente en estudiar los cambios producidos por el CCl4 en la composición lipídica de la membrana plasmática del hepatocito y su modificación por la silimarina. Este estudio abarcó tanto a la intoxicación aguda como crónica con CCl4.

También se hicieron cortes histológicos de hígado, con el fin de demostrar el daño hepático.

En los casos en los que se encontraron alteraciones en la composición lipídica se midieron enzimas de membrana para correlacionar el cambio en los lípidos con la actividad enzimática.

III. JUSTIFICACION

Un gran número de agentes químicos y biológicos pueden inducir daño hepático. Algunas hepatotoxinas son productos del metabolismo de plantas, hongos o bacterias, otras son minerales. Muchos son productos, subproductos o desperdicios de la industria química o farmacéutica. El daño hepático se puede llevar a cabo en una variedad de circunstancias. Algunas toxinas naturales tales como los péptidos de Amanita phalloides, alcaloides de perrolizidina, se pueden encontrar como contaminantes occidentales en la dieta. Otras como las micotoxinas son ingeridas debido a condiciones climáticas y a prácticas culturales en algunas partes del mundo, favoreciendo su presencia como contaminantes en los alimentos.

Los hepatotóxicos químicos también pueden ser ingeridos como contaminantes accidentales en la dieta. Este fenómeno es ilustrado por la epidemia "Epping Jaundice" en Inglaterra causada por la contaminación de un gran suplemento de harina con 4,4'-diamino-diphenyl metano (145); y por la enorme cantidad de personas con daño hepático y porfiria en Turquía por la ingestión de trigo al cual se le había agregado hexaclorobenceno como fungicida (68).

La exposición doméstica a hepatotóxicos puede resultar de la inhalación o ingestión accidental o suicida de tóxicos conocidos (CCl_4, fosforo elemental, sales de cobre), o debido a prolongadas sobredosis de algunos agentes medicinales (acetaminofen, sulfato ferroso) (20, 63, 68, 119).

Varios agentes hepatotóxicos han sido utilizados en la

industria (hidrocarburos clorados, compuestos nitroaromáticos, nitrosaminas, arsenicales inorgánicos, cloruro de vinilo) (10, 116, 119, 163), aunque en la actualidad a los agentes a los que se les reconoce hepatotoxicidad potencial se les utiliza con mucha precaución, además dentro de los subproductos industriales, desechos y pesticidas que contaminan el medio ambiente, se encuentran hepatotoxinas conocidas (11, 63).

El daño hepático debido a agentes medicinales es una de las facetas de hepatotoxicidad de mayor interés para la clínica, ya que existen un gran número de drogas que pueden producir daño hepático como resultado de un error en el tratamiento o debido a prolongadas sobredosis (63, 97, 163).

Por otra parte sabemos que la cirrosis hepática constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. Mientras que en el hemisferio oriental resulta como consecuencias de la esquistosomiasis hepatoesplénica (150); en el hemisferio occidental el alcoholismo es el responsable de más del 60% del total de muertes atribuibles a cirrosis hepática (24, 40). Rojkind (114) ha reportado que en México y en los Estados Unidos de Norte América, la cirrosis hepática es la tercera causa de muerte de individuos de ambos sexos entre 30 y 60 años de edad, y que la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando.

La hepatotoxicidad experimental es una faceta de relevancia singular y de gran importancia en la medicina humana y en la veterinaria (162). También la hepatología experimental provee modelos para el estudio de fenómenos bioquímicos, fisiológicos, patológicos, farmacológicos y clínicos.

El desarrollo de métodos de diagnóstico hepatológico está basado en la hepatotoxicología experimental.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1. Intoxicación Aguda con CCl4

Se usaron ratas Wistar macho cuyo peso oscilaba entre 200 y 250 g y se les administró por vía intragástrica, una solución de CCl4 en aceite de maíz (1:1, v/v) (88) a razón de 0.5 ml/100 g de peso. Los animales se sacrificaron 24 hs después de la intoxicación.

IV.2. Intoxicación Crónica con CCl4 (88)

Se usaron ratas Wistar macho, cuyo peso oscilaba inicialmente entre los 50 y 75 g y se les inyectó por vía intraperitoneal 0.15 ml de la solución de CCl4 en aceite mineral cada tercer día, durante 8 semanas o más según se indique en los resultados, con el siguiente protocolo:

1a. Semana: CCl4: aceite 1:7.
2a. Semana: CCl4: aceite 1:6.
3a. Semana: CCl4: aceite 1:5.
4a. en adelante Semana: CCl4: aceite 1:4.

el aceite utilizado fue nujol (aceite mineral-Sigma). Los animales se sacrificaron 3 días después de la última administración.

Este esquema de intoxicación fue diseñado con el fin de mantener aproximadamente la misma dosis por gramo de peso de las ratas durante todo el proceso.

IV.3. Tratamiento con Silimarina

IV.3.1. En el Daño Agudo

La silimarina se administró en forma de suspensión en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.7% a una dosis de 200 mg/kg i.p. conjuntamente con el CCl4. También se hizo un grupo control que recibió únicamente silimarina y otro únicamente con el vehículo (CMC).

IV.3.2. En el Daño Crónico

La silimarina se administró también en suspensión de CMC al 0.7% pero a una dosis de 50 mg/kg p.o. 5 veces a la semana durante el período de tiempo que se indica en el apartado de resultados.

IV.4. Determinación del Grado de Lipoperoxidación (13)

La lipoperoxidación se midió cuantificando el malondialdehído formado con el ácido tiobarbitúrico (MDA).

Se hizo un homogenado de hígado en agua tridestilada (1:9) P/V.

Una muestra de homogenado conteniendo 5 mg de proteína se llevó a 1 ml con Tris-HCl 0.15 M, pH 7.4 y se incubó 30 min a 37 C. Se agregó 1.5 ml de ácido tricloroacético al 20% (ajustando a pH 2.5 con KOH) y 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8%. Las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo por 45 minutos y posteriormente se les agregó 1 ml de KCl al 2%.

El complejo colorido formado se extrajo con una mezcla

butanol-piridina (15:1, v/v) y se leyó a 532 nm.

El coeficiente de extinción molar (E) del complejo malondialdehído-tiobarbitúrico es 1.56×10^{5} cm^{-1} M^{-1}.

$\varepsilon = 1.56 \times 10^{5}\ cm^{-1}\ M^{-1}$

$c = \frac{A}{\varepsilon l}$ l = grosor celda (depende del espectro)

IV.5. Obtención de las Membranas (91)

Las ratas se anestesiaron con éter y se les extrajo el hígado; 10 g de hígado se picaron con tijeras, agregándoseles 25 ml de NaHCO3 1 mM y se homogeneizaron en un homogenizador Dounce de vidrio (émbolo flojo) mediante 8 golpes fuertes de émbolo. Cada 20 g de hígado tratado de esta manera se juntaron y se les añadieron 450 ml de NaHCO3 1 mM. Esta suspensión se agitó durante 3 minutos, y se filtró a través de 2 capas de gasa. Este filtrado se pasó ahora a través de 4 capas de gasa. El nuevo filtrado se distribuyó en botellas de centrífuga de 250 ml, y se centrifugó a 1500 x g a 4 C. El sobrenadante se descartó y la pastilla se homogenizó con 3 golpes suaves en el mismo homogeneizador; 48 ml de este homogenado se mezclaron con 62 ml de sacarosa al 69% y se ajustó para que quedara con un índice de refracción igual al de una solución de 44% 0.1% de sacarosa, esto con un refractómetro ABBE.

Veinticinco mililitros de esta suspensión se colocaron en tubos de centrífuga (Rotor SW 27) cuya capacidad es de 38.5 ml y se les agregó sacarosa al 42% en el volumen necesario para llenar el tubo con el objeto de formar un gradiente discontinuo. Se centrifugó durante 150 minutos a 25,000 rpm a 4 C. El material que flotó después de la centrifugación se recogió con una espátula con forma de cuchara. Este material flotante se

pasó a través de jeringas con agujas No. 18 primero y después del No. 20. A esta fracción le hemos llamado "membranas parcialmente purificadas".

Las pastillas se resuspendieron en NaHCO 1 mM y se almacenaron en un congelador Revco a -70 C hasta su utilización.

IV.6. Extracción de Lípidos (151)

A n ml de muestra se añadieron lentamente a 5 x n ml de metanol en matraz con agitación suave durante 30 min. A temperatura ambiente.

Se añadieron 5 x n ml de cloroformo agitando vigorosamente. Después de 15 min se filtraron los solventes por papel Whatman No. 1. Se regresó el residuo al matraz y se extrajo 2 veces más en la misma forma. Se combinaron los filtrados y se evaporaron a sequedad bajo corriente de en N2 a 25-37 C. El residuo se extrajo con cloroformo, metanol y KCl 0.1 N en la proporción (5:3:2) x n.

Se agitó en embudo de separación y se extrajo la fase orgánica (inferior), se evaporó en atmósfera de Na.

Se resuspendió en 0.5 x n ml de benceno.

IV.7. Preparación de las Placas para Cromatografía en Capa Fina (151)

Las placas para identificar los lípidos se prepararon como sigue:

41 g de sílica gel G-60.

4.5 g de sulfato de amonio.

103 ml de H2O.

En cada caso la suspensión se colocó sobre placas de vidrio de 20 cms x 20 cms con el aparato formador de placas.

Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente 24 hs antes de usarse.

Cromatografía en Capa Fina (151)

Para separar las diferentes especies de fosfolípidos se usó el siguiente sistema de solventes:

Cloroformo :	Metanol :	Acido Acético :	Agua
90	20	9	5

la cámara se dejó saturar durante 2 horas.

IV.8. Cromatografía de Fosfolípidos (151)

Se aplicaron sobre las placas 10 ul del extracto de lípidos totales. Una vez secas las manchas, las placas se introdujeron en las cámaras con el sistema de solventes anteriormente descrito y saturadas. El solvente se dejó llegar hasta 14 cms por arriba del punto de aplicación. El tiempo de corrida aproximado fue de 1 hora.

IV. 9. Identificación de las Especies de Lípidos

Para identificar las diferentes especies de lípidos se realizaron las siguientes pruebas:

a). Fosfatidil serina (PS): se identificó mediante el uso de un estándar puro del fosfolípido (Sigma) y por su reacción especifica con ninhidrina. Una solución de ninhidrina 1% en butanol se roció por encima de la placa. La placa se calentó a

120 C por 10 min. La mancha correspondiente dió un color violeta.

b). Fosfatidil etanolamina (PE): se usó un estándar puro del fosfolípido (Sigma) y también se corroboró con la prueba de ninhidrina.

c). Fosfatidil colina (PC): se usó también un estándar puro sintético-dipalmitoil lecitina y se le identificó con el reactivo de Dragendorff específico para grupos amino cuaternarios.

d). Esfingomielina (SPH): se hizo mediante un estándar puro (BDH) y con la reacción de Dragendorff. El color que dió la prueba de Dragendorff fue amarillo.

e). Fosfatidil inositol (PI): se usó un estándar puro (Applied Science Laboratories) que igual que en los casos anteriores se juntó con el extracto.

IV.10. Determinación Cuantitativa de los Diferentes Fosfolípidos Separados (149)

Una vez separados los lípidos por cromatografia e identificados con los estándares, las manchas se rasparon y se colocaron en tubos especiales libres de fósforo, posteriormente se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

a). Reactivos:

KH_2PO_4 10 mM en H_2SO_4 0.1 N.

$Mg(NO_3)_2\ 6H_2O$ 10% P/V en etanol.

HCl 0.1 N.

Acido ascórbico 10% P/V (fresco).

Molibdato de amonio al 0.42% en H_2SO_4 1 N.

b). Se tomó 1 ml de la solución de KH_2PO_4 y se llevó a 100 ml con agua (100 nmoles/1 ml). De esta solución se colocaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml. Estos estándares se colocaron en tubos especiales para fósforo (al igual que las muestras).

Tanto a las muestras como a los estándares se les trató de la siguiente manera:

1. Se calcinó con 30 ul de $Mg(NO_3)_2$ $6H_2O$.
2. Se agregó 0.3 ml de HCl 0.1 N.
3. Se hirvió 15 minutos a ebullición.
4. Se agregó 0.3 ml de H_2O tridestilada.
5. Se agregó 0.2 ml de ácido ascórbico 10%.
6. Se agregó molibdato de amonio (1.2 ml).
7. Se incubó a 37 C 30 minutos.
8. Se leyó a 820 nm.

Se hizo la curva estándar y se calculó el contenido de fósforo inorgánico en las muestras (equivalente a la concentración molar del fosfolípido.

IV.11. Determinación de Colesterol (1)

Se preparó una solución estándar de colesterol 100 mg/100 ml (1 Ug/UI) en cloroformo.

Se colocaron alícuotas por duplicado de 30, 50, 70, 100 y 150 ul de este estándar en tubos con tapón. Se evaporó el cloroformo bajo corriente de Na.

Se colocaron 100 ul de membrana en tubos con tapón de vidrio, tanto a los estándares como a las muestras. Se les agregaron 2.5 ml de KOH alcohólico preparado de la siguiente

manera:

10 g KOH + 20 ml H2O (solución stock).

De esta solución stock se tomaron 6 ml y se les agregó 94 ml de etanol. Esta mezcla se preparó en el momento.

Se taparon los tubos, se agitaron y se incubó a 37-40 C por 55 minutos.

Se colocaron los tubos en hielo y se agregaron 5 ml de éter de petróleo frío, se agitó y se adicionaron 25 ml de H2O.

Se agitó durante 1 minuto.

Se dejó sedimentar hasta romper la emulsión y se tomó una alícuota de 4 ml de la fase de éter de petróleo (superior) y se evaporó a baño maría (50 C), se terminó de secar bajo corriente de N2.

Se preparó el reactivo de Liebermann Buchand como se describe a continuación:

20 volúmenes de anhídrido acético se enfriaron en hielo, se agregó 1 volumen de H2SO4 concentrado, se agitó y se agregaron 10 volúmenes de ácido acético. El reactivo se puso a temperatura ambiente y se utilizó al momento.

Se añadieron 2 ml del reactivo a cada tubo de muestra o estándar y se incubó a 25 C por 30 minutos se leyó a 620 nm en el espectrofotómetro.

Se hizo la curva estándar y se calculó el contenido de colesterol en las muestras.

IV.12. Determinación de Proteínas por el Método de Bradford (9)

Reactivos:

Acido fosfórico	85%	100 ml.
Etanol	95%	50 ml.
Azul de Coomassie G-250		100 mg.
H2O CSP		1000 ml.

Se hizo un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml., se hicieron estándares de 10-25-50-75-100 ul, y se tomaron las muestras.

Tanto los estándares como la muestras se llevaron a 100 ul. Se añadieron 2.5 ml de reactivo, se agitó y se leyó a 595 nm en el espectrofotómetro.

IV.13. Determinación de Enzimas

a). La fosfatasa alcalina se midió con la técnica de Berger y Rudolph (6).

b). La gamma-glutamil transpeptidasa se midió con el método de Glossmaun y Neville (46).

c). La medición de la ATPasa de Na+/K+ se llevó a cabo con el método de Pullman y Penefsky (100-101).

IV.14. Incorporación de Fosfolípidos a Membranas Plasmáticas

El fosfolípido disuelto en algún solvente se colocó en un tubo (tubo 1) de ensayo y se evaporó bajo corriente de N2.

Una vez seco el fosfolípido, se le añadió un buffer tris-HCl, pH 7.4 que contenía 1% de octil glucósido. Se agitó en un vortex hasta que todo el fosfolípido se solubilizó.

En otro tubo (tubo 2) se colocaron 100 ul de membrana, se le agregó tris-HCl 7.4 y octil glucósido para tener una concentración final de 1% de detergente y un volumen del doble del tubo 1. Se agitó para solubilizar la membrana.

El 50% del volumen del tubo 2 se virtió en el tubo 1, se agitó y se incubó 30 min a 37 C para permitir la fusión.

Se diluyó 1:1 la membrana remanente del tubo 2 con tris-Hcl 7.4, octil glucósido 1% para tener aproximadamente la misma concentración de membrana en ambos tubos.

Se hizo un control con membranas y tris-HCl 7.4 sin detergente. Se midieron las enzimas y se determinó proteína en los 3 tubos: membrana + buffer, membrana + detergente, membrana + detergente + fosfolípido.

IV.15. Tratamiento Estadístico de los Datos y Significancia de las Diferencias

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo de ratas fueron promediados obteniéndose la media (M) el error estándar de la media (EEM) y se compararon con los valores promedio del grupo control respectivo. Las diferencias entre el grupo control y los tratados se compararon estadísticamente utilizando la prueba "t" de student para muestras pareadas (156).

En el caso de las regresiones lineales se calculó el coeficiente de correlación y además se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) para la regresión lineal simple (156).

En ambos casos se tomó como diferencia significativa cuando fue $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

V.1. Daño Agudo

La figura 6 muestra que el CCl4 administrado en dosis aguda aumentó la lipoperoxidación hepática casi 4 veces con respecto al control ($p < 0.005$), cuando se administró silimarina conjuntamente con el CCl4 se previno parcial pero significativamente ($p < 0.005$) este efecto.

En la figura 7 se muestra un corte de hígado de rata control en el que se observa la integridad del parénquima y la clásica estructura poliédrica de los hepatocitos; 24 hs después de la intoxicación aguda con el CCl4 se observó necrosis del parénquima, pérdida de la estructura lobular, hinchazón de células y vaciamiento celular (Fig. 8). La silimarina también previno parcialmente las alteraciones estructurales causadas por el CCl4 (Fig. 9), notándose en los cortes correspondientes que las zonas de daño fueron menores.

El colorante Rojo Sudán tiñe selectivamente de rojo las zonas del tejido que tienen acumulaciones de grasa. En la figura 10 se muestra un corte de hígado de rata control que prácticamente no presenta acumulación de grasa. En la figura 11 se muestra un corte de hígado de una rata intoxicada con CCl4 en la que se aprecian grandes acumulaciones de grasa, principalmente cerca de la vena central, zona por la que entró el CCl4. La figura 12 muestra un corte de hígado de rata tratada conjuntamente con silimarina y CCl4; en la que se observa una situación intermedia en donde las acumulaciones de grasa están limitadas a pequeñas zonas.

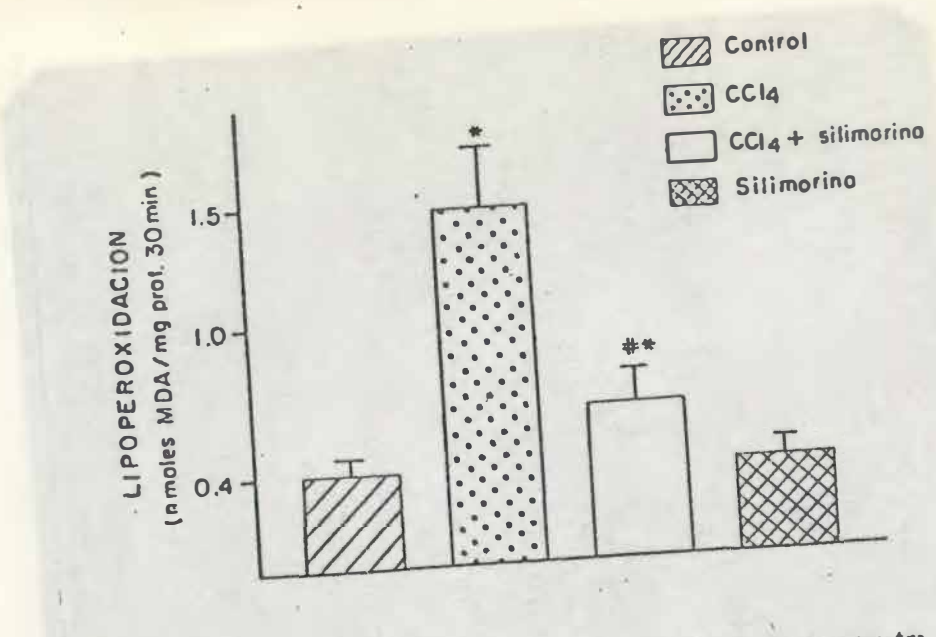


Fig. 6. Grado de lipoperoxidación en homogenados de hígados de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina. Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina 200 mg/kg) i.p.

Los resultados se muestran como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el control.
\# Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo de CCl_4.

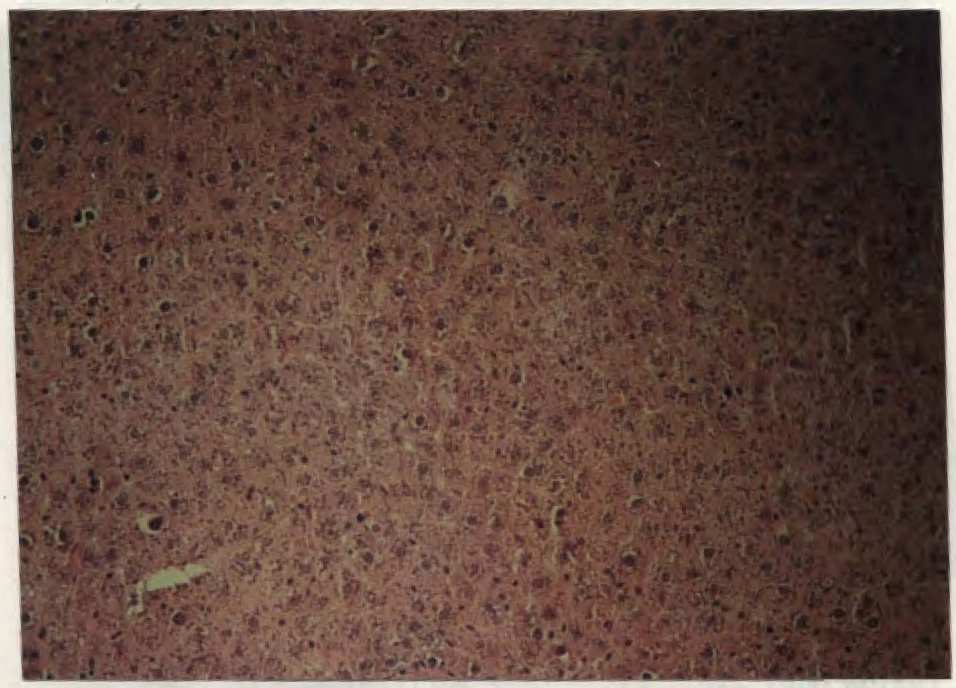


Fig. 7. Tinción de hematoxilina-eosina en un corte de hígado de rata control.

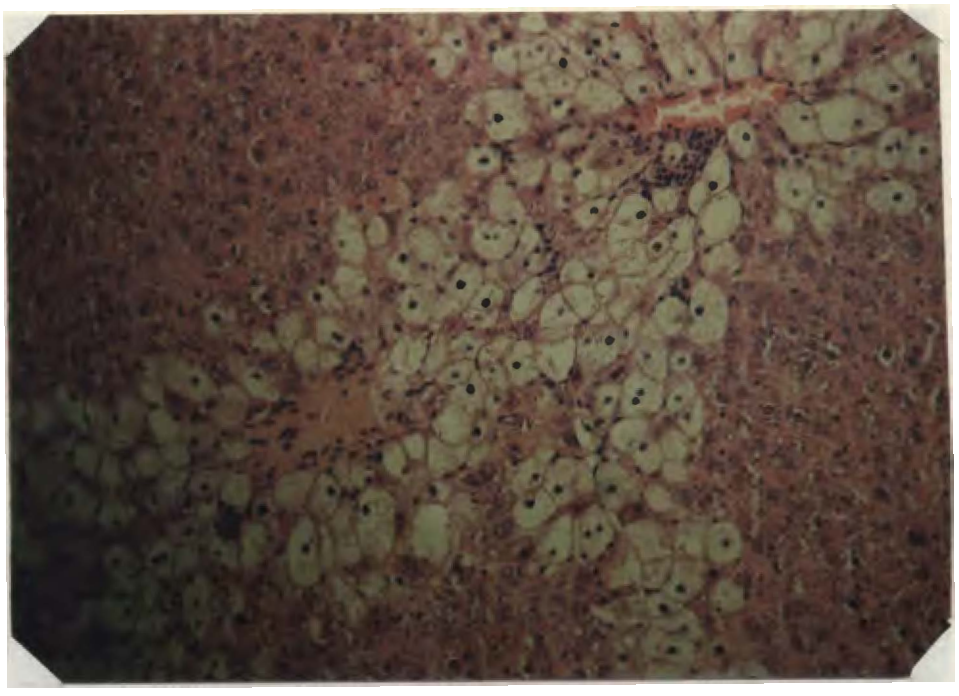


Fig. 8. Tinción de hematoxilina-eosina en un corte de hígado de rata tratado con CCl_4 (4 g/kg) p.o.

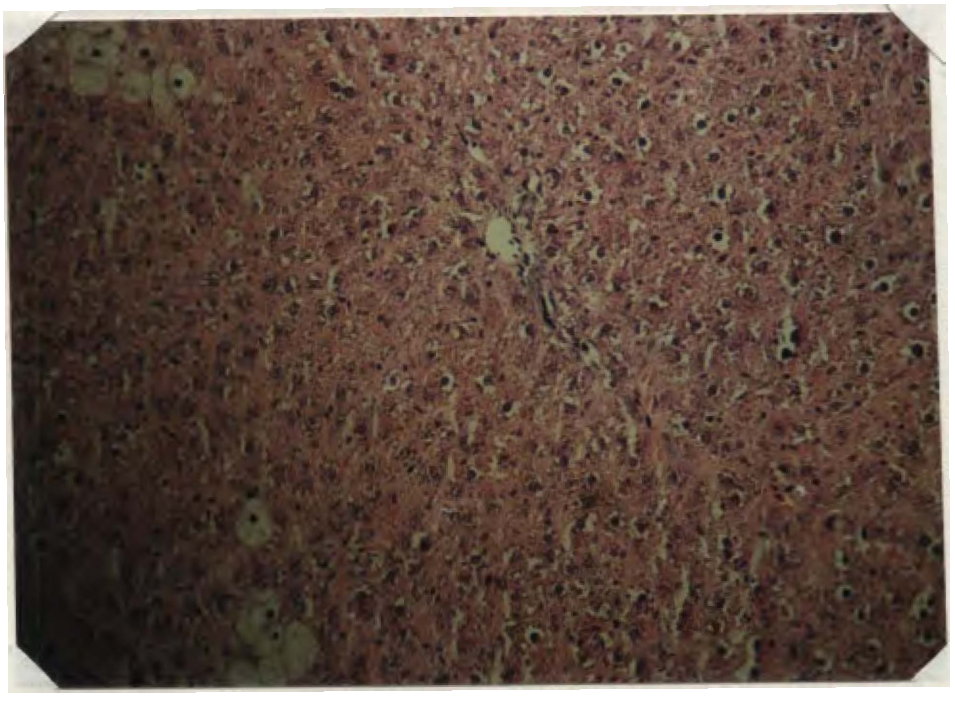


Fig. 9. Tinción de hematoxilina-eosina en un corte de hígado de rata tratada con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y silimarina (200 mg/kg) i.p.

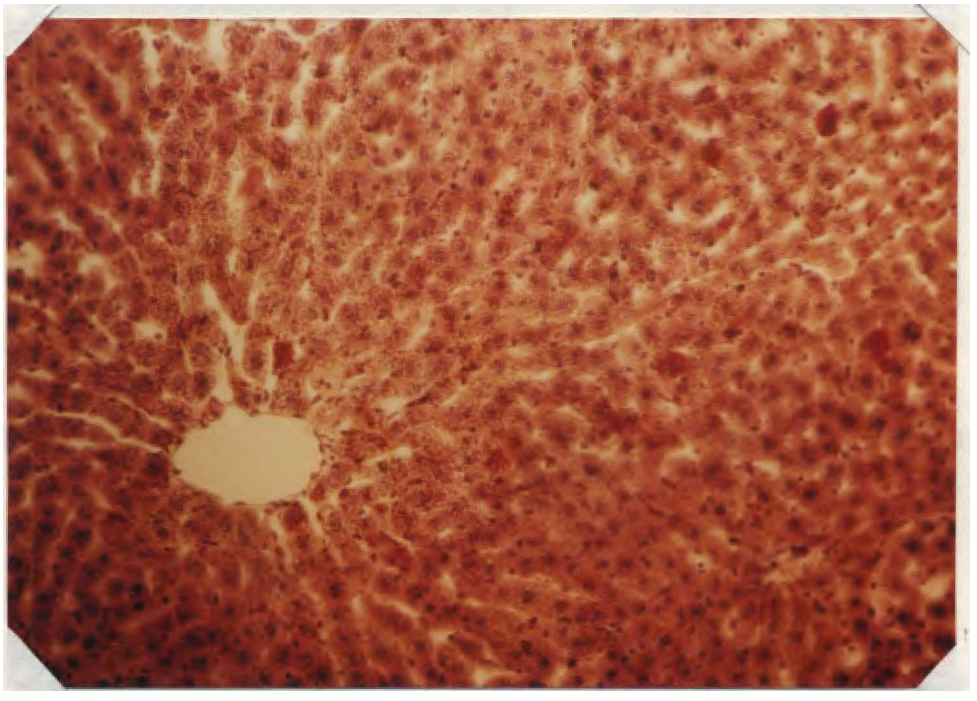


Fig. 10. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata control.

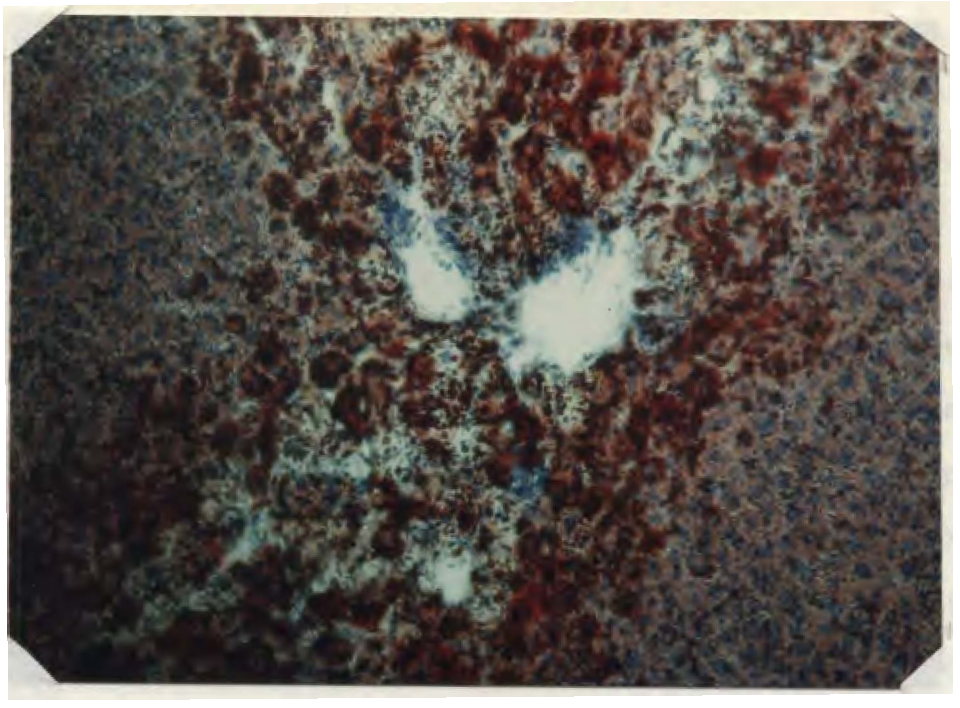


Fig. 11. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratada con CCl_4 (4 g/kg) p.o.

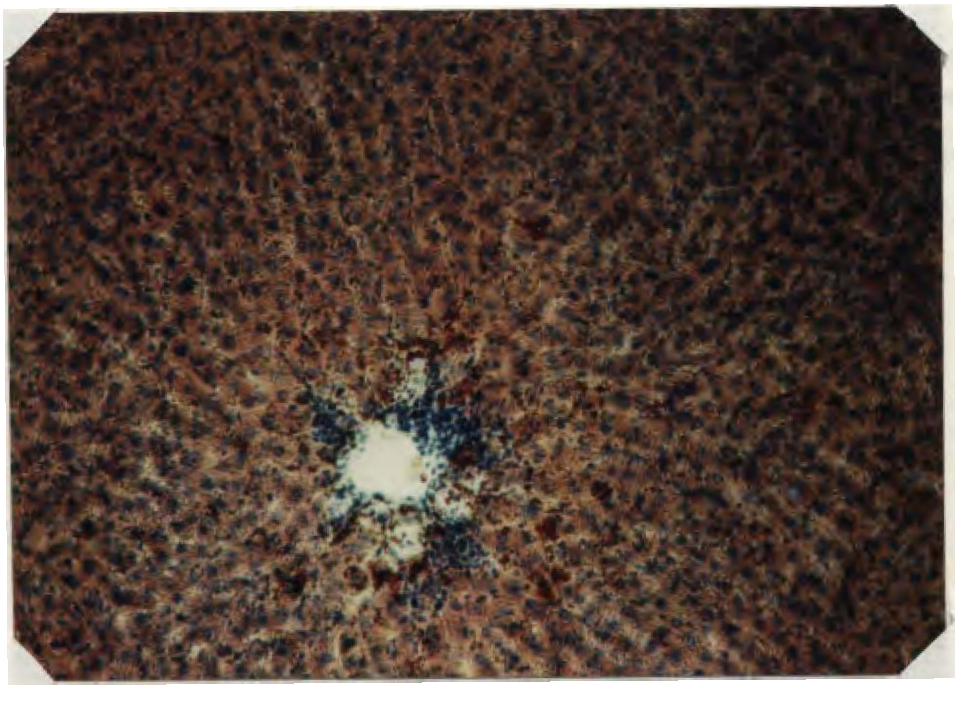


Fig. 12. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratado con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y con silimarina (200 mg/kg) i.p.

Cabe mencionar que los cortes de hígados de ratas tratadas únicamente con silimarina no mostraron diferencias con relación a los controles que solo recibieron el vehículo.

La figura 13 muestra las relaciones colesterol/proteínas (CH/Prot.), fosfolípidos/proteínas (PL/Prot.) y colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en las membranas plasmáticas aisladas de hepatocitos de ratas. Como se puede apreciar, el CCl4 disminuyó significativamente ($P < 0.005$) el contenido de colesterol, incrementó el de fosfolípidos ($P < 0.005$) y por lo tanto disminuyó el cociente CH/PL ($p < 0.005$). La silimarina administrada junto con el CCl4 no fue capaz de prevenir estos cambios.

Cuando se midió la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en las membranas plasmáticas de ratas tratadas con CCl4 se presentó una actividad casi un orden de magnitud inferior al control ($p < 0.005$) (Fig. 14). La silimarina previno totalmente esta caída y además por sí sola elevó la actividad de la FA 3 veces por encima del control ($p < 0.005$) (Fig. 14).

La GGTP membranal (Fig. 15) también mostró una actividad mucho menor (25 veces) comparada con la de los controles ($p < 0.005$). La silimarina previno parcial pero significativamente ($p < 0.005$) la caída de la actividad de esta enzima causada por el CCl4 (Fig. 15).

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis de los fosfolípidos realizado en las membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas control, tratadas agudamente con CCl4, tratadas con CCl4 + silimarina y ratas que únicamente recibieron

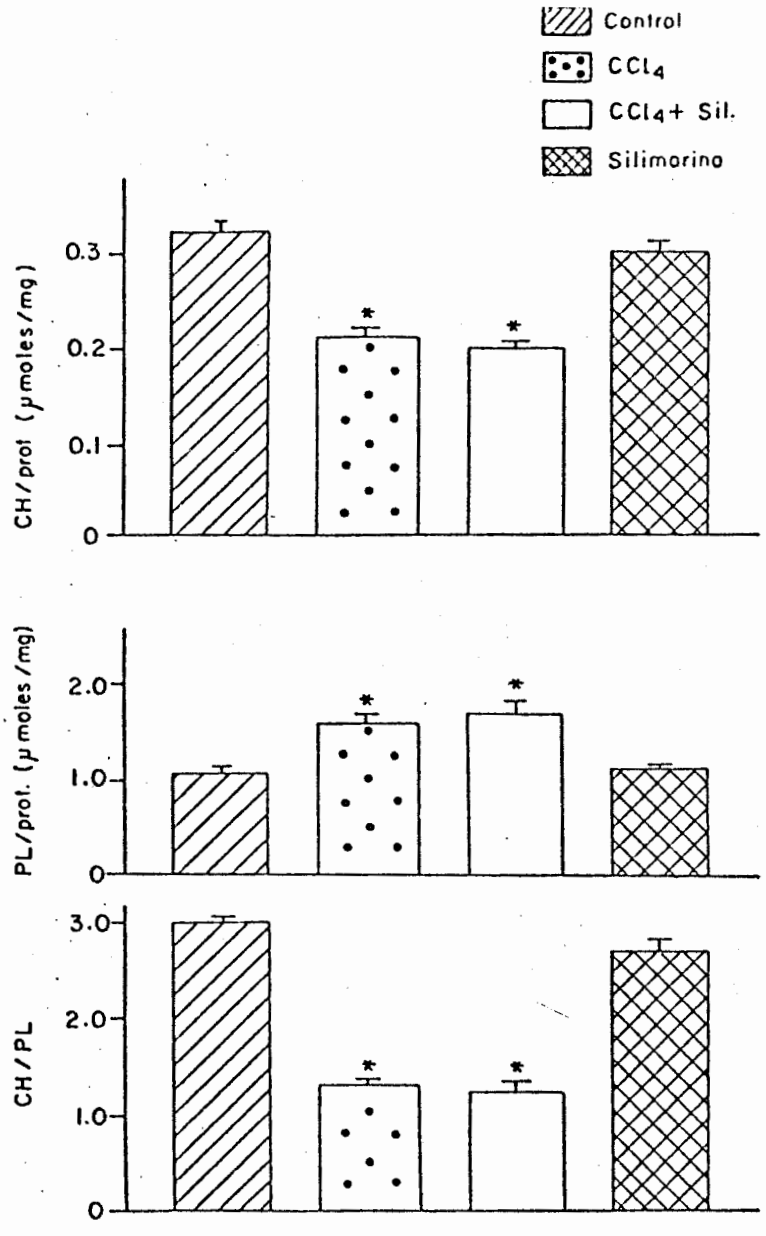


Fig. 13. Relaciones colesterol/proteína (CH/Prot.), fosfolípidos/proteína (PL/Prot.) y colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo de CCl_4.

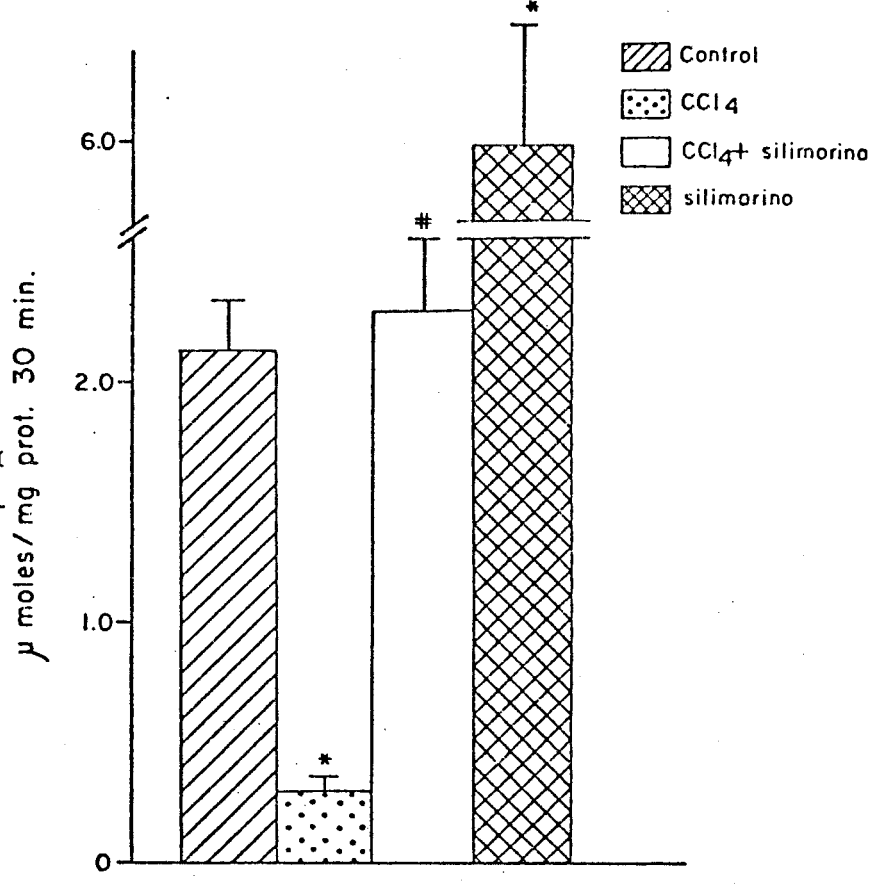


Fig. 14. Actividad de la fosfatasa alcalina (F.A.) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina. Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo de CCl_4.

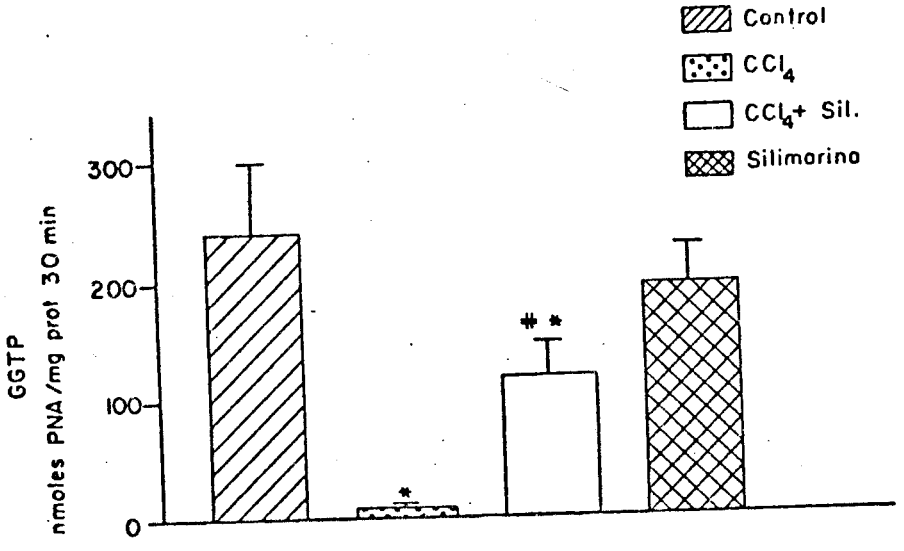


Fig. 15. Actjvidad de la gama-glutamil transpeptidasa (GGTP) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 24 horas después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo de CCl_4.

silimarina. Los fosfolípidos que mostraron cambios significativos en los diferentes tratamientos fueron el fosfatidilinositol (FI) y la fosfatidiletanolamina (FEA). Estos cambios se encuentran graficados en las figuras 16 y 17, el contenido se expresó como % con respecto al total de fosfolípidos en las muestras.

El CCl4 condujo a una disminución en el contenido porcentual de la FEA, esta caída fue prevenida en su totalidad mediante la administración conjunta de silimarina ($p < 0.005$) (Fig. 16).

Con relación al contenido de FI se puede ver que fue mayor en las membranas del grupo tratado con CCl4 ($p < 0.05$) y que la silimarina fue capaz de prevenir parcialmente este incremento ($p < 0.05$). En este caso, la silimarina "per se" no alteró el contenido de FI (Fig. 17).

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, los lípidos determinan el microambiente para las enzimas embebidas en la membrana y regulan la actividad de éstas. Por lo tanto es importante observar si existen correlaciones entre la actividad de la F A membranal con los cambios en el contenido de los lípidos, así también con el cociente fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (FC/FEA).

En la Fig. 18 se muestra la variación de la actividad de la FA membranal con el contenido porcentual de FEA de la membrana. Cada punto graficado corresponde a los valores experimentales obtenidos al analizar las membranas de los diferentes grupos de tratamientos (control, CCl4, CCl4 + silimarina y silimarina). Es importante notar el alto

Tratamiento / Fosfolípido	Control	CCl_4 (4g/kg)	CCl_4 (4g/kg) + Silimarina (200 mg/kg)	Silimarina (200 mg/kg)
Fosfatidilinositol %	14.8 ± 0.8	33.7 ± 1.8*	24.7 ± 0.9#*	11.8 ± 0.6
Esfingomielina %	10.3 ± 1.5	9.0 ± 1.2	6.6 ± 0.6	7.6 ± 0.7
Fosfatidilserina %	12.0 ± 0.4	9.1 ± 1.2	4.2 ± 0.3	6.7 ± 0.9
Fosfatidilcolina %	33.5 ± 1.1	30.8 ± 2.7	36.6 ± 0.7	33.6 ± 1.6
Fosfatidiletanolamina %	30.6 ± 2.0	21.7 ± 2.1*	27.8 ± 0.5#	39.5 ± 2.5*

TABLA 1. Contenido de fosfolípidos en las membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.
Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el control.

\# Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CCl_4.

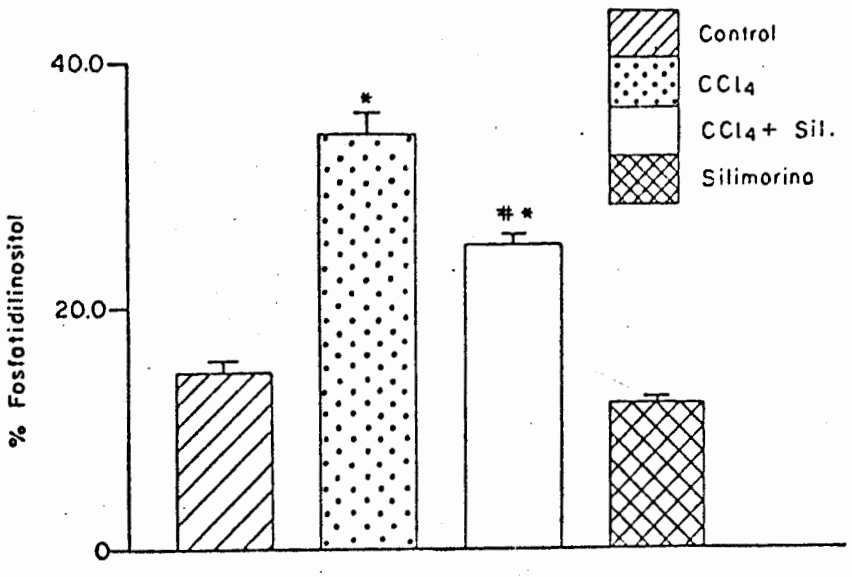


Fig. 16. Contenido de fosfatidilinositol en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el control.

\# Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CCl_4.

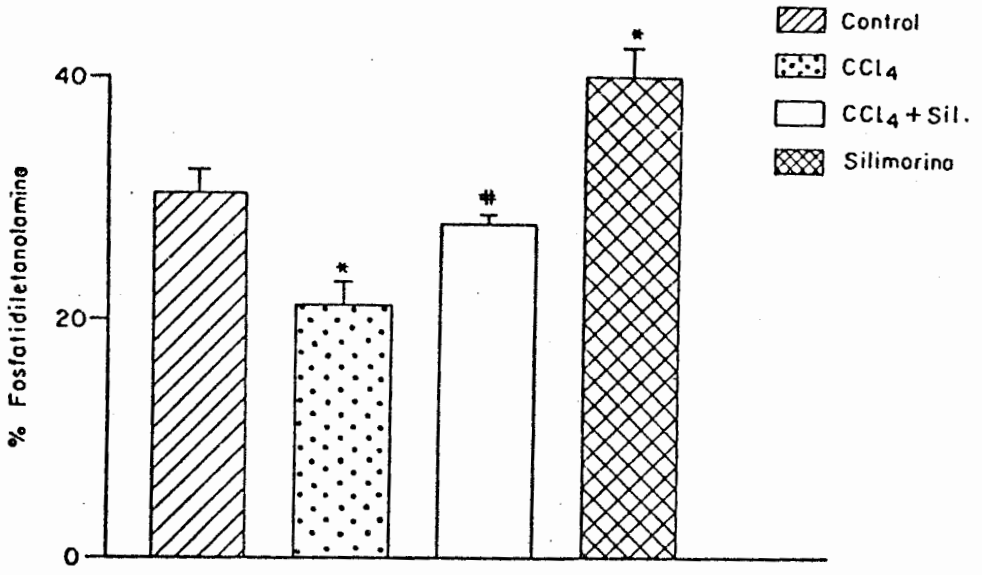


Fig. 17. Contenido de fosfatidiletanolamina (FEA) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 24 hrs. después del tratamiento con CCl_4 (4 g/kg) p.o. y/o silimarina (200 mg/kg) i.p.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el control.

Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CCl_4.

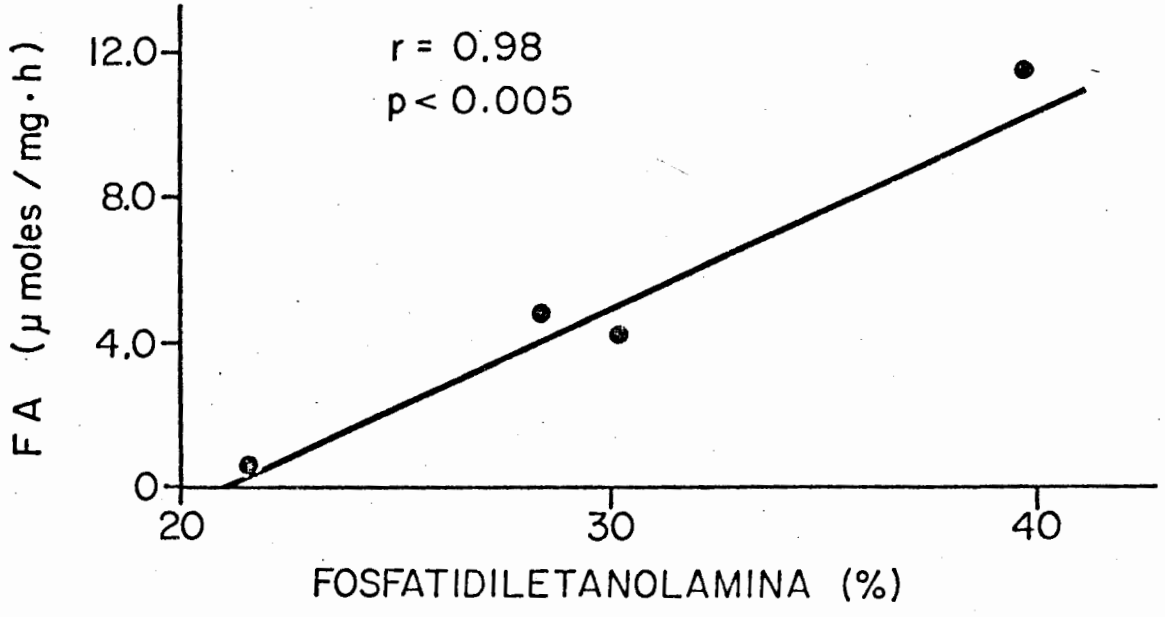


Fig. 18. Correlación entre la actividad de la F.A. y el contenido de fosfatidiletanolamina (FEA) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas.

Cada punto corresponde al promedio de por lo menos 5 ratas que recibieron diferentes tratamientos (control, CCl_4, CCl_4 + silimarina, silimarina).

La p se calculó mediante un análisis de varianza para regresión lineal simple.

coeficiente de correlación ($r = 0.98$) y la probabilidad altamente significativa ($p < 0.005$) obtenida al aplicar el método de análisis de varianza (ANDEVA) para esta regresión lineal simple.

De manera similar, al graficar el cociente FC/FEA con respecto a la actividad de la F.A. membranal se encontró una correlación buena ($r = 0.99$) con una probabilidad de ($p < 0.025$) (Fig. 19).

Con el objeto de verificar si efectivamente existía una correlación entre la actividad de la FA y el contenido de FEA de la membrana como parecían indicar los resultados de los tratamientos (Fig. 18), se planearon experimentos en los cuales las membranas se enriquecieron artificialmente con FEA y posteriormente se midió la actividad de la FA (Fig. 20 y Tabla 2).

En la tabla 2 y la figura 20 se puede apreciar que cuando se incorporó FEA a las membranas, la actividad de la F.A. aumentó más de un 50% ($p < 0.005$). Este efecto es específico del añadido del fosfolípido ya que el detergente utilizado para solubilizar no tuvo efecto por sí solo sobre la actividad de la enzima. También es importante señalar que el fosfolípido no se utiliza como sustrato por parte de la enzima. Este efecto parece ser específico para la FEA ya que al añadir FS la actividad no se modificó.

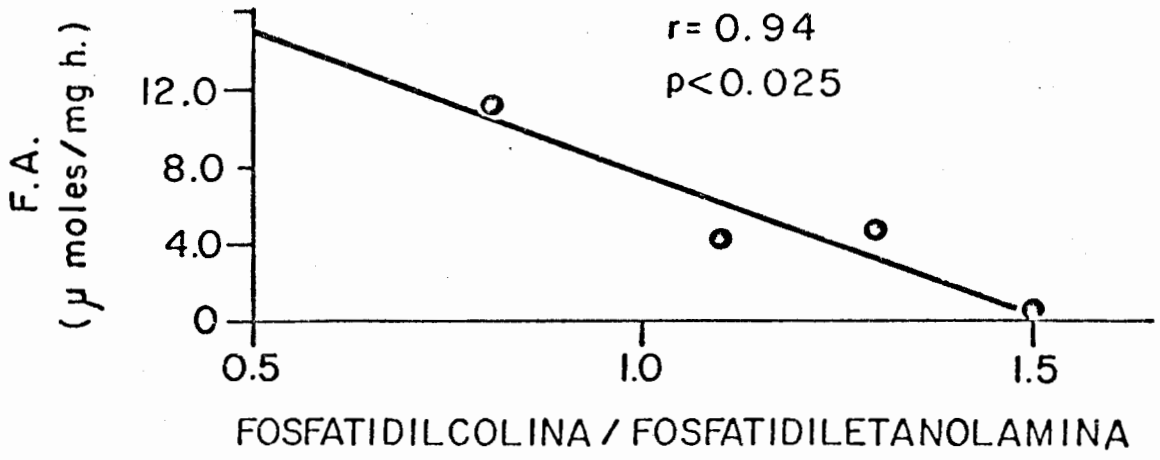


Fig. 19. Correlación entre la actividad de la F.A. y el cociente FC/FEA en membranas plasmaticas de hepatocitos de ratas.

Cada punto corresponde al promedio de por lo menos 5 ratas que recibieron diferentes tratamientos (control, CCl_4, CCl_4 + silimarina, silimarina).

La p se calculó mediante un análisis de varianza para regresión lineal simple.

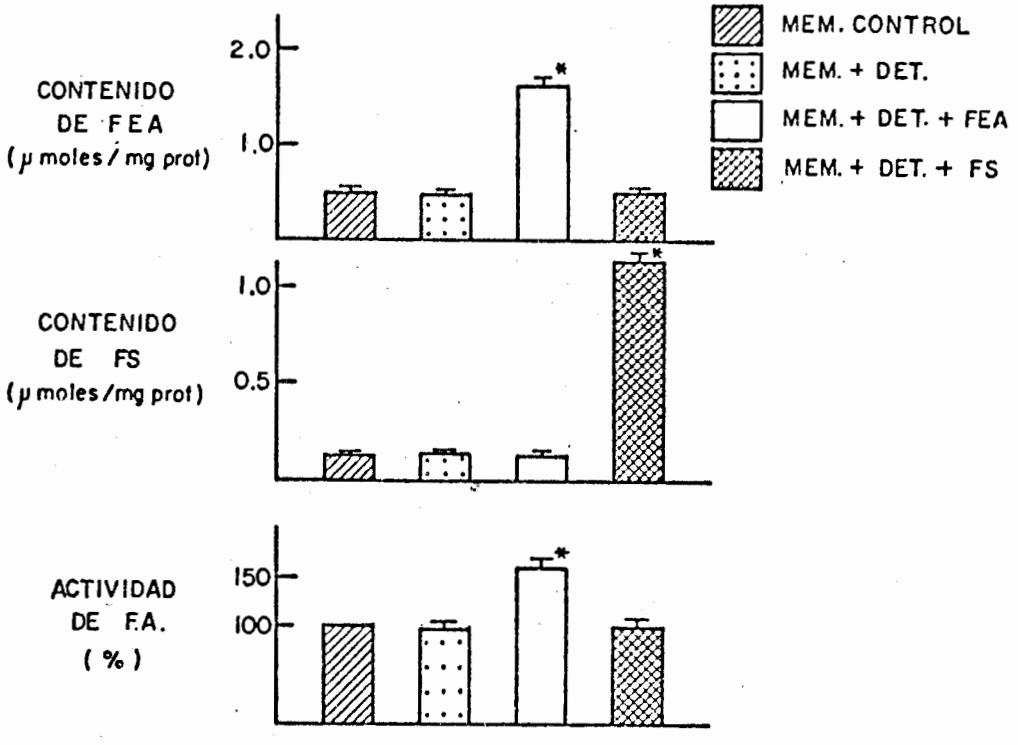


Fig. 20. Modulación de la actividad de la F.A. en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas por la FEA.

Los fosfolípidos se agregaron disueltos en octil glucósido (1%).

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

V.2. Daño Crónico

V.2.1. Capacidad de la Silimarina para Prevenir el Daño Crónico por CCl4

En este esquema experimental la silimarina se administró conjuntamente con el CCl4 durante 8 semanas de tratamiento.

La administración crónica de CCl4 para producir cirrosis, incrementó 3 veces el grado de lipoperoxidación en los homogenados de hígados de ratas tratadas comparadas con los controles ($p < 0.01$). La silimarina administrada conjuntamente con el CCl4 nuevamente previno el incremento en la lipoperoxidación ($p < 0.025$) (Fig. 21).

En la figura 22 se muestra un corte de hígado de rata cirrótica procesada con la técnica de Rojo Sudán para visualizar la grasa que se tiñe de rojo. Nótece la presencia de grandes acumulaciones de grasa principalmente en la periferia de los nódulos.

Los cortes de hígado de ratas protegidas con silimarina y teñidos con Rojo Sudán (Fig. 23) muestran menos acumulación de grasa que la que se observa en aquellos del grupo que sólo recibió CCl4.

Mediante la tinción con ácido tricrómico de Mallory se visualizó la colágena teñida selectivamente de color azul. El corte de hígado de la figura 24 pertenece a una rata control y se nota que sólo se tiñó de azul alrededor de la vena central. En un corte de hígado de rata cirrótica (Fig. 25) se hacen evidentes las gruesas bandas de colágena formando nódulos de hepatocitos

	FEA µmol/mg Prot.	FS µmol/mg Prot.	FA % de Actividad
Membranas Control	0.48 ± 0.04	0.12 ± 0.03	100
Membranas + Octil Glucósido	0.47 ± 0.03	0.13 ± 0.02	95.4 ± 3.2
Membranas + Octil Glucósido + FEA	1.6 ± 0.05*	0.13 ± 0.02	157.1 ± 7*
Membranas + Octil Glucósido + FS	0.47 ± 0.03	1.26 ± 0.05*	97.2 ± 4.1

TABLA 2. Modulación de la actividad de la F.A. en membranas plasmaticas de hepatocitos de ratas a las que se les agregó FEA o fosfatidilserina (FS) puros.
Los fosfolípidos se agregaron disueltos en octil glucósido (1%).
Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.
* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

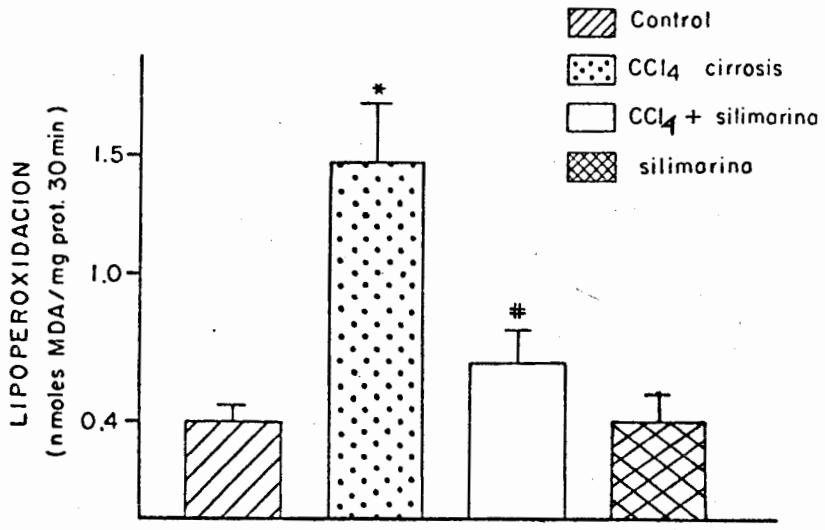


Fig. 21. Grado de lipoperoxidación en homogenado de hígado de ratas tratadas crónicamente con CCl_4 y/o silimarina.
Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y silimarina (50 mg/kg) p.o. diario.
Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.
* Significa $p < 0.01$ comparado con el control.
# Significa $p < 0.025$ comparado con el grupo CCl_4.

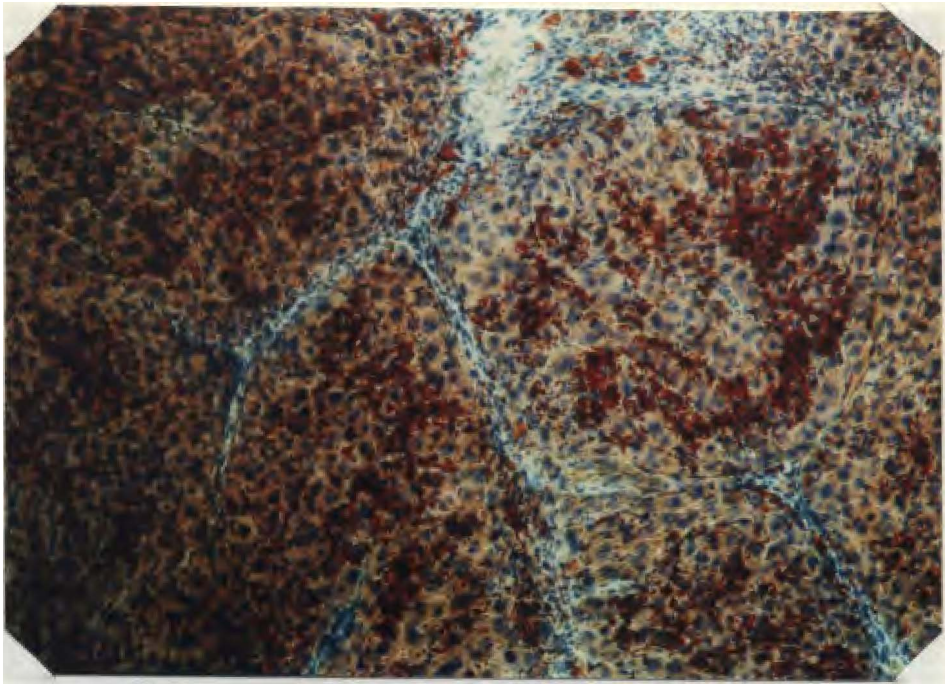


Fig. 22. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata cirrótico (8 semanas).

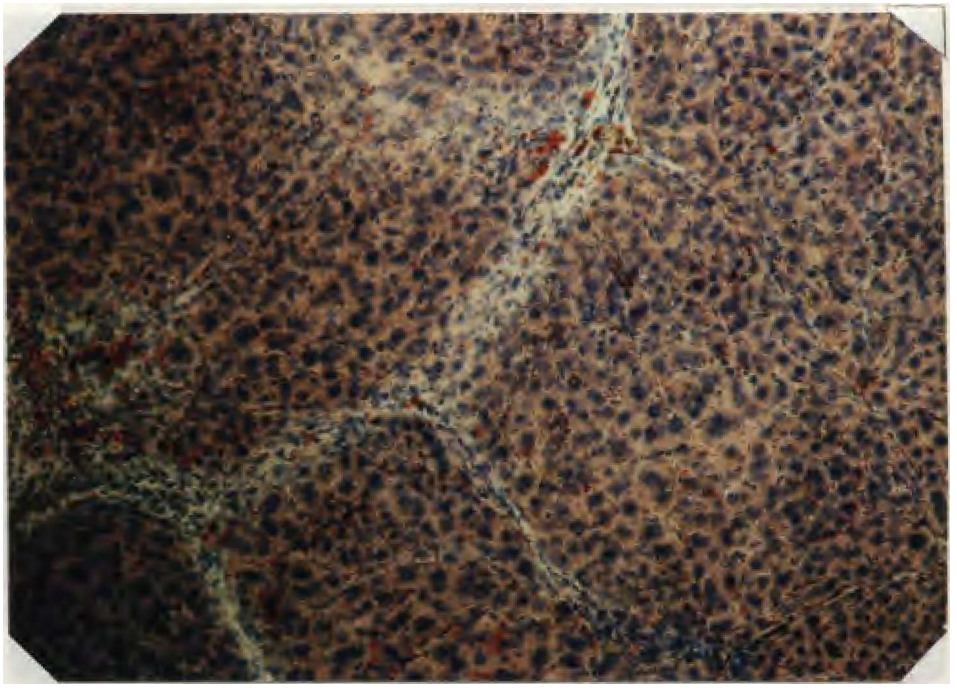


Fig. 23. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratada crónicamente con CCl_4 y silimarina (50 mg/kg) p.o. diario (8 semanas).

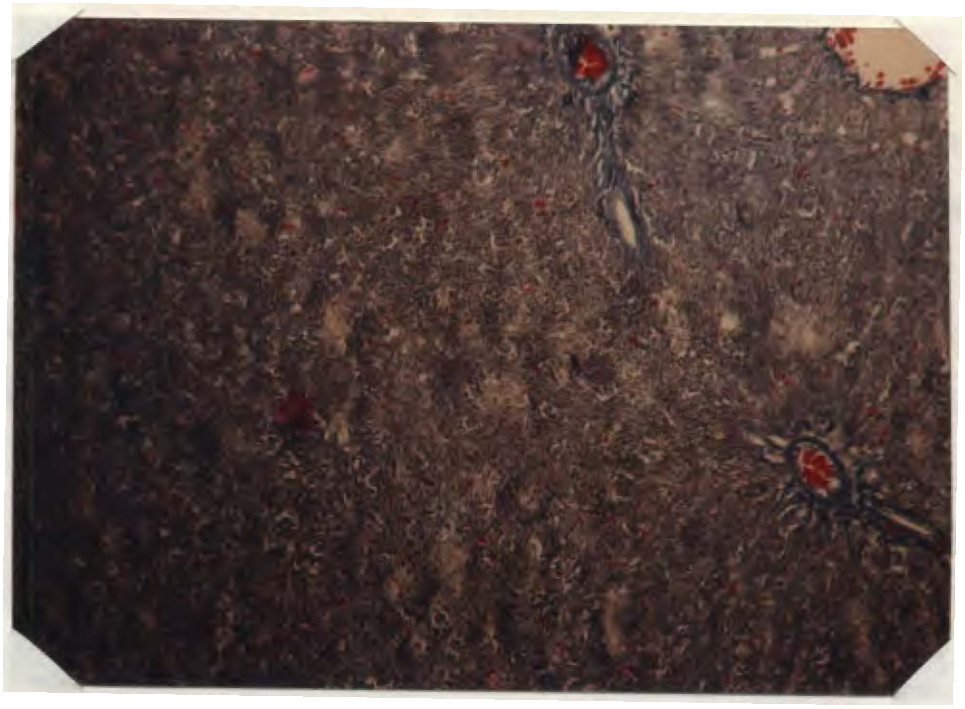


Fig. 24 Tinción para colágena en un corte de hígado de rata control.

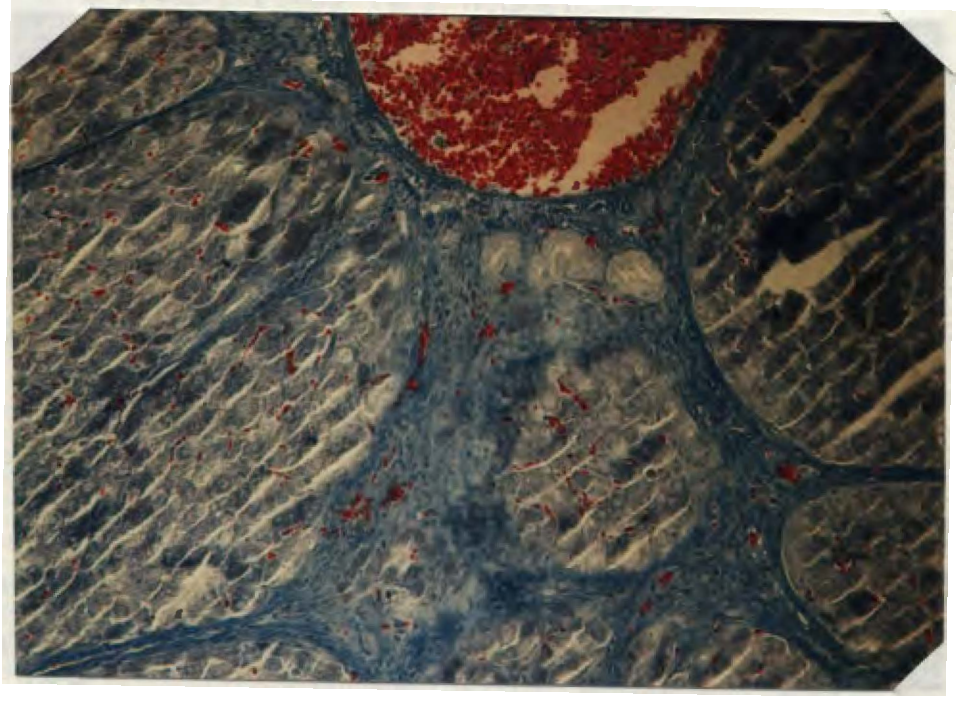


Fig. 25 Tinción para colágena en un corte de hígado de rata cirrótica (8 semanas).

atrapados.

Las bandas de tejido conjuntivo observadas en los cortes de hígados de ratas que recibieron CCl4 + silimarina fueron notablemente más delgadas (Fig. 26) que las observadas en ratas cirróticas que se trataron únicamente con CCl4.

Las relaciones colesterol/proteínas (CH/Prot.) fosfolípidos/proteínas (PL/Prot.) y colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en las membranas plasmáticas aisladas después del tratamiento crónico se representan en la figura 27. A diferencia de lo que sucedió en el daño agudo, en la cirrosis el contenido de colesterol/proteína de las membranas plasmáticas aumentó significativamente ($p < 0.005$) con respecto al control, los fosfolípidos, en cambio, no se vieron modificados. Como consecuencia de estos cambios el cociente CH/PL también aumentó. La administración conjunta de CCl4 + silimarina previno eficazmente estas alteraciones ($p < 0.005$).

La tabla 3 nos muestra el porcentaje de los diferentes fosfolípidos determinados en las membranas plasmáticas de los hepatocitos de ratas cirróticas y tratadas con silimarina. El único cambio observado fue en el contenido de FEA que se encontró ligeramente disminuído ($p < 0.05$) en las membranas cirróticas, y en el grupo que recibió CCl4 + silimarina éste fue similar al control (Fig. 28).

A diferencia de lo que sucedió en la administración de una dosis única de silimarina, la administración crónica de éste no aumentó el contenido porcentual de FEA en las membranas (Fig. 28).

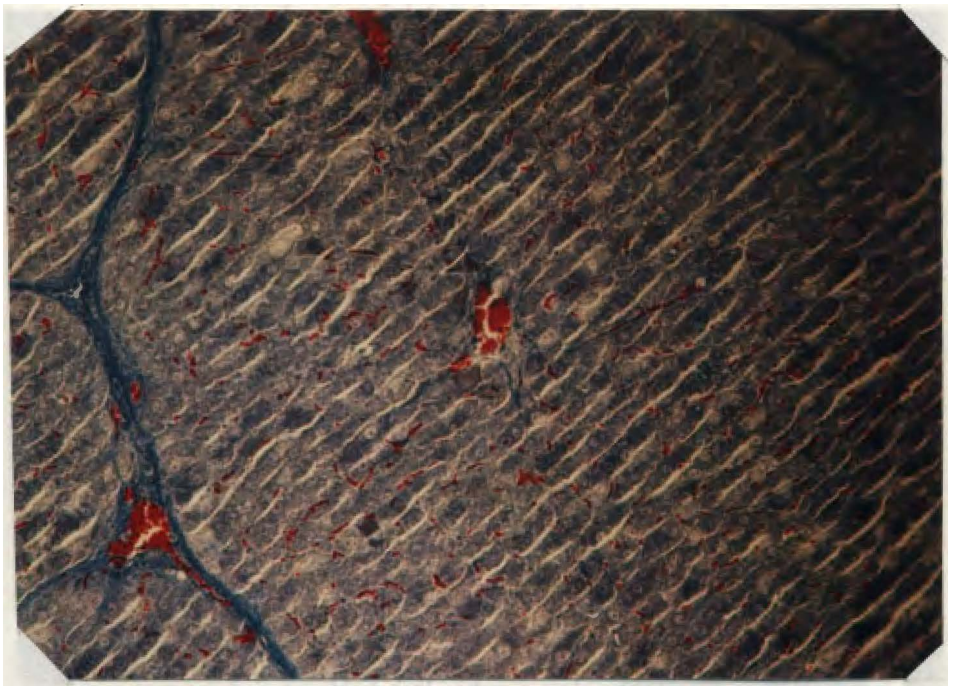


Fig. 26 Tinción para colágena en un corte de hígado de rata tratada crónicamente con CCl_4 y silimarina (50 mg/kg) p.o. diario.

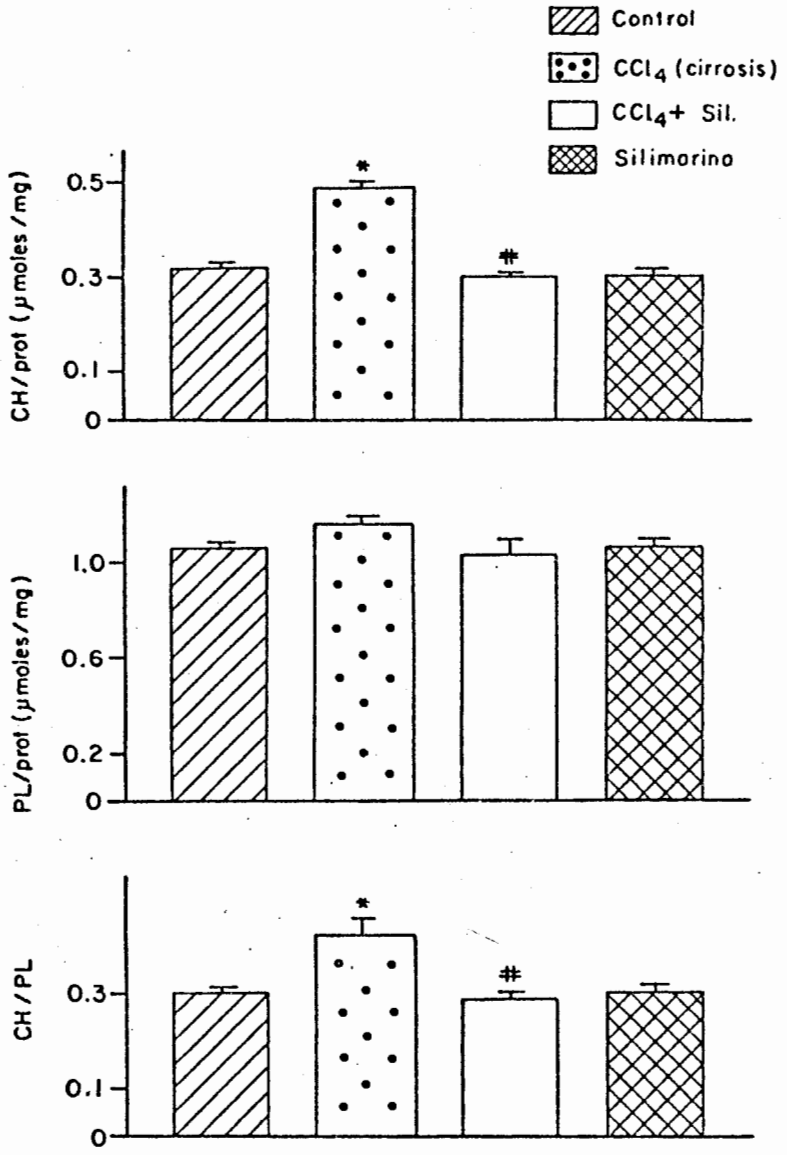


Fig. 27. Relaciones colesterol/proteína (CH/Prot.), fosfolipidos/Proteína (PL/Prot.) y colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 cronicamente, CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y/o silimarina (50 mg/kg) p.o. diario.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl_4 crónico.

Fosfolípido	TRATAMIENTO Control	Cirrosis	Silimarina + Cirrosis	Silimarina
Fosfatidil inositol %	14.8 ± 0.8	12.9 ± 0.2	12.0 ± 0.7	12.5 ± 0.6
Esfingomielina %	10.3 ± 1.5	13.5 ± 0.5	9.2 ± 0.5	11.5 ± 0.5
Fosfatidil serina %	12.0 ± 0.4	11.7 ± 0.5	8.6 ± 0.5	10.5 ± 0.6
Fosfatidil colina %	33.5 ± 1.1	37.6 ± 0.7	36.5 ± 0.8	36.9 ± 0.8
Fosfatidil etanolamina %	30.6 ± 2.0	25.3 ± 0.8*	31.4 ± 1.0#	29.1 ± 1.0

TABLA 3. Composición fosfolipídica de membranas plasmáticas de hepatocitos de hígados de ratas tratadas cronicamente con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y/o silimarina 50 mg/kg p.o. diario.

Los resultados se expresan como la media de al menos 7 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.05$ comparado con el control.

Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo cirrótico.

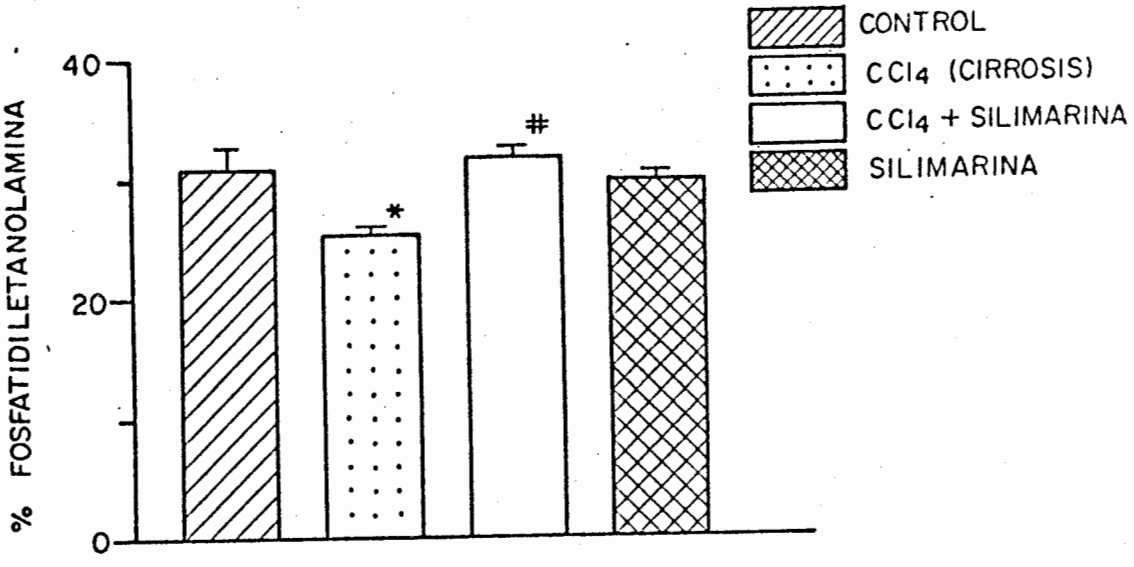


Fig. 28. Contenido de FEA en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas cronicamente con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y silimarina (50 mg/kg) p.o. diario.

Los resultados se expresan como la media de al menos 7 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.05$ comparado con el control.

Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo cirrótico.

Las membranas plasmáticas del grupo de ratas cirróticas presentaron un incremento de más del doble en la actividad de la FA ($p < 0.005$). La silimarina no previno este incremento aunque por sí sola fue capaz de elevar la actividad de dicha enzima ($p < 0.005$) (Fig. 29).

La actividad de la GGTP también se vió incrementada en las membranas plasmáticas de los hepatocittos de las ratas cirróticas con respecto al control ($p < 0.025$), en este caso la capacidad de la silimarina para prevenir este cambio fue parcial ($p < 0.05$) como se observa en la Fig. 30.

V.2.2. Estudio de la Capacidad de la Silimarina para Revertir las Alteraciones Producidas por la Administración Crónica de CCl4

Las ratas se trataron con CCl4 por 8 semanas y la silimarina se administró durante 5 semanas para descontinuar el tratamiento con CCl4.

Con este esquema de tratamiento el CCl4 también incrementó la lipoperoxidación 3 veces en los homogenados de hígados de ratas ($p < 0.005$) (Fig. 31) y la silimarina revirtió de manera parcial pero significativa ($p < 0.005$) la lipoperoxidación producida por el CCl4.

La silimarina fue capaz de revertir la elevación en el contenido de colesterol/proteína que se observó en las membranas cirróticas ($p < 0.005$), el cociente CH/PL en el grupo de ratas cirróticas que después recibieron silimarina también regresó a niveles normales ($p < 0.005$) (Fig. 32).

La figura 33 nos muestra la actividad de la ATPasa de

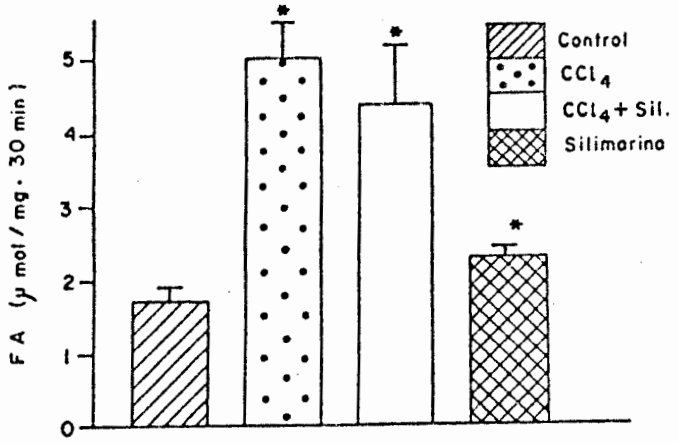


Fig. 29. Actividad de la fosfatasa alcalina (F.A.) en las membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl_4 cronicamente y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y silimarina 50 mg/kg p.o. diario.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo de CCl_4.

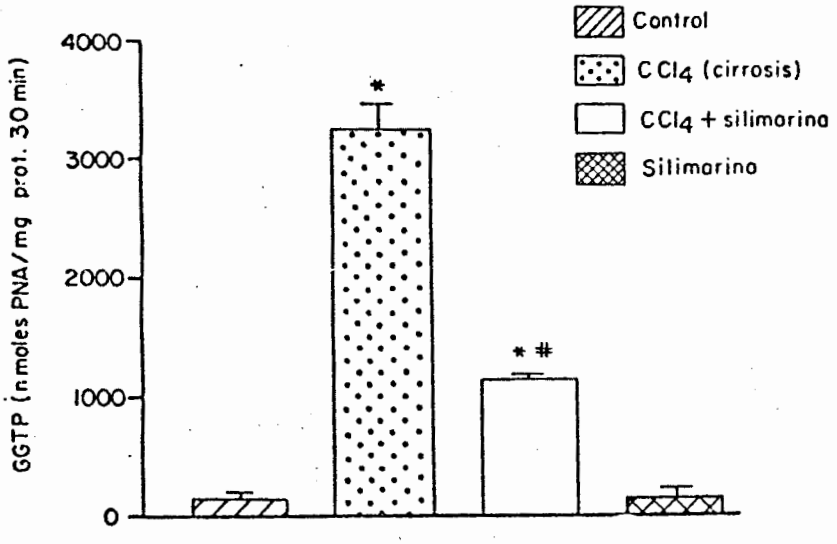


Fig. 30. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa (GGTP) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas cronicamente con CCl_4 y silimarina.

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl_4 y/o silimarina 50 mg/kg p.o. diario.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.005$ comparado con el control.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo cirrótico.

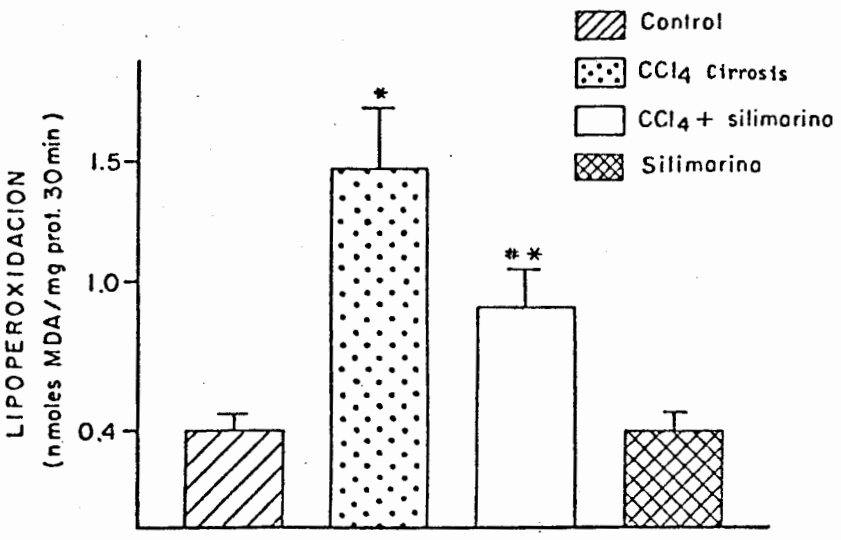


Fig. 31. Grado de lipoperoxidación en homogenados de hígado de ratas tratadas crónicamente con CCl_4 (cirrosis) y silimarina.

La silimarina 20 mg/kg p.o. diario se administró durante 5 semanas a ratas cirróticas que habían recibido 13 semanas de CCl_4, sin descontinuar el CCl_4.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.05$ comparado con el control.

Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo cirrótico.

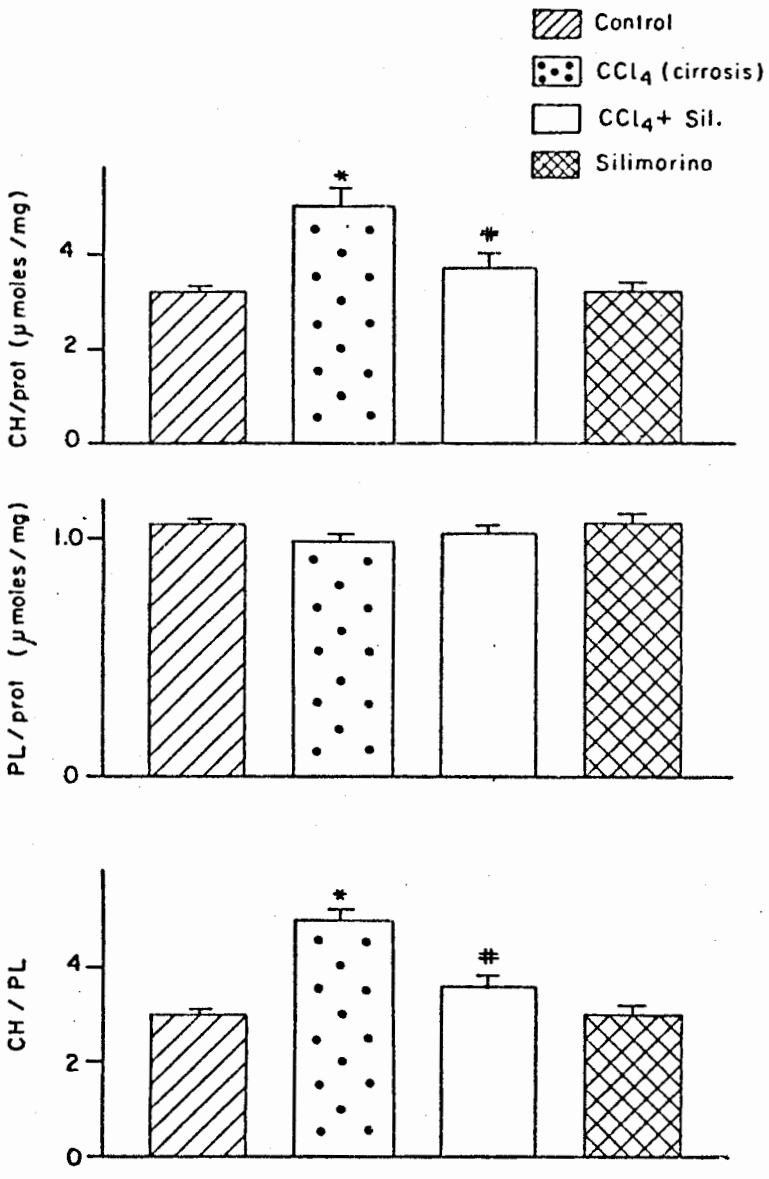


Fig. 32. Relaciones colesterol/proteína (CH/Prot.), fosfolípidos/proteína (PL/Prot.) y colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas cronicamente con CCl_4 y silimarina.

La silimarina 20 mg/kg p.o. diario se administró durante 5 semanas a ratas cirróticas que habían recibido 13 semanas de CCl_4 sin descontinuar el CCl_4.

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 ratas ± E.E.M.

* Significa $p < 0.05$ comparado con el control.

Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo cirrótico.

Na+/K+ en membranas plasmáticas de diferentes grupos experimentales (normales, cirróticas, cirróticas + silimarina y silimarina) con respecto al cociente colesterol/fosfolípidos.

Como se puede ver existe un buen coeficiente de correlación (0.87) y el análisis de varianza (ANDEVA) Para regresión lineal simple nos reveló también una buena significancia con una $p < 0.025$ indicándonos que este parámetro (CH/PL) es de importancia para determinar la actividad de la ATPasa de Na+/K+.

De manera similar se construyó el gráfico de la figura 34 utilizando al cociente colesterol/proteínas como variable independiente y la actividad de la ATPasa de Na+/K+ como variable dependiente. El coeficiente de correlación fue ligeramente mayor ($r = 0.98$) que el obtenido en el gráfico de la figura 33, asi mismo la significancia que reveló el ANDEVA para regresión lineal simple fue mayor ($p < 0.005$). La pendiente negativa indica que la actividad de la ATPasa de Na+/K+ es inversamente proporcional al cociente colesterol/proteína, es decir, cuanto mayor sea el contenido de colesterol por unidad de proteína en la membrana, menor será la actividad de la enzima.

Con el fin de verificar la correlación entre el contenido de colesterol/proteína y el cociente CH/PL con la actividad de la ATPasa de Na+/K+ que se encontró *in vivo*. se llevaron a cabo experimentos *in vitro*. La tabla 4 nos muestra que las membranas plasmáticas de ratas cirróticas presentan un cociente CH/PL mayor a las del control ($p < 0.025$) debido a un incremento en el contenido de colesterol/proteínas. Además la

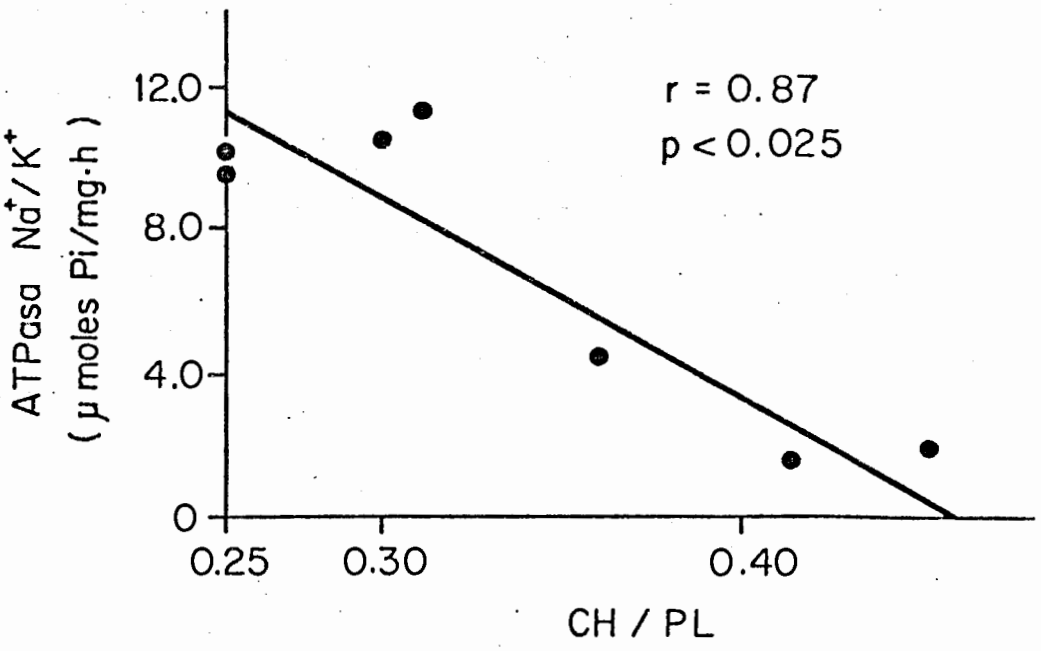


Fig. 33. Modulación de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ por el cociente colesterol/fosfolípidos (CH/PL) en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas.

Cada punto corresponde al promedio de 7 ratas que recibieron diferentes tratamientos.

La p se calculó mediante un análisis de varianza para regresión lineal simple.

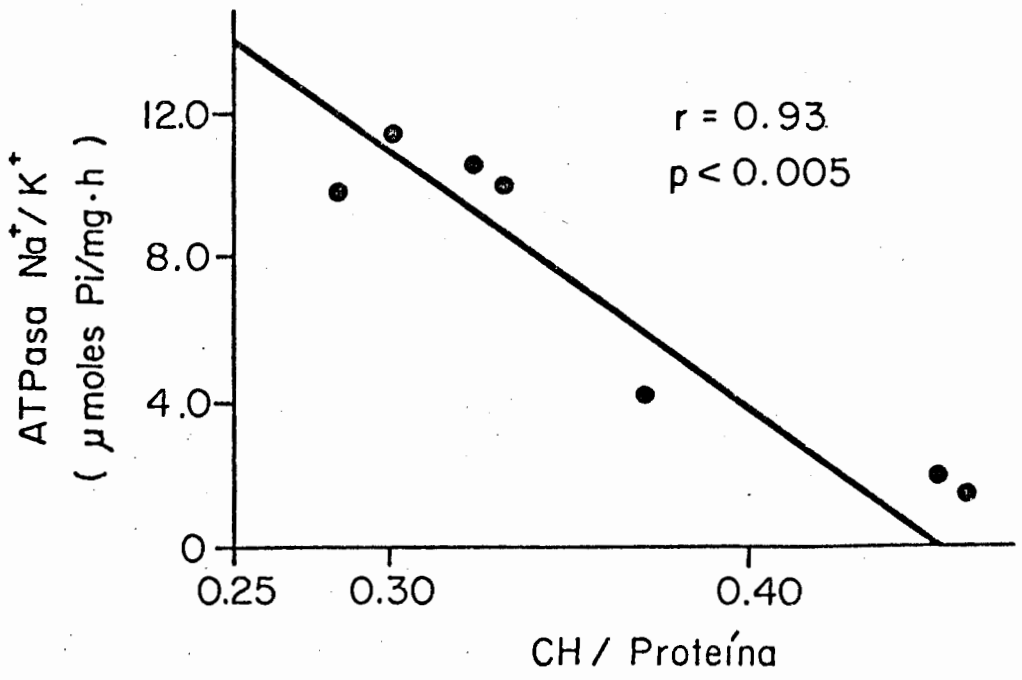


Fig. 34. Modulación de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ por el cociente colesterol/proteína en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas.

Cada punto corresponde al promedio de 7 ratas que recibieron diferentes tratamientos.

La p se calculó mediante un análisis de varianza para regresión lineal simple.

actividad de la ATPasa de Na+/K+ es menor en las membranas del grupo cirrótico que en las del normal ($p < 0.025$). Si agregamos colesterol a las membranas normales (simulando un cociente CH/PL propio de ratas cirróticas), al medir la actividad de la ATPasa encontramos resultados similares a los del grupo cirrótico (Tabla 4, Fig. 35).

Por otro lado, cuando agregamos un fosfolípido (FS) a las membranas que tienen un cociente CH/PL elevado (membranas cirróticas) y una actividad de la ATPasa de Na+/K+ baja, entonces el cociente CH/PL disminuyó y la actividad de la ATPasa se vió incrementada ($p < 0.005$) (Tabla 4, Fig. 35) confirmando nuevamente que la relacion CH/PL es inversamente proporcional a la actividad de la ATPasa de Na+/K+.

Membrana	CH/Proteína µmoles/mg	PL/Proteína µmoles/mg	CH/PL	ATPasa de Na^+/K^+ µmoles Pi/mg Prot.h.
Normal	0.30 ± 0.02	0.94 ± 0.11	0.31 ± 0.02	11.3 ± 1.2
CCl_4 (Cirrótica)	0.46 ± 0.04*	1.14 ± 0.08	0.41 ± 0.03*	1.9 ± 0.5*
CCl_4 + Silimarina	0.30 ± 0.01#	1.03 ± 0.05	0.29 ± 0.01#	9.5 ± 0.7#
Normal + Colesterol	0.44 ± 0.02*	1.08 ± 0.06	0.42 ± 0.02*	2.2 ± 0.3*
Cirrótica + FS	0.48 ± 0.04*	3.74 ± 0.20*#	0.14 ± 0.03*#	8.23 ± 0.4#

TABLA 4. Modulación de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ por el cociente CH/PL en membranas plasmáticas.

Los lípidos se agregaron disueltos en octil glucósido (1%).

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el grupo normal.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo cirrótico.

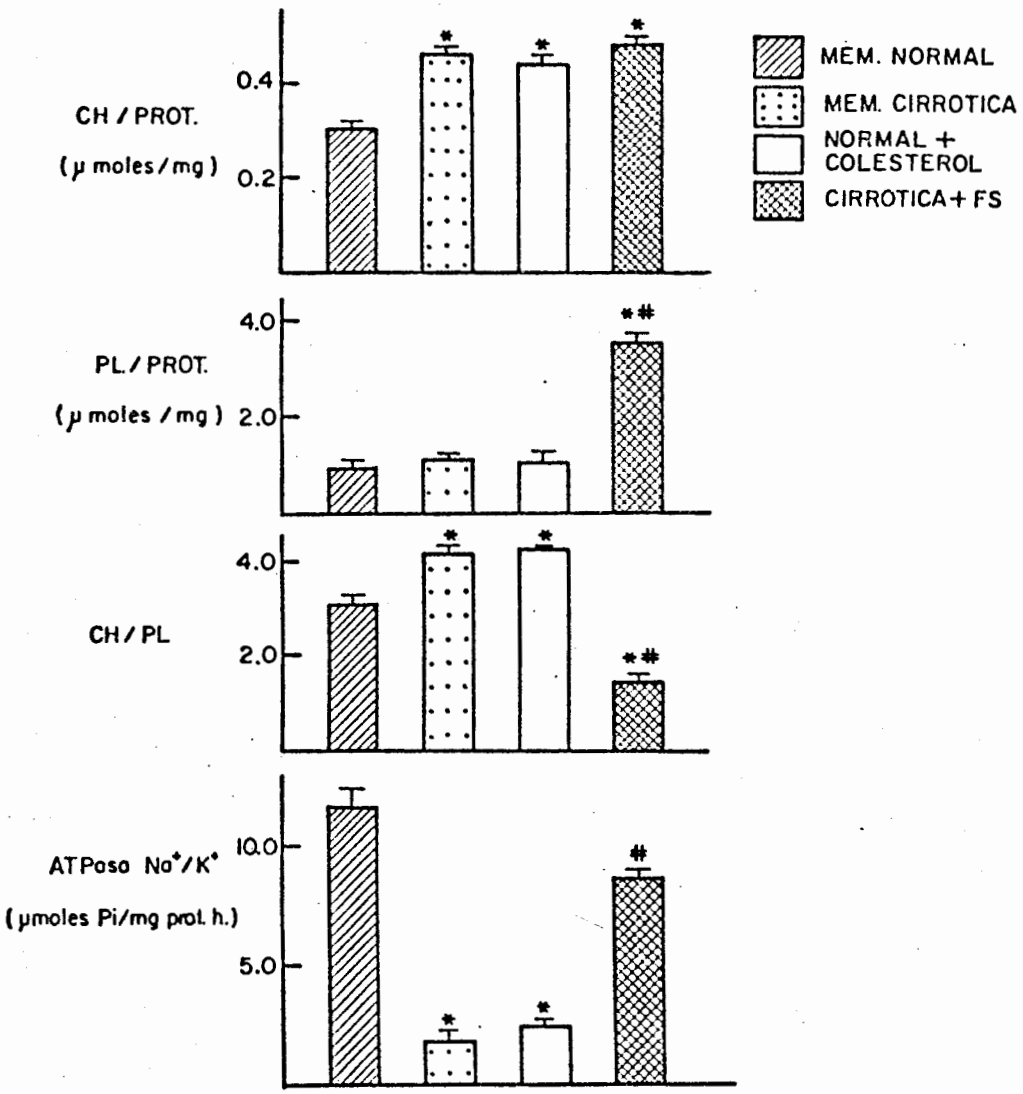


Fig. 35. Modulación de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ por el cociente CH/PL en membranas plasmáticas.

Los lípidos se agregaron disueltos en octil glucósido (1%).

Los resultados se expresan como la media de al menos 5 experimentos ± E.E.M.

* Significa $p < 0.025$ comparado con el grupo normal.

Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo cirrótico.

VI. DISCUSION

VI.1. Hepatitis Tóxica

El mecanismo de acción tóxico del CCl4 más aceptado en la actualidad es el de la lipoperoxidación. Se ha demostrado la formación de radicales libres como resultado del metabolismo del CCl4 (Fig. 3), que atacan a los lípidos insaturados en reacciones autocatalóticas. No es sorprendente entonces que el daño provocado por el CCl4 involucre alteraciones en los lípidos que pudieran a su vez ser causa de otras alteraciones de la célula hepática. El problema del daño hepático puede ser estudiado desde distintos ángulos. Así por ejemplo el estudio del daño agudo se ha centrado en la búsqueda de factores que estimulen la regeneración hepática. Otros investigadores han dedicado sus esfuerzos en el daño lipoperoxidativo y han utilizado sustancias inhibidoras del citocromo P-450, sistema responsable de la conversión del CCl4 en radicales libres tales como el radical triclorometilo (CCl_3) (44, 81). Otros grupos han usado agentes antioxidantes como el ácido ascórbico (161) y captadores de radicales libres como los tocoferoles (Vit. E) para evitar el daño que produce el CCl4 (19, 41, 82).

El estudio del daño crónico, por su parte, se ha centrado en la búsqueda de sustancias que interfieran con la síntesis y/o el transporte de la colágena.

En este trabajo el problema de la toxicidad del CCl4 se ha enfocado al estudio de los cambios lipídicos derivados de la lipoperoxidación mediada por los radicales libres, metabolitos

del CCl4. Es por esta razón que se escogió a la silimarina como agente hepatoprotector, ya que frecuentemente se mencionan sus propiedades para captar radicales libres.

Valenzuela y colaboradores (140) mencionan que después del tratamiento con silimarina se incrementa el contenido intrahepático de glutatión, que protege al tejido frente de un "stress" oxidativo. El glutatión reducido (GSH) puede ser utilizado en el hígado como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa en el metabolismo de peróxidos orgánicos ó directamente como un atrapador de radicales libres.

Estudios "in vitro" (17) indican que la silibina, principal compuesto de la silimarina, puede afectar el metabolismo de los fosfolípidos en las membranas de los hepatocitos de rata, este es un mecanismo que también podría operar "in vivo" frente al daño lipoperoxidativo producido por el CCl4.

Vogel (147) también está de acuerdo en que la silimarina puede influenciar el metabolismo de los lípidos y propone como una de las posibilidades del mecanismo de acción de la silimarina, la hipótesis "membrano-trópica".

Ya sea que la silimarina capte radicales o que su efecto se deba a un incremento en el contenido de GSH intrahepático su acción antilipoperoxidativa se pone de manifiesto en nuestros resultados.

El CCl4 administrado ya sea aguda o crónicamente incrementó el grado de lipoperoxidación y la silimarina lo previno, entonces fue lógico pensar que la silimarina podía

prevenir los cambios lipídicos que causa el CCl4. Sin embargo los cambios inducidos por el CCl4 son complejos y dependen de varios factores, por lo tanto, no es sorprendente que la silimarina no haya ejercido ningún efecto en la disminución del contenido de colesterol ni en el incremento en el contenido de fosfolípidos producidos por el CCl4.

Debido a que no se modificó el contenido total de fosfolípidos pensamos entonces que el efecto de la silimarina se podría encontrar a nivel de los fosfolípidos individuales como lo han sugerido Castigli y colaboradores (157), por lo que se estudió el contenido porcentual de los diferentes fosfolípidos de la membrana plasmática de hepatocitos de ratas tratadas con CCl4 y silimarina.

Nuestros resultados confirmaron los hallazgos de Castigli y colaboradores (157) en el sentido de que efectivamente la silimarina interviene en el metabolismo de los fosfolípidos.

La silimarina no solo previno la disminución en el contenido de FEA, sino que lo incrementó por encima de lo normal. La silimarina también previno aunque solo de manera parcial, el incremento en el contenido membranal de FI. Sin embargo, la administración de silimarina sola no alteró el contenido de éste.

El efecto protector de la silimarina en la caída de la actividad de la FA membranal en la intoxicación aguda con CCl4 fue total.

Nuestros resultados indican también que existe un efecto directo de la silimarina sobre esta enzima produciendo una estimulación. Analizando estos resultados se observa que existe una relación entre la actividad de la FA y el contenido de FEA.

Por una parte se presenta una elevación de la FA "in vivo", tras la administración de silimarina que es paralela al incremento que produce el flavonoide en el contenido de FEA. Por otra parte se vió que el efecto de la FEA es específico, ya que experimentos "in vitro" mostraron que la adición de este fosfolípido a membranas plasmáticas incrementaba la actividad de la FA mientras que la adición de otro fosfolípido (FS) no modificaba dicha actividad.

La relación de concentraciones de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (FC/FEA) de las membranas es directamente proporcional a la fluidez membranal (53, 124) debido a que los metilos de la amina cuaternaria de la FC impiden alostéricamente un mayor empaquetamiento de los lípidos. La alta correlación y significancia entre la actividad de la FA y el cociente membranal FC/FEA sugieren que la actividad de esta enzima se ve modificada por la fluidez de la membrana a la que se encuentra unida. Sin embargo debido a que la fluidez membranal no solo depende del cociente FC/FEA, sino también de la relación colesterol/fosfolípidos, grado de insaturación, etc., con los resultados obtenidos en esta investigación, no podemos saber si la alta significancia en la correlación FA Vs FC/FEA se debe a un efecto de la fluidez membranal o a una dependencia directa del contenido membranal de FEA para la actividad de la FA. Los resultados aquí presentados apoyan más la segunda posibilidad, ya que de los datos "in vivo" no se observó correlación entre la actividad de la FA membranal y el cociente CH/PL (inversamente proporcional a la fluidez). Además, en los experimentos "in

vitro" al agregar fosfatidilserina y disminuir el cociente CH/PL y por lo tanto incrementar la fluidez de la membrana, no se observó modificación en la actividad de la FA, en contraste con el incremento observado al agregar FEA.

VI.2. Cirrosis Hepática

La inducción de cirrosis por el CCl4 en las ratas fue verificada por la presencia de fibrosis en los cortes histológicos y por los indicadores séricos de daño hepático: FA, TGP y G-6-Pasa.

Como se vió en los resultados, la silimarina fue capaz de prevenir los cambios observados en los cortes histológicos, el incremento en el grado de lipoperoxidación hepática y en las actividades de las enzimas GGTP y FA membranales, indicándonos su utilidad en el tratamiento de la cirrosis hepática.

Cuando se analizaron los lípidos de la membrana se vió que la silimarina administrada conjuntamente con el CCl4 previno en su totalidad las alteraciones en los cocientes CH/Prot., PL/Prot., y CH/PL.

Los cambios en el contenido de fosfolípidos en las membranas plasmáticas del grupo de ratas cirróticas fueron menos intensos que los observados en el daño agudo y no se observaron correlaciones entre éstos y las actividades de las enzimas FA y GGTP. De hecho, la única alteración observada en los fosfolípidos de las membranas del grupo cirrótico fue una pequeña disminución en el contenido de FEA que se vió prevenida por la silimarina.

Parece que la alteración lipídica más importante en las membranas plasmáticas de las ratas cirróticas es el aumento en el contenido de colesterol por mg. de proteína.

El colesterol es un constituyente esencial de la membrana plasmática de las células eucarióticas. Aunque su significado funcional no está totalmente aclarado, posee la habilidad de alterar la fluidez de la bicapa (66, 73), de suprimir el transporte pasivo de sustancias polares a través de ella (7), y de crear dominios discretos dentro de la bicapa (3, 86), presumiblemente en virtud de su interacción preferencial con ciertos fosfolípidos (26, 141). El cociente colesterol/fosfolípidos sólo se altera significativamente en enfermedades tales como la cirrosis hepática (159) y bajo estrictos regímenes dietéticos (66).

Es de esperarse entonces que el incremento en el contenido de colesterol/proteína observado en el grupo cirrótico modifique la actividad de los sistemas embebidos en la membrana, ya que entre otras cosas la fluidez de ésta se verá disminuída.

Efectivamente, la actividad de la ATPasa de Na+/K+ de la membrana plasmática mostró una correlación alta y muy significativa con los cocientes CH/Prot., y CH/PL.

Los experimentos "in vitro" nos muestran como el incremento en el contenido de colesterol (y por lo tanto en el cociente CH/PL) inhibe a la ATPasa de Na+/K+, además una disminución en el cociente CH/PL provocada por la adición de FS incrementa la actividad de la enzima. Estos experimentos "in vitro" corroboran las correlaciones antes mencionadas observadas

"in vivo" y aportan aun mayor evidencia de que la ATPasa de Na+/K+ se inhibe por altas proporciones de colesterol.

La ATPasa de Na+/K+ es una enzima formada por varias subunidades que tienen que interaccionar entre sí para acoplar la desfosforilación del ATP a una traslocación del Na+ y del K+ a lados opuestos de la membrana, lo que requiere de una alta movilidad de estas subunidades para lo cual se precisa de un ambiente fluído. Es probable que cuando aumenta el contenido de colesterol, la membrana se hace más rígida y se impide que la ATPasa de Na+/K+ funcione a su velocidad normal. Por otro lado, además se ha visto que la enzima en cuestión requiere de ciertos fosfolípidos para su óptimo funcionamiento (en particular de fosfatidilserina) y como ya mencioné el colesterol tiene la habilidad de formar asociaciones con ciertos fosfolípidos, pudiendo así restarle a la ATPasa el contacto con fosfolípidos necesarios para su óptima actividad.

En cuanto a la capacidad de la silimarina para revertir en un mes de tratamiento las alteraciones en ratas ya cirróticas con CCl4, los resultados no fueron tan notorios como en el tratamiento preventivo. Sin embargo, tomando en cuenta que las ratas recibieron crónicamente CCl4 por 13 semanas y luego silimarina únicamente por 5 sin descontinuar el CCl4, la reversión parcial del incremento en la lipoperoxidación fue un efecto muy favorable de la silimarina. Es probable que si se continúa el tratamiento se obtengan efectos aún más sorprendentes.

Estos resultados de alguna manera nos indican que entre más pronto se traten a los animales, mayor será el efecto de la

silimarina.

Es importante señalar que aún con este esquema de tratamiento la silimarina revirtió el alto contenido de colesterol/proteína producido por el CCl4 a niveles normales.

VII. CONCLUSIONES

VII.1. Hepatitis Tóxica

El tratamiento agudo con CCl4:

- aumentó la lipoperoxidación hepática.
- aumentó el cociente PL/Prot. en la membrana plasmática.
- aumentó el porcentaje de fosfatidilinositol (FI) en la membrana plasmática.
- disminuyó el porcentaje de fosfatidiletanolamina (FEA) en la membrana plasmática.
- disminuyó la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y de la gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP) membranales.

La administración conjunta de silimarina en el daño agudo:

- previno la lipoperoxidación hepática.
- previno los cambios en el porcentaje de FI y FEA.
- no tuvo efecto en la alteración del cociente PL/Proteína.
- previno la caída en las actividades de la FA y GGTP membranales.

Los cambios en el contenido de FEA correlacionaron con los cambios de la F.A.

La FEA parece modular la actividad de la FA.

VII.2. Cirrosis Hepática

El tratamiento crónico con CCl4:

- incrementó la lipoperoxidación.
- aumentó el contenido de colesterol/proteína en la membrana plasmática.
- no modificó la relación fosfolípidos/proteína membranal.
- consecuentemente se incrementó el cociente colesterol/fosfolípidos (CH/PL).

La administración conjunta de silimarina en el daño crónico:

- previno y revirtió la lipoperoxidación.
- previno y revirtió el aumento en la relación CH/PL.
- previno la disminución en el porcentaje de FEA membranal.

Los cambios en la relación CH/PL y CH/Prot., correlacionaron significativamente con los cambios en la actividad de la ATPasa de Na+/K+ de la membrana plasmática.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abell, L.L., Levy, B.B., Brodie, B.B. and Kendal, F.E. A simplified method for the estimation of cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J. Biol. Chem. 195:367-366, 1951.
2. Alves, P.S., Correia, J.P., d'Agua, C.B., et al. Alcoholic liver diseases in Portugal. Clinical and laboratory picture, mortality and survival. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 6:216-224, 1982.
3. Andrews, L.D. and Cohen, A.I. Freeze-fracture for the presence of cholesterol in particle-free patches of basal disks and the plasma membrane of retinal rod outer segments of mice and frogs. J. Cell Biol. 81:215-228, 1979.
4. Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthetized collagen. J. Biol. Chem. 255:2843-2847, 1980.
5. Berg, R.A., Schwartz, M.L. and Crystal, R.G. Regulation of the production of secretory proteins. Intracellular degradation of newly synthetized "defective" collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:4746-4750, 1980.
6. Berger, L. and Rudolph, G.N. Alkaline and acid phosphatase. Standard methods of clinical chemistry. Ed. Meites New York, Academic Press, Vol. 5, 1963.
7. Blok, M.C., Van Deenen, L.L.M. and De Gier, J. The effect of cholesterol incorporation on the temperature dependence of water permeation through liposomal membranes prepared

from phosphatidilcholines. Biochim. Biophys. Acta 464:509-518, 1977.

8. Boyer, J.L. Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. Am. J. Physiol. 221:1156-1163, 1971.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254, 1976.
10. Brooks, S.E.H., Miller, C.G., McKenzie, K., Audretsch, J.J. and Bras, G. Acute veno-occlusive disease of the liver. Arch. Pathol. 89:507-520, 1970.
11. Browning, E. Toxicology and metabolism of industrial solvents. Elsevier, Amsterdam, 1965.
12. Bucher, N.L.R., and Malt, R.A. In regeneration of liver and kidney. Little Brown, (eds.), Boston, pp. 176, 1971.
13. Buege, J.A., and Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. In: Methods of Enzymology. Vol. 53. Eleischer, S. and Packer, L. Eds. pp. 302-310. Academic Press, New York, 1978.
14. Calbert, D.N. and Brody, T.M. Role of the sympathetic nervous system in CCl4 hepatotoxicity. Amer. J. Physiol. 198:669-676, 1960.
15. Candel, A.V., Gómez, R. et al. Estudio experimental de la lesión hepática (hepatitis reactiva inespecífica) en procesos supurativos y necróticos renales. Efecto hepatoprotector de la silimarina. Cátedra de Patología Médica de la Facultad de Medicina de Valencia. MMW, No. 10, 1978.

16. Castano, J.G., Alemany, S., Nieto, A. and Mato, J.M. Activation of phospholipid methyl transferase by glucagon in rat hepatocyte. J. Biol. Chem. 255:9041-9043, 1980.

17. Castigli, E., Montanini, I., Roberti, R. and Porcellati, G. The activity of silybin on phospholipid metabolism of normal and fatty liver in vivo. Pharmacol. Res. Commun. 9:59-69, 1973.

18. Castro, J.A., Cignoli, E.V. de Castro, C.R. and de Fenos, O.M. Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by CCl4. Biochem. Pharmacol. 21:49, 1972.

19. Cawthorne, M.A., Bunyan, J., Sennitt, M.V. and Green, J. Vitamin E and hepatotoxic agents. 3. Vitamin E. synthetic antioxidants and carbon tetrachloride toxicity in the rat. Br. J. Nutr. 24:357, 1970.

20. Clark, R., Borirakchanyavat, V., Davidson, A.R., Thompson, R.P.H., Widdop, B., Goulding, R. and Williams, R. Hepatic damage and death from overdose of paracetamol. Lancet 1:66-70, 1973.

21. Chaplin, M.D. and Mannering, G.J. Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabolizing system. Mol. Pharmacol. 6:631, 1970.

22. Charles, L., Witte, M.D. and Marlys, H. Hepatic circulation. The liver. Normal and abnormal functions. Part A. Edited by Frederick, F. Becker, 1974.

23. Choppin, and A. Desplaces. The action of silybin on the mouse liver in alfa-amanitine poisoning. Arzneim Forsch/

Drug Res. 29(1):63-68, 1979.

24. Dajer, F., Guevara, L., Arosamena, L., Suárez, G.I. y Kershenobich, D. Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México. Rev. Invest. Clin. 30:13, 1978.

25. Daniel, W.W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, primera edición. Tercera reimpresión. México, 1982.

26. Demel, R.A., Jansen, J.W.C.M., Van Dijck, P.W.M. and Van Deenen, L.L.M. The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 465:1-10, 1977.

27. Desplaces, A. et al. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. Drug. Res. 25(1):89-99, 1975.

28. Dianzani, M.V., Baccino, F.M. and Comporti, M. The direct effect of carbon tetrachloride on subcellular articles. Lab. Invest. 15:149, 1966.

29. Diluzio, N.R. and Costales, R. Inhibition of the CCl4 induced fatty liver by antioxidants. Fed. Proc. 23:520, 1964.

30. Dillard, C.J., Dumelin, E.E. and Tappel, A.L. Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. Lipids 12:109, 1977.

31. Dunn, M.A., Kamel, I.A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. Gastroenterolgoy 76:978-982, 1979.

32. Duterea, S.M., Byrne, W.L. and Ganoza, M.C. Studies on the phospholipid requirement of glucose-6-phosphate. J. Biol.

Chem. 243:2216, 1968.

33. Ehrlich, H.P., Ross, R. and Bornstein, P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. J. Cell Biol. 62:390-405, 1974.

34. Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M. Cytochrome P-450 dependent lipid peroxidation in reconstituted membrane vesicles. Biochem. Pharmacol. 33:2521-2523, 1984.

35. Erlinger, S. Dhumeaus, D. and Binhamou, J.P. Effect on bile formation of inhibitors of sodium transport. Nature (London), 223:1276-1277, 1969.

36. Esko, J.D., Gilmore, J.R. and Glover, M. Use of a fluorescent probe to determined the viscosity of L.M. Cells membrane with altered phospholipid composition. Biochemistry 16:1881-1890, 1977.

37. Evans, W.H. Preparation of plasma membranes from certain tissues and cell lines. In: Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. Part I. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical 177-183, 1978.

38. Fintelmann, V. Zur therapie der fettleber mit silymarin. Theraplewoche 20:23, 1970.

39. Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. The presence of collagenase in kupffer cells of the rat liver. Biochim. Biophys. Res. Commun. 54:531-537, 1973.

40. Galambos, J.T. Editor. Epidemiology. In: Cirrhosis major problems in internal medicine, Vol. XVII, pp. 91, W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A.

41. Gallagher, C.H. The effect of antioxidants on poisoning by

CCl4. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40:241, 1962.

42. Ganong William F. Manual de Fisiología Médica, 5a. edición, Editorial El Manual Moderno, 1976.

43. Gimon, F.R., Sutherland, E., Accatino, L. Stimulation of hepatic sodium and potassium activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital. J. Clin. Invest. 59:849-861, 1977.

44. Glende, E.A. Jr. and Recknagel, R.O. Microsomal electron transport and "in vitro" CCl4 induced lipoperoxidation. Fed. Proc. 29:755, 1970.

45. Glende, E.A., Jr. On the mechanism of carbon tetrachloride toxicity-coincidence of loss drug metabolizing activity with peroxidation of microsomal lipid. Biochem. Pharmacol. 21:2131, 1972.

46. Glossmaun, M. and Neville, D.M. Gamma-glutamyltransferase in kidney brush border membrane. Febs Letters 19(4):340-344, 1972.

47. Graham, A.B. and Wood, G.C. The phospholipid dependence of UDP-glucuronyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:567, 1969.

48. Gravela, E., Gabriel, L. and Ugazio, G. Protection by glutathione and propyl gallate on the impaired "in vitro" amino acid incorporation into liver microsomal protein of CCl4-poisoned rats. Biochem. Pharmacol. 20:2065, 1971.

49. Hahn, G., Lehmann, H.D., Kurten, M., Uebel, H. und Vogel, G. Zur pharmakologie und toxikologie von Silymarin, des antihepatotoxischen wirkprinzipes aus Silybum marianum (L) Gaertn. Arzneim Forsch (Drug Res.) 18:698, 1968.

50. Hall, M.C. and Shillinger, J.E. Miscellaneous tests of carbon tetrachloride as anthelmintic. J. Agric. Res. 23:163, 1923.

51. Hans, E. and Sherrick, J.C. Morphology of the liver. Academic Press, 1969.

52. Harris, E.D. and Krane, S.M. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. Arth. Rheum. 14:669-684, 1971.

53. Hauser, H. and Phillips, M.C. Interactions of the polar groups of phospholipid bilayer membranes. Prog. Surt. Memb. Sci. 13:297-303, 1979.

54. Hernández-Muñoz, R., Glender, W., Díaz-Muñoz, M. and García-Sainz, A. Effects of adenosine on liver cell damage induced by CCl4. Biochem. Pharmacol. 33:2599-2604, 1984.

55. Himsworth, H.P. Lectures on the liver and its diseases. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1947.

56. Hokin, L.E. and Hexun, J.D. Studies on the caracterization of the sodium potassium transport adenosine triphosphatase. Arch. Biochem. 151:453-463, 1972.

57. Homann, J., Rotter, S., Kratz, F. and Matthes, J. Influence of cimetidine on CCl4-induced liver injury and survival in rats. Biochem. Pharmacol. 34:415-416, 1985.

58. Hove, E.L. Interrelation between tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl4 poisoning in rats. Arch. Biochem. 17:467, 1948.

59. Jaiswal, R.K., Rama, B.V. and Landon, E.J. Changes in

microsomal membrane microviscosity and phospholipid methyltransferases during rat liver regeneration. Pharmacology 24:355-365, 1982.

60. Jones, A.L. and Mills, E.S. Hígado y vesícula biliar. R.D. Greep and J. Weiss. Histología, Ed. El Ateneo, tercera edición, 1978.

61. Keith, A.D., Sharnoff, M. and Cohn, G.E. A summary and evaluation of spin levels used as probes for biological membrane structure. Biochem. Biophys. Acta 300:379-419, 1973.

62. Kershenobich, D., Uribe, M., Suárez, G.I. et al. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double randomized trial. Gastroenterology 77:535-536, 1979.

63. Kiatskin, G. Toxic and drug-induced hepatitis. In: Diseases of the liver, Forth edition, edited by L. Schiff, pp. 604-710. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1973.

64. Kiechle, F.L., Jarett, L., Kotagal, N. and Popp, D.A. Partial purification from rat adipocyte plasma membranes of a chemical mediator which simulated the action of insulin on pyruvate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 256:2945-2951, 1981.

65. Kimelberg, H.K., and Papahadjopoulis, D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transistors, and cholesterol on (Na+, K+)-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 249:1071-1080, 1974.

66. Kimelberg, H.K. In: Dynamic aspects of cell surface organization (Poste, G. é Nicolson, G.L., eds., pp. 205-293, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1977.

67. Kimimitsu, O. and Ikehara, Y. Inhibitory effect of colchicine on translocation of alkaline phosphatase to the plasma membrane concomitant to its induction in rat liver. Biochim. Biophys. Acta 640:398-408, 1981.

68. Kopelman, H., Scheuer, P.J. and Williams, R. The liver lesion of the Epping jaundice. Q.J. Med. 35:553-554, 1966.

69. Korlish, S.J.D. Protein conformational changes in [Na+, K+]-ATPase and the role of cation occlusion in active transport. N.Y. Acad. of Sci. 402:226-238, 1982.

70. Kyte, J. Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250:7443-7449, 1975.

71. Lamb, R.G. and Schwartz, D.W. The effects of bromobenzene and CCl4 exposure "in vitro" on the phospholipase C activity of rat liver cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 63:216-229, 1982.

72. Lecomte, J. Les proprietes pharacologigues de la silybine et de la silymarine. Revue Medicale de Liegl 30(4):110-104, 1975.

73. Lee, A.G. Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. Biochim. Biophys. Acta 472:285-344, 1977.

74. Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T. and Rubalcava, B. Hormonal control of rat liver regeneration. Gastroenterology 76:1470-1482, 1979.

75. Leoni, S., Spagnuolo, S. and Conti de Virgilis, L. Effect of colchicine on rat liver plasma membrane. Biochim.

Biophys. Acta 596:451-456, 1980.

76. Lotersztajn, S., Hanoune, J. and Pecker, F. A high affinity calcium stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. Dependence on an endogenous protein activator distinct from calmodulin. J. Biol. Chem. 256:11209-11215, 1981.

77. Lutz, L.M., Glende, E.A. Jr. and Recknagel, R.O. Protection by diethyldithiocarbomate against CCl4 lethality in rats and against CCl4-induced lipoperoxidation "in vitro". Biochem. Pharmacol. 22:1729, 1973.

78. Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L. and Gorinis. Drug. Res. 23:161-167, 1973.

79. Malech, H.L., Root, R.K. and Gallin, J. Structural analysis of human neutrophile migration. J. Cell Biol. 75:666-693, 1978.

80. Marcus, D.L., Halbrecht, J.L., Bourque, A.L. and Freechman, M.L. Effect of cimetidine on -aminolevulinic acid synthase and microsomal heme oxygenase in rat liver. Biochem. Pharmacol. 33:2005-2008, 1984.

81. Marchand, C., McLean, S. and Plaa, G.L. The effect of SKF-525 A on the distribution of carbon tetrachloride in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 174:232, 1970.

82. Martínez-Calva, A., Campos-Apáez, E., Rosales-Vega and Marisabel Mourelle. Vitamin E improves membrane lipid alterations induced by CCl4 intoxication. J. Appl. Tox. 4(5):270-272, 1984.

83. Martonosi, A., Donley, J. and Halpin, R.A. Sarcoplasmic reticulum. III. The role of phospholipids in the adenosine

triphosphatase activity and Ca++ transport. J. Biol. Chem. 243:61, 1968.

84. Maruyama, K., Feinman, L., Okazaki, I., Lieber, Ch. S. Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and human liver. Biochim. Biophys. Acta 658:124-131, 1981.

85. Masukama, T., Nishimura, T. and Iwata, H. Differential changes of glutathione-S-transferase activity by dietary selenium. Biochem. Pharmacol. 33:2635-2639, 1984.

86. Montesano, R. Inhomogeneous distribution of filipin-sterol complexes in smooth muscle cell plasma membranes Nature (London). 280:328-329, 1970.

87. Moore, L. Inhibition of liver microsomes calcium pump by "in vivo" administration of CCl4, CHCl3 and 1,1-dichloroethylene (vinylidene chloride). Biochem. Pharmacol. 29:2505-2511, 1980.

88. Mourelle, M. Comparación de cambios bioquímicos que ocurren durante la proliferación celular inducidos aguda o crónicamente por CCl4 y en hepatomas de crecimiento lento. Tesis de Doctorado en Farmacología, CINVESTAV-I.P.N., 1979.

89. Mourelle, M., Rojkind, M. and Rubalcava, B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase. System of cirrhotic rats. Toxicology 21:213, 1981.

90. Mourelle, M. and Rubalcava, B. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 256:1656-1660, 1981.

91. Neville, M.D. The isolation of a cell membrane fraction

from rat liver. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8:415-422, 1960.

92. Nicholson, G.K., Poste, G. and Ji, T.H. Dynamic aspects of cell surface. Poste, G. and Nicholson, G.K. (eds.). Amsterdam, pp. 73, 1977.

93. Nishimura, M. and Teschke, R. Effect of chronic alcohol consumption on the activities of liver plasma membrane enzymes: gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase. Biochem. Pharmacol. 31:377-381, 1982.

94. Olmstead, J.B. and Borisky, G.G. Microtubules. Ann. Rev. Biochem. 42:507-540, 1973.

95. Pecker, F., Lotersztajn, S. The liver plasma membrane Ca++-ATPase. N.Y. Acad. Sci. 402:438-439, 1982.

96. Platt, D., Schnorr, B. Biochemische und elektroneneptische untrsuchungen zur frage der beenflussbarkeit der aethanol-schadigung der rattenleber durch Silymarin. Arzneim Forsch (Drug Res.) 21:1206, 1971.

97. Popper, H. Drug-induced hepatic injury. In: The Liver, edited by E.A. Gall and F.K. Mostoli, pp. 182-198. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1973.

98. Popper, H., Gerber, M., Schaffner, F. and Sclikoff, T. Environmental hepatic injury. In: Progress in Liver Diseases. Vol. VI, pp. 605-638 Edited by H. Popper and F. Schaffner. Grune and Stratton, New York, 1979.

99. Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Balian, C. and Kang, A. H. Induction of fibroblast chemostaxis by fibronectin. J. Exp. Med. 153:494-499, 1981.

100. Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Rocker, E.

Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorilation. I. Purification and properties of soluble dinitrofenol-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 235:3322-3329, 1960.

101. Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Data, A. and Racker, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorilation. J. Biol. Chem. 235:3330-3336, 1960.

102. Rabes, H.M. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. Progress in Liver Diseases 5:83-99, 1976.

103. Rappaport, A.M. Anatomics considerations in Lion Shiff. Diseases of the liver. ed. ed. pp. 1-49, I.B. Lippincott Company Phyladelphia, 1969.

104. Rappaport, A.M. Physioanatomical basis of liver injury. Toxic injury of the liver. Part A., Edited by M. Farber and M.M. Fisher. Marcel Dekker, I.N.C., 1979.

105. Raven, H.M. y Schriewer, H. La acción antihepatotóxica de la silimarina en las lesiones hepáticas provocadas experimentalmente en ratas mediante tetracloruro de carbono, D-galactosamina y alcohol etílico. Arzneim Forsch (Drug. Res.) 21(8):1194, 1971.

106. Recknagel, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 2:145-200, 1967.

107. Recknagel, R.O. and Glende, E.A. Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. CRC Crit.

Rev. Toxicol. 2:263-297, 1973.

108. Ricci, R.L., Crawford, S.S. and Miner, P.B. Jr. The effect of ethanol on hepatic sodium plus potassium activated adenosine triphosphatase activity in the rat. Gastroenterology 80:1445-1450, 1981.

109. Rojkind, M. and Díaz de León, L. Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices: A regulatory mechanism. Biochim. Biophys. Acta 217:512-522, 1970.

110. Rojkind, M. Inhibition of liver fibrosis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with CCl4. J. Clin. Invest. 52:2451-2456, 1973.

111. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Effects of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. Biochim. Biophys. Acta 378:415-423, 1975.

112. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Fibrosis and cirrhosis. In: The Liver Annual I. pp. 126. Arias, I.M., Frenker, M., y Wilson, J.H.P. (Eds.). Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton, 1981.

113. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Hepatic Fibrosis. Clinics in Gastroenterology 10:737-754, 1981.

114. Rojkind, M. Fibrogenesis. The Liver: Biology and Pathobiology, edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz. Raven Press, New York, 1982.

115. Rouser, G.G., Nelson, J., Fleisher, S. and Simon, G. Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. In: D. Chapman (Ed.), Biological Membrane, Academic Press, New York, p. 6, 1968.

116. Salfeder, K., Doehnert, H.R., Doehnert, G., Sauerteg, K.,

Deliscano, I.R. and Fabrega, S.F. Fatal phosphorus poisoning. A study of forty-five autopsy cases. Beitr. Pathol. 147:321-340, 1972.

117. Saltiel, A.R., Doble, A., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. Putative mediators of insulin action regulate hepatic acetyl COA carboxylase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 110:789-795, 1983.

118. Sasame, H.A., Castro, J.A. and Gillette, J.R. Studies on the destruction of the liver microsomal cytochromes P-450 by carbon tetrachloride administration. Biochem. Pharmacol. 17:1759, 1968.

119. Schmid, R. Cutaneous porphyria in Turkey. N. Engl. J. Med. 263:397-398, 1966.

120. Schriewer, H. and Rauen, H.M. Die antihepatotoxische wirkung von parenteral verabreichtern Silymarin bei der galactosamin-hepatitis der ratte. Arzneim Forsch (Drugs Res.) 23:159, 1973.

121. Seakins, A. and Robinson, D.S. The effect of the administration of CCl4 on the formation of plasma lipoproteins in the rat. Biochem. J. 86:401-407, 1963.

122. Seals, J.R. and Czech, M.P. Evidence that insulin activates and intrinsic plasma membrane protease in regenerating a secondary chemical mediator. J. Biol. Chem. 255:6529-6531, 1980.

123. Shinitzki, M. and Barenholz, Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescense polarization. Biochim. Biophys. Acta 515:367-394, 1978.

124. Shinitzky, M. and Henkart, P. Fluidity of cell membranes current concepts and trends. Int. Rev. Cytol. 60:121-147, 1979.

125. Siegers, C.P., Fruhiing, A. and Younes, M. Influence of dithiocarb, (+)-catechind and silybine on halotane hepatotoxicity in the hypoxic rat model. Acta Pharmacol. et Toxicol. 53:125-129, 1983.

126. Skou, J.C. The [Na+, K+]-ATPase: Coupling of the reaction with Na+ and K+. Biochim. Biophys. Acta 23:394, 1957.

127. Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na+ and K+ accross cell membranes. Physiol. Rev. 45:596-617, 1965.

128. Smith, R.K. In Drill's Pharmacology in Medicine. Nonnarcotic analgesics and antypyretics II: Nonsalicylates and Drugs Useful in Gout. pp. 404. McGraw-Hill (eds.). Y.Y. 1958.

129. Spilberg, I., Mandell, B. and Mehta, J. Mechanism of action of colchicine in acute urate-crystal-induced arthritis. J. Clin. Invest. 64:775-780, 1979.

130. Sugano, M., Cho, S., Imaizumi, K., and Wada, M. Hepatotoxicity and lipid metabolism. III. Changes in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine during hepatic injury caused by CCl4. Biochem. Pharmacol. 19:2325-2333, 1970.

131. Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J. and Coon, M.J. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. J. Biol. Chem. 245:4851, 1970.

132. Strubelt, O., Siegers, C.P. and Younes, M. The influence of

silybine on the hepatotoxic and hypoglycemic effects of praseodymium and other lantitanides. Drug Res. 30(10):1960-1964, 1980.

133. Tanaka, R. and Strickland, K.P. Role of phospholipid in the activation of Na+, Ka+-activated adenosine triphosphatase of beef brain. Arch. Biochem. Biophys. 111:583-592, 1965.

134. Teschke, R., Neuefeind, M., Nishimura, M. and Strohmeyer G. Hepatic gamma-glutamyltransferase activity in alcoholic fatty liver: comparison with other liver enzymes in man and rats. Gut 24:625-630, 1983.

135. Tyutyuikova, N., et al. Hepatoprotective effect of silymarine (carsil) on liver of d-galactosamine treated rats. Biochemical and Morphological Investigations. Meth. and Find Exptl. Clin. Pharmacol. 3(2):71-77, 1981.

136. Uehleke, H., Hellmer, K.H. and Tabarelli, S. Binding of 14CCl4 to microsomal proteins "in vivo" and formation of CHCl3 by reduced liver microsomes. Xenobiotica 3:1, 1973.

137. Uesugi, S., Dulak, N.C., Dixon, J.F., Hufum, T.D., Dahl, J.L., Perdue, J.F., and Hokin. L.E. 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, 1971.

138. Ugazio, G. and Torrielli, M.V. Effect of prolyl gallate on CCl4 induced fatty liver. Biochem. Pharmacol. 18:2271, 1969.

139. Valenzuela, A. and Guerra, R. Protective effect of the

flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. Febs. 181(2):291-294, 1984.

140. Valenzuela, A. et al. Sylimarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. Biochemical Pharmacology 34(12):2209-2212, 1985.

141. Van Dijck, P.W.M. Negatively charged phospholipids and their position in the cholesterol affinity sequence. Biochim. Biophys. Acta 555:89-101, 1979.

142. Villaldn Herrera C. M. Efecto protector de la colchicina contra el daño agudo inducido por CCl4 en el hígado de rata. Tesis de Maestría en Farmacología en el Centro de Investigaciдn y de Estudios Avanzados del I.P.N.

143. Vogel, G. Silymarin, das antihepatotoxische Wirkprinzip aus Silybum marianum (L) Gaertn., als antagonist der Phalloidin Wirkung. Arzneim Forsch (Drug Res.) 18:1063, 1968.

144. Vogel, G. und Temme, I. Die curative Antagonisierung des durch Phalloidin hervogerufenen Leberschadens mit Silymarin als Modell einer antihepatotoxischen Therapie. Arzneim Forsch (Drug Res.) 19:613, 1969.

145. Vogel, G. and Trost, W. Possibilities to antagonise the experimental poisoning by the toxic components of the toadstool Amanita phalloides fries. Digestion 8, 556, 1973.

146. Vogel, G. and Trost, W. Neutralization of the lethal effects of phalloidine and amanitine in animal experiments by substances from the seeds of Silybum marianum Gaertn. Naunyn Shmiedebergs. Arch. Pharmacol. 282:102, 1974.

147. Vogel, G. et al. (Traduccion). Investigaciones acerca de la farmacodinamia punto de ataque y mecanismo de acción de

la silimarina. Principio antihepatotoxico del Silybum marianum (L>) Gaertn. Arzneim Forsch. 25(1):82-89, 1975.

148. Vogel, G. Protection by silybin against amanita phalloides in beagles. Toxicology and Applied Pharmacology. 73:355-362, 1984.

149. Wagner, H., Diesel, P., Seitz, M. Zur chemie und analytik von silymarin aus Silybum marianum Gaertn. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 24:466, 1974.

150. Warren, K.S. Hepatosplenic schistosomiasis: a great neglected disease of the liver. Gut. 19:572, 1978.

151. Ways, P. and Hanahan, D.J. Characterization and quantification of red cells lipids in normal man. J. of Lipid Research 5:318-328, 1964.

152. Weddle, C.C., Hornbrook, K.R. and McCay, P.B. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to CCl4. J. Biol. Chem. 251:4973-4978, 1976.

153. Weir, J.F. Cirrhosis associated with chronic inorganic arsenical poisoning. Proc. Staff Mig. Mavo Clin. 5:173-175, 1930.

154. Wells, H.G. Chemicall Pathology, Ed. 5, 88:623-627,, W.B. Saunders, Philadelphy, 1925.

155. Wilfred, G. Colchicine increases hepatic alkaline phosphatase activity. Biochim. Biophys. Acta 500:209-212, 1979.

156. Wills, F.D. Effects of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of the endoplasmic reticulum. Biochem. J. 123:983,

1971.

157. Wing, D.R., Harvey, D.J., Hughes, J., Dunbar, P.G., McPherson, K.A. and Paton, W.D.M. Effects of chronic ethanol administration on the composition of membrane lipids in the mouse. Biochem. Pharmacol. 31:3431-3439, 1982.

158. Witschi, H. and Plaa, G.L. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. Am. Rev. Toxicol. Pharmacol. 16:125, 1976.

159. Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind and Mourelle, M. Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl4-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. Lab. Invest. 53(5):541-545, 1985.

160. Yamada, S., Ki, M.M. and Charles, S.L. Chronic ethanol consumption alters rat liver plasma membranes and potentiates release of alkaline phosphatase. Gastroenterology 88:1799-1806, 1985.

161. Younes, M. and Siegers, C.P. Interrelation between lipid peroxidation and otheer hepatotoxic events. Biochem. Pharmacol. 33:2001-2003, 1984.

162. Zimmerman, H.J. Experimental hepatotoxicity. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. XV/5 edited by G.V.R. Born. O. Eichler, A. Farah, H. Herkin, and A.O. Welch, pp. 1-120, Springer-Verlag, Berlin, 1976.

163. Zimmerman, H.J. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Appleton-Century-Crofts, New York, 1978.

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, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis de Maestría a los seis días del mes de noviembre del año mil novecientos ochenta y siete.

DRA. MARISABEL MOURELLE MANCINI

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNANDEZ

M. en C. VICTOR MANUEL PEREZ ALVAREZ