UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

CBS

EFECTO PROTECTOR DE LA SILIMARINA EN LA HEPATITIS Y CIRROSIS EXPERIMENTAL INDUCIDA CON CCl4 EN RATAS

MARIA TERESA FRANCO MUÑOZ

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Noviembre, 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 Autonoma 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.

Mi más profundo afecto y especial agradecimiento a la Dra. Marisabel Mourelle Mancini por su valiosa dirección y paciente enseñanza al dedicar incondicionalmente su tiempo, conocimiento y experiencia en la elaboración de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado una beca-crédito (Registro No. 47681) durante mis estudios e investigación de Maestría en Biología Experimental.

***

Agradezco al Dr. Rubén Román Ramos y al Dr. Gilberto Castañeda que aportaron valiosos comentarios en la elaboración de esta tesis.

***

Agradezco a todo el grupo de trabajo del laboratorio por la excelente colaboración técnica que me brindaron durante el desarrollo experimental de esta investigación, además del agradable ambiente de trabajo y compañerismo que demostraron.

***

Agradezco a la Sra. Concepción Avalos por su impecable trabajo mecanográfico y su incondicionable disposición en la elaboración de esta tesis.

***

Agradezco al Sr. Alfredo Padilla por la realización de las figuras y gráficas del presente trabajo.

A MIS PADRES

A MIS HERMANAS

A ARTURO

A CONY

INDICE

		Página
	PROLOGO	1
I.	INTRODUCCION	3
I.1.	Bases Anatomofisiológicas del Daño Hepático . .	7
I.1.1.	Organización de la Microcirculación	7
I.1.2.	Zonas Microcirculatorias y su Heterogeneidad Enzimática y Metabólica	9
I.2.	Estructura y Función Normal de la Superficie Celular del Hepatocito	11
I.3.	Clasificación de Agentes Hepatotóxicos	12
I.4.	Generalidades acerca de la Hepatotoxicidad que inducen los Hidrocarburos Halogenados (Halocarburos)	16
I.4.1.	Hepatotoxicidad del CCl4	18
I.4.2.	Concecuencias de la Lipoperoxidación	24
	a). Alteraciones de la Membrana Plasmática . .	24
	b). Alteraciones en la Actividad de los Sistemas Enzimáticos incluídos en las Membranas Celulares.	25
	c). Lipoperoxidación y Liberación de Enzimas Lisosomales	25
	d). Inhibición en la Síntesis de Proteínas Hepáticas	26
I.5.	Fisiopatología de la Cirrosis Hepática	26
I.5.1.	Tratamiento de la Cirrosis Hepática	29
	a). Colchicum Autumnale: Cólchico	30
	b). Silibium Marianum	33

I.6. Detección y Evaluación del Daño Hepático Inducido Químicamente 34
I.6.1. Análisis Histológico del Daño Hepático 37
I.6.2. Gamma-Glutamil Transpeptidasa (GGTP). 41
I.6.3. Fosfatasa Alcalina (FA) 43
II. OBJETIVO 45
III. MATERIAL Y METODOS 46
III.1. Animales 46
III.1.1. Obtención del Suero 47
III.1.2. Obtención de la Fracción de Membranas Semipurificadas de Hepatocitos de Rata 48
III.1.3. Medición de la Actividad de ATPasa por el Método Colorimétrico de Ames (3) 50
III.1.4. Determinación de la Gamma-Glutamil Transpeptidasa 50
III.1.5. Determinación de la Actividad de la Fosfatasa Alcalina 53
III.1.6. Determinación de la Actividad de la Alanina Amino Transferasa Sérica (Transaminasa Glutámico Pirúvica) 54
III.1.7. Determinación de la Glucosa-6-Fosfatasa en Sueros 55
III.1.8. Determinación de Proteínas Séricas Totales. Método de Bradford (18) 56
III.1.9. Determinación del Contenido de Glucógeno Hepático 56
III.1.10. Determinación del Contenido de Colágena en

Muestras de Tejido Hepático 58
III.1.11. Estudios Histoldgicos del Hígado 59
III.1.12. Tratamiento Estadístico de los Datos y Nivel de Significancia 59
IV. RESULTADOS 60
IV.1. Estudio Agudo 60
IV.2. Estudio Crónico 73
a). Capacidad de la Silimarina para prevenir el daño hepático crónico inducido por el CCl4 (cirrosis) 73
b). Capacidad de la Silimarina para revertir el daño hepático crónico inducido por el CCl4 (cirrosis) 92
V. DISCUSION 99
V.1. Efecto del Pretratamiento con Silimarina sobre la Actividad de FA, TGP, GGTP y G-6-Pasa . . . 101
V.2. Efecto del Pretratamiento con Silimarina sobre los Parámetros de Daño Hepático Determinados Histológicamente 105
V.3. Efecto del Tratamiento con Silimarina sobre los Parámetros de Daño Hepático en el Tratamiento Crónico con CCl4 108
VI. CONCLUSIONES 111
VII. BIBLIOGRAFIA 113

PROLOGO

El daño hepático inducido por sustancias químicas (CCl_4) depende no solamente del agente químico, sino también del período de exposición. Por ejemplo, después de una exposición aguda se puede observar acumulación de lípidos, necrosis celular o disfunción hepatobiliar, mientras que en la exposición crónica se observa generalmente cirrosis o cambios neoplásicos. En las células, las alteraciones en la estructura y sistemas enzimáticos de la membrana dan lugar a la pérdida de la integridad celular. Un fármaco con interesante acción hepatoprotectora es la silimarina, cuya capacidad para prevenir y revertir las modificaciones de los indicadores de daño hepático en la hepatitis tóxica y cirrosis experimental inducida con CCl_4, se evaluó en este trabajo.

Los resultados en el daño agudo muestran un incremento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA), gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y una disminución significativa de la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) en el suero de las ratas intoxicadas con CCl_4. También se presentó una disminución de la actividad de la F.A., GGTP, ATPasa Na^+/K^+ y Ca^{2+} en las membranas plasmáticas. La administración de una sola dosis de silimarina previamente al CCl_4 no previno el efecto causado por el CCl_4 en la actividad de las enzimas séricas: F.A., GGTP, y G-6-Pasa, pero sí se observó efecto significativo sobre la actividad de la TGP. La administración de silimarina también previno totalmente la

pérdida de la actividad de la F.A. en la membrana y parcialmente la de la GGTP. Aunque no se observó ningún efecto sobre la actividad de la ATPasa de Ca2+, el tratamiento con silimarina previno totalmente el efecto causado por el CCl4 sobre la actividad de la ATPasa de Na+/K+.

Los resultados en el daño crónico muestran un incremento significativo de la actividad de la F.A., GGTP, TGP y G-6-Pasa en el suero de ratas intoxicadas con CCl4, un aumento en la actividad de la F.A. y GGTP en las membranas plasmáticas y una disminución de la actividad de la ATPasa Na+/K+ y Ca2+ en las membranas plasmáticas. Se encontró un aumento en el contenido de colágena y una disminución en el contenido de glucógeno hepático. La administración de silimarina previno el efecto causado por CCl4 en la actividad de todas las enzimas séricas, no previno el aumento de la actividad de la F.A. y la GGTP en la membrana, pero se observó efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na+/K+ y

La administración de silimarina previno parcialmente el incremento del contenido de colágena y totalmente la pérdida del contenido del glucógeno. La silimarina por sí misma tuvo un efecto directo en la actividad de la F.A. sérica y membranal.

I. INTRODUCCION

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados, en el hombre comprende del 2 al 3% del peso corporal (72). Se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma y presenta cuatro lóbulos separados de manera incompleta. Su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson).

El hígado tiene doble sistema de irrigación sanguínea (Fig. 1). La vena porta, que transporta sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, del bazo y del páncreas, suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo (55); ésta 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. 2). La sangre de los sinusoides fluye hacía el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central.

La unidad estructural clásica del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido, que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los bordes del poliedro y la vena central pasa por el centro de éste (Fig. 2) (24).

El hígado es esencial para la vida y los mamíferos, sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las

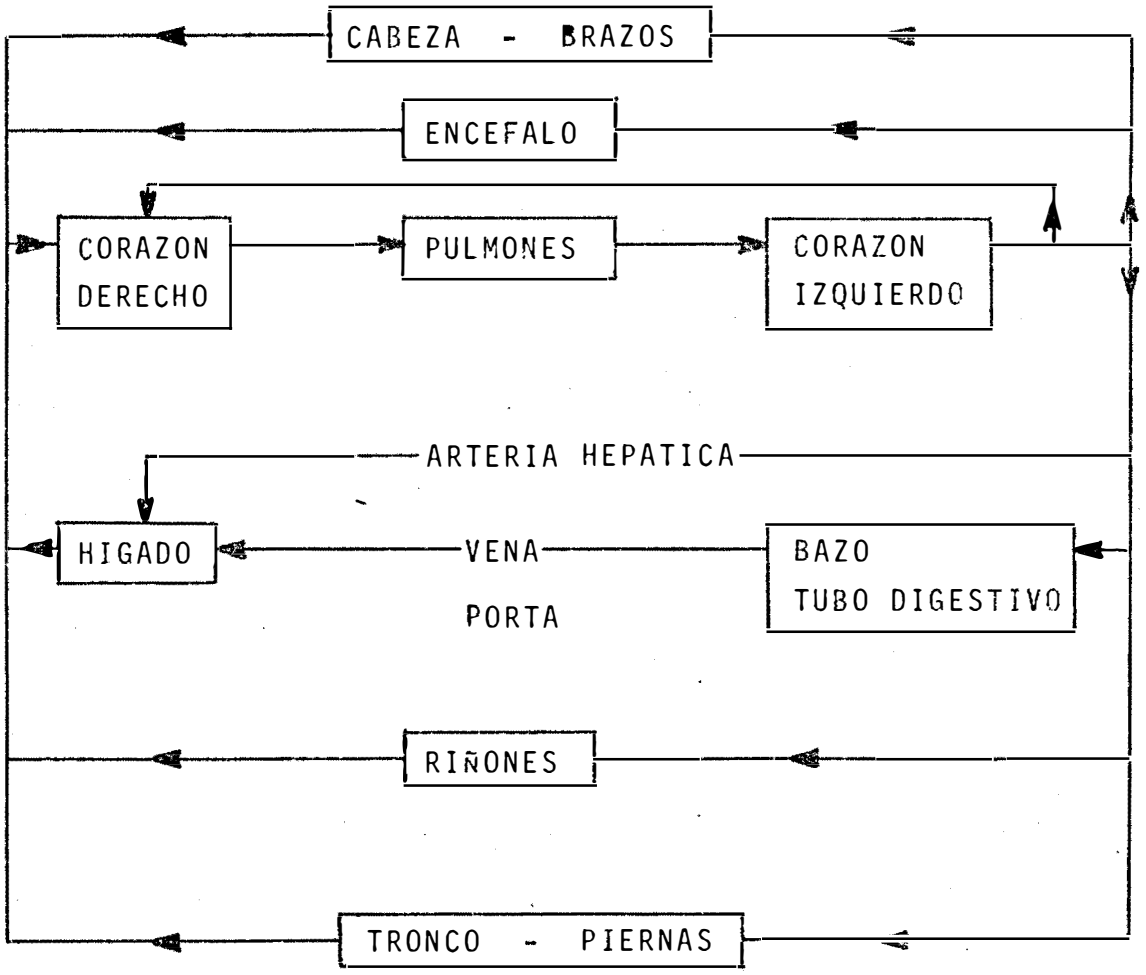


Fig. 1. Diagrama de la Circulación en el Adulto.

Tomado de William F. Ganong. Manual de Fisiología Médica. 5ta. Edición, pp. 488, Ed. El Manual Moderno, 1976.

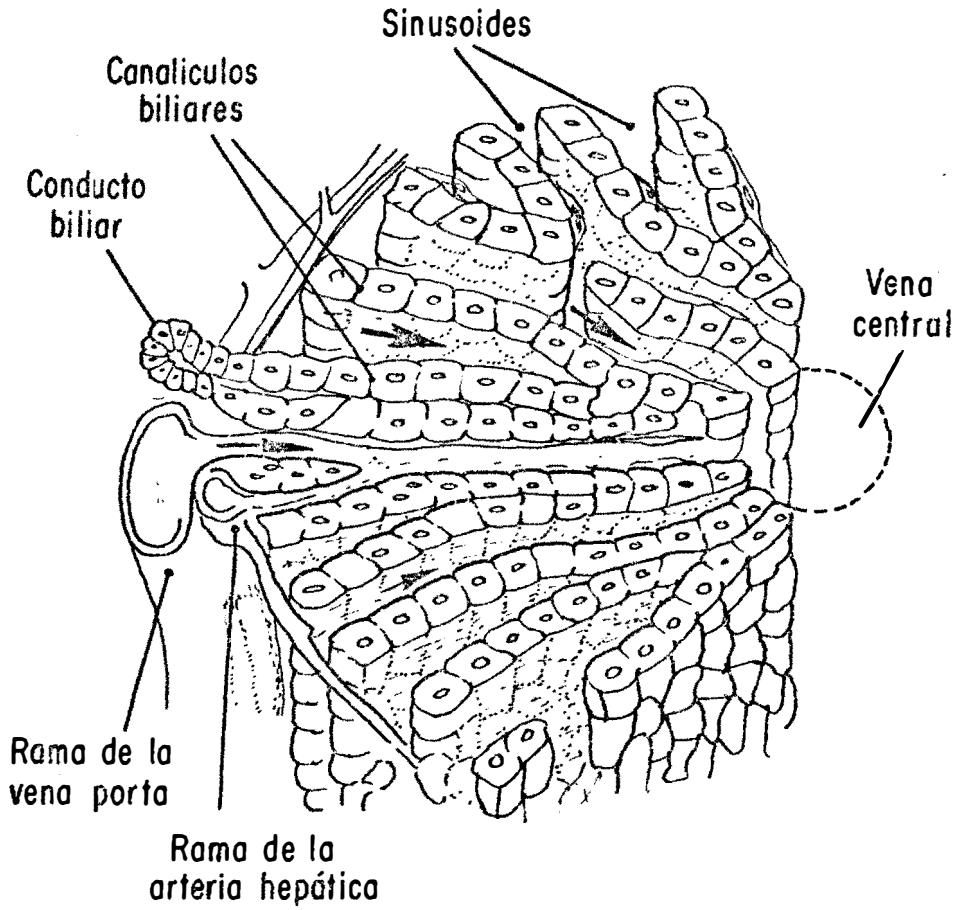


Fig. 2. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situadas en los canales portales, fluye a lo largo de los 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, Philadelphia, 1965.

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 endócrina. 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 (86). 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 (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. 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 (86).

I.1. Bases Anatomofisiológicas del Daño Hepático

I.1.1. Organización de la Microcirculación

Rappaport (145) menciona que la unidad estructural y funcional más pequeña del hígado es el acino hepático. Se define como una masa irregular de tejido parenquimatoso no encapsulado que se encuentra entre dos o más venas centrales. El eje de esta unidad llamado espacio portal, contiene una raíz del canal portal principal, una vénula portal terminal, una arteriola hepática, un conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios. En los cortes histológicos comprende solamente pequeños segmentos de los lobulillos clásicos adyacentes (Fig. 3) (145).

Rappaport y cols. (144) encontraron que el tejido dentro de cada acino recibe sangre de los vasos de su propio espacio portal. Dentro de cada acino, las células se agrupan en zonas concéntricas alrededor de su eje. Las células más próximas al eje y a los vasos aferentes 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 más sensible al daño por disturbios circulatorios (isquemia, anoxia ó congestión) y deficiencias nutricionales.

La zona 2 es una porción de tejido de transición entre las zonas 1 y 3, que continuamente cambia de dimensión. Con un incremento en el flujo de la microcirculación, la zona 1 se expande sobre la zona 2 (145).

Las sustancias tóxicas se empiezan a metabolizar en la

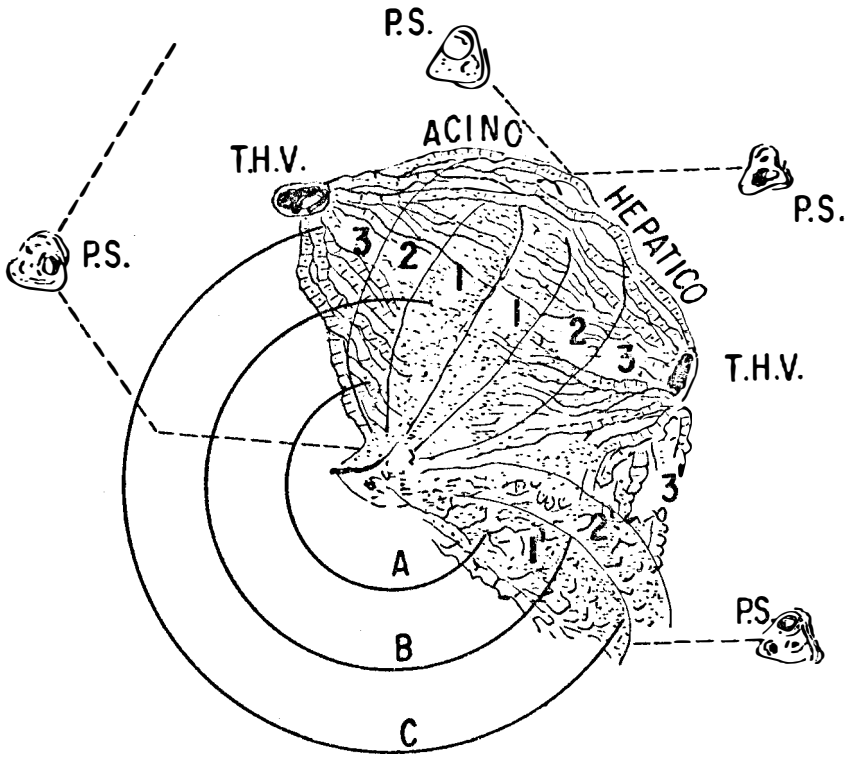


Fig. 3. Irrigación de un acino hepático simple. La tensión de oxígeno y el nivel de los principales nutrientes de la sangre disminuyen en los sinusoides desde la zona 1 hasta la 3. Las zonas 1', 2' y 3' indican volumenes correspondientes de una porción de una unidad acinosa inmediata. El círculo A encierra 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).

zona 1 dañando los microvasos aferentes, produciendo un incremento en la permeabilidad y en ocasiones microhemorragias.

I.1.2. Zonas Microcirculatorias y su Heterogeneidad Enzimática y Metabólica

La diferente irrigación y presión de oxígeno en las zonas 1 y 3 crean un microambiente específico para ciertas actividades enzimáticas. La zona 1 en el área periportal tiene una presión de oxígeno alta, mientras que la presión de oxígeno en la zona 3 que se encuentra en la periferia del acino y en la vecindad de la vena central es baja.

En la figura 4 se observa una organización metabólica diferente la cual está en estrecha relación con la dirección del flujo sanguíneo en el acino hepático.

Las células en la zona 1 presentan mayor síntesis de glucógeno que las células de las otras zonas, como se indica por los altos niveles de UDP-glucosa (uridin difosfato glucosa), α-4 glucosíl transferasa, fosforilasa y glucosa-6-fosfatasa (88). Estas células contienen numerosas mitocondrias y los procesos oxidativos operan a un alto nivel por la vía del ciclo de Krebs. También se ha encontrado actividad de enzimas respiratorias como succinil deshidrogenasa, citocromo oxidasa y β-glucuronidasa, para la glucuronidación de sustancias y drogas a ser excretadas.

Le Bouton (95) ha demostrado que la zona 1 es la principal área en la formación de proteínas plasmáticas y también es mas activa en la secreción de bilis.

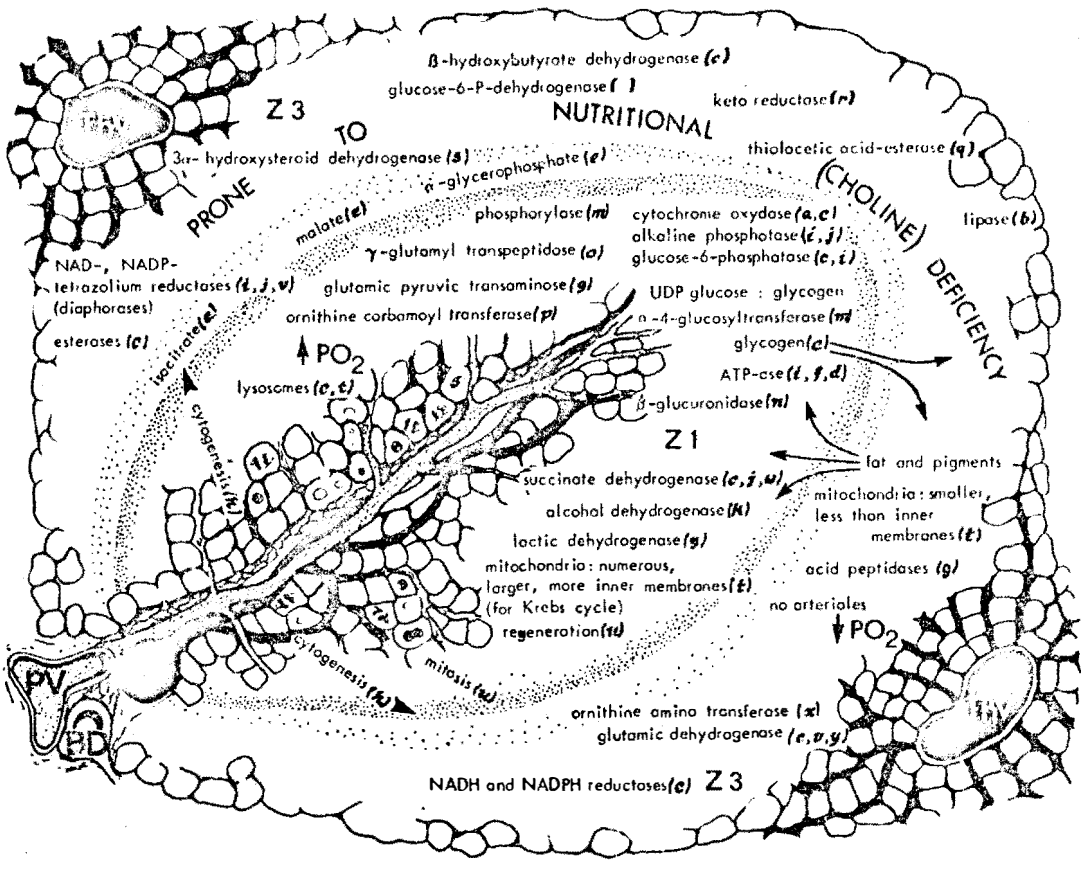


Fig. 4. Areas metabólicas en el acino hepático. Las actividades enzimáticas específicas indican predominantemente funciones metabólicas en cada una de las zonas microcirculatorias del acino. P:V, vena portal; ThV, vénula hepática terminal; BD, conducto biliar; hep. art, arteriola hepática; Z1 = Area periportal; Z3 = Area Perivenular. Rappaport Physioanatomical Basis of Liver Injury. Toxic Injury of the Liver. Pact A.M. Farber and M. M. Fisher. Marcel Dekker I.N.C. (1979).

En la zona 3 se ha observado mayor cantidad de retículo endoplásmico y menos mitocondrias que en la zona 1. Esta zona es rica en el sistema oxidasa de funciún mixta, que consiste de NADPH-citocromo reductasa y citocromo P-450 (57), responsable de un gran número de reacciones en el metabolismo de fármacos (63). Aquí hay más cantidad de NADH y NADPH (40). El glucógeno se almacena y hay formaciún de grasas y pigmentos.

Esta heterogeneidad enzimática y metabólica de las células en las diferentes zonas esta relacionada con la lesiún selectiva de las células en diferentes partes del acino hepático en presencia de agentes hepatotóxicos (178,191).

Estructura y Función Normal de la Superficie Celular del Hepatocito

El hepatocito que normalmente presenta apariencia poliédrica, tiene cuatro caras: dos caras adyacentes a otros hepatocitos, la sinusoidal y la pared del canalículo biliar, se ha estimado que representan el 37, 50 y 13% respectivamente del área membranal de los hepatocitos. La superficie sinusoidal presenta numerosas microvellosidades y es el sitio a través del cual se lleva a cabo el intercambio metabólico entre el hepatocito y la sangre. El canalículo biliar está formado por la separaciún de dos o más hepatocitos adyacentes aproximadamente de 1-2 um de diámetro y se ha observado que las microvellosidades de su pared son más regulares que las de la superficie sinusoidal (114).

De acuerdo a Wisher y Evans (214) hay una polarizaciún en las características bioquímicas de las subfracciones aisladas

de la membrana plasmática del hepatocito de rata, la subfracción derivada de la superficie sinusoidal se caracteriza por una alta actividad de adenilato ciclasa sensible a glucagon, las subfracciones de la membrana canalicular presentan alta actividad de diferentes enzimas incluyendo Mg+2 ATPasa, 5'-nucleotidasa, nucleótido pirofosfatasa, fosfatasa alcalina, sin embargo, la subfracción derivada de la superficie adyacente a otro hepatocito presenta baja cantidad de todas estas enzimas.

Por observaciones histoquímicas se ha demostrado que hay varias enzimas que pueden usarse como marcadores de función de la membrana plasmática, por ejemplo: fosfatasa alcalina y la aminotransferasa, las cuales aunque no se distribuyen uniformemente en la superficie del hepatocito están concentradas en la cara canalicular.

La membrana plasmática que envuelve a la célula, es una bicapa de lípidos en la cual se encuentran insertadas proteínas globulares. Algunas son estructurales; otras funcionan como enzimas, algunas están encargadas del transporte transmembranal, otras son receptores para hormonas o moléculas fisiológicamente activas, mientras que otras principalmente glucoproteínas están involucradas en la adhesión celular y en el reconocimiento de célula a célula. Aunque se ha estudiado mucho la organización estructural y molecular de la membrana plasmática en general se conoce muy poco acerca de la membrana plasmática del hepatocito.

I.3. Clasificación de Agentes Hepatotóxicos

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.

La mortalidad asociada con diversas formas de daño hepático varía, la incidencia de daño también varía en las diferentes especies y la presencia de una relación dosis-respuesta no siempre es aparente. En la actualidad no es suficiente decir que una sustancia causa daño hepático sino que es necesario plantear el posible mecanismo de acción de dicho daño (133).

El gran número y variedad de agentes químicos que pueden producir daño hepático puede ser considerado de acuerdo a la tabla I (222).

Las hepatotoxinas intrínsecas pueden ser clasificadas como directas o indirectas (Fig. 5). Las hepatotoxinas directas son venenos protoplásmicos que rápidamente causan daño al hígado y a una gran variedad de órganos (tracto gastrointestinal, páncreas, cerebro, pulmón, riñón, corazón, piel, etc.). El daño causado en el hepatocito es indiscriminado e incluye todos los organelos celulares, el resultado es una destrucción celular.

TABLA 1

DIFERENTES FORMAS DE CLASIFICACION PARA AGENTES HEPATOTOXICOS

I. DE ACUERDO AL MECANISMO DE ACCION.

A). HEPATOTOXINAS INTRINSECAS.

B). AGENTES QUE ACTUAN POR IDIOSINCRACIA DEL HUESPED.

II. DE ACUERDO AL TIPO DE DAÑO QUE CAUSAN.

A). CITOTOXICO.

B). COLESTATICO.

C). UNA MEZCLA DE AMBAS.

III. DE ACUERDO A LAS CIRCUNSTANCIAS DE LA EXPOSICION.

A). ACCIDENTAL: OCUPACIONAL O DOMESTICA.

B). SUICIDA.

C). IATROGENICA.

D). CONTAMINACION AMBIENTAL

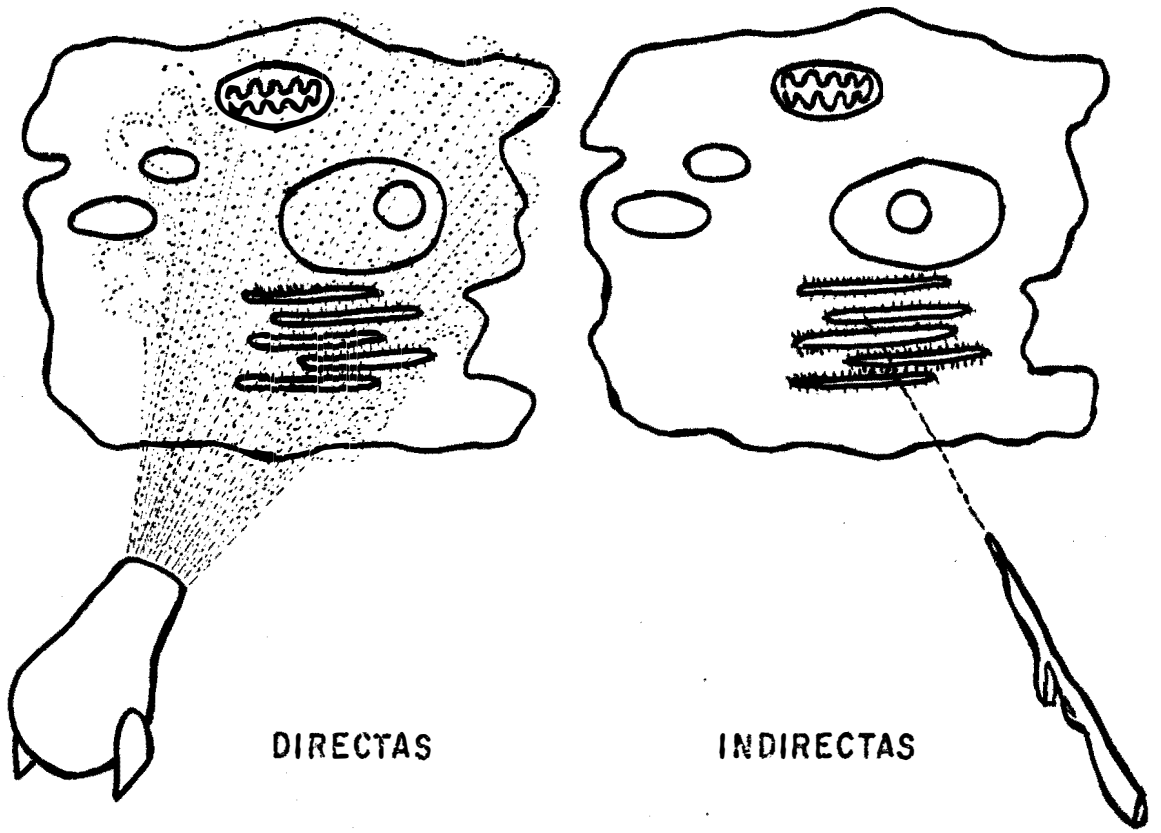


Fig. 5. Diagrama que representa las supuestas diferencias entre el modo de acción de hepatoxinas intrínsecas directas e indirectas. Las directas dañan todos los elementos de la célula, mientras que las indirectas dañan en forma precisa y selectiva. Tomado de H.J. Zimmerman. Hepatic injury caused by Therapeutic Agents. Part A. Ed. by Frederick F. Becker. Marcel Dekker I.N.C., New York, (1974).

Las hepatotoxinas directas producen lesiones zonales como necrosis generalmente acompañada por esteatosis (219). Esta categoría incluye al CCl4, hidrocarburos clorados, fósforo inorgánico y algunos metales pesados.

Las hepatotoxinas indirectas son generalmente antimetabolitos y compuestos relacionados que producen daño hepático por interferencia con alguna vía metabólica específica, ellos alteran la organización del hepatocito. Esta categoría incluye antibióticos, antimetabolitos y clorpromazina (129, 222).

I.4. Generalidades acerca de la Hepatotoxicidad que Inducen los Hidrocarburos Halogenados (Halocarburos)

Existen en la literatura numerosos reportes en los que se hace referencia a la hepatotoxicidad que producen diversas sustancias (16, 115), que varían desde las toxinas de origen vegetal, los compuestos sintéticos usados con fines terapéuticos y los solventes de uso industrial. Dentro de este último grupo destacan por su importancia los halocarburos, ya que durante los pasados 50 años se volvieron ubicuos constituyentes de nuestro ambiente y ahora están presentes en cantidades pequeñas en el aire, en el agua y en los alimentos. La exposición de los humanos a los halocarburos puede ser francamente intensa y/o prolongada bajo ciertas circunstancias tales como sitios de manufactura, lugares de uso en la industria, en el comercio o en la casa, o cuando se administran con propósitos médicos.

La mayoría de los xenobióticos son procesados en el hígado por sistemas enzimáticos inespecíficos (58). Durante este

proceso muchos halocarburos como el CCl4 se transforman en especies reactivas capaces de producir reacciones citotóxicas dañinas sobre los hepatocitos y otros tejidos.

Además, algunos halocarburos provocan respuestas en los constituyentes hepatocelulares, pudiendo sinergizar las acciones tóxicas de otros compuestos. Entre las respuestas potencialmente sinérgicas se incluyen la inducción del sistema de oxidasas de función mixta (FMO), que activa un amplio espectro de agentes químicos (26), y la depleción de los nucleófilos endógenos, que neutralizan a los electrófilos dañinos (224).

Algunas propiedades fisicoquímicas de los halocarburos tales como volatilidad a temperatura ambiente, alto coeficiente de partición y estabilidad contra la biotransformación extrahepática determinan su extensa captación hacia la célula y a sitios subcelulares, mientras que la polarización molecular, impedimento estérico y la fuerza relativa del enlace C-Cl determinan la facilidad de ruptura del mismo, influyendo así en la formación de radicales libres (42).

Los halocarburos son muy cotizados tanto a nivel industrial como de laboratorio debido a sus excelentes propiedades solventes y a su poca inflamabilidad, siendo el tetracloruro de carbono (CCl4) el compuesto más empleado. Actualmente se le usa en la industria en la extracción de grasas, como disolvente del caucho y en la manufactura de la laca. Se reportan constantemente intoxicaciones fatales en humanos sometidos a sus vapores (28, 47, 132), lo cual hace de la toxicología del CCl4 así como de las sustancias con posible efecto protector un importante motivo de investigación.

I.4.1. Hepatotoxicidad del CCl4

Cuando el CCl4 es inhalado se encuentran altas concentraciones del mismo en el cerebro, en la médula ósea, en el corazón y en el hígado (205), siendo el hígado el órgano más afectado. Sus efectos tóxicos pueden descubrirse en el animal íntegro a dosis tan bajas como 0.01 mg/kg (148).

Reynolds y Thiers (154) habían sugerido que el CCl4 producía toxicidad simplemente por ser un disolvente de los lípidos de las membranas. Sin embargo, el CCl4 reacciona con el citocromo P-450 de los microsomas hepáticos (73) que es parte del sistema FMO del RE liso hepático. No obstante, este sistema existe también en otros órganos, tales como el riñón y existen en la literatura numerosos reportes que hacen referencia a la nefrotoxicidad del CCl4 en varias especies (73, 85, 169). Cuando el CCl4 se metaboliza, produce un daño en el retículo endoplásmico que conduce a defectos funcionales del hepatocito y a manifestaciones bioquímicas de daño hepático (156, 205). De acuerdo con Recknagel y Glende (150) y con Slater (185), una característica de relevancia para la hepatotoxicidad potencial del CCl4 es la relativamente baja energía de asociación del enlace C-Cl.

Por estas razones se puede ver porqué el CCl4 ha sido uno de los agentes hepatotóxicos que más ha llamado la atención de los investigadores (36), ya que existen ciertas ventajas al estudiar una sustancia simple, capaz de producir efectos devastadores y muerte celular inmediata.

Se han planteado hipótesis para explicar la acción

tóxica del CCl_4, pero a la fecha la más aceptada es la de la lipoperoxidación. Hace mucho tiempo que se sabe que el CCl_4 es metabolizado en el organismo (149). En la actualidad se acepta (109, 138, 141, 149) que la toxicidad del CCl_4 depende de su metabolismo y que la lesión inicial principal ocurre en el retículo endoplásmico (RE) (149). Butler (20) fue el primer investigador en proponer que el enlace C-Cl se rompía homolíticamente "in vivo". Si esto último ocurre, los dos fragmentos formados con un electrón desapareado podrían ser los radicales libres $\dot{C}Cl_3$ y $\dot{C}l$ y así, cada fragmento podría casi instantáneamente, tomar un electrón de una fuente externa y en consecuencia alcanzar la estabilidad de su octeto. Si el radical orgánico adquiere un electrón y un ión hidrógeno, se forma $CHCl_3$ y el ión cloruro resulta de $\dot{C}l + 1e^- \longrightarrow Cl^-$.

Butler (20) reconoció que los radicales libres postulados como los productos inmediatos de la fisión homolítica inicial son poderosos agentes alquilantes de grupos -SH, además de inhibir irreversiblemente los grupos -SH de las enzimas. De esta manera, una característica importante de la hipótesis original de Butler fue la idea de que los efectos hepatotóxicos del CCl_4 "in vivo" se entenderían en términos de un ataque directo por radicales libres sobre las enzimas del hepatocito.

De manera independiente Wirschafter y Cronyn (213) comprobaron que el CCl_4 sufría ruptura homolítica en el hígado, con lo cual se producía el radical libre $\dot{C}Cl_3$ y el anión Cl^-.

Gregory (67) estableció que el CCl_4 puede reaccionar en el organismo de la siguiente manera:

a). $e^- + CCl_4 _____ \dot{C}Cl_3 + Cl^-$

b). $R^{\cdot} + CCl_4 _____ \dot{C}Cl_3 + R\text{-}Cl$

Dicho autor puntualizó que la reacción requiere de la captura de un electrón por el CCl_4 para que se pueda formar el $\dot{C}Cl_3$. Es importante destacar que las evidencias de que el CCl_4 sufre ruptura homolítica son indirectas, pues existen pruebas experimentales que demuestran que se forma exacloroetano ($Cl_3C\text{-}CCl_3$), posiblemente por una reacción de condensación entre dos radicales $\dot{C}Cl_3$ (48).

Los estudios descritos con anterioridad, complementados con los conocimientos de la protección proporcionada por los antioxidantes como la vitamina E (14, 54, 80), llevaron a Recknagel y Ghoshal (148) a proponer la hipótesis de la lipoperoxidación. Esta hipótesis, complementada con hallazgos descubiertos posteriormente por Recknagel (149-151), básicamente propone que la mayoría de los efectos producidos por la acción tóxica del CCl_4 dependen de su metabolismo previo por un complejo sistema enzimático incluído en la membrana del retículo endoplásmico liso (REL): las oxidasas de función mixta (FMO) (106), que consta de un conjunto de enzimas involucradas en el metabolismo de drogas y compuestos exógenos, con la consecuente formación del radical libre altamente reactivo $\dot{C}Cl_3$ (214), el cual ataca la estructura y función de las macromoléculas lipídicas y protéicas, disminuye la síntesis de proteínas "in vivo" (187), produce desactivación de los componentes selectivos del sistema FMO (155) y además, inicia una serie de reacciones autocatalíticas en cadena con los ácidos grasos poliinsaturados que componen los lípidos que integran las

membranas del REL (150), produciéndose la descomposición peroxidativa de los mismos. Este evento engendra serias consecuencias para el hepatocito (1, 196, 197), tales como la esteatosis hepática (149), glucogenolisis (76), liberación de enzimas celulares hacia el torrente sanguíneo (35, 152, 220), necrosis (169), hinchazón y desintegración mitocondrial (6, 77, 81-83, 97, 154), así como desintegración lisosomal debido a la descomposición peroxidativa de los lípidos de la membrana lisosomal, etc. (5, 32, 209).

Por lo tanto, la hipótesis de la lipoperoxidación explica los efectos tóxicos del CCl4 teniendo como base el metabolismo del mismo a $\dot{C}Cl_3$.

Un hecho notable de la hipótesis de la lipoperoxidación es el efecto multiplicativo de la misma, ya que durante este proceso se generan muchos radicales libres nuevos por cada $\dot{C}Cl_3$ formado.

En la figura 6 podemos observar como el CCl4 es metabolizado para iniciar el proceso de lipoperoxidación destructiva.

Una vez que el CCl4 es metabolizado por el citocromo P-450 (150, 181, 185), apreciamos que el radical $\dot{C}Cl_3$ sustrae hidrógenos de los grupos metilénicos adyacentes a carbonos con dobles enlaces en las cadenas poliinsaturadas de los ácidos grasos polienóicos de los lípidos de las membranas del RE dando lugar a la formación de cloroformo ($CHCl_3$) y el correspondiente radical libre orgánico (143) que ya sea inmediatamente o después de la deslocalización del electrón del radical libre por

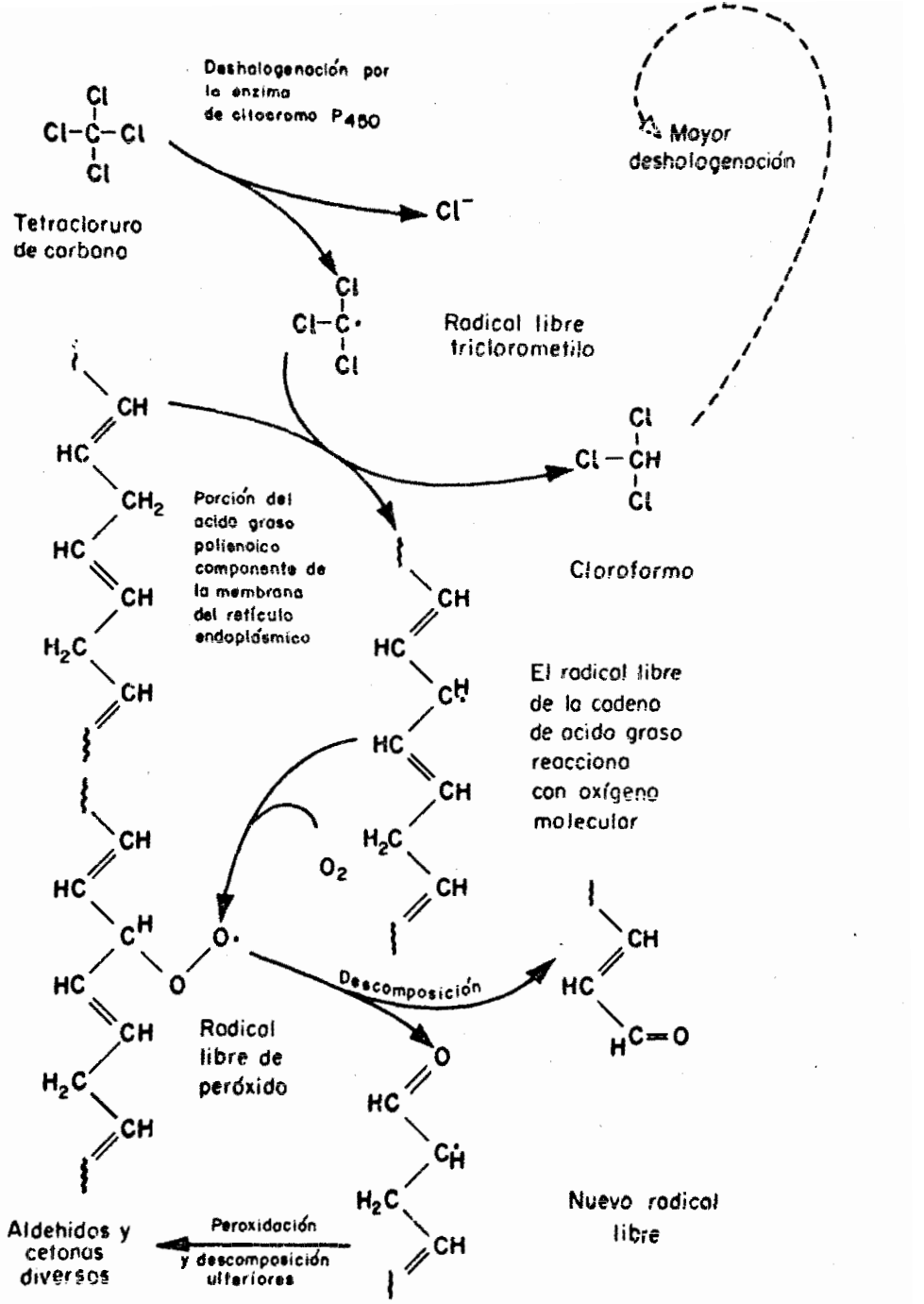


Fig. 6. Mecanismos que inician la reacción hepatotóxica del tetracloruro de carbono.

resonancia, es sensible de reaccionar con el oxígeno (02) (110), formándose rápidamente el radical peróxido (R-00·) y. eventualmente el peróxido orgánico.

El 02 es paramagnético y tiene 2 electrones desapareados, por lo que es un birradical libre, y sus reacciones con radicales libres orgánicos para formar el correspondiente radical peróxido orgánico ocurren muy rápidamente. El R-00· puede también sustraer hidrógenos de las cadenas poliinsaturadas y formar el correspondiente hidroperóxido (79) o endoperóxido (139, 140). Los peróxidos orgánicos son en general compuestos muy inestables que experimentan un número de reacciones muy complejas y mal entendidas que conducen a ruptura de las cadenas carbonadas, con la formación de aldehídos y cetonas (56), compuestos carbonílicos hidroxiinsaturados (176), malondialdehído (MDA), hidrocarburos de cadena corta como etano, pentano y otros.

Los peróxidos orgánicos también pueden experimentar ruptura homolítica, conduciendo a la formación de dos nuevos radicales libres los cuales pueden atacar los puentes metilénicos vecinos. El proceso una vez iniciado, es autocatalítico (171).

Ya que la lipoperoxidación involucra un ataque destructivo sobre los ácidos grasos poliendicos, es de esperarse una reducción marcada de éstos en el material microsomal sujeto a lipoperoxidación (34, 171, 201).

Estudios metabólicos más recientes realizados "in vitro" (93, 113, 136, 180), proporcionan evidencias convincentes de que el CC14 es metabolizado a diversos intermediarios reactivos potencialmente dañinos como el radical $\dot{C}C13$, fósgeno (O = CC12), especies electrofílicas de cloro, el radical

peroxitriclorometilo (·OOCCl3), que podría formarse por la reacción directa del ·CCl3 con el O2 o del CCl4 con el radical aniónico superóxido (127, 158).

De acuerdo con esta hipótesis, el CCl4 actuaría como un agente pro-oxidante en la descomposición peroxidativa de los lípidos de las células hepáticas. Más aún, dicha hipótesis proporciona nuevas evidencias de que la hepatotoxicidad del CCl4 depende de su metabolismo.

Muchos de los agentes que protegen contra la acción tóxica del CCl4, son compuestos captadores de radicales libres. Los antioxidantes lipídicos pertenecen a esta clase, lo mismo que los compuestos que contienen sulfhidrilos, aunque no todos los compuestos protectores funcionan por el mismo mecanismo (11, 101, 111).

I.4.2. Consecuencias de la Lipoperoxidación

a). Alteración de las Membranas Celulares.

El proceso de lipoperoxidación tiene serias consecuencias a nivel de las membranas, e involucra 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 (170), tales como el ácido araquidónico (71). 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 succinooxidasa de las mitocondrias de corazón e hígado se han

asociado con el daño lipoperoxidativo (71, 170, 195).

Asimismo, se ha demostrado (4, 106) que el CCl4 disminuye el metabolismo microsomal de las drogas y demás agentes exógenos, así como los niveles de citocromo P-450.

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.

b). Alteraciones en la Actividad de los Sistemas Enzimáticos incluídos en las Membranas Celulares.

Los fosfolípidos son esenciales para el normal funcionamiento de una gran variedad de enzimas microsomales como la glucosa-6-fosfatasa (37), ATPasa (103), UDP-glucuroniltransferasa (65) y el sistema metabolizante de drogas (23, 61, 192, 210), 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 estructural 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.

c). Lipoperoxidación y Liberación de Enzimas Lisosomales.

En una investigación muy reciente, Younes y Albrecht (217) realizaron un experimento "in vitro" en el que demostraron que el CCl4 y otros agentes que promueven lipoperoxidación dan

origen a la liberación de β-glucuronidasa lisosomal, mientras que los agentes que inhiben la lipoperoxidación previenen paralelamente la liberación de enzimas lisosomales, sugiriendo ésto, que ambos eventos están estrechamente relacionados, de tal manera que el daño a las membranas lisosomales con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas parece ser un paso consecutivo a la lipoperoxidación, conduciendo finalmente a daño celular.

d). Inhibición en la Síntesis de Proteínas Hepáticas.

Durante el daño celular hepático producido por el CCl_4 ocurre una marcada depresión en la síntesis de proteínas hepáticas y dispersión de los poliribosomas (2, 50, 177).

Existen evidencias de que el radical CCl_3 ataca los grupos -SH de las enzimas, y que es una característica sobresaliente en el daño celular hepático producido por el CCl_4 (25).

Además de producir elevación en la actividad sérica de algunas enzimas y alteraciones en los procesos de transporte del hepatocito, los agentes hepatotóxicos pueden producir cambios en los constituyentes estructurales y/o funcionales del hepatocito, que han sido usados para cuantificar y detectar el grado de daño hepático producido.

I.5. Fisiopatología de la Cirrosis Hepática

La cirrosis hepática constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. Mientras que en el hemisferio oriental resulta como consecuencia de la esquistosomiasis hepato-esplénica (206), en el hemisferio occidental el alcoholismo es el

responsable de más del 60% del total de muertes atribuibles a cirrosis hepática (29.53). Rojkind (165) 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. En México mueren aproximadamente 300,000 personas por año debido a las complicaciones de la cirrosis hepática (165).

La cirrosis hepática es la vía final común de todos los padecimientos crónicos que afectan al hígado en forma difusa. Desde el punto de vista anatómico, se caracteriza por daño celular generalizado, aumento del tejido conjuntivo, formación de nódulos de hepatocitos rodeados por bandas de colágena y distorsión de la arquitectura lobular (166).

El aumento del tejido conjuntivo hepático en la cirrosis, llamado fibrosis hepática y las modificaciones estructurales son responsables en parte de algunas de las alteraciones funcionales y hemodinámicas observadas (162).

El incremento en el contenido de tejido conjuntivo del hígado puede estar determinado por un aumento en la síntesis de colágena, una disminución de su degradación o ambos al mismo tiempo (160).

La distorsión de la arquitectura lobular del parénquima hepático causada por la fibrosis, produce cambios en la circulación del hígado que generalmente se manifiestan con una hipertensión portal. En los casos avanzados de la enfermedad, la fibrosis se convierte en el componente esencial. Los cortes histológicos revelan septos separados irregularmente que

constituyen los nódulos de hepatocitos, gruesas bandas de colágena distribuídas en todo el parénquima y una pérdida de la relación entre el espacio portal y la vena aferente hepática, resultando muy dificultoso lograr definir el lóbulo hepático (167).

Cuando el hígado sufre un daño masivo, con destrucción de un número grande de hepatocitos, la pérdida súbita del parénquima funcional estimula la regeneración hepática (121), la cual es un proceso coordinado que incluye regeneración celular, síntesis y degradación de colágena. En este caso se presenta una remodelación y una reabsorción del tejido cicatricial. El proceso regenerativo del hígado es rápido, en pocas semanas se reestablece la integridad anatómica y funcional (21, 142).

Cuando el hígado sufre un daño de menor intensidad y el número de células destruídas es pequeño, no se estimula la regeneración y solo se produce una pequeña cicatriz. Si la lesión se vuelve a producir, ya sea porque el agente inductor está presente o porque se estimulan mecanismos inmunológicos que perpetúan la enfermedad, tales como la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de la membrana de los hepatocitos, antígenos virales y proteínas contráctiles del citoplasma; el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero una fibrosis y posteriormente la cirrosis hepática (163, 164).

Aunque no se conoce el mecanismo exacto de la respuesta fibrogénica, hay datos experimentales que sugieren que los macrófagos juegan un papel muy importante en este proceso. La síntesis de colágena se estimula por la acción directa de los

agentes etiológicos o por efecto de los compuestos químicos que se liberan de los hepatocitos dañados (166). Los hepatocitos lesionados liberan una glucoproteína llamada fibronectina, que es un agente quimiotáctico capaz de dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (128).

Los conocimientos que se tienen hasta el presente parecen indicar que en las primeras etapas de la enfermedad predomina el aumento de biosíntesis de colágena con una actividad colagenolítica normal, o aumentada (52, 104).

Dependiendo del estado de la fibrosis hepática y de factores genéticos y metabólicos, aún no bien definidos, la fibrosis puede continuar hasta cirrosis, independientemente de que el agente etiológico esté o no presente.

A medida que la enfermedad avanza se observa una disminución en la actividad de la colagenasa (105) y una desaparición de la enzima en la parte central de las fibras gruesas de colágena encontrándose solamente en la periferia de las mismas. En las etapas finales de la enfermedad, la actividad de esta enzima ya no es detectable (117, 118).

I.5.1. Tratamiento de la Cirrosis Hepática

Se ha postulado que la inhibición de la síntesis y del depósito de tejido conjuntivo en el hígado podría acompañarse de una mejoría en la evolución de la cirrosis (161,162).

El tratamiento de la cirrosis hepática comprende dos aspectos fundamentales. El primero es el tratamiento sintomático de las complicaciones de la misma, tales como el manejo de la hipertensión portal (sangrado de várices esofágicas y retención

de líquidos) y de la insuficiencia hepática (encefalopatía hepática y desnutriciún). El segundo, consiste en el tratamiento de la enfermedad misma que ha sido posible en años recientes gracias al avance del conocimiento de la fisiopatología de la cirrosis hepática.

En la actualidad se ha encontrado que es posible influir favorablemente la cirrosis hepática por medios farmacolúgicos.

La colchicina es la droga que posee mayores cualidades benéficas para el tratamiento de la enfermedad.

a). Colchicum Autumnale: Cólchico.

El extracto de las semillas de la planta Colchicum Autumnale contienen una sustancia alcaloide: la colchicina junto con otros productos como el ácido quelidúnico, la fisosterina y azúcares.

La estructura química de la colchicina consta de tres anillos: el primero es de carácter aromático y el segundo y tercero están compuestos por siete átomos de carbono (Fig. 7). El primer anillo está sustituido por tres grupos metoxi. El segundo por un grupo acetilamino y el tercero por un grupo metoxi y un grupo carbonilo.

Efectos:

1). Efecto Antifibrogénico:

a). Inhibe el transporte transmembranal de las proteínas de exportaciún, tales como la colágena (38, 126).

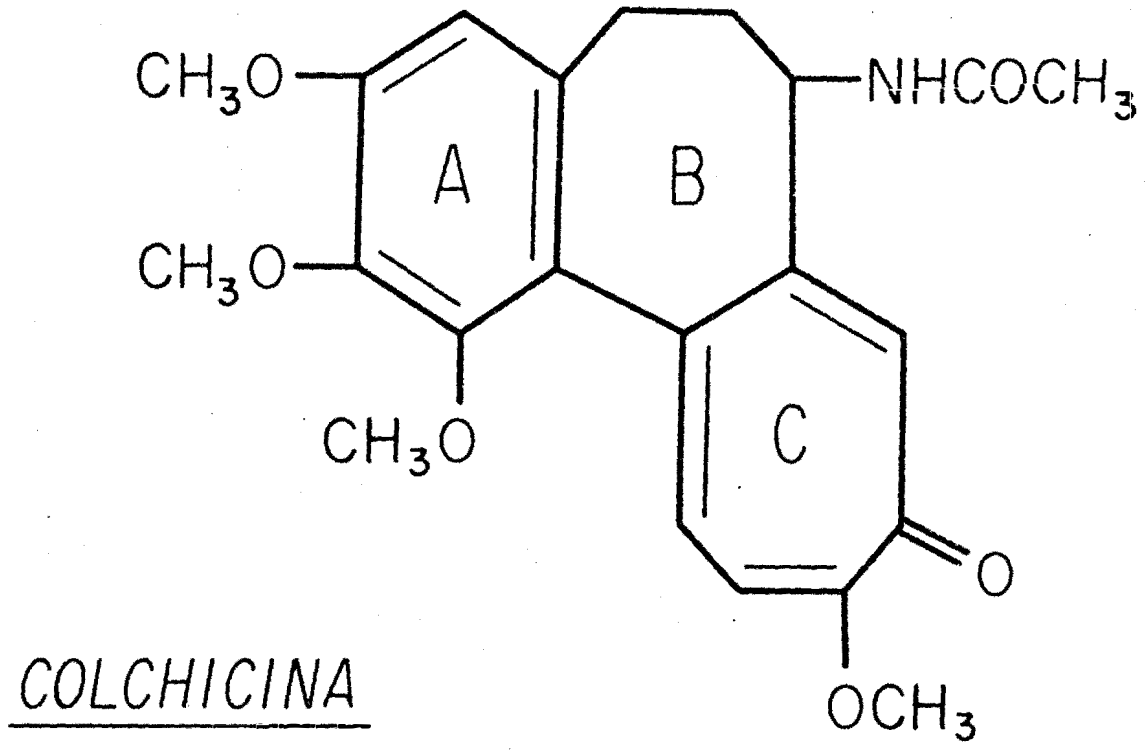


Fig. 7. Estructura Química de la Colchicina.

b). Inhibe de manera secundaria la síntesis de colágena (38).

c). Induce "in vitro" la producción de colagenasa y la liberación de procolagenasa activada por proteasa (74).

2). Efecto Antiinflamatorio

a). Inhibe citotoxicidad mediada por neutrófilos dependientes de anticuerpos, la movilización, adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos (102, 189).

b). Inhibe la liberación de histamina por los leucocitos y la liberación de cininas plasmáticas "in vitro" (102, 189).

3). En ratas cirróticas favorece las alteraciones de la actividad del sistema adenilato ciclasa de la membrana plasmática de hepatocito. En consecuencia corrige las alteraciones en el contenido de AMPc y glucógeno (122).

4). Protege las membranas plasmáticas y estabiliza las enzimas que tienen grupos -SH en su centro activo (175).

5). Incrementa permeabilidad de los canalículos biliares (8).

6). Previene alteraciones en las ATPasas (123).

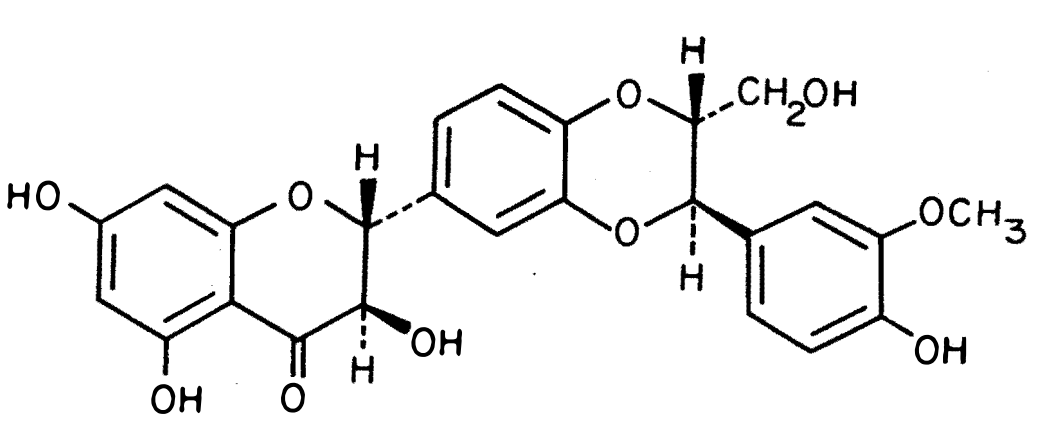
7). Fármaco seguro cuando se administra oralmente a una dosis diaria de 1.2 mg, sin embargo puede ser tóxica e incluso mortal (90).

8). Fármaco con un buen margen de seguridad y su uso resulta ético en la cirrosis (168).

b). Silibium Marianum

La silimarina aislada del extracto de las semillas de Silibium Marianum protege contra varias formas de daño experimental en el hígado, producido por diversas toxinas. Constituida de 3 compuestos isómeros: silibina, silidamina y silicristina. El principal componente activo es la silibina (204).

Estructura Química (96):



Los 3 compuestos tienen estructura fenilcromonona a la cual una molécula de alcohol coniferil es atacada por una unión oxidante de varias maneras (204).

Efectos:

1). Protector contra la hepatotoxicidad de CCl4 (70, 146), tioacetamida (70), galactosamina (146), faloidina y L-amanitina (204), praseodimium (193) y etanol (135).

2). Estabiliza membrana previniendo o inhibiendo la lipoperoxidación (186, 202).

3). Elimina radicales libres (186).

4). Altera fluidez de la membrana, interfiere con accesibilidad a la proteína de membrana (218).

5). Inhibe absorción primaria de toxinas y la reabsorción debida a la circulación enterohepática (44).

6). No es tóxico en pruebas agudas, crónicas y subcrónicas (70).

7). Efecto curativo que depende del tiempo entre la intoxicación y el tratamiento (203).

8). Estimula síntesis de RNA (188).

9). Modifica la capacidad regenerativa en ratas sujetas a hepatectomía parcial (125).

I.6. Detección y Evaluación del Daño Hepático Inducido Químicamente

Las lesiones hepáticas producidas por el CCl4 y el CHCl3 fueron estudiadas en animales de laboratorio durante los primeros 40 años del presente siglo. Las alteraciones celulares que se presentan entre los 10 y los 15 minutos posteriores a la intoxicación son comparables a los cambios que sufren las células hepáticas remanentes después de una hepatectomía parcial (96, 124). Se han estudiado las respuestas del hígado frente a una intoxicación aguda con CCl4 y se ha visto que un daño agudo produce necrosis que es seguida de una regeneración rápida.

Los complejos eventos reparativos que aparecen después de la administración de repetidas dosis de CCl4 varían con la magnitud del intervalo existente entre las dosis. Los intervalos cortos no permiten una reparación histológica completa y aunque los hígados se vuelvan relativamente resistentes a la acción del

CCl_4, después de administraciones sucesivas se produce un gradual desarrollo de cirrosis. Los cambios tempranos son reversibles si la administración del tóxico cesa a tiempo y el hígado regresa gradualmente a la normalidad.

La diversa naturaleza de la actividad funcional del hígado y su variedad de respuesta al daño, hace de la selección de los procedimientos de prueba apropiados una labor difícil.

La determinación de la actividad de las enzimas hepáticas liberadas a la sangre por el daño hepático se ha vuelto una de las herramientas mas útiles en los estudios de hepatotoxicidad.

La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para la determinación del daño hepático fue introducida en 1930 y 1940 con la demostración de la actividad sérica anormal de fosfatasa alcalina (157) y colinesterasa (19) en el daño hepático.

Sin embargo, el descubrimiento en 1950 de que la actividad de las diferentes transaminasas séricas estaban aumentadas por destrucción de los tejidos, representa un verdadero avance en los métodos enzimáticos séricos. Subsecuentemente se han identificado en la sangre otras enzimas, las cuales demuestran una actividad anormal en presencia de daño hepático.

Zimmerman (223) ha identificado cuatro categorías principales de enzimas séricas, basadas en su especificidad y sensibilidad a los diferentes tipos de daño hepático:

1). Enzimas cuya elevada actividad sérica refleja daño

colestático más sensiblemente que daño parenquimal, como la fosfatasa alcalina (FA), 5'-nucleotidasa y gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP).

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

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

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

c). Enzimas que están localizadas casi exclusivamente en el hígado, como la ornitina carbamil-transferasa (OCT) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH). Estas enzimas pueden ser particularmente usadas en el estudio de agentes con potencial hepatotóxico desconocido.

3. Enzimas que son insensibles al daño hepático, pero que son elevadas en el daño a tejidos extrahepáticos, como la creatina fosfocinasa.

4. Enzimas que muestran una actividad sérica deprimida en el daño hepático, como la colinesterasa.

En una serie de experimentos Molander y col. (116) establecieron que un número de estados necróticos inducidos con CCl4 son detectables por la elevación de la transaminasa glutámico-pirúvica sérica (TGPS).

Asimismo, Balazs y col. (9) demostraron que la TGPS se veía significativamente elevada en las ratas que eran tratadas agudamente con CCl4 y con otros agentes hepatotóxicos. Sin

embargo, también se ha demostrado que la TGPS es una medida insensible de esteatosis hepática (7, 64).

Balazs, estableció una correlación lineal entre la extensión de la necrosis hepática (determinada planimétricamente) producida con alcohol alílico en la actividad de la TGPS.

En lo que se refiere a FA y GGTP, pueden utilizarse, entre otras, para determinar daño hepático obstructivo. La actividad sérica de estas enzimas, localizadas en las membranas del hepatocito y de las células de los conductos biliares, aumentan durante la colestasis o daño hepatobiliar en humanos (12, 27, 208).

I.6.1. Análisis Histológico del Daño Hepático

El análisis del potencial hepatotóxico de un agente químico es incompleto sin una descripción histológica de la lesión producida. Zimmerman (223) ha encontrado algunas características de las lesiones hepáticas definidas por el microscopio de luz, tales como necrosis centrizonal, atribuída a la elevada concentración centrizonal del sistema FMO, que es responsable de la conversión del CCl4 al metabolito hepatotóxico. También se observa acumulación de grasa (esteatosis).

Tanto la necrosis, como la esteatosis son visibles al microscopio óptico mediante las tinciones adecuadas. Por ejemplo, la tinción de hematoxilina-eosina es útil para observar la integridad del parénquima hepático, mientras que la tinción con Rojo Sudán tiñe específicamente la grasa.

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 (17, 39, 59, 78, 89, 91, 94, 183, 194, 199).

En la década de los 50's, Skou y colaboradores (182), describieron un tipo de transporte activo de cationes, el cual requería de energía metabólica (ATP). Como se liberaba ADP y Pi concluyeron que debería estar involucrada una enzima que hidrolizara ATP en el proceso, es decir, una ATPasa.

En la actualidad se sabe que existen en el hepatocito varias ATPasas: la de [Na+, K+], la de Ca++ y la de Mg++.

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) el transporte de ácidos biliares, pues éstos últimos se acoplan al transporte de sodio. Dada la gran actividad metabólica que desarrolla el hígado, el papel de las ATPasas es muy importante.

La ATPasa de Na+, K+ es una proteína incorporada a la membrana celular con una orientación asimétrica fija. 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 (184). La estequiometría de la reacción es de 2 K+ introducidos por cada 3 Na+ liberados de la célula y una molécula de ATP hidrolizada.

En 1973, Stein y col. (190) propusieron un modelo

tetramétrico $\alpha 2\ \beta 2$ para la bomba de Na+, K+ (Fig. 8). La subunidad α (catalítica) podría representar el polipéptido de alto peso molecular, mientras que la subunidad β la glicoproteína. Ambas subunidades α y β están parcialmente embebidas en los lípidos de la bicapa y poseen segmentos transmembrana. La subunidad β es una proteína intrínseca de la membrana, es catalíticamente inactiva, pero estudios recientes sugieren que juega un papel de referencia para la orientación asimétrica correcta de la subunidad α en la membrana (87).

Una característica de la ATPasa es la capacidad para poder discriminar entre el potasio y el sodio, en presencia de K+ tiene una conformación (forma K) diferente a la que posee en presencia de Na+ (forma Na).

La adaptación de la estructura molecular en presencia de K+ y de Na+ está intimamente ligada con un cambio en la afinidad por el ATP. La conformación en presencia de Na+, abre un sitio de alta afinidad para el ATP; mientras que la conformación en presencia de K+, disminuye la afinidad por el ATP o cierra dicho sitio.

En el hepatocito una importante función de la ATPasa de Na+, K+ es la secreción activa de Na+ hacia los canalículos biliares, dirigiendo el flujo de agua a través de la membrana canalicular (17, 39).

Desde hace algún tiempo se sabe que la acción de varias hormonas y otros estímulos externos están mediados por cambios en la concentración intracelular de calcio. Por lo tanto la concentración intracelular de calcio libre debe estar finalmente regulada en la célula como "segundo mensajero", lo que implica un

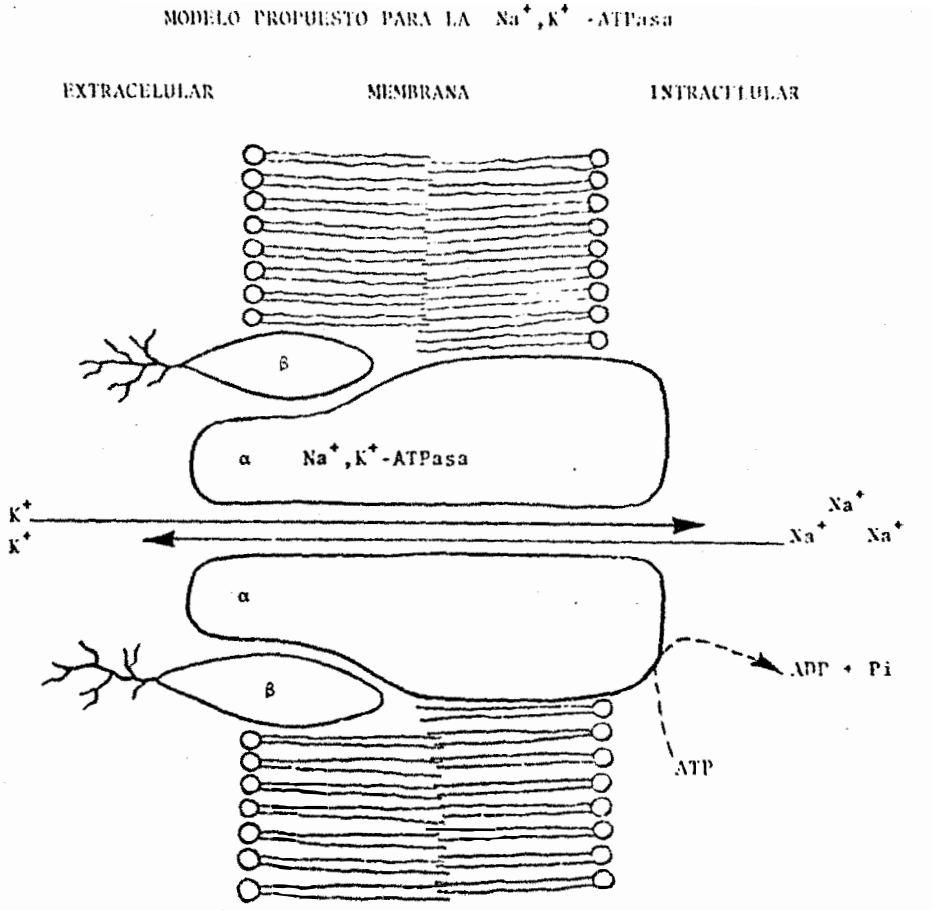


Fig. 8. Modelo propuesto por Stein y col. para el sistema tetramétrico α 2 β2 de la [Na+, K+]-ATPasa.

control muy fino de su concentración por parte de la célula.

A pesar de que el Ca+2 entra continuamente en forma pasiva a la célula, la concentración intracelular de calcio (0.1 a 1 uM) 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 la membrana (100). En la figura 9 se muestra el modelo propuesto para este sistema de transporte de calcio.

Mediante estudios cinéticos se ha demostrado la existencia de 2 sitios catalíticos para la enzima (130).

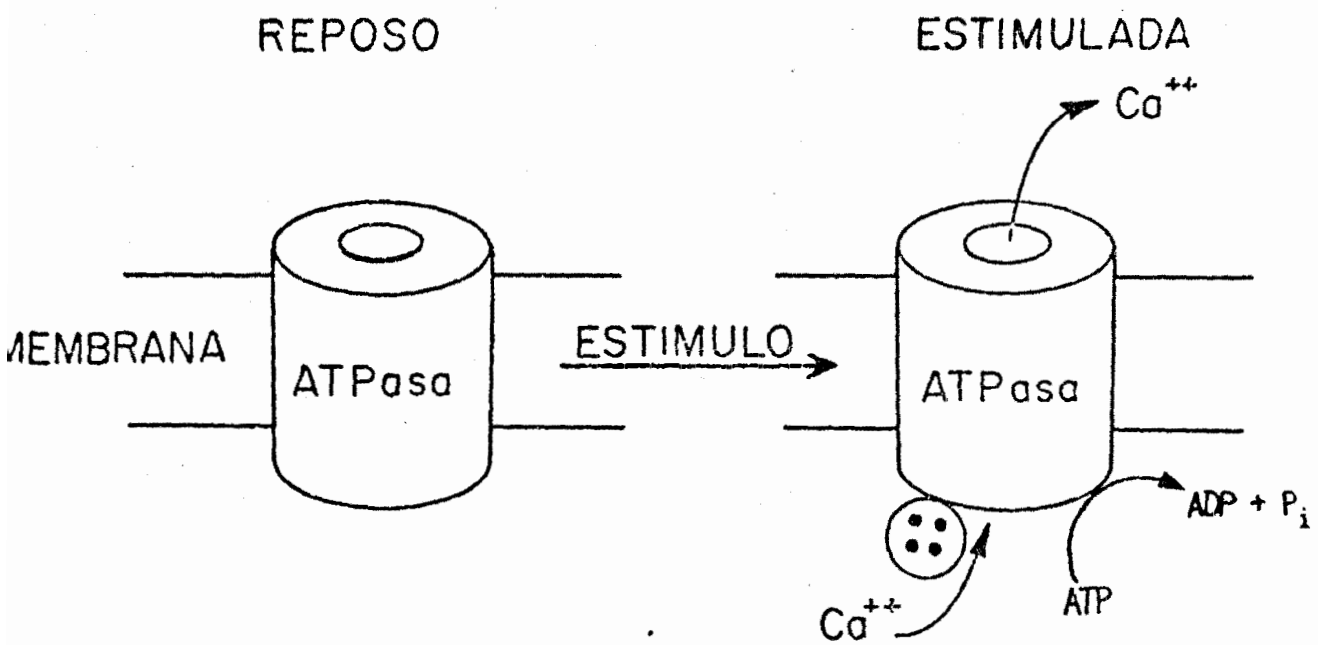
Es evidente que el exceso de Ca++ intracelular puede ser muy dañino para cualquier célula y que los mecanismos de defensa frente a la entrada masiva de Ca++ incluyen la baja permeabilidad de la membrana al Ca++ y la actividad de la ATPasa que bombea Ca++ hacia el exterior celular (100).

I.6.2. Gamma-Glutamil Transpeptidasa (GGTP)

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

Glutatión + aminoácido —— δ-glutamil aminoácido + cisteinil glicina.

Esta reacción es de gran importancia en el metabolismo de glutatión y se ha postulado que ésta o reacciones análogas estén involucradas en el transporte de aminoácidos a través de la



MODELO PROPUESTO PARA LA ATPasa de Ca^{++}

Fig. 9. Modelo propuesto para la ATPasa de Ca++.

membrana por interacción tanto con aminoácidos extracelulares como con glutatión intracelular.

De acuerdo a esta teoría, el aminoácido entra a la célula como un γ-glutamil aminoácido.

La γ- glutamil transpeptidasa está ampliamente distribuída en tejidos de mamíferos y se ha encontrado en un gran número de estructuras epiteliales, generalmente involucradas en procesos de absorción o secreción tales como el epitelio del túbulo proximal renal, las vellosidades del yeyuno, plexos coroides, conducto biliar, vesículas seminales, etc.*

La γ-glutamil transpeptidasa presenta relativamente baja especificidad con respecto al donador γ-glutamilo, lo cual permite su cuantificación sencilla a partir de métodos colorimétricos (112).

Se ha comprobado que el hígado fetal contiene una considerable actividad de esta enzima, pero que va disminuyendo durante el desarrollo, lo cual indica que esta enzima tiene un papel importante en el transporte de aminoácidos en el hígado fetal (22).

I.6.3. Fosfatasa Alcalina (F.A.)

La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuída en la naturaleza, ya que puede ser encontrada en bacterias, algas, hongos, protozoarios, plantas y animales. En los animales vertebrados se ha visto que está distribuída en diferentes tejidos.

El hígado contiene relativamente poca fosfatasa

alcalina en comparación con órganos tales como el intestino delgado y el riñón (107). La distribución de la fosfatasa alcalina en la rata presenta algunas discrepancias. Watchein (207) no encontró actividad de fosfatasa alcalina en la porción sinusoidal y solamente vió una distribución irregular en el canalículo biliar, mientras que Gandstrom (173), encontró mucha fosfatasa alcalina en el canalículo biliar.

En cuanto a la distribución de la fosfatasa alcalina dentro de los lóbulos hepáticos se ha visto que en la rata la actividad predomina principalmente en la porción periprotal.

Muchos compuestos de fósforo son substratos para las fosfatasas alcalinas. Por definición la fosfatasa alcalina es una enzima no específica, puede hidrolizar muchos compuestos de fósforo, aunque puede haber mayor especificidad para algunos compuestos como los ésteres fenólicos. En muchos de los ensayos bioquímicos se usa como sustrato el p-nitrofenil fosfato.

$$\text{p-nitrofenil fosfato} \xrightarrow{\text{F.A.}} \text{p-nitrofenol} + \text{Pi}$$

La función de la fosfatasa alcalina no está bien entendida. En general se considera que está encargada de la hidrólisis de ésteres de fosfato. Se ha visto que todas las fosfatasas alcalinas son capaces de transferir grupos fosfato de un alcohol a otro (45).

Se ha sugerido que la fosfatasa alcalina ayuda a mantener el estado estacionario de metabolitos fosforilados intracelulares (179).

II. OBJETIVO

Evaluar la capacidad para prevenir y revertir las alteraciones en los indicadores de daño hepático presentes en la hepatitis tóxica y en la cirrosis inducidas por CCl4 en la rata.

Consideramos adecuado seleccionar como parámetros para evaluar el grado del daño hepático la actividad de las enzimas:

a). F.A., TGP, GGTP y glucosa-6-fosfatasa en suero.

b). F.A., GGTP, ATPasa, Na+, K+ y ATPasa CA++, en membrana plasmática de hepatocitos.

c). Niveles de glucógeno en tejido hepático.

d). Cuantificación de colágena en cortes de tejido.

Para complementar el análisis de daño hepático producido, así como la protección aportada, estas investigaciones se corroboraron con estudios histopatológicos del hígado, que muestran el grado de necrosis, la acumulación de grasa, etc. Específicamente se efectuaron las tinciones de hematoxilina-eosina, la de Rojo Sudán y la tinción específica para la colágena.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. Animales

Se usaron ratas Wistar macho, con un peso entre 250-300g, se mantuvieron con libre acceso a la comida (Purina) y al agua. Los animales se agruparon de la siguiente manera:

1. Intoxicación aguda con CCl4. CCl4 grado espectro (Merck) en dosis única (de una mezcla CCl4/aceite comestible 1:4 v/v, correspondiente a 0.04g/100g de peso) por vía intraperitoneal.

a). Tratamiento con vehículo (Control). Los animales recibieron oralmente la dosis equivalente de aceite de maíz. (0.12 ml/100g de peso).

2. Intoxicación crónica con CCl4. Los animales de este grupo recibieron CCl4 de 0.04 g/100 g de peso disuelto en aceite comestible por V.O. según el siguiente esquema:

1a. Semana: CCl4: Aceite 1:7 (v,v).
2a. Semana: CCl4: Aceite 1:6 (v,v).
3a. Semana: CCl4: Aceite 1:5 (v,v).
4a. a 7a. Semana: CCl4: Aceite 1:4 (v,v).

3. Tratamiento con silimarina en la intoxicación aguda. La silimarina se administró en forma de suspensión en carboximetil celulosa (CMC) al 0.7% a una dosis de 150 mg/kg p.o. a las 0, 12, 24 hs. El CCl4 se administró conjuntamente con la última dosis de silimarina.

Se hizo un control que recibió únicamente silimarina y otro CMC.

4. Tratamiento con silimarina en el daño crónico.

a). Tratamiento preventivo. Las ratas recibieron el mismo esquema que el grupo 2, pero además recibieron 50 mg/kg de peso de silimarina p.o., 5 días a la semana, durante 8 semanas. Se hizo un grupo control que recibió únicamente silimarina y otro que recibió solo CMC durante el mismo período.

b). Tratamiento con silimarina de las ratas previamente cirróticas. Se hicieron cirróticas a las ratas como a los animales del grupo 2 y después de la 13a. semana de tratamiento con CCl4, pero sin descontinuarlo se inició el tratamiento con silimarina (20mg/kg) p.o. durante 5 semanas. Se hicieron 2 grupos controles, uno que recibió únicamente silimarina y otro que recibió sólo CMC.

III.1.1. Obtención del Suero

La sangre se obtuvo por punción cardíaca de las ratas anestesiadas con éter etílico y fue colocada en tubos de vidrio sumergidos en hielo. Para la obtención del suero se centrifugó la sangre en una centrífuga Beckman TJ-6 a 1000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4^0C. Después se procedió a separar los sueros con pipetas Pasteur y se colocan en tubos perfectamente etiquetados y sellados con parafilm para guardarlos en el refrigerador.

III.1.2. Obtención de la Fracción de Membranas Parcialmente Purificadas de Hepatocitos de Rata

Las membranas se prepararon usando el método de Neville con una modificación introducida por Pohl y colaboradores (159). El procedimiento se realiza a temperaturas de 0 a 4°C y consiste en lo siguiente:

1. Se sacrifican las ratas, se extrae la sangre por punción cardíaca para que el hígado quede libre de eritrocitos y se extirpa rápidamente lavándolo con NaHCO3 1 mM.

2. Se colocan vasos en hielo y se coloca cada hígado desmenuzándolo con tijeras de disección lo más finamente posible.

3. Los fragmentos de hígado se pasan a un homogenizador (Dounce) grande con émbolo flojo (Blaessing Glass Spec. Co., Rochester, N.Y.,) con 25 ml de NaHCO3 1 mM de los 250 que corresponden a cada hígado.

4. Se homogeniza con 8 a 10 choques del émbolo. Este procedimiento se repite para cada hígado, y luego se agrega el resto de NaHCO3 1 mM frío.

5. Se agita durante 3 minutos con varilla de vidrio o mosca magnética muy suavemente.

6. Se filtra a través de gasa doble y luego gasa cuádruple.

7. El filtrado se distribuye en botellas de centrífuga de 250 ml. Se centrifuga a 2500 rpm en una centrífuga Beckman modelo TJ-6 durante 30 min. El sobrenadante se desecha

con mucho cuidado.

8. El precipitado se coloca en el mismo homogenizador y se homogeniza con 3 choques del émbolo flojo muy suavemente.

9. El homogenado se pasa a una probeta de 50 ml y se añade una solución de sacarosa a una concentración de 69 ± 0.5% (P/P) de tal modo que la suspensión resultante quede ajustada a 44.0 ± 0.1%. Las medidas de concentración se efectúan con un refractómetro Abbe. La concentración final se ajusta con sacarosa si es necesario.

10. Con esta suspensión se llenan las dos terceras partes de los tubos del rotor Beckman SW-28. El tercio restante se llena cuidadosamente con una solución de sacarosa ajustada previamente a una concentración de 42.0 ± 0.1% (P/P).

11. Una vez hechos los gradientes de sacarosa los tubos se centrifugan a 105,000 x g durante 150 min usando una ultracentrífuga Beckman modelo L8-70.

12. Se quita la porción flotante que corresponde a las membranas con una espátula tipo cuchara y se colocan en un vaso con un pequeño volúmen de NaHCO3 1 mM y se resuspenden haciéndolas pasar por una aguja No. 18 y luego por una No. 20, para luego colocarlas en tubos de centrífuga agitando por inversión y centrifugando en una centrífuga Sorvall RC-5B a 15,000 x g durante 15 min., se resuspende en un mínimo de sobrenadante y se toman alícuotas de 0.2 ml y se colocan en viales pequeños, para posteriormente guardarlas en N2 líquido a -

180°C.

La determinación de la cantidad de proteínas en las membranas se realiza de acuerdo a lo establecido por el método de Bradford (18). Como estándar de proteínas se utiliza albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co. Fracción V, 96-99% de pureza). Las lecturas de densidad óptica a 595 nm se efectúan en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Coleman 44).

III.1.3. Medición de la Actividad de ATPasa por el Método Colorimétrico de Ames (3).

Este método mide colorimétricamente la cantidad de Pi desprendido del ATP mediante la formación de un complejo colorido formado con molibdato de amonio en presencia de ácido ascórbico. El protocolo experimental se describe en la tabla 2.

La curva de calibración de Pi se hace utilizando K2HPO4.

La determinación cuantitativa de las proteínas contenidas en las muestras membranales se efectúa por el método de Bradford (186).

La actividad de la ATPasa de sodio-potasio se obtiene por diferencia de la total y la de Mg^{2+}.

La actividad de la ATPasa de calcio se obtiene interpolando los datos en la curva de calibración.

III.1.4. Determinación de la Actividad de la γ-Glutamil Transpeptidasa

En este método se usa como sustrato la γ-glutamil -p-

TABLA 2

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa POR EL METODO COLORIMETRICO

	Total-ATPasa	Mg^{2+}-ATPasa	Ca^{2+}-ATPasa	Blanco
NaCl 750 mM	100 µl	100 µl	—	—
KCl 25 mM	100 µl	—	—	—
Imidazol 20 mM pH 7.8	170 µl	70 µl	180 µl	400 µl
Ouabaína 2.5 mM en Imidazol	—	200 µl	—	—
$CaCl_2$ 12.5 mM	—	—	200 µl	—
Membranas (60-100 µg) de proteína	20 µl	20 µl	20 µl	—
Preincubar durante 15 minutos a 37°C.				
$MgCl_2$ 125 mM	10 µl	10 µl	—	—
ATP 12.5 mM	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Preincubar durante 30 minutos a 37°C.				

Posteriormente se añaden 100 ul de TCA 35%, se agitan y se toman 20 ul y se les adiciona 500 ul de agua, 200 ul de ácido ascórbico al 10%, 1.2 ml de molibdato de amonio 0.45% en ácido sulfúrico 1 N. Los tubos se incuban durante 30 minutos a 37°C y se lee la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro.

nitroanilida que en presencia de la enzima γ-L-glutamil y de un receptor del grupo γ-glutamilo como lo es la glicilglicina se obtiene γ-L-glutamilglicilglicina y p-nitroanilida que puede ser cuantificada espectrofotométricamente (162). El método se realiza de la siguiente manera:

1. En un tubo de ensaye de vidrio de 12 x 100 mm se agregan los siguientes reactivos:

- 500 ul de Tris-HCl mM (pH = 8.2).
- 100 ul de MgCl2 200 mM.
- 100 ul de glicil-glicina 40 mM (pH = 8.2).
- 200 ul de γ-glutamil-p-nitroanilida 10 mM.

2. La mezcla de reacción se incuba en un baño maría a 37° C (5-10 min.), y se inicia la reacción agregando 100 ul de la suspensión de membranas que debe contener 5 a 20 ug de proteína. Si el ensayo es para suero se agregan 100 ul de suero. Se agita bien la mezcla y se introduce en el baño maría a 37°C.

3. Se detiene la reacción enzimática a los 10 minutos, agregando 2 ml de ácido acético 1.5 M.

4. Se lee la absorbancia de cada tubo a 410 nm en un espectrofotómetro Coleman 44. El resultado se interpola en una curva estándar de p-nitroanilida (con un rango de concentraciones de 10 a 330 nmoles de P.N.A.). La actividad enzimática se reporta como nmoles de p-nitroanilina/mg de proteína por minuto en las muestras de membrana y como umoles de p-nitroanilina/l de suero por minuto en el caso de los sueros.

III.1.5. Determinación de la Actividad de la Fosfatasa Alcalina

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato por la fosfatasa alcalina para obtener fosfato inorgánico y p-nitrofenol el cual se puede leer a 410 nm (13). El método se realiza de la siguiente manera:

1. En un tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 mm se agregan los siguientes reactivos:

- 0.5 ml de buffer de glicina 0.1 M y Mg Cl2 0.001 M a pH = 8.2.
- 0.5 ml de sustrato el cual se prepara pesando 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 ml de agua destilada (es estable hasta por 4 semanas si se congela).

2. Esta mezcla se incuba en un baño maría a 37°C por 5 minutos.

3. Se añaden 100 ul de la suspensión de membranas que debe contener de 5 a 20 ug de proteínas y en el caso de los sueros también se añaden 100 ul. La mezcla se agita suavemente y se incuba a 37°C por 30 minutos.

4. La reacción se para adicionando 10 ml de NaOH 0.02 M.

5. La absorbancia se determina a 410 nm en un espectrofotómetro Coleman 44. La lectura se interpola en una curva estándar de p-nitrofenol. La actividad enzimática se

reporta como nmoles de sustrato hidrolizado/mg de proteína, en el caso de membranas y en el caso de sueros como pmoles de p-nitrofenol/l suero por minuto.

III.1.6. Determinación de la Actividad de la Alanina Amino Transferasa Sérica (Transaminasa Glutámico Pirúvica)

La actividad de la TGP se determina por el método de Reitman-Frankel (153), en el que se mide el complejo formado por piruvato y 2,4,dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de alanina y alfa-oxoglutarato, complejo colorido que absorbe a 520 nm.

(Método de Reitman-Frankel)

Reactivos: Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4.

Solución de sustratos l-alanina. -

Reactivo cromógeno (2,-4-dinitrofenilhidrazina). -

NaOH 0.4 N.

Solución estándar de piruvato. -

Reactivo	Blanco	Problema
Solución sustrato l-alanina	0.250 ml	0.250 ml
Suero problema	---	0.050 ml
Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37 °C durante 60 minutos.		
Reactivo cromógeno	0.250 ml	0.150 ml
Suero problema	0.250 ml	---
Incubar 15' a 37°C		
NaOH 0.4 N	2.5 ml	2.50 ml

Leer a 515 nm con blanco de agua y restar la absorbancia del

blanco al problema, interpolar en la curva estándar.

III.1.7. Determinación de Glucosa-6-Fosfatasa en Sueros. Método (92)

I. Reacción enzimática.

1. Colocar en tubos:

- 150 ul de amortiguador de citrato 0.1 M pH = 6.5.
- 250 ul de G-6-fosfato (0.01 M).
- 100 ul de suero.

2. Incubar una hora a 37°C.

3. Al pasar este tiempo, adicionar 100 ul de ácido tricloroácetico al 10% y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.

II. Tomar 0.6 ml* del sobrenadante y determinar fósforo.

* Puede tomarse 0.3 ml + 0.3 ml de agua, ya que los animales tratados pueden presentar una elevación no legible en el espectro.

1. Poner en tubos:

- 0.3 ml de agua,
- 0.3 ml de muestra,
- 0.2 ml de ácido ascórbico al 10% (recién preparado).
- 1.2 ml de molibdato de amonio 0.42 M en H_2SO_4 1 N.

2. Incubar a 37°C 30'.

3. Leer a 820 nm en NIR escala 2.

4. Se coloca un tubo blanco con 100 ul de agua desde el principio de la reacción enzimática.

Las lecturas se interpolan en la curva tipo de fósforo.

III.1.8. Determinación de Proteínas Séricas Totales

Método de Bradford (18)

1. Preparar una curva tipo utilizando albúmina sérica bovina (BSA). Colocando en tubos de ensayo 10, 25, 75, y 100 ul de una solución de BSA a una concentración de 1 mg/ml.

2. Tomar alícuotas adecuadas de la muestra y llevarlas a 100 ul con agua (el blanco lleva solo 100 ul de agua).

III.1.9. Determinación del Contenido de Glucógeno Hepático

El contenido de glucógeno se determina utilizando el reactivo de la antrona (46).

Se colocan las muestras del tejido hepático de aproximadamente 1 g de peso en los tubos de ensayo, posteriormente se añaden 3 ml de una solución de KOH al 30% a cada uno de ellos. El tejido se digiere mediante el calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. No es necesario separar las proteínas antes de efectuar el ensayo ya que este paso no es esencial en los tejidos tales como el hígado donde el contenido de glucógeno es elevado. La muestra

digerida se coloca en un matraz aforado de 50 ml y se diluye con agua bidestilada. Una alícuota de 2 ml de esta dilución se coloca en otro matraz aforado de 5 ml y se diluye nuevamente a 50 ml con agua con el objeto de que el contenido de glucógeno en esta solución, esté en un rango de concentración de 3 a 300 ug/ml. Una alícuota de 5 ml de la última dilución de los digeridos se coloca en diferentes tubos.

Otros tubos contienen 5 ml de una solución estándar de glucosa que corresponde a 100 ug de hexosa y otros 5 ml de agua con el objeto de que sirvan como blancos. Todos los tubos se mantienen en un baño de hielo y allí se les añade 10 ml de reactivo de la antrona. Este reactivo se prepara añadiendo 0.2 g de antrona (J.T. Baker) en 100 ml de H_2SO_4 de 95% de pureza.

Los tubos se cubren con perlas de vidrio y se calientan durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo. Inmediatamente después los tubos se enfrían en un baño de agua fría y se lee la absorbancia en un colorímetro a una longitud de onda de 620 nm. La concentración desconocida de glucógeno se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ug de glucógeno} = \frac{100 \times U}{1.11 \times S}$$

dónde:

U es la absorbancia de la solución de concentración desconocida.

S es la absorbancia de la solución estándar de glucosa.

1.11 es un factor de conversión determinado por Morris (120) para convertir glucosa o glucógeno.

III.1.10. Determinación del Contenido de Colágena en Muestras de Tejido Hepático

Para determinar el contenido de colágena en los hígados de las ratas, se utilizó el método reportado por López de León y Rojkind (99). Este método permite estimar la concentración de colágena en secciones de tejido fijadas con formol.

El método está basado en la unión selectiva del Rojo Sirio F3BA y el verde rápido FCF a las proteínas colagénicas y no colagénicas respectivamente. Los colorantes tienen absorbancias máximas a diferentes longitudes de onda y pueden ser eluídos simultáneamente de manera cuantitativa con NaOH-metanol de las secciones histológicas.

Los cortes de 10 um de tejido fijado en formol embebidos en parafina para su corte deben desparafinarse efectuando incubaciones sucesivas con xilol, xilol:etanol (1:1), etanol, etanol: agua (1:1), y agua.

Posteriormente los cortes colocados en tubos de ensayo se cubren con 0.2 ml de una solución saturada de ácido pícrico en agua destilada que contenía verde rápido FCF al 0.1% y Rojo Sirio al 0.1%. Los tubos se cubren con papel alumino y se incuban a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante. Se quita la solución con una pipeta desechable y las secciones de tejido se lavan varias veces con agua destilada hasta qaue el fluído sale transparente. Posteriormente, se adiciona 1 ml de

NaOH 0.1 N en metanol absoluto (1:1, v:v) y cada tuvo se agita suavemente hasta que todo el color se haya eluído de las secciones (normalmente en unos pocos segundos). El colorante eluído se cuantifica espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a 540 y 605 nm, longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción del Rojo Sirio F3BA y del verde rápido FCF respectivamente. La cantidad de proteína colagénica y no colagénica se calculó utilizando la "equivalencia de color" de cada colorante reportado por los autores del método.

III.1.11. Estudios Histológicos del Hígado

De los hígados extraídos de todas las ratas se separaron dos cortes y se colocan en formol al 10% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se efectúan las tinciones de hematoxilina-eosina y de Rojo Sudán.

III.1.12. Tratamiento Estadístico de los Datos y Nivel de Significancia

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo de ratas fueron promediados obteniéndose la media ± error tipo de la media (ETM), y se compararon con los valores promedio del grupo control respectivo. Las diferencias entre los grupos control y tratados se demostraron estadísticamente realizando comparaciones pareadas aplicando el método de los rangos múltiples de Duncan (119) con una significancia de $p < 0.05$, como se recomienda para estos estudios (137).

IV. RESULTADOS

IV.1. Estudio Agudo

La presencia de daño hepático agudo inducido por el CCl4 se verificó por el análisis histológico de muestras de los hígados.

Una serie de preparaciones histológicas se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. La figura 10 nos muestra un corte de hígado de rata control en donde se aprecia la arquitectura lobular normal del hígado y no se detecta ninguna distorsión del parénquima en general. En la figura 11, se observa un corte obtenido de un hígado de rata tratada agudamente con CCl4 en donde se puede observar necrosis celular y esteatosis generalizada. El corte de hígado de ratas pretratadas con silimarina mostró que existen menos zonas de daño (Fig. 12).

Otra de las tinciones empleadas fue la específica para grasa. En la figura 13 se muestra un corte de hígado de rata control teñido con esta técnica en el que no se observa acumulación de grasa. La figura 14 hace ver un corte de hígado de rata intoxicada con CCl4 en el cual se aprecian grandes acumulaciones de grasa, principalmente cerca de la vena central. En la figura 15 se aprecia un corte de hígado de rata tratada previamente con silimarina más CCl4; en el que se observa una situación intermedia en donde las acumulaciones de grasa están limitadas a pequeñas zonas.

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

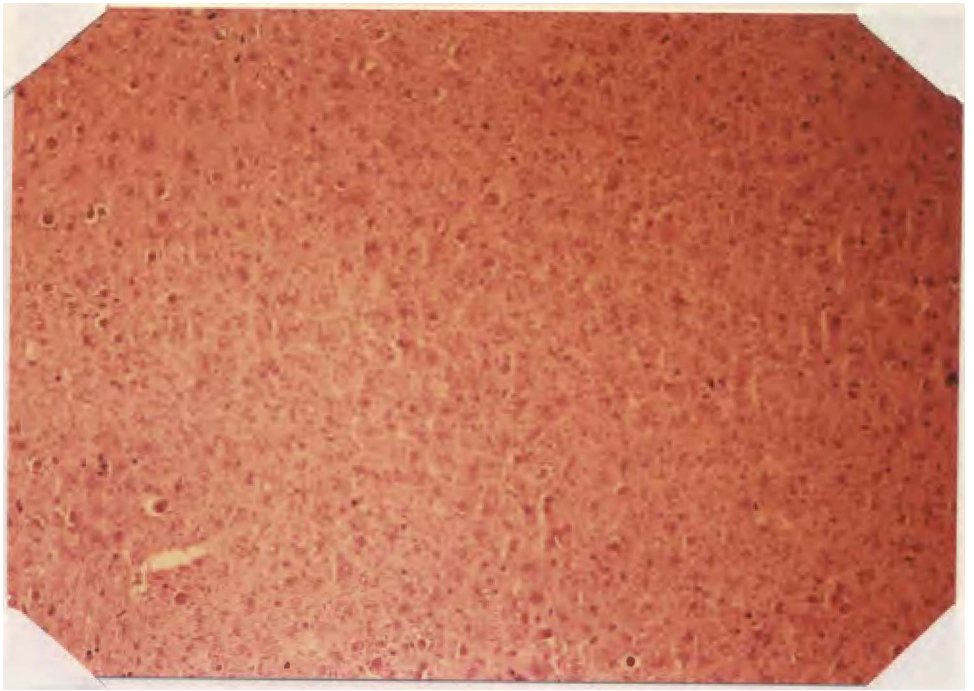


Fig. 10. Tinción de Hematoxilina-Eosina en un corte de hígado de rata control.

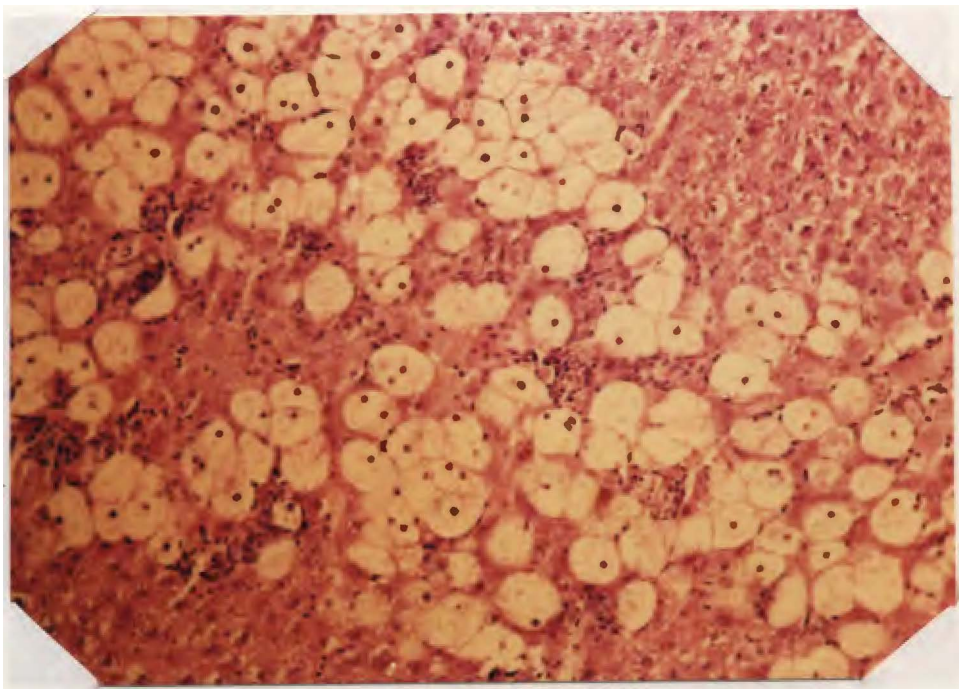


Fig. 11. Tinción de Hematoxilina-Eosina en un corte de hígado de rata tratada con CCl_4 (0.04g/100g) i.p.

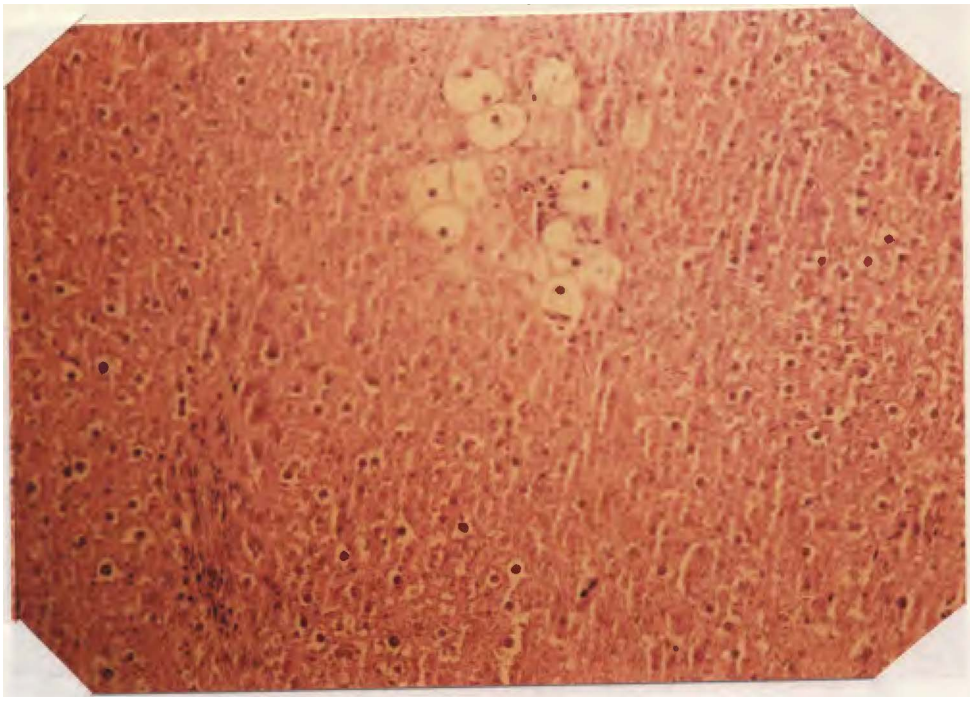


Fig. 12. Tinción de Hematoxilina-Eosina en un corte de hígado de rata tratada con CCl4 (0.04g/100g) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

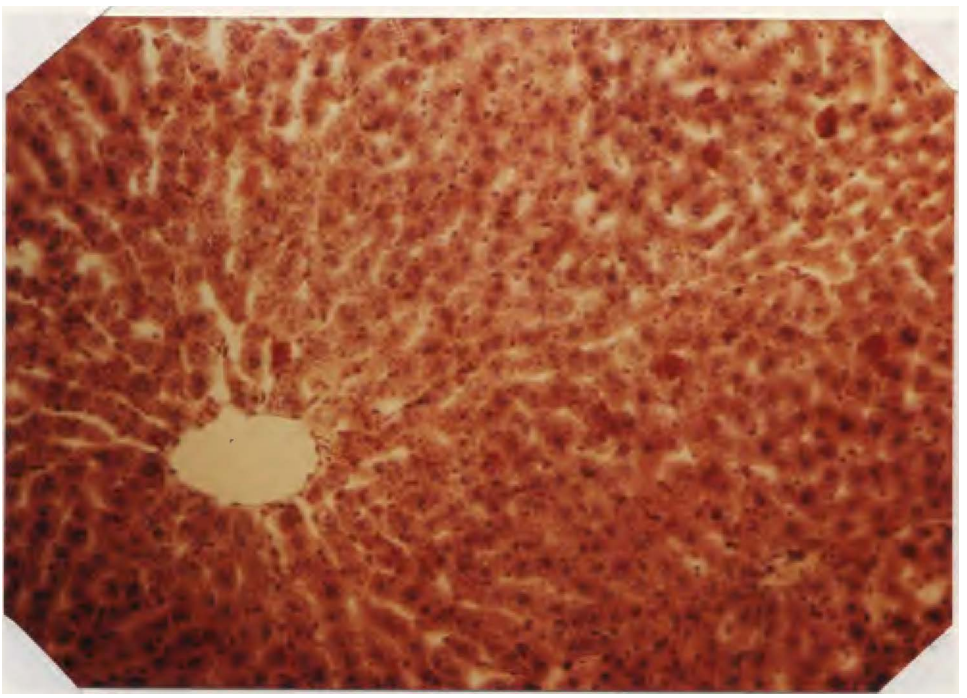


Fig. 13. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata control.

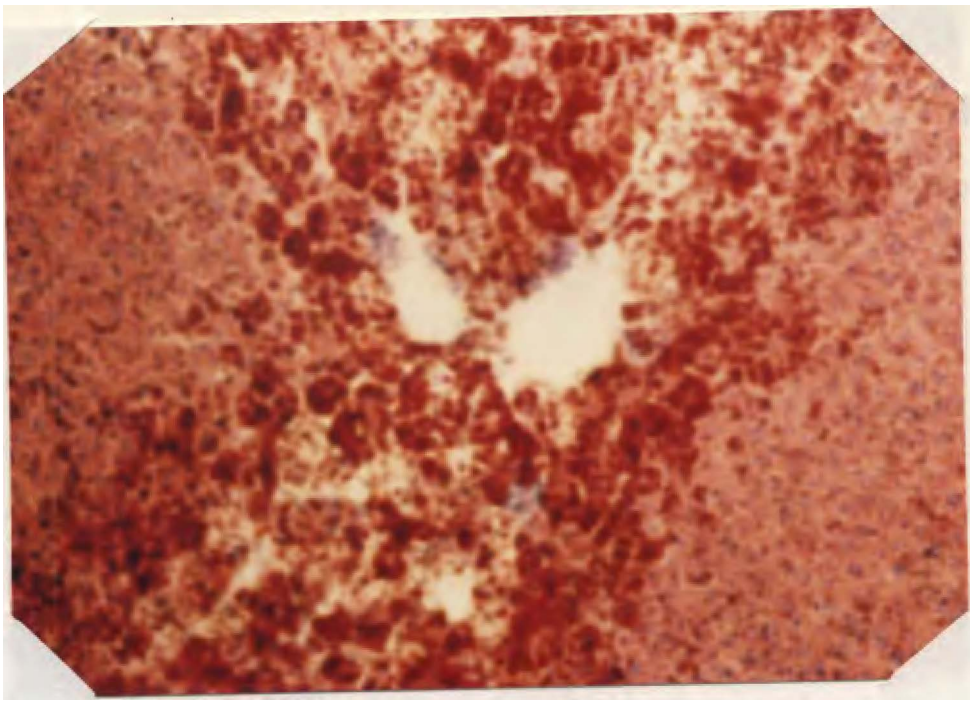


Fig. 14. Tinciún de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratada con CCl4 (0.04g/100g) i.p.

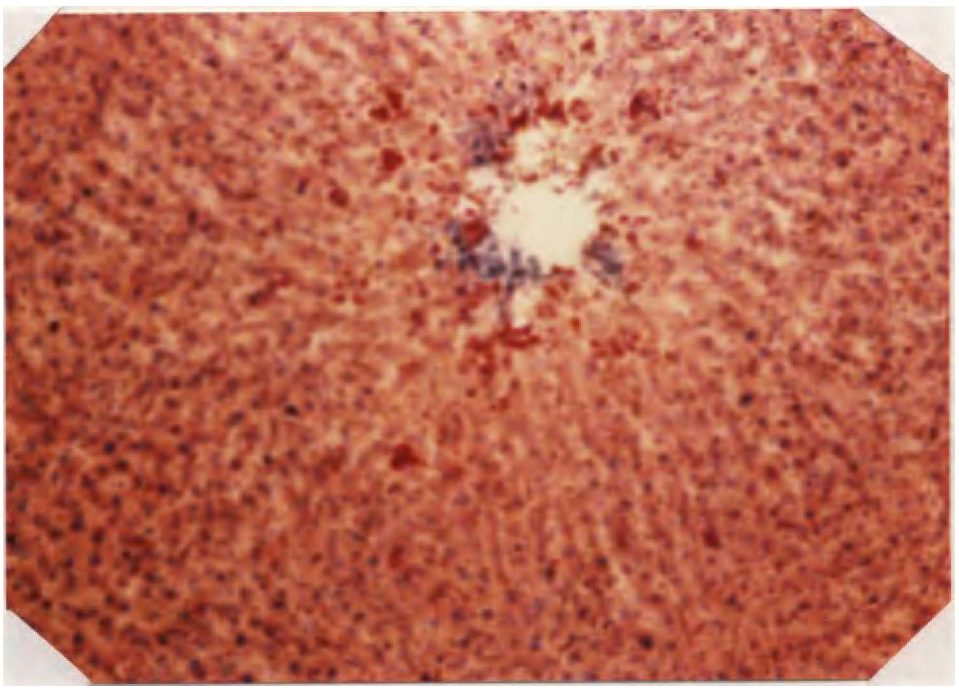


Fig. 15. Tinciún de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratada con CCl4 (0.04g/100g) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

En la figura 16 podemos observar la actividad de la fosfatasa alcalina sérica. El CCl4 produjo un aumento significativo de la actividad de esta enzima con respecto a la encontrada en los animales no tratados, ($p < 0.005$). Las ratas pretratadas con silimarina mostraron una disminución significativa ($p < 0.005$) de la actividad de la enzima en comparación con las que recibieron únicamente CCl4. Sin embargo, esta actividad no se pudo considerar igual a la del control ya que el análisis estadístico indicó una diferencia significativa, ($p < 0.005$). Las ratas tratadas exclusivamente con silimarina mostraron un aumento importante de la actividad de la FA con respecto a los animales no tratados ($p < 0.005$).

Al cuantificar la actividad sérica de la gamma-glutamil transpeptidasa se observó que las ratas tratadas solamente con CCl4 presentaron un aumento del 100% de la actividad con respecto a los controles, ($p < 0.001$) (Fig. 17). Los resultados obtenidos en los sueros de los animales tratados con silimarina mostraron una disminución significativa con respecto a los de las ratas que solo recibieron CCl4 ($p < 0.005$) sin llegar a alcanzar valores normales ($p < 0.005$). Las ratas tratadas con 3 dosis de silimarina mostraron un ligero aumento en la actividad de la GGTP en comparación con el grupo control ($p < 0.005$).

En la Fig. 18 se muestra que la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) aumentó significativamente en el grupo tratado con CCl4, ($p < 0.005$). En los animales tratados con silimarina se observó una prevención total del

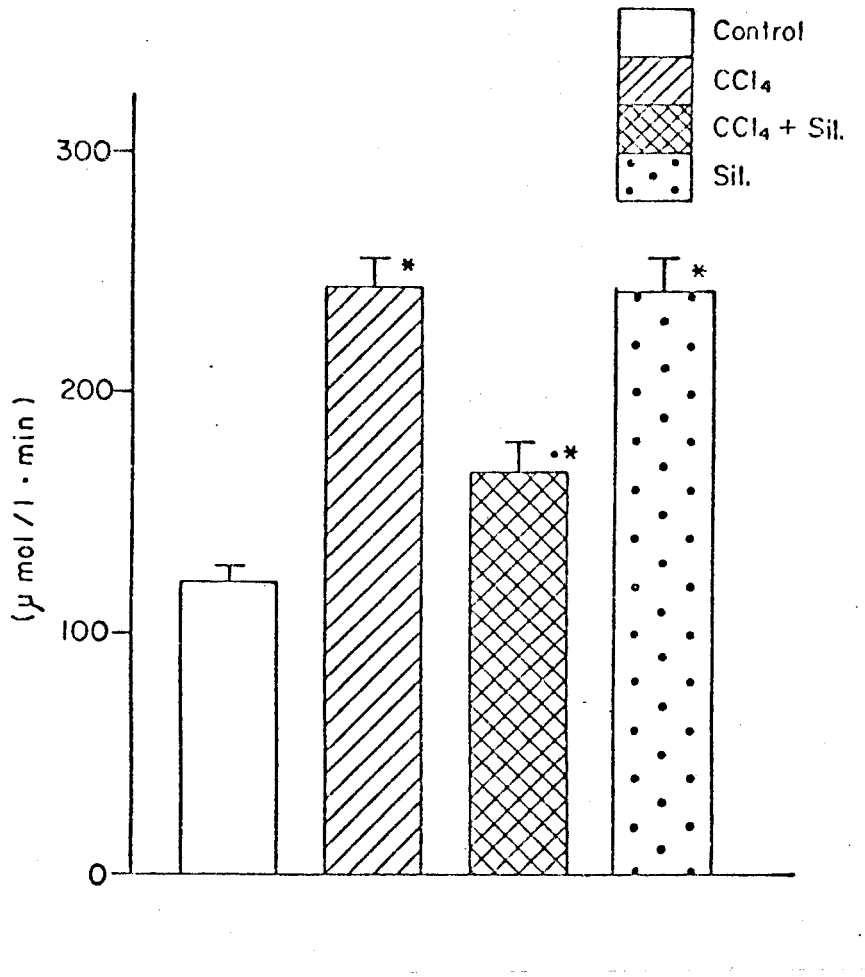


Fig. 16. Actividad de la fosfatasa alcalina sérica de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

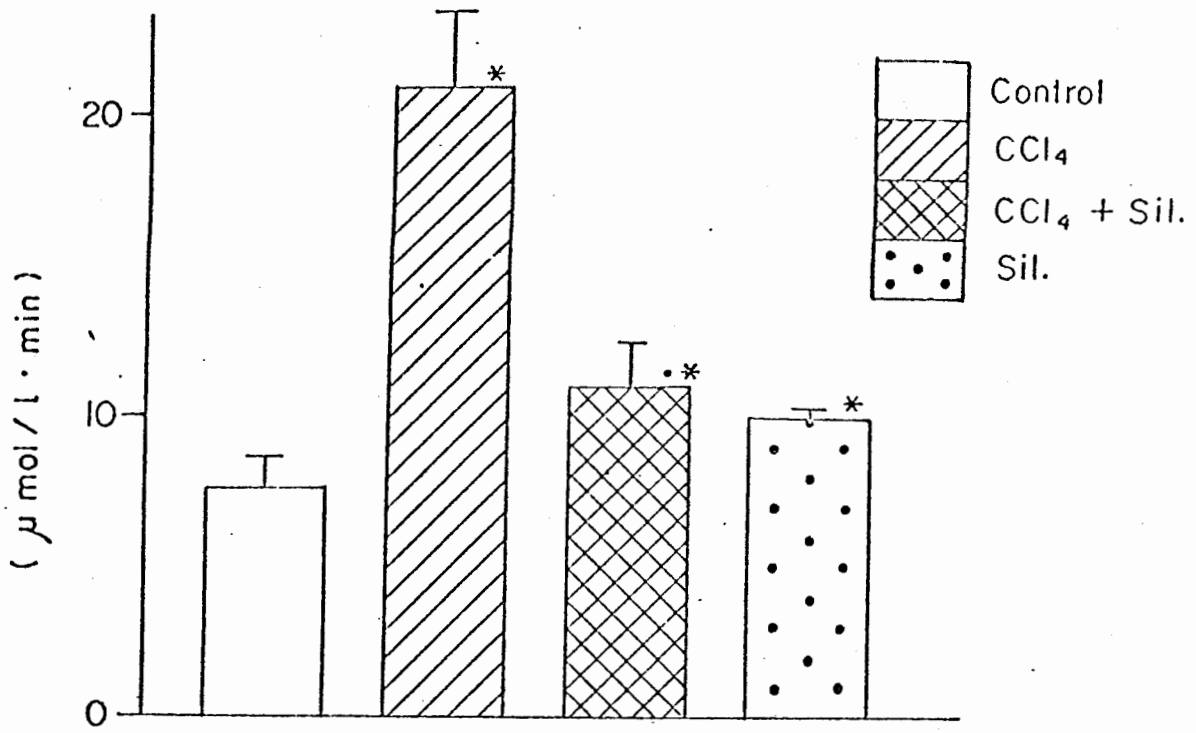


Fig. 17. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa sérica de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

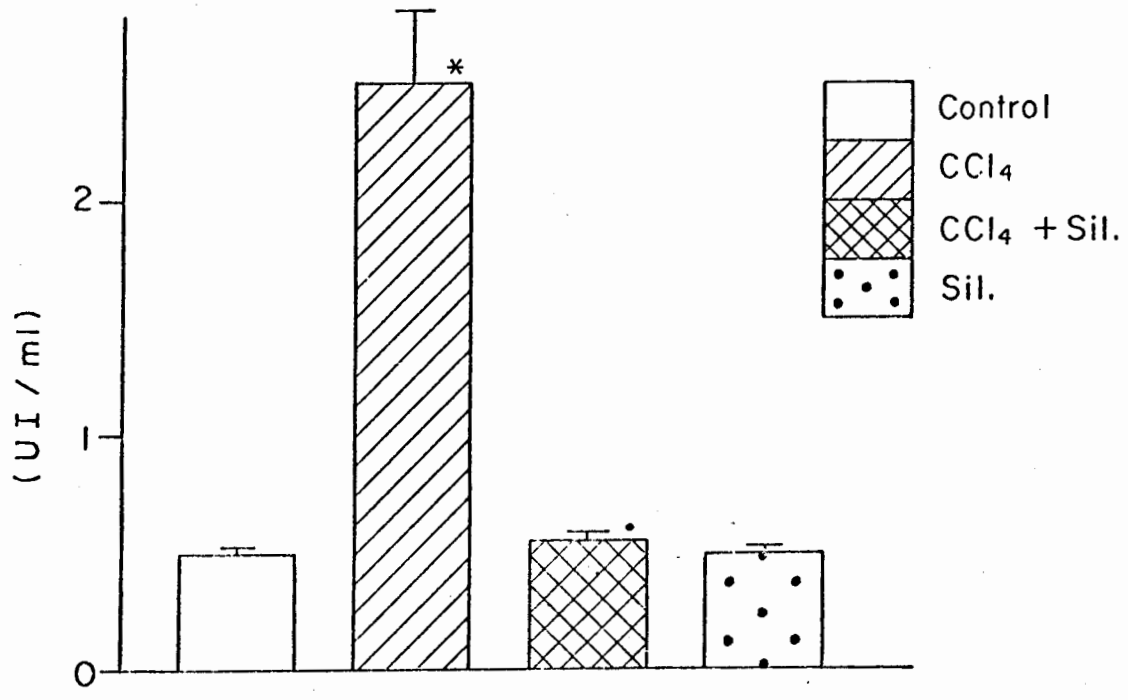


Fig. 18. Actividad de la transaminas glutámico pirúvica sérica de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

efecto del CCl4. El tratamiento con silimarina exclusivamente no produjo modificaciones.

Al medir la actividad de la glucosa-6-fosfatasa sérica se observó (Fig. 19) una disminución de ésta en los sueros de los animales tratados con CCl4 ($p < 0.005$), que se revirtió a valores normales en los animales que además del CCl4 recibieron silimarina ($p < 0.005$).

Analizando los datos de la actividad de la fosfatasa alcalina en las membranas plasmáticas de los hepatocitos (Fig. 20) se observó que las ratas tratadas con CCl4 poseían una actividad disminuída de la enzima ($p < 0.005$) con respecto al grupo control. En las ratas a las que se les administró silimarina y CCl4 se observó que la actividad de la FA estaba aumentada de manera importante con respecto al valor normal ($p < 0.005$). Nuevamente, la silimarina por sí misma aumentó la actividad de la enzima ($p < 0.005$).

La actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa de la membrana disminuyó significativamente en los animales que recibieron CCl4, (Fig. 21) ($p < 0.05$). El pretratamiento con silimarina previno parcialmente ese efecto ($p < 0.05$). Los animales que recibieron únicamente silimarina no mostraron ninguna diferencia con respecto al control.

En la Fig. 22 se aprecia que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana disminuyó notablemente en los animales que recibieron CCl4 ($p < 0.05$). El pretratamiento con silimarina evitó esta alteración ($p < 0.05$). También se puede ver en la misma figura que el tratamiento sólo con silimarina no tuvo efectos sobre la actividad de esta enzima.

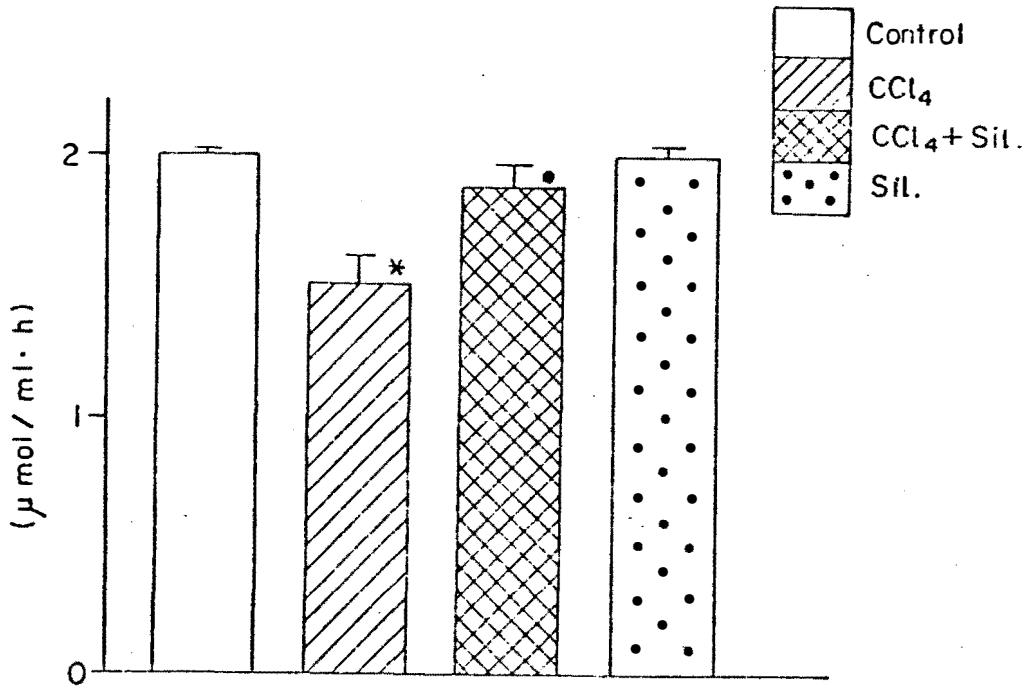


Fig. 19. Actividad de la glucosa-6-fosfatasa sérica de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

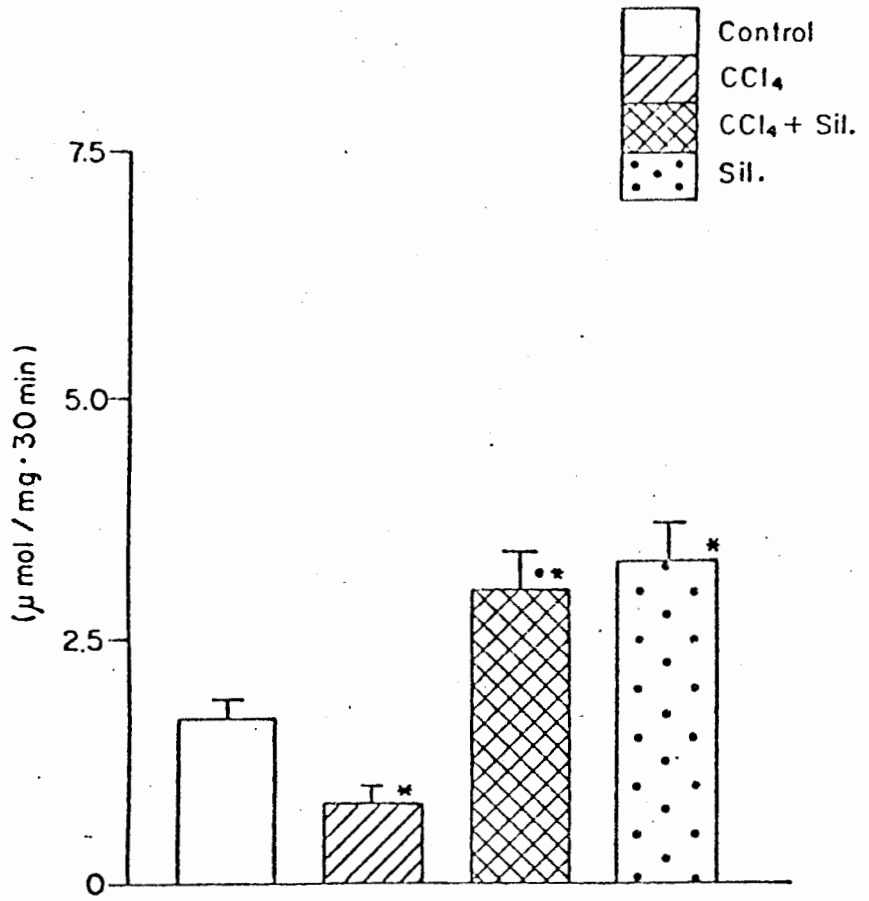


Fig. 20. Actividad de la fosfatasa alcalina en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

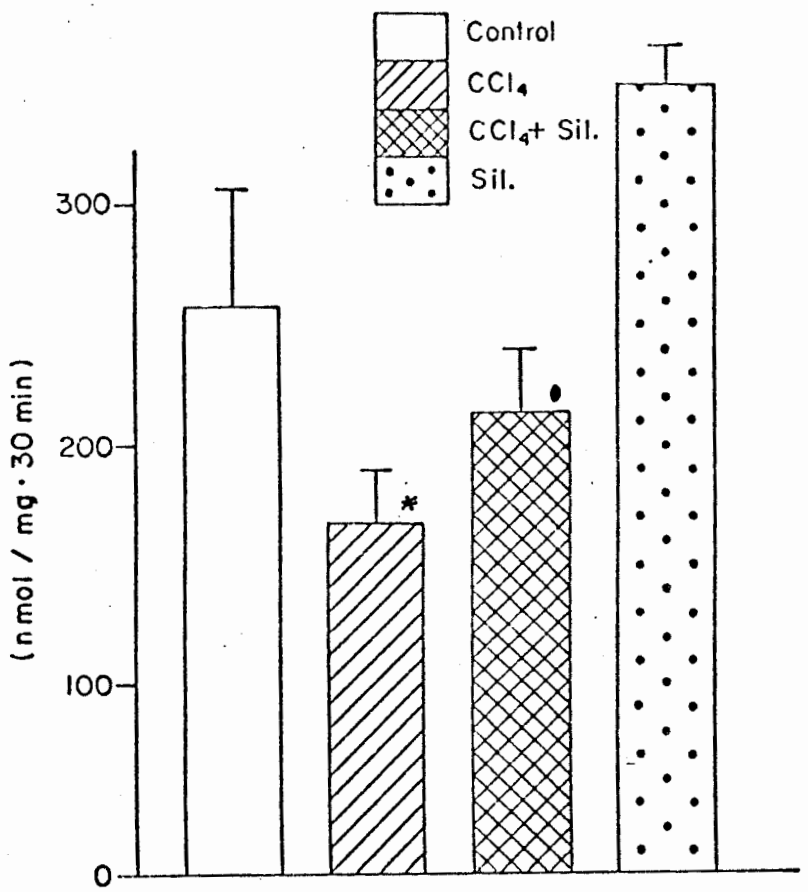


Fig. 21. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CC14 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CC14 (1:4, 0.15 ml/rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CC14.

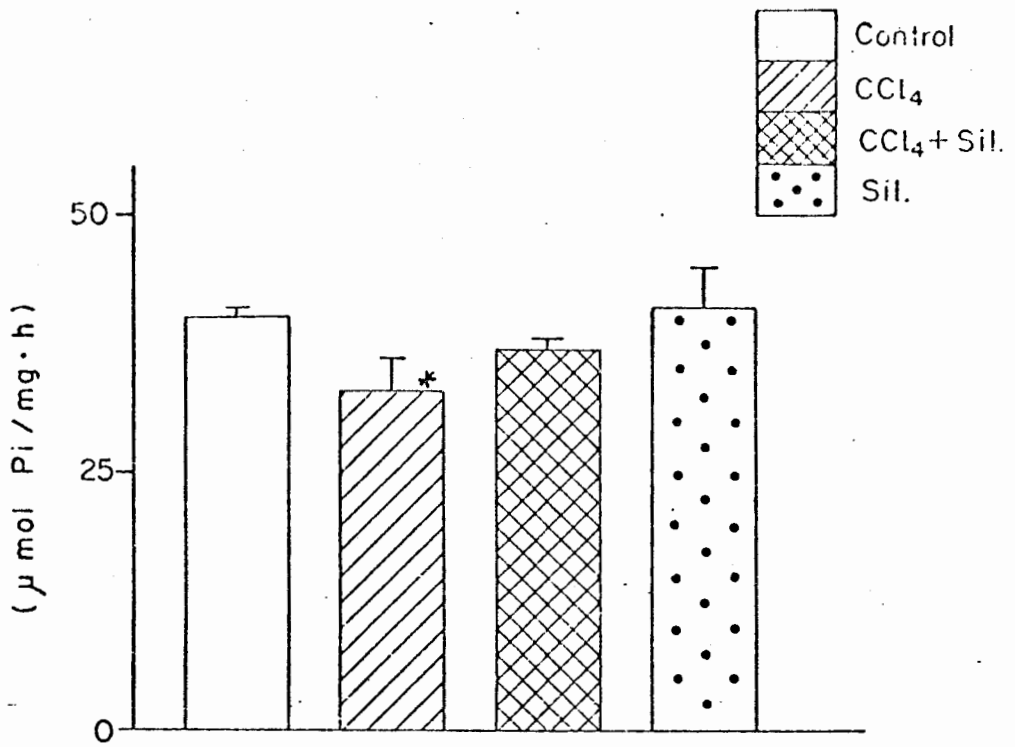


Fig. 22. Actividad de la ATPasa de Ca2+ de membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CCl4 (1:4, 0.15 ml/ rata) i.p. y Silimarina 3 dosis (150 mg/ kg) p.o.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

La actividad de la ATPasa de Na+/K+ determinada en las membranas presentó una disminución significativa de la actividad en las ratas tratadas con CCl4 al compararla con el control (Fig. 23), ($p < 0.005$). Dicha disminución se vió parcialmente prevenida por el pretratamiento de los animales con silimarina ($p < 0.005$). El tratamiento único con silimarina provocó una disminución en la actividad de la enzima que fue estadísticamente diferente del normal ($p < 0.025$). Esto se corroboró con una serie de experimentos "in vitro" (Fig. 23a).

IV.2. Estudio Crónico

a). Capacidad de la silimarina para prevenir el daño hepático crónico inducido por el CCl4 (cirrosis).

La presencia de fibrosis en el hígado de los grupos de ratas tratadas con CCl4 se comprobó por el estudio histológico y por la cuantificación de la colágena en las muestras de los hígados.

Una serie de preparaciones histológicas se tiñeron con la tinción específica para la colágena: la tinción de Mallory. En la Fig. 24 se observa un corte de hígado de rata control teñido con esta técnica. En ésta se aprecia que solo existe colágena en los sitios que rodean los vasos, específicamente en la zona central y en la tríada hepática. Los cortes de hígado de los animales cirróticos (Fig. 25) revelaron áreas de necrosis difusas, esteatosis y nódulos de hepatocitos de diferentes tamaños rodeados por gruesas bandas de colágena.

El contenido de colágena de los hígados cirróticos fue

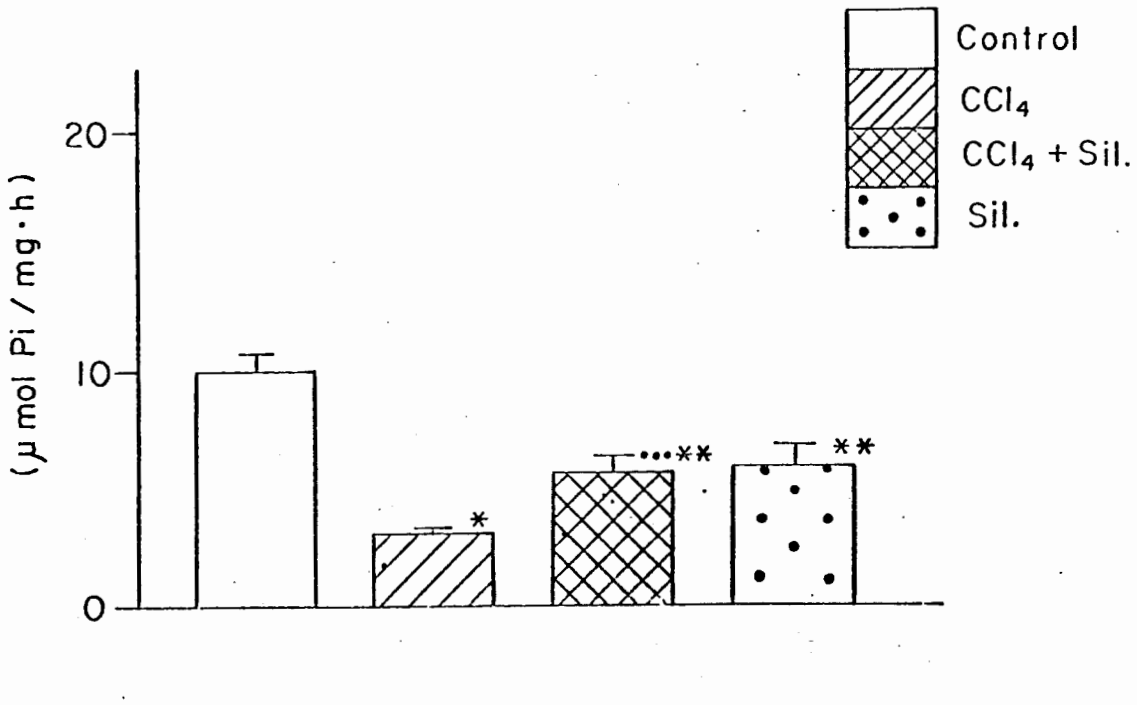


Fig. 23. Actividad de la ATPasa de Na+/K+ de membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas con CC14 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 24 h. después del tratamiento con CC14 (1:4, 0.5 ml/rata) i.p.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

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

ooo Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CC14.

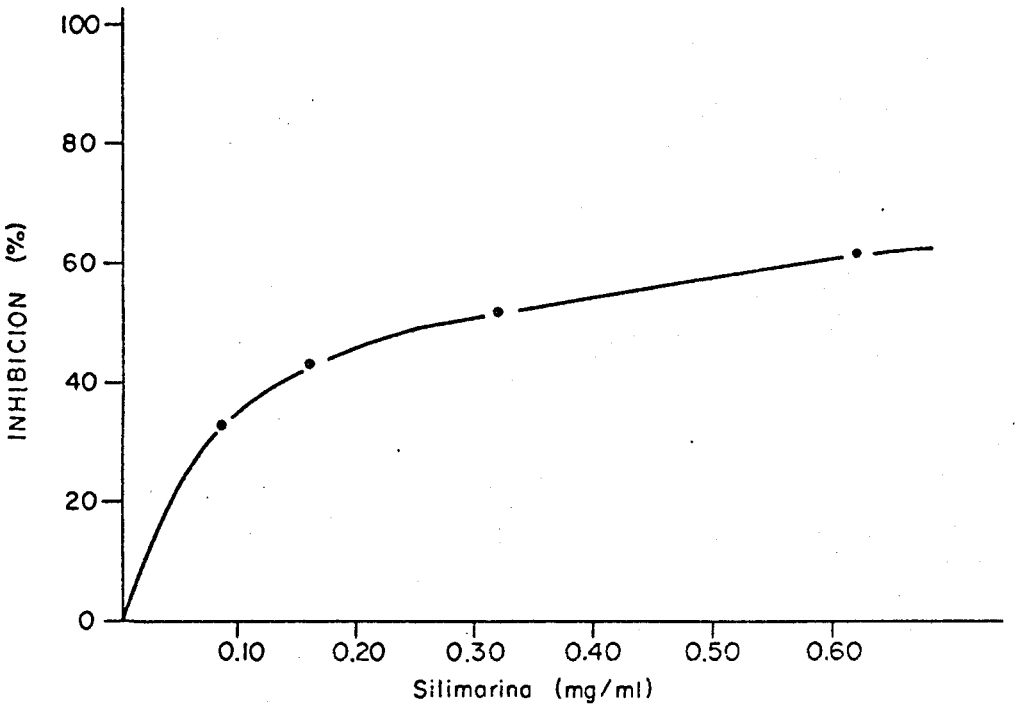


Fig. 23a. Inhibición "in vitro" de la ATPasa-Na+/K+ por la Silimarina en membranas plasmáticas aisladas de hepatocitos.

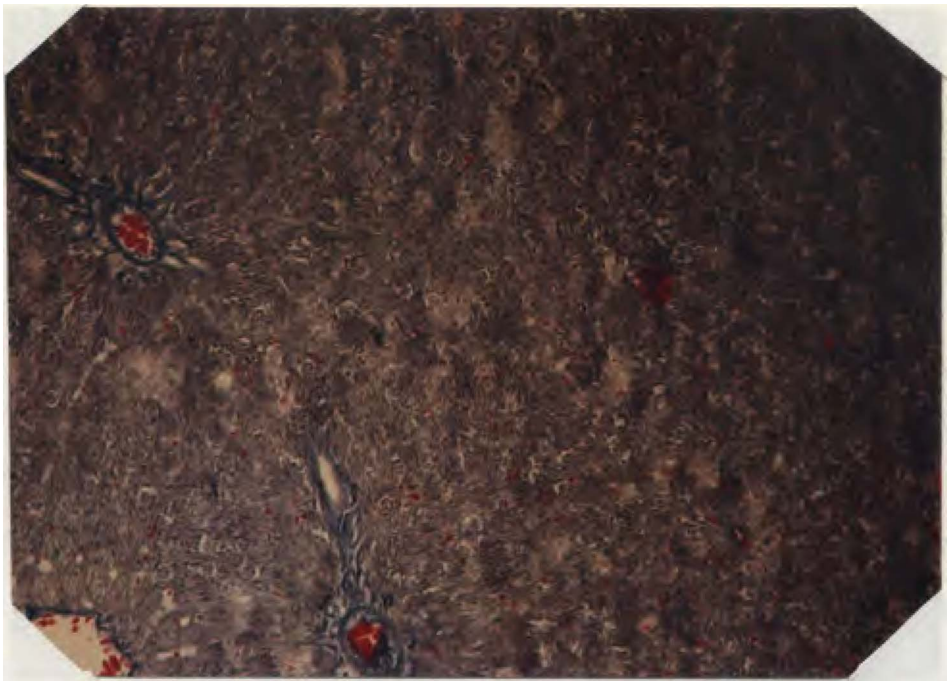


Fig. 24. Tinciún para colágena en un corte de hígado de rata control.

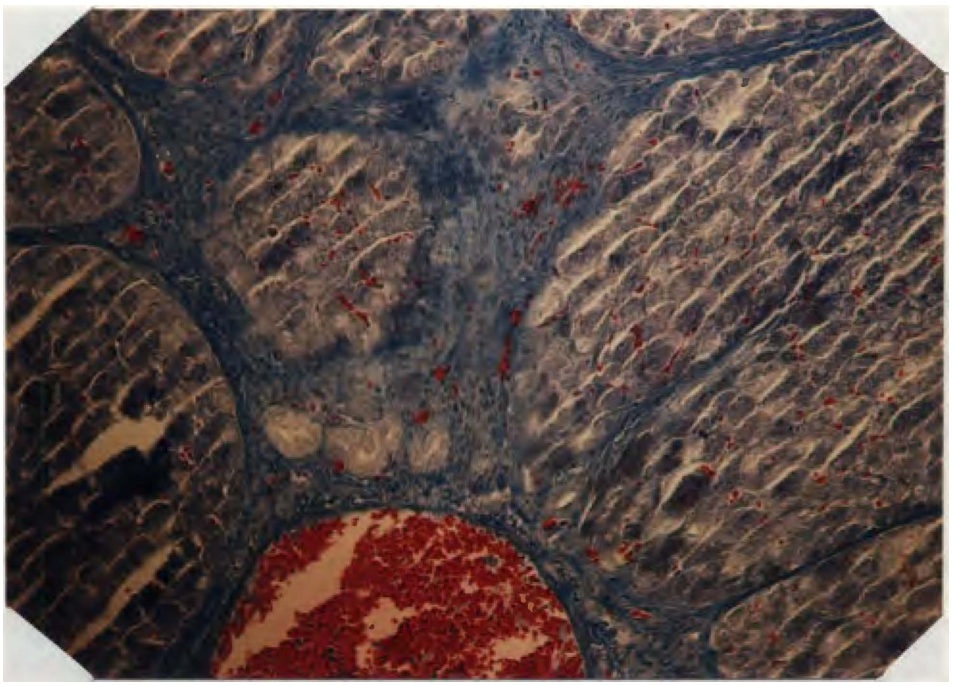


Fig. 25. Tinciún para colágena en un corte de hígado de rata cirrótica (8 semanas).

33.8 ± 3 ug/mg de proteína, y en el grupo de animales que recibió CCl4 más silimarina fué de 20.5 ± 2.1 ug/mg de proteína. Aunque hubo una reducción importante, fue diferente del valor control (10.8 ± 1.5 ug/mg de proteína $p < 0.001$). La diferencia entre el grupo tratado con CCl4 y el grupo CCl4 + silimarina fue estadísticamente significativa, $p < 0.05$ (Fig. 26).

Las bandas de tejido conjuntivo observadas en los cortes de hígados de ratas que recibieron CCl4 + silimarina fueron notablemente más delgadas (Fig. 27) que las observadas en ratas cirróticas. En los hígados de los animales que recibieron silimarina únicamente no se observaron cambios histológicos y el contenido de colágena en el hígado se encontró dentro de los niveles normales (11.2 ± 1.0 ug/mg de proteína).

También se realizó una técnica específica para grasa, para observar sí en el hígado cirrótico existía infiltración grasa, y se pudo apreciar que los cortes de hígados de ratas cirróticas presentaban un gran depósito de grasa (Fig. 28). Cuando se tiñeron cortes de hígados de ratas tratadas con silimarina además de CCl4 (Fig. 29) se mostró menos acumulación de grasa que la observada en aquellos del grupo que sólo recibió CCl4.

Las actividades enzimáticas de la fosfatasa alcalina (F.A.), gama-glutamil transpeptidasa (GGTP), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) fueron medidas en el suero de todos los grupos de animales. Como se muestra en la tabla 3 (Fig. 30-33), todas las actividades enzimáticas aumentaron en las ratas cirróticas, comparadas con el control siendo las diferencias estadísticamente

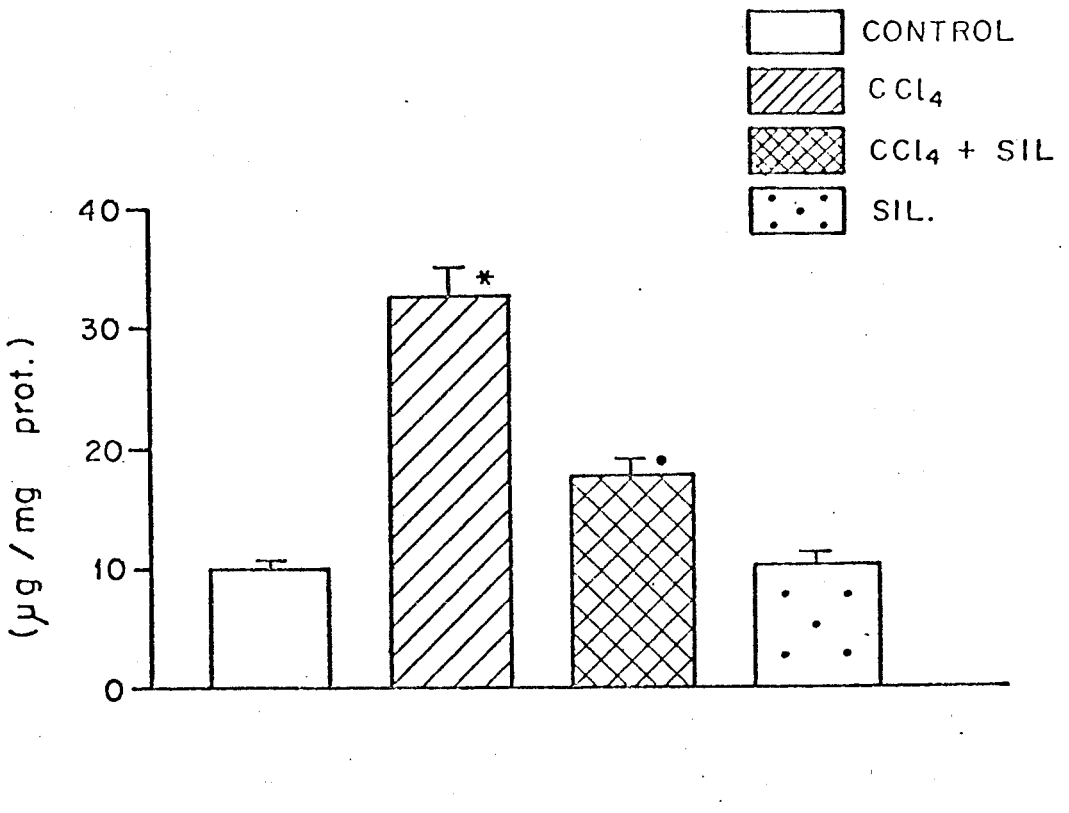


Fig. 26. Contenido de colágena hepática de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p. o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas $\pm$ E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

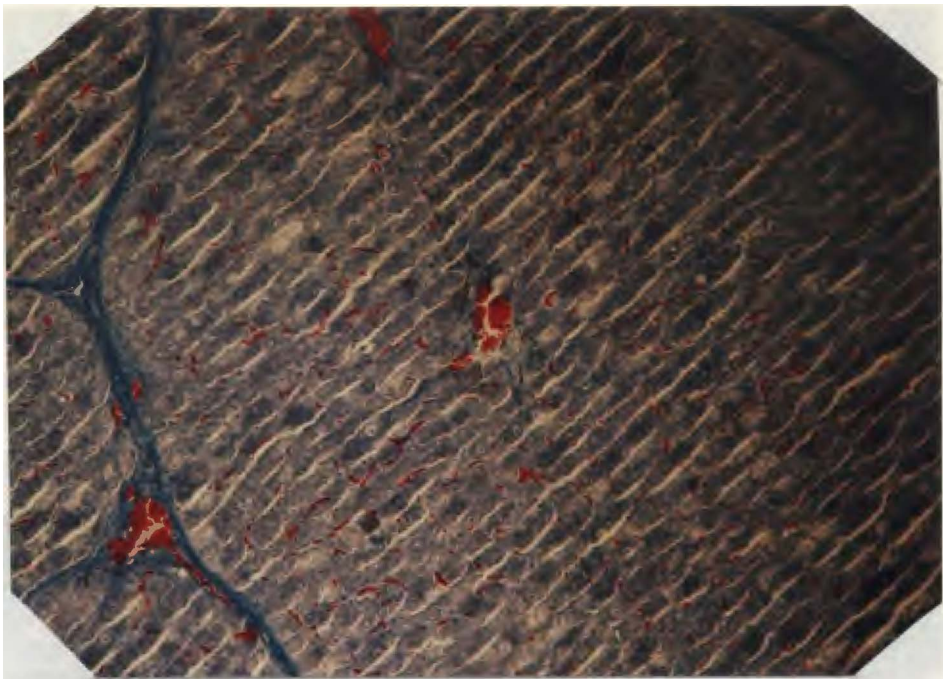


Fig. 27. Tinción para colágena en un corte de hígado de rata tratada crónicamente con CCl4 y Silimarina (50 mg/kg) p.o. diario.

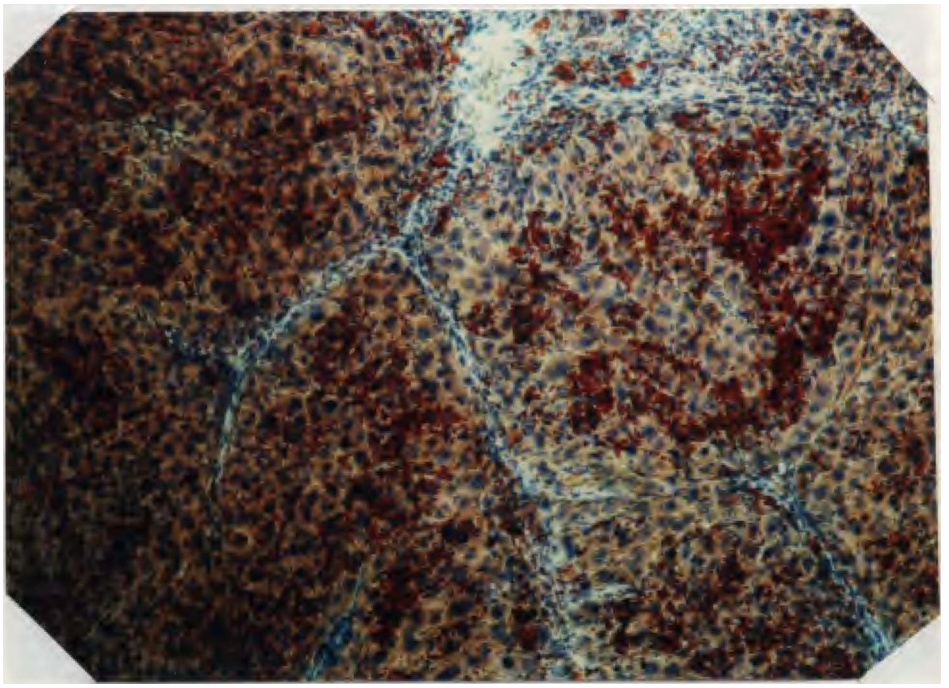


Fig. 28. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata cirrótica (8 semanas).

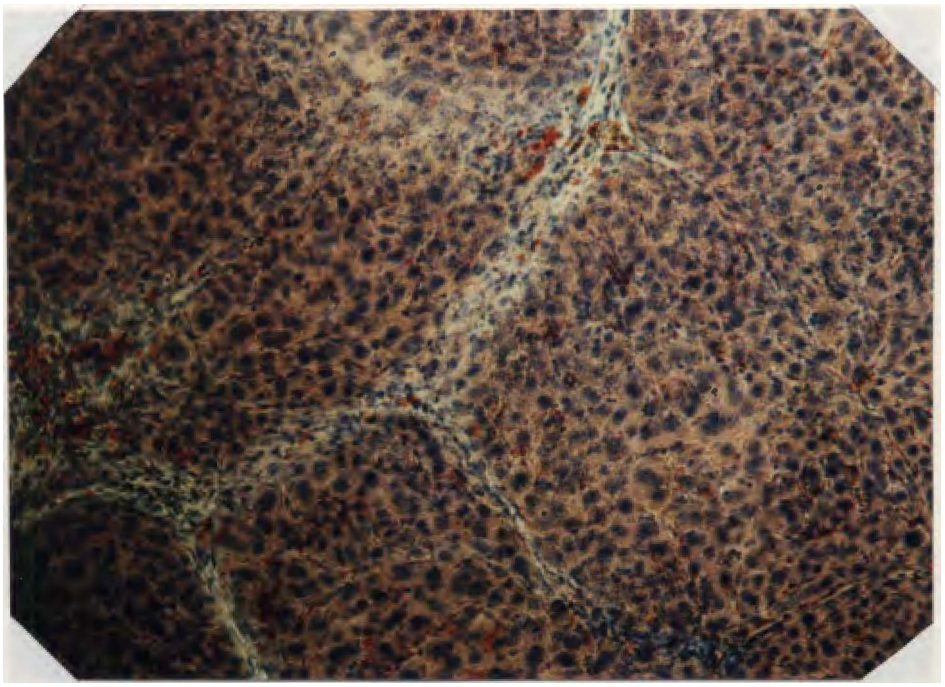


Fig. 29. Tinción de Rojo Sudán en un corte de hígado de rata tratada crónicamente con CCl4 y Silimarina (50 mg/kg) p.o. diario (8 semanas).

TABLA 3

ACTIVIDAD SERICA DE FA, GGTP, TGP Y G6Pasa EN RATAS TRATADAS CRONICAMENTE CON CCl4 Y SILIMARINA+

Tratamiento	F.A. (µmol/1.min)	GGTP (µmol/1.min)	TGP (UI/ml)	G-6-Pasa (µmol/ml.h.)
Control	110 ± 8 (10)	9 ± 1.0 (10)	428 ± 21 (10)	2.5 ± 0.4 (10)
CCl_4	298 ± 10* (10)	24 ± 1.5* (10)	1300 ± 30* (10)	3.5 ± 0.5* (10)
CCl_4 + Silimarina	135 ± 11● (10)	13 ± 1.0● (10)	526 ± 25 (10)	2.8 ± 0.4 (10)
Silimarina	161 ± 9** (10)	10 ± 0.8 (10)	402 ± 19 (10)	2.6 ± 0.2 (10)

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

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

o Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo CCl4.

() Significa número de animales.

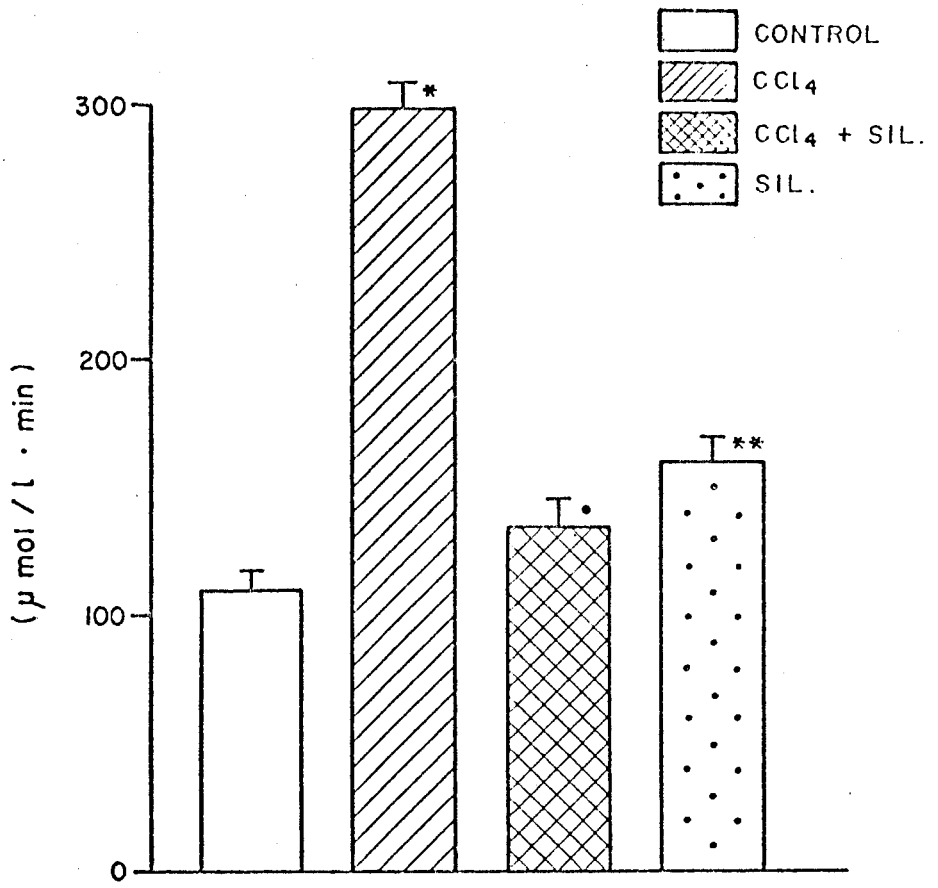


Fig. 30. Actividad de la fosfatasa alcalina sérica de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

\+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

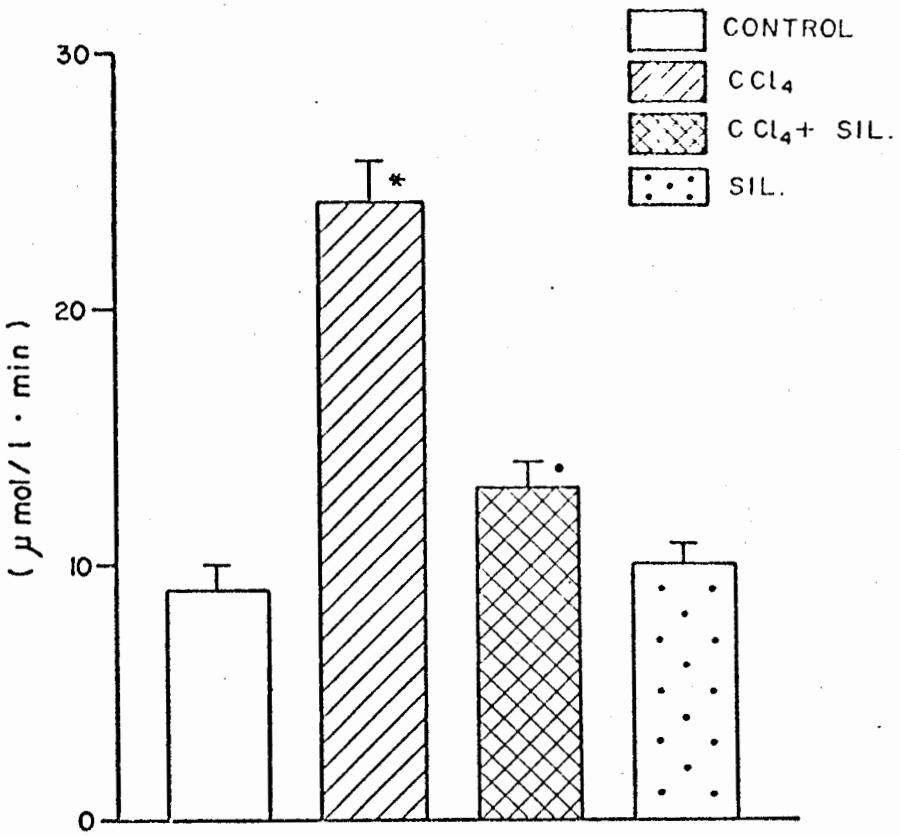


Fig. 31. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa sérica de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

o Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo CCl4.

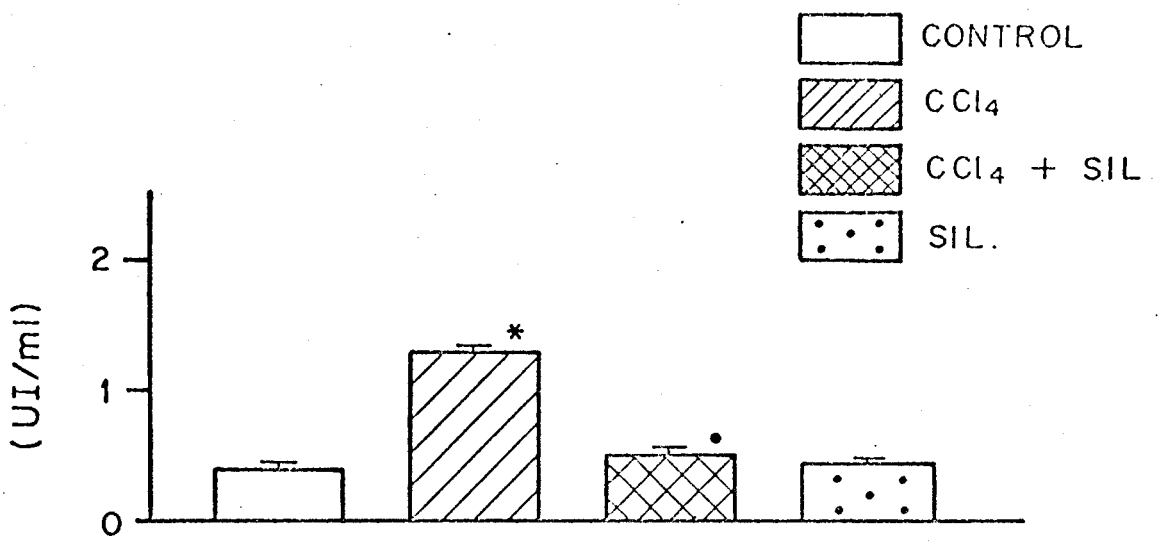


Fig. 32. Actividad de la transaminasa glutámico pirúvica sérica de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

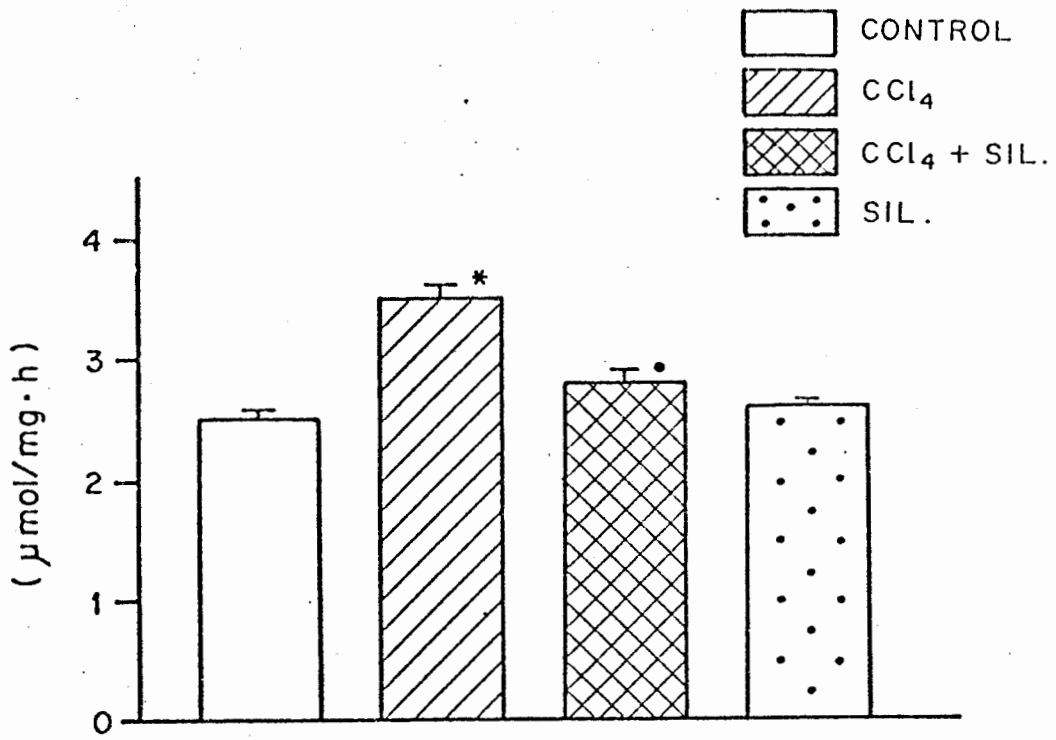


Fig. 33. Actividad de la glucosa-6-fosfatasa sérica de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

ignificativas, $p < 0.005$.

En el grupo de ratas tratadas con CCl4 + silimarina las ctividades enzimáticas se redujeron de manera importante omparadas con las del grupo tratado con CCl4, sin embargo, los alores permanecieron ligeramente arriba de los valores ontroles. En los animales tratados únicamente con silimarina se bservó un aumento en la actividad de la F.A. comparado con el grupo control.

La Fig. 34 muestra que la actividad de la F.A. de la embrana aumentó ($p < 0.005$) en el grupo de ratas tratadas con Cl4. En el grupo de animales que recibió CCl4 + silimarina no se observó cambio alguno con respecto al grupo anterior. En el grupo de animales que recibió solamente silimarina se encontró un aumento significativo de la actividad ($p < 0.005$).

En la Fig. 35 se observa que la actividad enzimática de la GGTP de la membrana de los animales cirróticos aumentó casi 2 veces con respecto al valor normal, ($p < 0.005$). El tratamiento con silimarina conjuntamente con el CCl4 no produjo modificaciones respecto al grupo de CCl4. Los animales que recibieron exclusivamente silimarina no mostraron diferencia con respecto a los controles.

Las figuras 36 y 37 muestran las actividades de la ATPasa de Na^+/K^+ y de Ca^{2+}, determinadas en las membranas plasmáticas aisladas. El CCl4 redujo la actividad de ambas enzimas en magnitud significativa ($p < 0.001$) y la silimarina previno totalmente esta caída de la actividad. La Fig. 38 indica que el contenido de glucógeno hepático se redujo en un

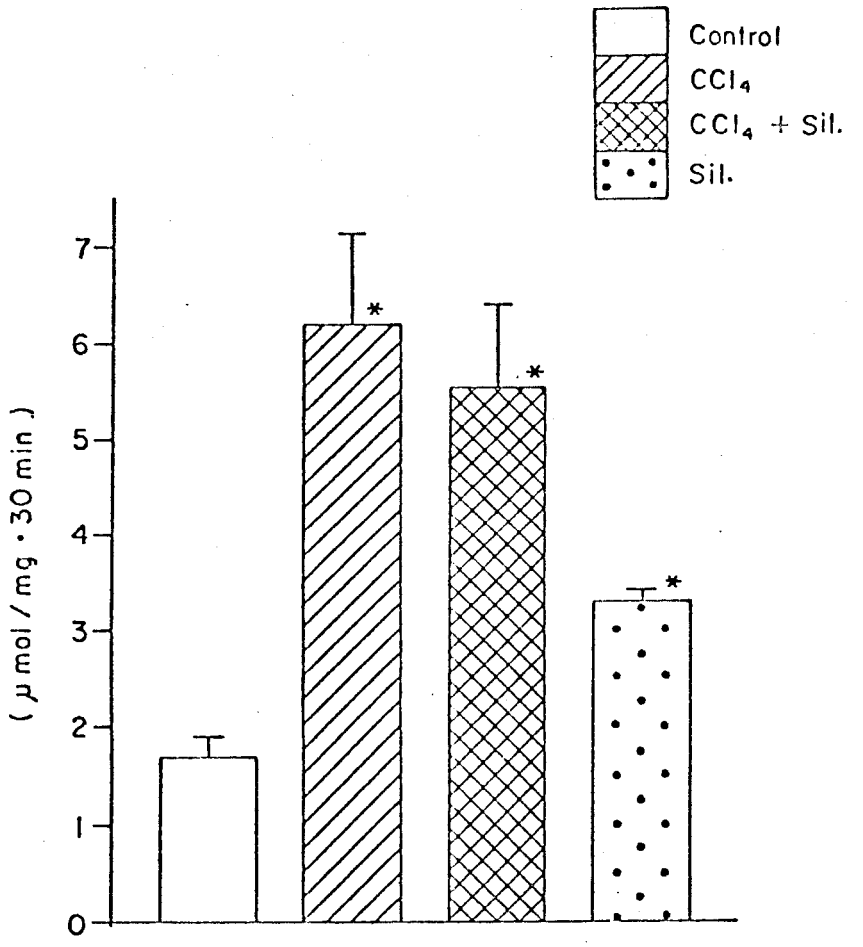


Fig. 34. Actividad de la fosfatasa alcalina en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

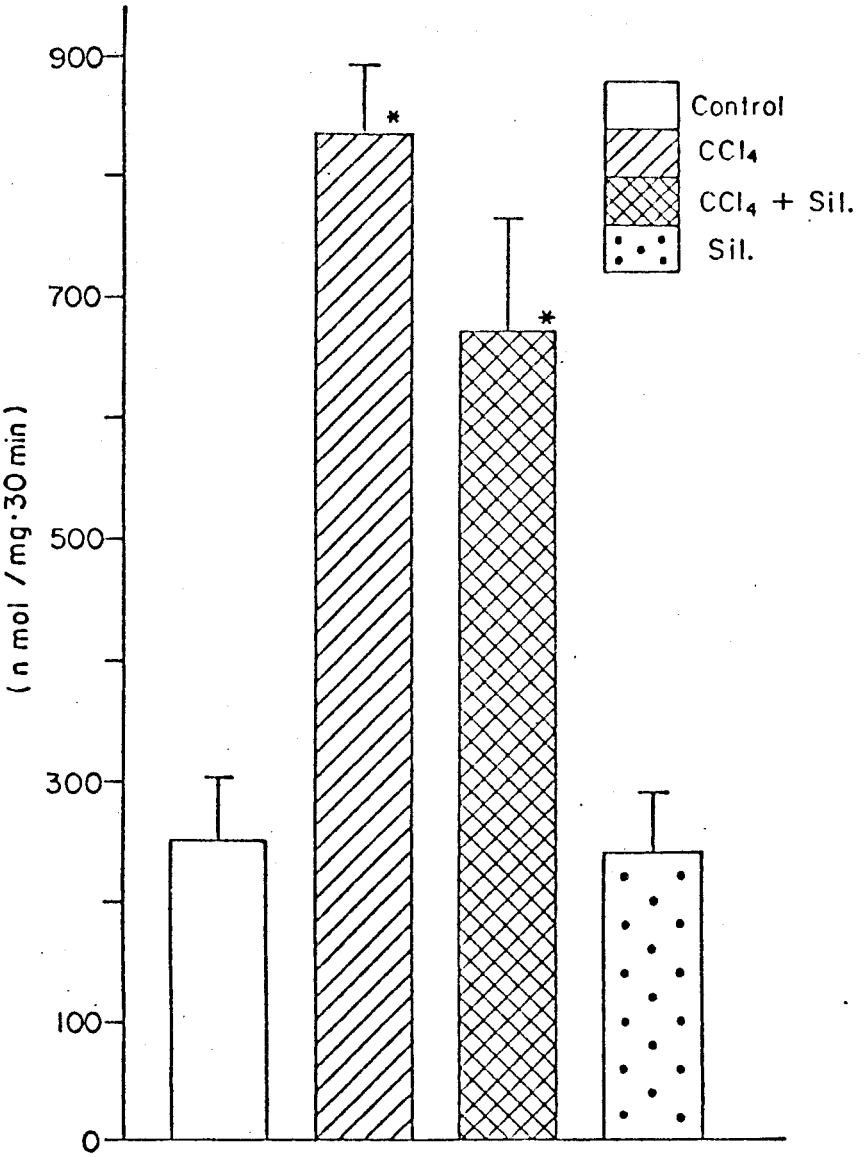


Fig. 35. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa en membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p. o. se administrá diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas $\pm$ E.S.M.

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

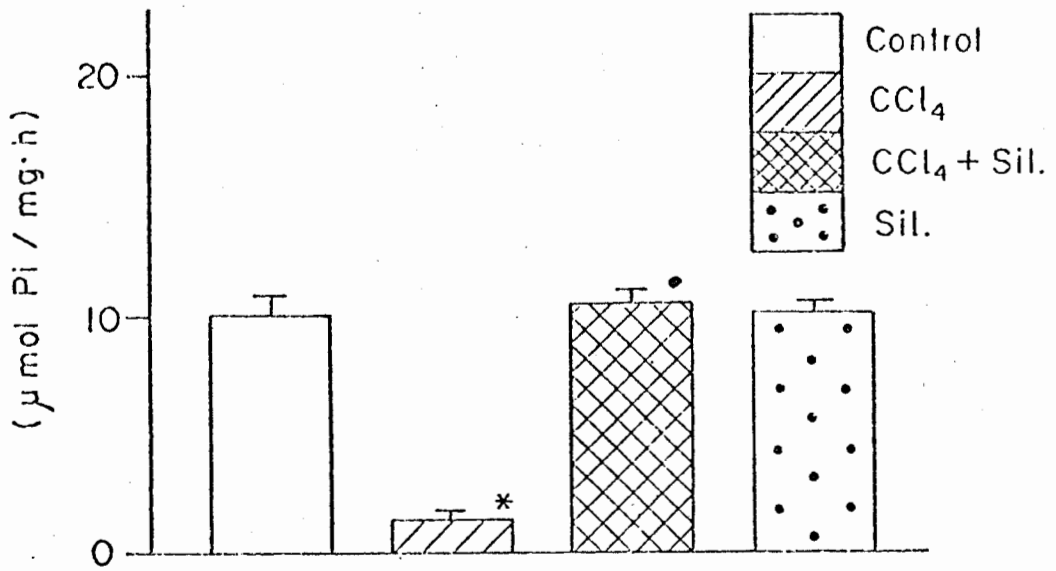


Fig. 36. Actividad de la ATPasa de Na+/K+ de membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

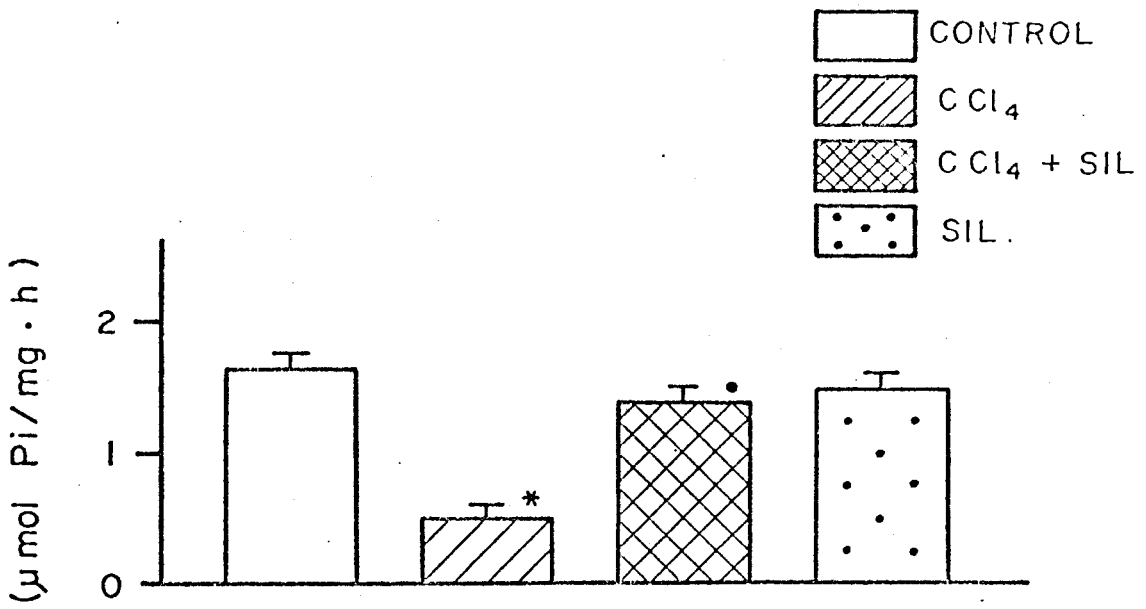


Fig. 37. Actividad de la ATPasa de Ca2+ de membranas plasmáticas de hepatocitos de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

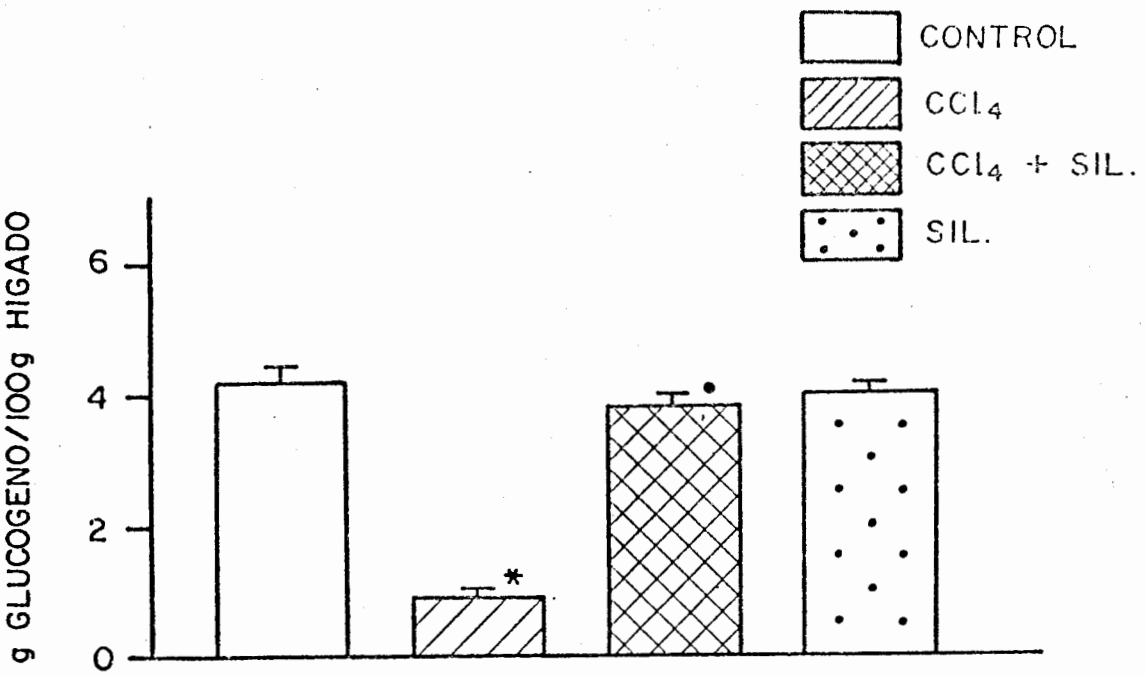


Fig. 38. Determinación de glucógeno en ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 i.p. La Silimarina (50 mg/kg) p.o. se administró diariamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

* Significa $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

o Significa $p < 0.005$ comparado con el grupo CCl4.

90% en los animales cirróticos ($p < 0.001$), y que las ratas que fueron tratadas con CCl4 + silimarina presentaron un contenido de glucógeno normal.

b). Capacidad de la silimarina para revertir el daño hepático crónico inducido por el CCl4 (cirrosis).

En la Fig. 39 se presentan los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica. Las ratas cirróticas presentaron un aumento en el contenido de F.A. de 3 veces con respecto a las controles ($p < 0.005$). El tratamiento de los animales cirróticos con silimarina sin discontinuar el CCl4, revirtió significativamente ese efecto, ($p < 0.025$).

Analizando la actividad de la gama-glutamil transpeptidasa, podemos ver en la Fig. 40 que los animales cirróticos presentaron un incremento de 2 veces con respecto al valor control ($p < 0.005$). El tratamiento con silimarina revirtió parcialmente ese incremento comparado con el grupo que recibió solamente el CCl4 ($p < 0.025$).

La Fig. 41 muestra los cambios en la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica sérica. Como se puede ver, la actividad de la enzima aumentó significativamente con respecto al control, ($p < 0.005$). El tratamiento conjunto con silimarina no revirtió el efecto causado por el CCl4.

Al determinar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa sérica (Fig. 42) se encontró elevada con respecto al control ($p < 0.005$) y como se puede ver la silimarina no revirtió este efecto.

En relación a los niveles de glucógeno hepático (Fig. 43) se observó que la cantidad de glucógeno presente en los

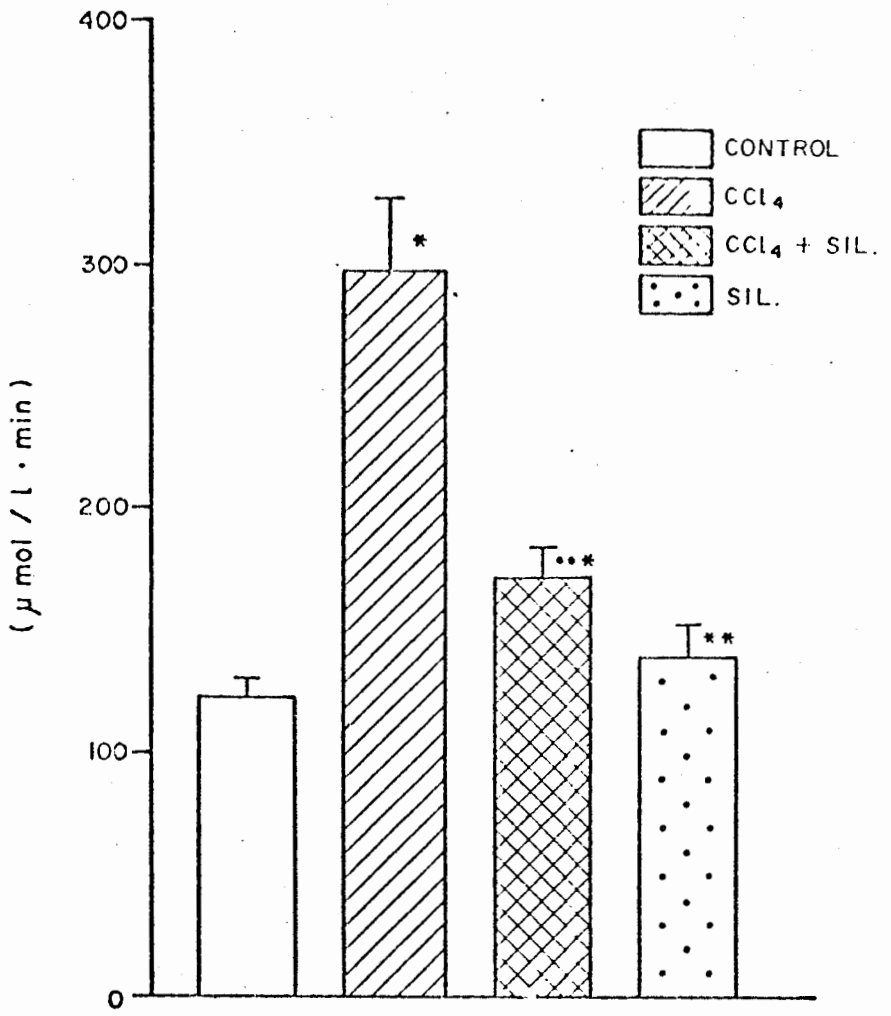


Fig. 39. Actividad de la fosfatasa alcalina sérica de ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 18 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 18 semanas i.p. y Silimarina 5 semanas (20 mg/kg) p.o. conjuntamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

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

oo Significa $p < 0.025$ comparado con el grupo CCl4.

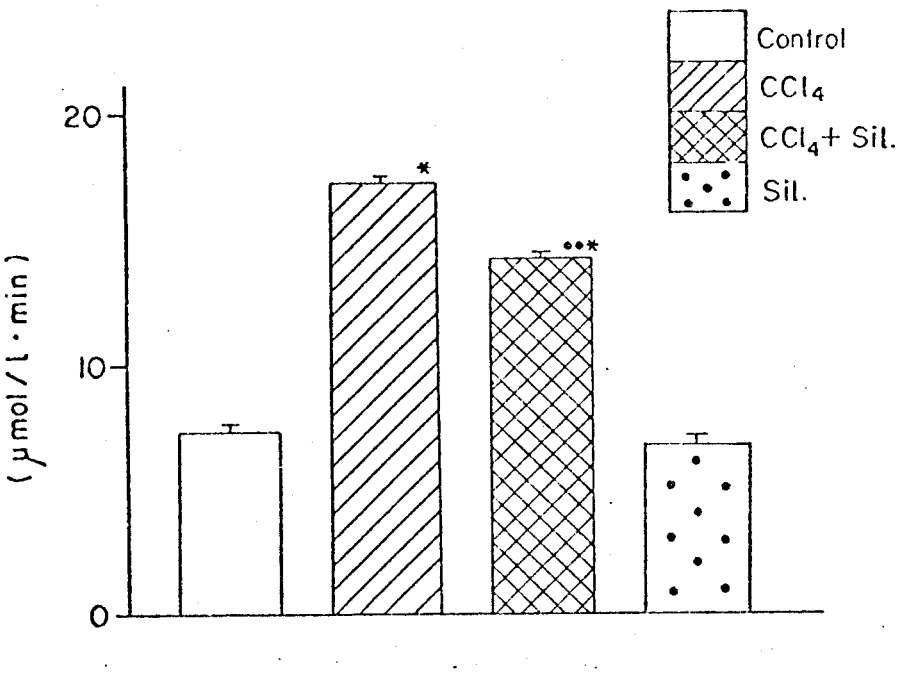


Fig. 40. Actividad de la gama-glutamil transpeptidasa sérica de ratas tratadas crónicamente con CC14 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 18 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CC14 18 semanas i.p. y Silimarina 5 semanas (20 mg/kg) p.o. conjuntamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

oo Significa $p < 0.025$ comparado con el grupo CC14.

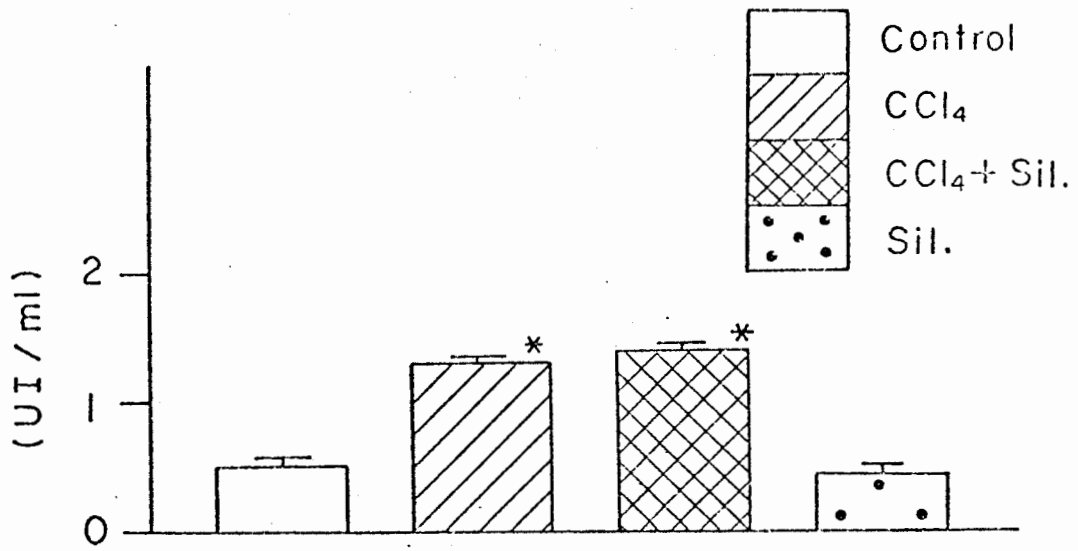


Fig. 41. Actividad de la transaminasa glutámico pirúvica sérica en ratas tratadas crónicamente con CCl4 y silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron a las 18 semanas de haber iniciado el tratamiento con CCl4 18 semanas i.p. y Silimarina 5 semanas (20 mg/kg) p.o. conjuntamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

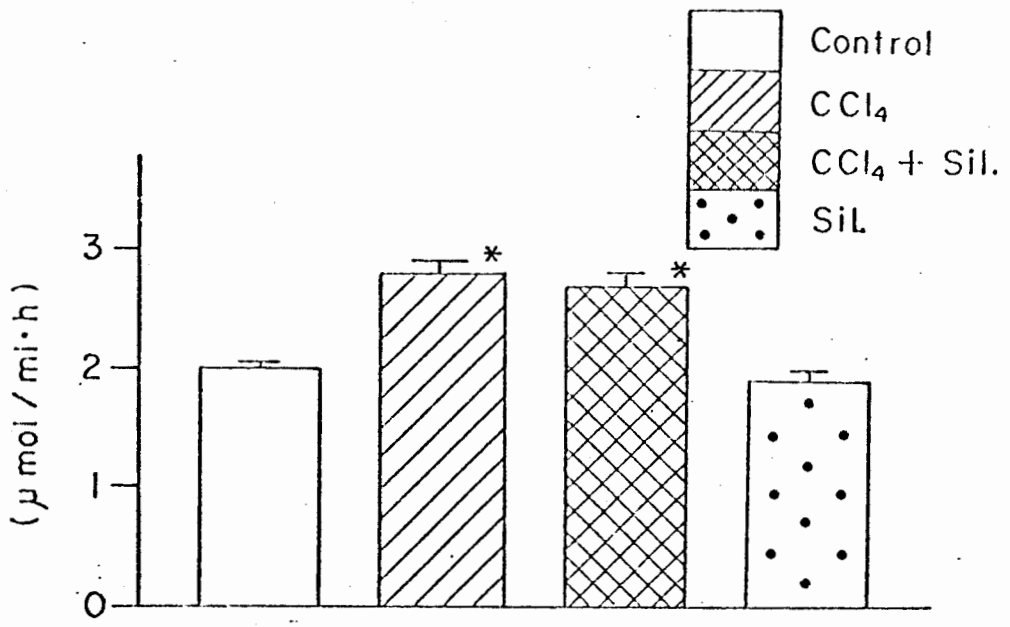


Fig. 42. Actividad de la glucosa-6-fosfatasa sérica de ratas tratadas crónicamente con CC14 y Silimarina+.

+ Las ratas se sacrificaron 18 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CC14 18 semanas i.p. y Silimarina 5 semanas (20 mg/kg) p.o. conjuntamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

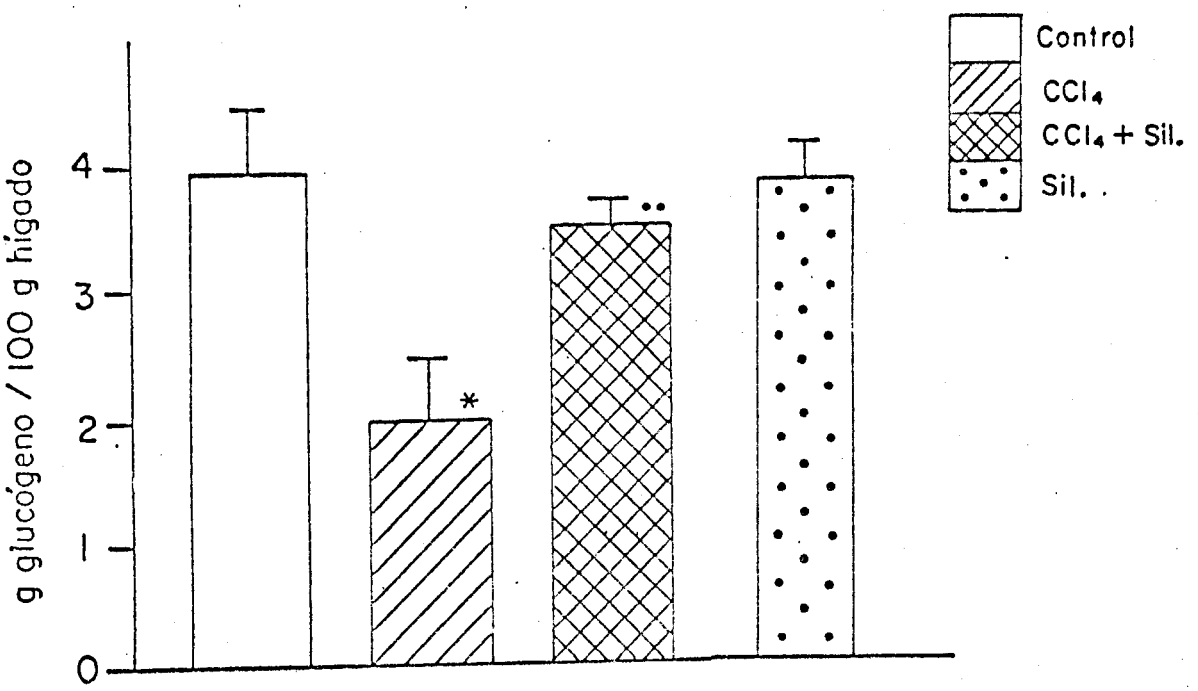


Fig. 43. Determinación de glucógeno en ratas tratadas crónicamente con CCl4 y Silimarina conjuntamente+.

+ Las ratas se sacrificaron 18 semanas después de haber iniciado el tratamiento con CCl4 18 semanas i.p. y Silimarina 5 (20 mg/kg) p.o. conjuntamente.

Los resultados se expresan como la media del número de ratas ± E.S.M.

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

oo Significa $p < 0.05$ comparado con el grupo CCl4.

hígados de ratas cirróticas estaba notablemente disminuído ($p < 0.005$). En este caso el tratamiento conjunto con silimarina revirtió en su totalidad ese efecto siendo significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo de ratas cirróticas.

V. DISCUSION

Desde el siglo XIX se tienen antecedentes del CCl_4 como veneno industrial, principalmente en aquellas personas que por sus ocupaciones necesariamente se veían expuestas a este solvente con diversos grados de intensidad. Sin embargo, la situación no ha cambiado en la actualidad a pesar de que se han implementado reglas de seguridad extremas en aquellas personas que por su trabajo tienen que exponerse inevitablemente a dicho solvente; prueba de ello es el hecho de que hasta la fecha se reportan constantemente intoxicaciones fatales en humanos sometidos a sus vapores (28, 47, 132), lo cual hace de la toxicología del CCl_4, así como de las sustancias que ejercen un efecto protector de su acción tóxica un importante motivo de investigación.

Existen publicaciones en las que se destaca que algunas sustancias que no guardan relación química alguna entre sí protegen de la acción hepatotóxica del CCl_4, inhibiendo el proceso de lipoperoxidación destructiva que este último desencadena cuando es metabolizado por el sistema microsomal metabolizante de drogas (54, 60, 66, 80, 200).

Se ha postulado que la silimarina ejerce efectos benéficos a diferentes niveles contra la hepatotoxicidad del CCl_4 (70, 146). No obstante, hasta el momento no existen en la literatura reportes que hagan referencia al posible efecto protector que la silimarina podría ejercer sobre el hígado de rata tratada aguda y crónicamente con CCl_4. Esto justifica las investigaciones realizadas en este trabajo.

Como ya se mencionó en la introduccion el "daño hepático" inducido químicamente no es una entidad simple, ya que la lesión observada no solo depende del agente químico involucrado, sino también del período de exposición.

La diversa naturaleza de la actividad del hígado y su variedad de respuesta al daño hace de la selección de los procedimientos apropiados de prueba una tarea difícil. La aplicación de la metodología de las enzimas séricas para la detección del daño hepático inducido químicamente, incluye entre otras a la fosfatasa alcalina (F.A.), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa).

De acuerdo con Zimmerman (223), la TGP es un indicador de daño parenquimal específico del hígado, mientras que la F.A. y la GGTP son indicadores de daño hepático obstructivo. Sin embargo, éstos últimos no son indicadores específicos de daño hepático, puesto que su actividad también puede verse incrementada en otras situaciones patológicas en que el hígado no se ve afectado (107).

Asimismo, existen en la literatura reportes publicados por otros autores (31, 106, 107, 138, 141, 149, 150, 151, 174, 213), en los cuales se ha establecido que el citocromo P-450 juega un papel determinante en la toxicidad del CCl4, ya que su metabolito primario, el radical libre altamente reactivo triclorometilo (CCl_3), inicia el proceso de lipoperoxidación destructiva por sí mismo (20, 213, 214) y por la formación de radicales libres secundarios (79, 93, 103, 110, 113, 127, 136,

139, 140, 143, 158, 171, 180, 212).

A continuación discutiremos los efectos producidos por el tratamiento con silimarina sobre los diversos parámetros que nos permitieron detectar y evaluar el daño hepático producido por la intoxicación con CCl4.

V.1. Efectos del Pretratamiento con Silimarina sobre la Actividad de F.A., TGP, GGTP y G-6-Pasa

La F.A. es una enzima de amplia distribución en los tejidos. En proporciones relativas el intestino delgado y el riñón tienen más F.A. que el hígado (107), y para el caso de la rata, la actividad de la F.A. predomina principalmente en la porción periportal del lóbulo hepático. Con lo anteriormente expuesto, es probable que el incremento observado en la actividad sérica de F.A. en los animales no pretratados, no sea únicamente una consecuencia del daño hepático obstructivo (223), sino también de daño al intestino delgado y al riñón (107). No obstante, los alcances de este trabajo se limitaron al daño hepático, por lo que para tener una demostración objetiva de la participación del daño hepático en el incremento de la actividad sérica de F.A., se determinó su actividad en las membranas plasmáticas de los hepatocitos, encontrándose en las mismas una disminución estadísticamente significativa, situación que concuerda con lo reportado por Tsuboi (198) en el sentido de que la administración de CCl4 a ratas y ratones provoca una disminución en la actividad de F.A. y de otras enzimas de la membrana plasmática de hepatocito durante el período de daño tisular. Esta enzima está lábilmente unida a la membrana y por

lo tanto el daño producido en el hepatocito se reflejará en una disminución de su actividad en la membrana y en un aumento de la misma en el suero. En los animales pretratados con silimarina se observaron aumentos, tanto en la actividad sérica como membranal de la F.A. Esto puede deberse a que por sí sola la silimarina ejerce un efecto directo sobre esta enzima, lo cual concuerda con lo ya reportado por Desplaces (33).

El incremento observado en la actividad sérica de TGP en los animales no pretratados es una manifestación de daño parenquimatoso (necrosis), que concuerda con lo establecido por Balazs (9, 10), en el sentido de que las ratas que eran intoxicadas agudamente con CCl4 experimentaban un notable incremento en la actividad sérica de TGP, como una manifestación de las lesiones necróticas severas producidas por la ya mencionada hepatotoxina. En los animales pretratados con silimarina se encontró una actividad igual a la normal. De acuerdo con la correlación lineal existente entre la actividad sérica de la TGP y el grado de necrosis hepática establecida por Balazs (10), el pretratamiento con silimarina hizo que el grado de necrosis producido por el CCl4 observado a las 24 horas fuera nulo.

La GGTP es una enzima integral de la membrana plasmática del hepatocito y de las células de los conductos biliares. Se encuentra en muchas estructuras epiteliales, generalmente involucradas en los procesos de absorción o secresión, tales como el epitelio del túbulo proximal renal, las vellosidades del yeyuno, los plexos coroides, los conductos

biliares, las vesículas seminales, etc.

De aquí que el incremento observado en la actividad sérica de la GGTP en los animales no pretratados sea una consecuencia, no solo del daño hepático obstructivo (223), sino también de daño renal y de otros órganos. No obstante, Boelsterli (15), ha establecido que si se encuentran alteraciones en la actividad de la GGTP tanto en el hígado como en el suero, se puede considerar que el aumento en este último puede deberse a daño hepático. Por lo tanto, para demostrar objetivamente la participación del daño hepático en el incremento de la actividad sérica de la GGTP, se determinó su actividad en membranas plasmáticas de hepatocitos de rata y se encontró un decremento significativo que puede asociarse en el incremento de la actividad sérica.

En los animales pretratados con silimarina, se incrementó la actividad sérica de la GGTP, sin embargo, dicho incremento fue significativamente inferior al de los animales no pretratados. Observándose en las membranas plasmáticas de estos animales que la actividad de la GGTP no difirió significativamente del control normal.

Estos resultados sugieren que muy posiblemente el pretratamiento con silimarina ejerce un efecto protector sobre la membrana plasmática. Ya en estudios previos, Slatter y Valenzuela (186, 202), demostraron que la silimarina protegía las membranas plasmáticas previniendo o inhibiendo la lipoperoxidación.

La G-6-Pasa es una enzima asociada al retículo endoplásmico, y la disminución de su actividad refleja daño

a este organelo (150). La integridad funcional de esta enzima es dependiente de la presencia de fosfolípidos, por lo tanto, en la descomposición de los lípidos microsomales provocada por el CCl4, resulta una disminución de la actividad de la enzima (147, 150, 151).

Grice (68) sugirió que las alteraciones en la actividad de la G-6-Pasa pueden servir como un indicador de daño hepático y puede detectarse histológicamente el daño en el mismo órgano.

Nuestros resultados muestran que en las ratas tratadas con CCl4 la actividad está significativamente reducida y que el pretratamiento con silimarina restablece este efecto a valores normales.

Las ATPasas son enzimas de la membrana plásmatica muy importantes para conservar la homeostasis celular (183). Por tal razón se pensó que en la hepatitis tóxica, las actividades de estas enzimas podrían encontrarse alteradas.

Nuestros resultados demuestran que la actividad de las dos ATPasas de la membrana plasmática del hepatocito (Na^+/K^+, Ca^{2+}) sufren una disminución importante. Las disminuciones observadas en las actividades de las ATPasas podrían deberse a cambios en los parámetros cinéticos de las enzimas (Vmax, Km), a una disminución en el número de moléculas de enzimas en su forma activa en la membrana, a un cambio en la velocidad de transporte de los cationes, etc.

En este trabajo se observó que el pretratamiento con silimarina no fue capaz de prevenir la disminución de la ATPasa de Na^+, K^+ debido a que la silimarina por sí sola ejerce un efecto

sobre la enzima.

Para confirmar lo anterior se realizó una serie de experimentos en los que se añadió la droga "in vitro" utilizando membranas normales. Los resultados obtenidos sugieren que la droga sí ejerce un efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na+, K+ de la membrana plásmatica de los hepatocitos. Las alteraciones en la actividad de la ATPasa de Na+/K+ originan por un lado modificaciones celulares debidas a un desequilibrio electrolítico y además como a este sistema se acoplan sistemas de transporte de nutrientes indispensables para el hepatocito (a.a. y azúcares), el daño sobre esta enzima conduciría a una disminución importante en el aporte de estas sustancias al interior celular. Asimismo, como consecuencia de la disminución de la actividad de la bomba de sodio, el transporte de ácidos biliares hacia los canalículos podría estar modificado en el hígado dañado. Con relación a la ATPasa de Ca2+, nuestros resultados podrían sugerir un incremento en el contenido de calcio intracelular. El calcio juega un papel importante en la regulación de varios sistemas enzimáticos y en el control del metabolismo del AMPc, por lo tanto estos resultados podrían explicar muchas de las anomalías que se encuentran en el hígado dañado relacionados con el metabolismo de nucleótidos cíclicos, tal como el nivel de glucógeno hepático.

V.2. Efecto del Pretratamiento con Silimarina sobre los Parámetros de Daño Hepático Determinados Histológicamente

De acuerdo a lo establecido por Plaa y Hewit (134), el

análisis del potencial hepatotóxico de un agente químico es incompleto sin una descripción histológica de la lesión producida. Zimmerman (223) ha establecido algunas características de las lesiones hepáticas definidas por el microscopio de luz, tales como necrosis centrizonal y esteatosis. La integridad del parénquima hepático puede hacerse visible por medio de la tinción hematoxilina-eosina, mientras que la presencia de grasa se visualiza con la tinción de rojo Sudán.

Al realizar las tinciones, hematoxilina-eosina en cortes de hígado provenientes de animales no pretratados y pretratados con silimarina, notamos que mientras en los animales control se aprecia claramente la integridad del parénquima hepático, en los animales no pretratados 24 horas después de la intoxicación con CCl4 se observa un daño generalizado de todo el parénquima hepático, con amplias zonas de necrosis y células que han perdido su citoplasma, resultado que concuerda con lo establecido por Zimmerman (223), en el sentido de que el radical libre CCl3 es el principal agente causal del desarrollo de necrosis por iniciar el proceso de lipoperoxidación en las membranas celulares.

Farber (43) propone la alteración de la membrana plasmática como el evento necrogénico inicial, ya que conduce a una pérdida de K+ intracelular, proteínas (incluyendo enzimas citoplásmicas) y coenzimas, así como una acumulación intracelular de agua y Ca2+.

No obstante, en los animales pretratados con silimarina no se observó daño generalizado del parénquima hepático y las

zonas de necrosis fueron mucho menores que en las ratas no pretratadas. Estos hallazgos se encontraron en todas las ratas analizadas, y el hecho de que en todos los animales pretratados se observen pequeñísimas zonas de necrosis sería atribuible a que la silimarina sí, actúe como atrapador de radicales libres (186), impidiendo de esta manera los efectos característicos que producen los mismos sobre las membranas celulares. No obstante, de acuerdo a lo establecido por otros investigadores (30, 98,172, 221), el CCl4 ejerce parte de sus efectos hepatotóxicos por ser un poderoso solvente lipídico, teniendo efectos adversos principalmente sobre la membrana plasmática (98, 172), donde ejercería un efecto dañino, propuesto por algunos autores como el evento necrogénico inicial (41).

Por otro lado, también consideramos de importancia evaluar los cambios lipídicos que se producían en el hígado como consecuencia de la intoxicación con CCl4. La mayoría de los lípidos almacenados en la célula son triglicéridos, los cuales constituyen las reservas metabólicas en forma de gotas, y sus fluctuaciones en los tejidos pueden seguirse citoquímicamente.

Las técnicas de tinción de lípidos se fundamentan en el hecho de que los colorantes de los lípidos son débilmente ionizables y por ello tienen la capacidad de disolverse en ellos, coloreándolos intensamente.

En este caso, se utilizó la técnica de Rojo Sudán para evaluar los cambios producidos por el CCl4 en el contenido de grasa. Como se pudo observar en los resultados la acumulación de grasa en las ratas pretratadas fue menor que en los que únicamente recibieron el CCl4 que como se sabe produce

esteatosis. Como consecuencia de la inhibición en la síntesis protéica, y de la dispersión de los ribosomas de las membranas del retículo endoplásmico rugoso, lo cual hace pensar que muy probablemente la silimarina, al actuar como un captador de radicales libres, evite la acción devastadora de los mismos sobre la síntesis de proteínas y los poliribosomas del retículo endoplásmico rugoso, no se desencadenaría una acumulación excesiva de grasa en hígado.

V.3. Efecto del Tratamiento con Silimarina sobre los Parámetros de Daño Hepático en el Tratamiento Crónico con CCl4

Un buen modelo para estudiar la disfunción bioquímica de la cirrosis hepática se obtiene de ratas intoxicadas con CCl4, así como también para estudiar los efectos de nuevas drogas para ser usadas en el tratamiento de la enfermedad en humanos (131).

La presencia de fibrosis en el hígado se manifestó por medio de determinaciones histológicas y bioquímicas de la colágena. Nuestros resultados demostraron que las ratas cirróticas muestran un patrón de alteraciones de daño crónico característico en el hígado. El contenido de colágena se incrementó más de 3 veces en el grupo tratado con CCl4. Las actividades enzimáticas séricas de la F.A., GGTP, TGP y G-6-Pasa y las actividades membranales de la F.A. y GGTP, aumentaron en el grupo cirrótico. Mientras que las ATPasas de Na+/K+ y Ca2+, al igual que el contenido de glucógeno fueron

notablemente reducidas en los hígados cirróticos.

Nuestros resultados demostraron que la silimarina mejora todas las anormalidades estudiadas en las ratas cirróticas. La capacidad de la silimarina para prevenir la lipoperoxidación podría ser la responsable de algunos otros efectos benéficos observados en los hígados cirróticos incluyendo actividades enzimáticas.

La F.A., GGTP y las ATPasas, como ya mencionamos son enzimas de la membrana plasmática y su actividad refleja el estado funcional de la membrana (27). Mientras que la G-6-Pasa es una enzima microsomal y la TGP es una enzima citosólica, que al aparecer en el plasma reflejan un defecto en la membrana celular de los hepatocitos (215).

Las ATPasas mantienen la concentración intracelular de iones y determinan el gradiente electroquímico (183). Generalmente se acepta que el gradiente electroquímico en el hepatocito provee una fuerza motriz para el transporte de Na+ acoplado a una variedad de solutos (49) incluyendo ciertos aminoácidos (69), ácidos biliares (84) y azúcares (49). Por otro lado el Ca2+ intracelular es esencial en la regulación de un gran número de actividades enzimáticas que participan en la gluconeogénesis (51) y glucogenólisis (75).

Nuestros resultados en este trabajo demostraron claramente que la silimarina efectivamente protege contra alteraciones de la membrana plasmática del hígado en las ratas cirróticas.

Los cambios encontrados en las ATPasas podrían explicarse por alteraciones en los mecanismos regulatorios de

cada enzima, así como por cambios en la fluidez de la membrana (216).

La mejoría de las funciones hepáticas por la silimarina puede atribuirse a su acción sobre la membrana. La mejoría en la fibrosis y en las funciones celulares del hígado son dos procesos distintos que pueden ocurrir por actividades farmacológicas independientes de la droga o de sus metabolitos.

La silimarina protege contra el efecto fibrogénico del CCl4, quizás por actuar modificando factores que promueven fibrogénesis después del daño al hígado pero esta pregunta permanece sin respuesta. Es importante enfatizar que este trabajo demuestra que la silimarina es una de las drogas más prometedoras en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

VI. CONCLUSIONES

La administración aguda de CCl4:

- Disminuye la actividad de la G-6-Pasa, eleva la actividad de la F.A., la GGTP y la TGP en el suero.
- Disminuye la actividad de la F.A. y la GGTP en la membrana.
- Disminuye la actividad de las ATPasas.

La administración aguda de CCl4 + Silimarina:

- Previene significativamente la actividad de las enzimas séricas.
- Previene parcialmente los cambios enzimáticos membranales.

La administración de silimarina:

- Incrementa per se la actividad de la F.A. y la GGTP sérica y membranales.

La administración crónica de CCl4:

- Eleva la actividad de las enzimas séricas.
- Aumenta la actividad de la F.A. y la GGTP en la membrana.
- Disminuye la actividad de las ATPasas.
- Aumenta el contenido de colágena del hígado.
- Disminuye el contenido de glucógeno del hígado.

El tratamiento crónico de CCl4 + silimarina:

- Previene y revierte la actividad de enzimas séricas.
- Previene y revierte parcialmente las alteraciones en enzimas membranales.
- Previene parcialmente la acumulación de colágena.
- Previene totalmente la pérdida glucógeno hepático.

La administración de silimarina:

- Incrementa per se la actividad de la F.A. sérica y membranal.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Alfin-Slater, R.B. and Morris, R.S. Vitamin E and lipid metabolism. Adv. Lipid Res. 1:183, 1963.
2. Alpers, D.H. and Isselbacher, K.H. Biochemical effects of CCl4 on rat intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 158:414, 1968.
3. Ames, B.N. Detection of phosphatase esters on chromatograms: A improved reagent. Anal. Biochem. 117:81-83, 1981.
4. Archacov, A.I. and Kurzina, I.I. CCl4-induced damage to endoplasmic reticulum membranes. Biochem. Pharmacol. 22:2095, 1973.
5. Artizzu, M., Pani, P., Satta, G. and Dianzani, M.U. The action of CCl4 on lisosomes "in vitro". Biochim. Biophys. Acta 82:454, 1964.
6. Artizzu, M., Baccino, F.M. and Dianzani, M.U. The action of CCl4 on mitochondria "in vitro". Biochim. Biophys. Acta 78:1, 1963.
7. Asada, M. Transaminase activity in liver damage. I. Study on experimental liver damage. Med. J. Osaka U. 9:45-51, 1958.
8. Bajwa, R.S. and Fujimoto, J.M. Effect of colchicine and DEF on the biliary excretion of sucrose manitol and horseradish peroxidase in the rat. Biochem. Pharmacol. 32:85, 1983.
9. Balazs, T., Murray, T.K., McLaughlan, J.M. and Grice, H.C. Hepatic test in toxicity studies on rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 3:71-79, 1961.

10. Balazs, T., Airth, J.M. and Grice, H.C. The use of serum glutamic piruvic transaminase test for the evaluation of hepatic necrotropic compounds in rats. Canad. J. Biochem. Physiol. 40:1-6, 1962.

11. Bangham, A.D., Rees, K.R. and Shorlander, U.L. Penetration of lipid film by compounds preventing liver necrosis in rats. Nature (London) 193:754-756, 1962.

12. Batsakis, J.G., Kremers, B.J., Thiessen, M.M. and Shilling, J.M. Biliary tract enzymology. A clinical comparison of serum alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase and 5'-nucleotidase. Am. J. Clin. Pathol. 50:485-490, 1968.

13. Berger, L. and Rudolph, G.N. Alkaline and acid phosphatase. Standard methods of clinical chemistry Ed. Meites New York. Academic Press. Vol. 5, 1983.

14. Bernheim, F. Biochemical implications of pro-oxidants and oxidants. Radiat. Res. (Suppl. 3) p. 17, 1963.

15. Boelsterli, U. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP) and early marker for hepatocarcinogens in rats. Trends. Pharmacol. Sciences 16:141-143, 1979.

16. Bowman, W.C. y Rand, M.J. En Farmacología: Bases Bioquímicas y Patológicas, Ed. Interamericana, p. 26-29, México, D.F., 1984.

17. Boyer, J.L. Canalicular-bile formation in the isolated perfused rat liver. Am. J. Physiol. 221:1156-1163, 1971.

18. Bradford, M.M. A rapid and sensitivie method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248

-254, 1976.

19. Brauer, R.W. and Root, M.A. The effect of CCl4 induced liver injury upon the acetylcholine hydrolyzing activity of blood plasma of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 88:109-118, 1946.

20. Butter, T.C. Reduction of CCl4 "in vivo" and reduction of CCl4 and CHCl3 "in vitro" by tissue homogenates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 134:311, 1961.

21. Buvher, N.L.R., Malt, R.D. In: Regeneration of liver and kidney. Little Brown, (Eds.). Boston, pp. 176, 1971.

22. Cameron, R., Kellen, F., Kolin, A., Malkin, A. and Farber, E. -glutamyl transferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 38:823-829, 1978.

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

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

25. Cleveland, P.D. and Smuckler, E.A. Effect of CCl4, dimethyl-nitrosamine and thioacetamide on hepatic DPNH and TPNH cytochrome c reductase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120:808, 1965.

26. Conney, A.H. and Burns, J.J. Metabolic interactions among environmental chemical and drugs. Science 178:576-586, 1972.

27. Coodley, E.L. Enzyme diagnosis in hepatobiliary diseases.

Am. J. Gastroenterol. 52:189-202, 1969.

28. Cralley, L.V. and Cralled, L.J. In Patty's industrial hygiene and toxicology. Vol. III. Theory and rationale of industrial hygiene practice, p. 296. John Wiley and Sons, New York, 1979.

29. 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.

30. Darling, P.R. and Le Page, R.N. Studies on "in vitro" treatment of rat liver plasma membranes with carbon tetrachloride. Biochem. Pharmacol. 21:2139, 1972.

31. Dawkins, M.J.R. Carbon tetrachloride poisoning in the liver of the new-born rat. J. Pathol. Bacteriol. 85:189, 1963.

32. Desai, I.D., Samant, P.L. and Tappel, A.L. Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. Biochim. Biophys. Acta 86:227, 1964.

33. Desplaces, A., Choppin, J., Vogel, G. and Trost, W. The effects of Silymarin on Experimental Phalloidine Poisoning. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 25:1, 1975.

34. Dingell, J.V. and Heimberg, M. The effects of aliphatic halogenated hidrocarbon on hepatic drug metabolism. Biochem. Pharmacol. 17:1268-1278, 1968.

35. Dinman, B.D., Fox, C.F., Frajola, W.J. and Rabor, A. Serum enzyme and B12 changes in CCl4 hepatotoxicity. Arch. Environ. Health 4:168-182, 1962.

36. Drill, V.A. Pharmacology of Hepatotoxic Agents.

Gastroenterol. 38:786-787, 1960.

37. 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.

38. Ehrlich, P., Roussel, R., Bornstein, P. Effect of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. J. Cell Biol. 62:390, 1974.

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

40. Farber, E. Histochemical localization of specific oxidative enzymes: Tetrazolium stain for the dephosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Histochem. Cytochem. 4:254, 1956.

41. Farber, J.L. and El-Mofty, S.K. The biochemical pathology of liver cell necrosis. Am. J. Pathol. 81:237, 1975.

42. Farber, E., Fischer, M.M. In Toxic Injury of the Liver. Part B. (Marcel Dekker, Inc.). p. 547-549, New York, 1980.

43. Farber, J.L. The role of calcium in cell death. Life Sci. 29: 1289-1295, 1981.

44. Faulstich, H., Jahn, W. Wieland. Silybina inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver. Drug Res. 3:1, 1980.

45. Fernely, H.N. Kinetic behavior of calf intestinal alkaline phosphatase with 4-methylhembellyteryl phosphatase. Biochem. J. 95-97, 1965.

46. Fong, I., Schoffner, F.C., Kirk, P. The ultramicrodetermination of glycogen in liver. A comparison of the anthrone and reducing sugar methods. Arch. Biochem.

Biophys. 45:319-326, 1953.

47. Forbes, J.R. Carbon tetrachloride nephrosis. The Lancet 2:590-592, 1944.

48. Fowler, J.S.L. Carbon tetrachloride metabolism in the rabbit. Br. J. Pharmacol. 37:733, 1969.

49. Freel, R.W. and Goldner, A.M. Sodium coupled electrolyte transport across epithelial: emerging concepts and directions. Am. J. Physiol. 241:G451, 1981.

50. Friedman, L., Sage, J. and Blenderman, E.M. Growth and liver response chicks and rats to carbon tetrachloride and ethanol. Poult: Sci. 49:298, 1970.

51. Friedmann, N. Effects of glucagon and ciclyc AMP on ion fluxes in the perfused liver. Biochim. Biophys. Acta 274:214, 1972.

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

53. Galambos, J.T. Editor. Epidemiology. In: Cirrhosis major problems in internal medicine. Vol. XVII, pp. 91, W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A., 1979.

54. Gallagher, C.H. The effect of antioxidants on poisoning by CCl4. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40:241, 1962.

55. Ganong, W.F. Manual de Fisiología Médica. 5a. Edición. Ed. El Manual Moderno, 1976.

56. Gardner, H.W. Descomposition of linoleic acid hidroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymatic. J. Agric. Food Chem. 23:129-136, 1975.

57. Gillete, I.R. Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. Adv. Pharmacol. 4:219, 1966.

58. Gillete, J.R. and Jollow, D.J. In The Liver: Normal and abnormal functions (F.F. Becker, ed.) Dekker, New York, p. 165, 1974.

59. 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.

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

61. 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.

62. Glossmann, M. and Neville, D.M. Gamma-glutamyl transferase in kidney bursh border membranes. Febs. Letters 19(4):340-344, 1972.

63. Goldstein, A., Aronow, L. and Kalman, M. Principles of drug action; the basis of pharmacology. 2nd. Ed. Wiley, New York, pp. 242-251, 1974.

64. Goshal, A.K., Porta, E.A. and Hartroft, W.S. The role of lipoperoxidation in the pathogenesis of fatty livers induced by phosphorous poisoning in rats. Am. J. Pathol. 54:275-291, 1969.

65. Graham, A.B. and Wood, G.C. The phospholipid dependence of

UDP-glucuronyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:567, 1969.

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

67. Gregory, N.L. CCl4 toxicity and electron capture. Nature 212:1460, 1966.

68. Grice, H.C. The changing role of pathology in modern safety evaluation. C.R.C. Crit. Rev. Toxicol. 1:119-152, 1972.

69. Guidotti, G.G., Gorghetti, A.F. and Gazzola, G.C. The regulation of aminoacid transport in animals cells. Biochem. Biophys. Acta 515:329, 1978.

70. Hahn, G., Lehmann, H., Kurten, M., Vogel, G. Zur pharmakologie und toxikologie von silymarin, des antihepatotoxischen wirkprinzipes aus silybum marianum. Drug Res. 18:698, 1968.

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

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

73. Hardin, B.L. Jr. Carbon tetrachloride poisoning review. Industr. Med. Surg. 23:93, 1954.

74. Harris, E.D. and Krane, S.M. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatic synovium. Arth. Rheum. 14:669, 1971.

75. Hems, D.A. and Whitton, P. Control hepatic glycogenolysis. Physiol. Rev. 60:1, 1980.

76. Hickenbottom, R.S. and Hornbroock, K.R. Effects of CC14 on the metabolism of liver glycogen in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 178:383-394, 1971.

77. Hoffsteh, P.E., Hunter, F.E. Jr., Gebiki, J.M. and Weinstein, J. Formation of "lipid peroxide" under conditions which lead to swelling and lysis of rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7:276, 1962.

78. Hokin, L.E., Hexum, J.D. Studies on the characterization of the sodium potassium transport adenosine triphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 151:453-463, 1972.

79. Holman, R.T. Autoxidation of fats and related substances. In Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Vol. 2. Edited by Holman, R.T., Liendberg, W.O. and Malkin, T. pp.51-98, Pergamon Press, London, 1954.

80. Hove, E.L. Interrelation between alfa-tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CC14 poisoning in rats. Arch. Biochem. 17:467, 1948.

81. Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Hoffsten, P.E. and Schneider, A. Studies on the mechanism of swelling lysis and distintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione. J. Biol. Chem. 239:614, 1964.

82. Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Hoffsten, P.E. and Guerra, F. Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. J. Biol. Chem.

239:604, 1964.

83. Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Weinstein, J. and Schneider, A. Effects of phosphate, arsenate and other substances on swelling and lipid peroxide formation when mitochondria are treated with oxized and reduced glutathione. J. Biol. Chem. 239:622, 1964.

84. Iga, T. and Klaasen, C.D. Uptake of bile acids by isolated rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 31:211, 1982.

85. Jennings, R.B. Fatal fulminant acute carbon tetrachloride poisoning. Arch. Pathol. 55:269, 1955.

86. Jones, A.L. y Mills, E.S. Hígado y vesícula biliar. Greep, R.D. and Weiss, J. Histología, Ed. El Ateneo, 3a. Ed., 1978.

87. Jorgensen, R.L., Skriver, E., Hebert, H. and Maunsbach, A.B. Structure of the Na+, K+ pump: Crystallization of pure membrane bound Na+, K+-ATPase and identification of functional domains of the alfa-subunit. N.Y. Acad. Sci. 402:207-225, 1982.

88. Katz, N. Heterogeneous distribution of glucose-6-phosphatase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. Febs. Letters 76:226, 1977.

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

90. Kershenobich, D., Uribe, M. and Suárez, G.I. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double blind randomized trial.

Gastroenterology 77:535, 1979.

91. 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.

92. Koide, H. and Oda, T. Pathological ocurrence of glucose-6-phosphatase in serum in liver diseases. Clinica Chimica Acta 4:554-561, 1959.

93. Kubic, V.L. and Anders, M.W. Metabolism of carbon tetrachloride to phosgene. Life Sci. 26:2151-2155, 1980.

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

95. Le Bouton. Heterogenicity of protein metabolism between liver cells as studies by radioantography. Curr. Med. Biol. 2:111, 1968.

96. Leduc, E.H. and Wilson, J.W. Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning. A.M.A. Arch. Pathol. 65:147-157, 1958.

97. Lehninger, A.L. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 234:2465, 1969.

98. Le Page, R.N. and Dorling, P.R. Plasma membranes in acute liver injury: Biochemical changes induced by carbon tetrachloride. Aust. J. Exp. Biol. 49:345, 1971.

99. López de León, A. and Rojkind, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embeded sections. The Journal of Histochemistry

and Cytochemistry 33:737-743, 1985.

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

101. Lutz, L.M., Glende, E.A. and Recknagel, R.O. Protection by diethyldithiocarbamate against carbon tetrachloride lethality in rats and against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation "in vitro". Biochem. Pharmacol. 22:1729-1734, 1973.

102. Malech, H.L., Root, R.K. and Galbin, J. Structural analysis of human neutrophile migration. J. Cell Biol. 75:666, 1978.

103. 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.

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

105. Maruyama, A., Feinman, L. and Fainsiller, R. Measurement of mammalian collagenase in human liver biopsies of patients with alcoholic liver disease. Decrease in activity with development of cirrhosis. In Proceedings of Connective Tissue of the Normal and Fibrotic Human Liver. Popper, H., Gerlach, U., Kuhn, K. and Sttugart, F.R. (eds.). Georg

Thieme Verlag (En prensa).

106. Mason, H.S., North, J.C. and Vanneste, M. Microsomal mixed function oxidations: The metabolism of xenobiotics. Fed. Proc. 24:1172, 1965.

107. McCombs, R.B. Bowers, G.N. and Rosens. Alkaline phosphatase. Ed. Plenum Press, New York, 1979.

108. McDonald, T.L. Chemical mechanisms of halocarbon metabolism. C.R.C. Crit. Rev. Toxicol. 11:85, 1982.

109. McLean, A.E.M. The effect of diet and vitamin E on liver injury due to CCl4. Br. J. Exp. Pathol. 48:632, 1967.

110. McMillan, G.R. and Calvert, J.G. Gas phase photo-oxidation. Oxidation Combustion Rev. 1:84-135, 1965.

111. Megirian, R. Influence of CCl4 on thiopental sleeping time and distribution in the rat. J. Pharmacol. Exp. Therap. 144:331-336, 1964.

112. Meister, A., Tate, S.S. and Ross, L.L. Membrane-bound -glutamyl transpeptidase. The enzymes of biological membranes. Anthony Marlonosi. Vol. 3, pp. 315-343, 1976.

113. Mico, B.A., Branchflower, R.V., Pohl, L.R., Pudzianowski, A.T. and Loew, G.H. Oxidation of CCl4, BrCCl3, and CBr4 by rat liver microsomes to electrophilic halogens. LIfe Sci. 30:131-137, 1982.

114. Migai, K. Utraestructural basis for liver injury toxic injury of the liver. Part A. Ed. by Farber, M. and Fisher, M.M., Marcel Dekker, I.N.C., pp. 59-163, 1979.

115. Miners, J.O., Drew, R. and Birkett, D.J. Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice "in vivo". Biochem. Pharmacol. 33:2995-3000, 1984.

116. Molander, D.W., Wroblowski, F. and La Due, J.S. Serum glutamic oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular injury. J. Lab. Clin. Med. 46:831-839, 1955.

117. Montfort, I. and Pérez-Tamayo, R. The distribution of collagenase in normal rat tissues. J. Histochem. Cytochem. 23:910, 1975.

118. Montfort, I. and Pérez-Tamayo, R. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. Am. J. Pathol. 92:411, 1978.

119. Montgomery, D.C. Desing and analysis of experiments. John Wiley and Sons, Inc. pp. 33-70, 1976.

120. Morris, D. Quantitative determination of carbohydrates with drey wood's anthrone reagent. Science 107:254-255, 1948.

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

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

123. Mourelle, M., Yahuaca, P. and Rojkind, M. Ca+2 and (Na+, K+) liver ATPases decrease after treatment with CCl4. Hepatology 3(5):303. 1983.

124. Myren, J. Injury of the liver tissue in mice after single injections of carbon tetrachloride. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 116:1-64, 1956.

125. Nagliulo, E. and Carosi, P. Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. Drug Res. 23:1,

1973.

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

127. Packer, J.E., Slater, T.F., and Willson, R.L. Reactions of the CCl4-related peroxy free radical (CCl4-OO) with aminoacids: pulse radiolysis evidence. Life Sci. 23:2617-2620, 1978.

128. Pasthlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Balian, G. and Kang, A.H. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. J. Exp. Med. 153:494, 1981.

129. Peck, H. Detection of drug hepatotoxicity in animals. Toxic injury of the liver part A. Ed. by Farber, M. and Fisher, M.M. Marcel Dekker I.N.C. pp. 469-486, 1979.

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

131. Pérez-Tamayo, R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 an adequate model of human cirrhosis? Hepatology 3:112, 1983.

132. Phelps, B.M. and Hu, C.H. Carbon tetrachloride poisoning. J. Amer. Med. Assoc. 92:1254-1256, 1924.

133. Plaa, G.L. Toxic responses of the liver. Toxicology Ed. by Cassarett and Doulls. McMilan Publishing Co., I.N.C., New York, 2nd. Edition pp. 206-231, 1980.

134. Plaa, G.L. and Hewitt, W.R. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In Principles and Methods of Toxicology. Edited by Wallace, A. p. 407-445. Raven Press, N.Y. 1982.

135. Platt, D. and Schnorr, B. Biochemische und

elektronenoptische untrsuchungen zur frage der beenflussakeit der a ethanol schadigung der rattenleber durch silymarin. Drug Res. 21, 1206, 1971.

136. Poyer, J.L., Floyd, R.A., McCay, P.B., Janzen, E.G. and Davis, E.R. Spin-trapping of the trichloromethyl radical produced during enzymic NADPH oxidation in the presence of CCl4 o BrCCl3 . Biochim. Biophys. Acta 539:402-409, 1978.

137. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de sustancias químicas. Parte I. Criterios de Salud Ambiental No. 6. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1980.

138. Pryor, W.A. Free radical pathology. Chem. Eng. News 49:34, 1971.

139. Pryor, W.A. and Stanley, J.P. A suggestted mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of poly-unsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. J. Org. Chem. 40:3616-3617, 1975.

140. Pryor, W.A., Stanley, J.P. and Blair, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like-endoperoxides. Lipids 11:370-378, 1976.

141. Pryor, W.A. In Free Radicals in Biology. Vol. VI. (Edited by Pryor, W.A.), p. 291. Academic Press, Inc. London, 1984.

142. Rakes, H.M. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. Progress in Liver Diseases

Popper, H. and Schaffner, F. (eds.). 5:83, 1976.

143. Rao, K.S. and Recknagel, R.O. Early incorporation of carbon-labeled carbon tetrachloride in to rat liver particulare lipids and proteins. Exp. Mol. Pathol. 10:219, 1969.

144. Rappaport, A.M. Anatomics considerations in Lion Shiff. Diseases of the liver. 3d. ed. pp. 1-49 I.B. Lippincott Company Phyladelphia, 1969.

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

146. Raven, H.M. and Schriewer, H. Die entihepatotoxische wirking von silymarin bei experimentellen le berschadigungen der ratte durch tetrachlorkohlenstoff, D-galaktosamin un allylalkonol. Drug Res. 21:1194, 1971.

147. Recknagel, R.O. and Lombardi, B. Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to a new hypothesis regarding the pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation. J. Biol. Chem. 236:564-569, 1961.

148. Recknagel, R.O. and Ghoshal, A.K. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest. 15:132, 1966.

149. Recknagel, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 19:145, 1967.

150. Recknagel, R.O. and Glende, E.A. In: Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage, CRC Critical Reviews Toxicol. 2:263, 1973.

151. Recknagel, R.O. and Glende, E.A. Jr. Lipid peroxidation: A specific form of cellular injury, in Lee, D.H.K., Falk, H.L. Murphy, S.D. and Geiger, S.R. Geiger (Eds.), Handbook of Physiology, Reactions to Environmental Agents, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, Md., p. 591, 1977.

152. Rees, K.R. and Sinha, K.P. Blood enzymes in liver injury. J. Pathol. Bacteriol. 80:297-307, 1960.

153. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum oxaloacetic and glutamic piruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28:56-63, 1957.

154. Reynolds, E.S., Thiers, R.E. and Vallee, B.L. Mitochondrial function and metal content in CCl4 poisoning. J. Biol. Chem. 237:3546, 1962.

155. Reynolds, E.S. and Ree, H.S. Liver parenchymal cell injury. VII Membrane denaturation following carbon tetrachloride. Lab. Invest. 25:269-278, 1971.

156. Reynolds, E.S. Comparison of early injury to liver endoplasmic reticulum by halomethanes, hexachloroethane, benzene, toluene, bromobenzene, ethionine, thioacetamide and dimethylnitrosamine. Biochem. Pharmacol. 21:2255, 1972.

157. Roberts, W.M. Blood phosphatase and the Van Den Bergh reaction in the differentiation of the several types of jaundice. Br. Med. J. 1:734-738, 1933.

158. Roberts, J.L. Jr. and Sawyer, D.T. Facile degradation by superoxide ion of CCl4, CH3Cl2 and p, p-DDT in aprotic media. J. Amer. Chem. Soc. 103:712-714, 1981.

159. Rodbell, M., Pohl, S.L. and Birnbaumer, L. The glucagon

sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. J. Biol. Chem. 246:1849, 1971.

160. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Regulation of collagen synthesis in liver cirrhosis. Inhibition of fibrogenesis in rats and human. In: Collagen metabolism in the liver. Edited by Popper, H. and Decker, K., 1975. pp. 129. Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, New York.

161. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Hepatic Fibrosis. Progress in Liver Diseases. 5:294-310, 1976.

162. Rojkind, M. and Dunn, M. Hepatic Fibrosis. Gastroenterology 75:1010-1015, 1978.

163. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Fibrosis and Cirrhosis. In: The Liver Annual I. pp. 126, Arias, I.M., Trenker, M. and Wilson, J.H.P. (eds.). Excerpta Médica. Amsterdam, Oxford-Princeton, 1981.

164. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Hepatic fibrosis. Clinics in Gastroenterology 10:737, 1981.

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

166. Rojkind, M. y Kershenobich, D. Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis en la cirrosis. Gastroenterología y Hepatología 5:37-51, 1982.

167. Rojkind, M. and Pérez-Tamayo, R. Liver Fibrosis. International Review of Connective Tissue Research. 10:333, 1983.

168. Rojkind, M., Mourelle, M. and Kershenobich, D.

Antiinflammatory and antifibrogenic activities of colchicine: treatment of liver cirrhosis. In: Myelofibrosis and the Biology of Connective Tissue (P.D. Berk, ed.) Alan R. Liss Inc., New York, 1984.

169. Rouiller, Ch. Experimental toxic injury of the liver. In The Liver. Vol. II (Ch. Rouiller, ed.), p. 335-476, Academic Press, New York, 1964.

170. Rouser, G.G., Nelson, J., Fleisher, S. and Simon, G. Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. In: Chapman, D. (Ed.), Biological Membrane, Academic Press, New York, p. 5, 1968.

171. Rubinstein, D. and Kanics, L. The conversion of CCl4 and CHCl3 to CO2 by rat liver homogenates. Can. J. Biochem. Physiol. 42:1577-1585, 1964.

172. Rufeger, U. and Frimmer, M. Inhibition by polyhalogenated hydrocarbons (PHHC) of ATPasas in plasma membranes of parenchymal liver cells. Arch. Pharmacol. 293:187, 1976.

173. Sandstrom, B. On the specificity of histochemically demostrable bile canalicular phosphate activities. Histochemic. 22:316, 1970.

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

175. Schnell, E., Schonharting, M. and Siebert, G. Metabolic transformation of colchicine. IV. On the interaction of colchicine and colchicein with sulphydryl compounds. Hoppe-

Seyler's Z., Physiol. Chem. 357-567, 1976.

176. Schovenstein, E. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: Chemical structure and biological activity of the products. J. Lipid Res. 8:417-428, 1967.

177. Seakins, A. and Robinson, D.S. The effect of administration of carbon tetrachloride on formation of plasma lipoproteins in the rat. Biochem. J. 86:401, 1963.

178. Seawright, A.A. The effect of prior dosing with phenobarbitone and -diethylaminaethyl dephenylpropyl acetato (SKF 525 A) on the toxicity and liver lesion caused by ngaine in the mouse. B. J. Exp. Pathol. 53:242, 1972.

179. Sela, B.A. and Sachs, L. Alkaline phosphatase activity and the regulation of growth in transformed mammalian cells. J. Cell Physiol. 83:17, 1974.

180. Shah, H., Hartman, S.P., and Weinhouse, S. Formation of carbonyl chloride in CCl4 metabolism by rat liver "in vitro". Cancer Res. 39:3942-3947, 1979.

181. Sipes, I.G., Krishna, G. and Gillette, J.R. Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of cytochrome P-450. Life Sci. 20:1541-1548, 1977.

182. Skou, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23:394-401, 1957.

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

184. Skou, J.C. The [Na+, K+]-ATPase: Coupling of the reaction with ATP to the reaction with Na+ and K+. Biochim. Biophys.

Acta 23:394, 1957.

185. Slatter, T.F. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. Nature (London) 209:36, 1966.

186. Slatter, T.F. and Eakins, M. Interactions of (+) cyanidanol -3 with free radical generating systems. New trends in the therapy of liver disease 84:91, 1975.

187. Smuckler, E.A., Ioeri, O.A. and Benditt, E.P. An intracelular defect in protein synthesis induced by CCl4. J. Exp. Med. 116:55-72, 1962.

188. Sonnenbichler, J. and Pohl, A. Untersuchungen zum wirkungsmechanismus von silybin IV. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361:1757-1761, 1980.

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

190. Stein, W.D., Lieb, W.R., Karlish, S.J.D. and Eilam, Y. A model for the active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:275-278, 1973.

191. Stoner, H.B. The mechanism of toxic necrosis. Br. J. Exp. Pathol. 37:176, 1956.

192. 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.

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

silybin on the hepatotoxic and hipoglycemic effects of praseodymium and other lanthanides. Drug Res. 30(10):1960-1964, 1980.

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

195. Tappel, A.L. and Zalkin, H. Lipid peroxidation in isolated mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 80:326, 1959.

196. Tappel, A.L. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitamins Hormones 20:493-510, 1962.

197. Tappel, A.L. Vitamin E and selenium as inhibitors in "in vivo" lipid peroxidation. In Lipids and their Oxidation, ed. by Schultz, H.W. p. 367-386. The A.V.I. Publishing Co., Westport, Conn., 1962.

198. Tsuboi, K.K. Enzyme alterations associated with mouse liver degeneration and regeneration after single carbon tetrachloride feeding. Cancer Res. 11:221, 1951.

199. 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.

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

201. Vainio, H., Parkki, M.G. and Marniemi, J. Effects of aliphatic chlorohydrocarbons on drug-metabolizing enzymes in

rat liver "in vivo". Xenobidtica 6(10):599-604, 1976.

202. Valenzuela, A., Lagos, C. and Schmidt, K. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. Biochem. Pharmacol. 34:2209-2212, 1985.

203. Vogel, G., Trost, W. and Braatz, K.P. Untersuchunger zu pharmakodynamik angriffspunkt und wirkungs mechanism von silymarin dem antihepatotoxischen prinzip aus silybum mar. Drug Res. 25:2, 1975.

204. Vogel, G. Protection by silibina against amanita palloides intoxication in beagles. Toxicology and Applied Pharmacology 73:355-362, 1984.

205. Von Oettingen, W.F. The halogenated hydrocarbons industrial and toxicological importance. Elsevier, New York, 1964.

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

207. Watchein, M. Enzymatic histochemistry of the liver. Gastroenterology 57:525, 1959.

208. Whitfield, J.B., Pounder, R.E., Neale, G. and Moss, D.W. Serum -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. Gut. 13:702-708, 1972.

209. Wills, E.D. and Wilkinson, A.E. Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. Biochem. J. 99:657, 1966.

210. Wills, F.D. Effects of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of the endoplasmic reticulum. Biochem. J. 123:983, 1971.

211. Wisher, M.N. and Evans, W.H. Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and characterization of plasma membrane subfractions from the blood sinusoidal, bile canalicular and continuous surfacces of the hepatocyte. Biochem. J. 146:375-388, 1975.

212. Wolf, C.R., Mansuy, D. and Nastainczy, K.W. The reduction of polyhalogenated methanes by liver microsomal cytochrome P-450. Molec. Pharmacol. 13:698-705, 1977.

213. Writschafter, Z.T. and Cronyn, M.W. Relative hepatotoxicity. Arch. Environ. Health 9:180, 1964.

214. Writschafter, Z.T. and Cronyn, M.W. Free radical mechanism for solvent toxicity. Arch. Environ. Health 9:186, 1964.

215. Wroblewski, F. The clinical significance of transaminase activities of serum. Am. J. Med. 27:911, 1959.

216. Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind, M. and Mourelle, M. Cryptic ATPase activities in plasma membranes of CCl4 cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. Lab. Invest. 53:541, 1985.

217. Younes, M., Albrecht, M. and Sieger, C.P. Interrelation between lipid peroxidation and lysosomal-enzyme release in the presence of carbon-tetrachloride, cumene hydroperoxide or thioacetamide. Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 40:121-132, 1983.

218. Ziegler, K. Further characterization of 3'-isoathiocyanatobenzamido [3H] cholate binding to hepatocytes. Correlation with bile acid transport inhibition and protection by substrates and inhibitors. Biochemica et Biophysica Acta 819:37-44, 1985.

219. Zimmerman, H.J. Clinical and laboratory manifestations of hepatotoxicity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104:954, 1963.

220. Zimmerman, H.,J., Kodera, Y. and West, M. Rate of increase in plasma level of citoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental CCl4 hepatotoxicity. J. Lab. Clin. Med. 66: 315-323, 1965.

221. Zimmerman, H.J. The spectrum of hepatotoxicity. Perspectives Biol. Med. 12:135, 1968.

222. Zimmerman, H.J. Hepatic injury caused by therapeutic agents. The liver normal and abnormal functions part A. Marcel Dekker I.N.C., New York, pp. 225-302, 1974.

223. Zimmerman, H.J. Hepatotoxicity, Appleton-Century-Crofts, p. 97-106, 200-210, New York, 1978.

224. Zleingen, G. Progress in Toxicology, Special Topics, Vol. 2. Springer-Verlag, p. 60, Berlin, 1976.

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