



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Estudio del ácido valproico en la cirrosis hepática inducida con
tioacetamida en la rata.**

Tesis que presenta:

L.C.F. KILLIAM YAYAKI GARCÍA GONZÁLEZ

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

México, D.F.

Diciembre, 2013

El presente estudio se realizó en el laboratorio 15 del departamento de Farmacología perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Para la realización del proyecto, se contó con beca CONACyT No.333647.

El protocolo tiene como número de registro: 269-05.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos, por las incontables situaciones en que me brindaron su ayuda, sin ellos, las cosas habrían sido un tanto caóticas.

A mis compañeros de generación y del laboratorio por las experiencias compartidas, los conocimientos adquiridos y el apoyo incondicional brindado.

A Dr. Pablo Muriel de la Torre, por haber confiado en mí para la realización del trabajo y sobre todo por los conocimientos adquiridos durante mi estancia en su laboratorio.

A C. Luis Ramón Hernández Guadarrama, Lic. en Enf. Rosa Elena Flores Beltrán y C. Benjamín Salinas Hernández por el apoyo técnico durante las determinaciones de variables, además de poseer el carisma necesario para que las cosas fluyeran adecuadamente en el laboratorio.

A C. Ma. Teresa García Camacho por su apoyo técnico en la determinación de variables del proyecto.

A Q.F.B. Silvia Galindo Gómez, auxiliar de investigación; por su asistencia en técnicas histológicas.

A los M.V.Z. Benjamín E. Chávez Álvarez, Rafael Leyva Muñoz y Ricardo Gaxiola Centeno por su asistencia técnica en el cuidado y manejo de los animales de bioterio.

*En especial, a mi prodigiosa y amada **familia**, así como a mis siempre laudables **amigos** de posgrado; quienes me permitieron extender la mirada a una realidad tan humana, tan científica, tan distinta al morbo que gran parte del tiempo nos asecha. Una realidad en la cual ciencia, humanismo y sociedad van de la mano; aquella en la que la meta a alcanzar es la felicidad, sin prejuicio y sin arrebatos; simplemente del modo más genuino y consciente con el afán perpetuo de aquello que nos hace: la intrepidez y el conocimiento.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
Introducción	1
ASPECTOS GENERALES DEL HÍGADO	1
ANATOMÍA MACROSCÓPICA	1
ANATOMÍA MICROSCÓPICA	2
Patogénesis de daño hepático crónico	4
Infiltrado inflamatorio	5
Daño por etanol	6
Cirrosis hepática	7
Alteraciones en el lobulillo	7
Células, moléculas y cascadas de señalización en el proceso fibrótico	7
Células involucradas en la fibrosis	8
Ácido valproico como potencial terapéutico de la cirrosis	10
Modelo daño hepático crónico con tioacetamida	13
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivos	17
Objetivo general	17
Objetivos particulares	17
Materiales y métodos	18
Materiales	18
Tratamiento de los animales	18
Modelo de reversión de daño hepático	18
Modelo de prevención de daño hepático	19
Determinaciones bioquímicas e histología	20
Determinación de la Alanino-aminotransferasa (ALT)	21
Determinación de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP)	21
Determinación de fosfatasa alcalina (FA)	22

Evaluación colorimétrica de glutatión reducido (GSH)	22
Determinación de proteínas	23
Determinación de la peroxidación lipídica	23
Determinación del contenido de glucógeno	24
Cuantificación de colágena	25
Actividad de catalasa (CAT)	26
Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	27
Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	28
Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)	28
Tinción tricrómica de Masson	29
Análisis estadístico	29
Resultados	31
Modelo de reversión	31
Alanino aminotransferasa (ALT)	31
Fosfatasa alcalina (FA)	32
Glucógeno	33
Peroxidación lipídica	33
Glutatión reducido (GSH)	34
Cuantificación de colágena	35
Modelo de prevención	36
Alanina aminotransferasa (ALT)	36
Fosfatasa alcalina (FA)	38
Glucógeno	38
Peroxidación lipídica	39
Glutatión reducido (GSH)	40
Colágena	41
Catalasa (CAT)	42
Glutatión peroxidasa (GPx)	43
Superóxido dismutasa (SOD)	43
Histologías	44
Discusión	48
Modelo de reversión	48

Modelo de prevención	49
Conclusiones	54
Perspectivas	55
Referencias	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Patogénesis de la fibrosis hepática	9
Figura 2: Modelo de reversión	19
Figura 3: Modelo de prevención	20
Figura 4: Actividad de ALT (Reversión)	31
Figura 5: Actividad de γ -GTP (Reversión)	32
Figura 6: Actividad de FA (Reversión)	32
Figura 7: Niveles de glucógeno (Reversión)	33
Figura 8: Peroxidación lipídica (Reversión)	34
Figura 9: GSH (Reversión)	35
Figura 10: Contenido de colágena (Reversión)	36
Figura 11: Actividad de ALT (Prevención)	37
Figura 12: Actividad de γ -GTP (Prevención)	37
Figura 13: Actividad de FA (Prevención)	38
Figura 14: Niveles de glucógeno (Prevención)	39
Figura 15: Peroxidación lipídica (Prevención)	40
Figura 16: GSH (Prevención)	41
Figura 17: Contenido de colágena (Prevención)	42
Figura 18: CAT	42
Figura 19: GPx	43
Figura 20: SOD	44
Figura 21: Arquitectura de hígados	45
Figura 22: Tinción con H&E	46
Figura 23: Tinción tricrómica	47

ABREVIATURAS

α -SMA	Alfa actina de músculo liso
Γ -GTP	Gamma-glutamyltranspeptidasa
ALT	Alanino-aminotransferasa
CAT	Catalasa
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CNS	Sistema nervioso central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
FA	Fosfatasa alcalina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HBV	Virus de la hepatitis tipo B
HCV	Virus de la hepatitis tipo C
HDAC	Desacetilasa de histonas
HDACI	Inhibidor de desacetilasas de histonas
HSC	Células estelares hepáticas
IL	Interleucina
MDA	Malondialdehído
NaB	Butirato de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MAPK	Proteínas cinasa activadas por mitógenos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
T β R	Receptor de TGF- β
TAA	Tioacetamida
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TNF	Factor de necrosis tumoral

TSA
VPA

Tricostatina
Ácido valproico

RESUMEN

Introducción: La cirrosis hepática es el estado avanzado de un proceso fibrótico crónico en el que las funciones del hígado son seriamente dañadas y cambia drásticamente la arquitectura del órgano. En dicho proceso, ocurre la estimulación continua de un agente etiológico sobre las células estelares hepáticas (SHC) en los espacios de Disse desencadenando una respuesta inflamatoria en la que intervienen además del sistema inmune, diversas citocinas como interleucinas, TNF- α y TGF- β . Este último es el principal responsable de activar vías de señalización dependientes de proteínas Smad dando como resultado una sobreproducción de colágena. Por su parte, el ácido valproico (VPA) es utilizado en la clínica para tratar la esquizofrenia y el trastorno bipolar. Sin embargo; dada su capacidad para inhibir a las desacetilasas de histonas (HDAC), ha mostrado ser eficaz en la resolución de la fibrosis *in vitro*, por lo que podría revertir y prevenir la cirrosis hepática *in vivo*. Debido al problema que representa la cirrosis hepática y la falta de cura de la enfermedad, es necesario estudiar al VPA en modelos de cirrosis en animales.

Objetivo: Evaluar el efecto del VPA en la reversión y prevención de la cirrosis hepática inducida con tioacetamida en la rata.

Métodos: Se utilizaron ratas Wistar machos de 120-150g de peso. Se abarcaron dos fases: reversión y prevención cuyo agente causal de daño fue la tioacetamida (200mg/kg/día i.p.) tres veces por semana y como agente de reversión o preventivo se empleó VPA (200mg/kg/día v.o.) cada 24 horas. Se realizaron pruebas de función hepática (ALT, FA, γ -GTP y glucógeno), estrés oxidativo: glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA), las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), así como la evaluación de la presencia de colágena (cuantificación de hidroxiprolina, tinción con H&E y tricrómica).

Resultados: El VPA fue capaz de revertir los niveles de MDA. Además, previno las elevaciones de los niveles de ALT, FA y de manera parcial, la disminución de los niveles basales de glucógeno, la acumulación de colágena y la disminución de la actividad de SOD. Por otro lado, los cortes histológicos muestran un arreglo similar entre el grupo de daño (TAA) y el experimental (TAA + VPA) y no se presentó una prevención importante en la acumulación de colágena.

Conclusión: El VPA no fue capaz de revertir la cirrosis hepática inducida con TAA, sino sólo previno el daño en algunos niveles de la función celular. No obstante, hacen falta estudios donde se usen dosis de VPA más altas así como ensayos de biología molecular como Western blot para constatar la eficacia del fármaco en este tipo de daño *in vivo*.

SUMMARY

Introduction: Hepatic cirrhosis is the complicated state of chronic fibrosis which liver functions are seriously damaged and a structural conformation is altered. In that process, an inflammatory response is given and the stellate hepatic cells (SHC), from Disse's space, are continuously stimulated by cytokines including interleukins, TNF- α γ TGF- β . The last one is the mainly responsible for activating Smad proteins-dependent signals transduction, which will lead to collagen overproduction. Meanwhile, valproic acid (VPA), actually used in clinical treatment of schizophrenia and bipolar disorder, has been shown to inhibit histone deacetylase (HDAC) and improving fibrosis of *in vitro* models. By this way VPA could resolve or prevent hepatic cirrhosis of *in vivo* models. As it is a big health problem and actually there is not treatment for the disease, it is necessary to study VPA in animals.

Objective: To evaluate the reversal and preventing effect of VPA in thioacetamide induced-hepatic cirrhosis in rats.

Methods: Wistar male rats initially weighing 120-150g were used. There were two experimental phases: reversion and prevention. Liver damage was caused with thioacetamide 200 mg/kg/day i.p.) three times a week while VPA was used 200mg/kg/day daily p.o. Hepatic liver tests were carried out (ALT, alkaline phosphatase, γ -GTP and glycogen), oxidative stress (GSH and MDA), antioxidant enzymes (CAT, GPx and SOD). Furthermore, collagen evaluation was made (hydroxyproline quantification), H&E and Masson's trichrome stainings).

Results: VPA reversed the MDA levels. Besides, it prevented ALT and FA elevation and partially prevented the fall of basal levels of glycogen as well as the accumulation of collagen and the decrease in SOD activity. However, histological slides show a similar architecture between damaged (TAA) and experimental (TAA + VPA) groups and no difference in collagen deposition.

Conclusion: there was no reversal effect by VPA in hepatic cirrhosis. It just prevented damage in some levels of cellular function. Nonetheless, it is necessary to study both, reversal and prevention, with a higher dose of VPA in the rats and Molecular Biology tests as well as Western blot as such it proves the drug efficacy of *in vivo* models.

Introducción

ASPECTOS GENERALES DEL HÍGADO

ANATOMÍA MACROSCÓPICA

El hígado es el órgano más grande del cuerpo después de la piel, con un peso que oscila entre 1200 y 1500g. Se conforma de dos lóbulos; el derecho es seis veces más grande que el izquierdo y están separados en la parte anterior por el ligamento falciforme. La irrigación sanguínea del órgano se da de dos maneras. La primera de ellas gracias a la vena portal, la cual conlleva sangre desde los intestinos y bazo, mientras que la arteria hepática supe de sangre oxigenada. Las dos vasculaturas entran al hígado a través de la cara inferior del lóbulo derecho ramificándose a lo largo de ambos lóbulos. Los ductos, tanto izquierdo como derecho, salen del hígado para unirse en el *porta hepatis* originando el ducto hepático común, con la posterior conjunción del ducto cístico de la vesícula biliar y forma así el ducto biliar¹.

Lóbulos hepáticos

El lóbulo derecho es de mayor tamaño que el izquierdo y se ubican en la cavidad abdominal. La pared ventral es convexa y lisa, mientras que la dorsal es cóncava con las huellas de los órganos que rodean al hígado.

La vesícula biliar es una pequeña bolsa con forma de pera de 9cm de largo con una capacidad de 50 mL. Se posiciona por atrás del colon transversal junto a duodeno. El fondo de la vesícula es más grande prolongándose en un cuello pequeño que continuará con el ducto cístico. La vesícula consiste de una lámina de tejido conectivo y muscular depositándose en ella la bilis y las sales biliares secretadas por el hígado¹.

El órgano presenta una estructura parenquimatosa y un estroma. El primero se conforma de células epiteliales y el segundo de tejido conjuntivo. Es penetrado por una red de vasos sanguíneos como la vena porta; responsable de conducir la sangre proveniente del bazo y del tracto gastrointestinal, la arteria hepática proveniente de la aorta abdominal transportando sangre oxigenada. La sangre, fluyendo por ambos vasos se mezcla para irrigar al órgano a través de los sinusoides hepáticos cuyo espacio entre éstos y los hepatocitos se denomina espacio de Disse, delimitado por células de distintos tipos. De forma más precisa, el parénquima hepático consta de una serie de hepatocitos de una célula de grosor formando placas en forma radial atravesadas por los sinusoides para desembocar en la vena central del lobulillo. Por cada dos

hepatocitos se conecta un canalículo biliar que portará la bilis en sentido contrario al torrente sanguíneo hacia los conductillos y conductos biliares de las tríadas portales para excretar el contenido en el duodeno¹⁻².

El tejido conectivo que funge como soporte del órgano se conforma de tres tipos de fibras de colágena: tipo I, en las tríadas portales, venas hepáticas así como cápsulas de Glisson; tipo III en las fibras reticulares y tipo IV, alrededor de los vasos y los conductos portales.

El hígado es una glándula que cumple funciones tanto exócrinas como endócrinas gracias a los hepatocitos. Esto es, produce la bilis y además regula, en presencia de la insulina, los niveles de glucosa sanguínea así como la síntesis de una gran variedad de proteínas como albúmina, fibrinógenos, globulinas, lipoproteínas, factores de coagulación y complemento que serán vertidos a la sangre. Adicionalmente, se encarga de metabolizar sustancias extrañas al organismo tales como tóxicos (drogas o insecticidas, como ejemplo) y compuestos endógenos entre los que se encuentran esteroides y hormonas².

Conductos hepáticos

Los canalículos biliares se unen en los conductos biliares de ambos lóbulos y de ahí al conducto hepático, el cual continúa con el conducto biliar o colédoco, que junto con el conducto pancreático converge en el conducto hepatopancreático para desembocar finalmente en el duodeno.

ANATOMÍA MICROSCÓPICA

Lobulillos hepáticos

A lo largo del parénquima hepático, se originan las estructuras en forma de prisma hexagonal irregular con una vena hepática central y en cada uno de los vértices con una triada portal (rama de la vena porta, una de la arteria hepática, un conductillo biliar, un vaso linfático y una rama del nervio vago). A tal estructura se le denomina *lobulillo hepático*, considerado la unidad funcional del hígado. La circulación sanguínea se da desde la rama de la vena porta y de la arteria hepática a través de los sinusoides y capilares para desembocar en la vena centrolobulillar, en contraste, la bilis circula hacia la periferia a los conductos de las triadas. El hígado tiene aproximadamente entre 50, 000 y 100, 000 lobulillos.

Hepatocitos

Son las células que conforman el hígado cuyo diámetro es de alrededor de $30\mu\text{m}$ y a pesar de tener forma poliédrica se pueden distinguir tres tipos de superficies. Una de ellas hace contacto con otros hepatocitos por medio de uniones intercelulares, el segundo tipo son las que delimitan los canalículos biliares y forman microvellosidades hacia la luz de éstos; se unen por desmosomas a modo de impedir la extravasación de bilis hacia los hepatocitos y el tercer tipo son las perisinusoidales, que dan lugar a un gran número de microvellosidades en la luz de los espacios de Disse, por lo que se localizan entre los hepatocitos y el endotelio sinusoidal. Los espacios de Disse filtran la linfa hacia los hepatocitos. Es en estas superficies donde se lleva a cabo el intercambio de metabolitos.

Los hepatocitos pueden distinguirse mediante la tinción de eosina-hematoxilina con núcleos cuyo aspecto es vesiculoso y que en personas mayores de 60 años pueden ser grandes y poliploides. En adolescentes se pueden encontrar núcleos vacuolados ricos en glucógeno, sin embargo; si esto llegase a suceder en adultos podría relacionarse con patologías tales como diabetes tipo 2, carcinoma de páncreas, insuficiencia cardíaca, etc.

Adicionalmente, este tipo celular tiene la capacidad de extraer los aniones orgánicos como bilirrubina y sulfobromoftaleína (SBP) que forman parte del complejo proteína plasmática-anión. Muchos de estos aniones unidos a proteínas tienen propiedades lipofílicas y podrían atravesar la membrana celular por simple disolución. No obstante; esto no ocurre como tal en condiciones fisiológicas sino se da a través de los transportadores de aniones orgánicos. Así, el hígado es capaz de extraer cerca del 50% de los ácidos biliares de la circulación atravesando los hepatocitos en un mecanismo de cotransporte Na^+ /ácido biliar³.

Sinusoides hepáticos

Los sinusoides consisten en una serie de vasos sanguíneos intralobulillares de calibre y trayecto irregulares cuya lámina basal es discontinua dando origen a fenestraciones, responsables del intercambio de nutrientes provenientes de la vena porta entre el espacio de Disse y los hepatocitos. Del mismo endotelio sinusoidal emergen las células de Kupffer, que son macrófagos fijos en forma estelar protruyendo hacia la luz de los sinusoides prolongándose hacia el espacio perisinusoidal a través de las fenestraciones y son los encargados de limpiar la sangre proveniente del tracto intestinal contaminada con bacterias y diversas sustancias. Junto a

éstas, las células estelares y las endoteliales interactúan por respuesta a citosinas y por transducción de señales con el parénquima hepático¹.

En el espacio perisinusoidal se producen fibras de colágena tipo III, que constituyen el soporte estructural del hígado. Aquí mismo, se encuentran las células estelares, también conocidas como células de Ito o lipocitos dada su capacidad para acumular grasa. Éstas pueden ser observadas con el método del cloruro de oro gracias a que la vitamina A contenida en su citoplasma reacciona positivamente y que junto con el núcleo emiten una coloración marrón. Otra manera de observar tales células es mediante la microscopía de fluorescencia puesto que la vitamina A es autofluorescente y generalmente se observa en forma de gotas pequeñas rodeando al núcleo en forma de cuentas de rosario¹.

El espacio intra y extrasinusoidal se conforma principalmente de colágena tipo IV, laminina, heparano, proteoglicano, fibronectina y sulfato de heparano y juntos pueden influenciar la función hepatocelular incluso afectándola, tal es el caso de la sobreproducción de dichas moléculas en el espacio de Disse resultando en un impedimento de la expresión de genes favorables para el buen funcionamiento del órgano o su regeneración. De modo particular, el daño por ingesta de alcohol, altera la microcirculación una vez dada la sobreproducción de matriz extracelular modificándose el endotelio sinusoidal así como las fenestraciones contribuyendo al aumento de la presión portal¹.

Sistema biliar

La bilis formada en los hepatocitos es vertida hacia los canalículos biliares y desemboca en el colédoco. Las células epiteliales de dichos conductos poseen una superficie con microvellosidades hacia su luz. Los canalículos se originan en las áreas centrolobulillares, se dirigen a la periferia para formar los conductillos biliares y continuar en los conductos biliares interlobulillares de las tríadas portales. Así, el sistema biliar lo conforman el canalículo biliar, ductos biliares intra y extrahepáticos, glándulas peribiliares, la vesícula biliar y la ámpula de Vater².

Patogénesis de daño hepático crónico

Una enfermedad hepática crónica se define por un daño al hígado persistente durante al menos seis meses y sus estados tardíos se clasifican de dos formas clinicoanatómicas: cirrosis e hipertensión portal no cirrótica. En ambos casos se ve seriamente afectado el balance

hemodinámico debido a la obstrucción de los vasos hepáticos. Esto significa que si ocurre una obstrucción de la vena hepática, el flujo de sangre hacia el exterior del órgano tenderá a acumularse y lo mismo sucede cuando se da la angiogénesis, lo cual provocará una congestión de las venas portales, paredes sinusoidales, parénquima y venas hepáticas con la consecuente atrofia sinusoidal o la extinción de los hepatocitos aunado a la hipertensión portal. Tales efectos darán lugar a septos fibrosos en el parénquima dada la destrucción celular. Sin embargo; en respuesta al estímulo nocivo, tenderá a darse la regeneración de hepatocitos, empero, mostrarán un acomodo tal que los septos serán deformados ocasionando que la arquitectura del hígado sufra un cambio drástico, ocasionando incluso nódulos regenerativos en su estructura rodeados de fibras de colágena¹.

En la enfermedad crónica necroinflamatoria, el daño tiende a ser portal y periportal y se acompaña de fibrosis hasta progresar a un estado cirrótico. Las zonas portales presentan linfocitos e incluso pueden presentarse lesiones en los ductos biliares. El parénquima presenta regiones focales necrosadas con infiltrados de neutrófilos y también puede haber macroesteatosis según la etiología del daño¹.

Infiltrado inflamatorio

El daño hepático puede surgir por diversos motivos. Sin embargo, siempre se da algún tipo de proceso inflamatorio dependiendo de la etiología, dado es el caso del infiltrado de polimorfonucleares relacionado con los conductos biliares (hepatitis colangioltica o colangitis ascendente), evento secundario a una obstrucción biliar intra o extrahepática. Si el infiltrado se da en el lobulillo puede deberse a la hepatitis alcohólica, sepsis por colestasis, infecciones virales, esteatohepatitis no alcohólica, etc.

Por su parte, si el infiltrado se conforma de eosinófilos, podrían ser indicio de hepatopatías tóxicas, parasitosis (esquistosomas), cirrosis biliar con granulomas y lesión de los conductos biliares, procesos inmunológicos o enfermedad de Hodgkin.

El infiltrado linfocitario en el espacio porta se presenta en una amplia gama de enfermedades como hepatitis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad de Wilson, obstrucción biliar y si se presentan folículos linfoides, se puede asociar a hepatitis crónica por virus C⁴.

Básicamente, el daño al hígado se da de dos formas: por apoptosis o por necrosis. Durante la apoptosis, se da la activación de endonucleasas y proteasas así como la generación

de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana sin una respuesta inflamatoria. El proceso inicia mediante los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia del TNF; por vía mitocondrial, en la cual los factores proapoptóticos contenidos en el espacio intermembranal como citocromo *c* o SMAC/DIABLO se liberan al citosol tras un incremento de la permeabilidad mitocondrial generando una cascada de señalización de apoptosis. En el caso del etanol, se generan ROS ocasionando el daño a los lípidos membranales, proteínas y al DNA. Además, la sobreexpresión de TNF- α también provoca el aumento de las moléculas oxidantes, las cuales favorecerán la permeabilidad de ambas membranas mitocondriales, conduciendo a una serie de eventos tanto apoptóticos como necróticos⁴.

En cuanto a la necrosis, no se requiere del uso de energía celular para dar lugar a la vacuolización citoplasmática y la hinchazón celular vaciándose el contenido citoplasmático y generando una reacción inflamatoria. Algunos factores que la generan son la isquemia, el estrés oxidativo y los xenobióticos. El sistema inmune innato también se activa tras alguna infección por virus de hepatitis, por esteatosis alcohólica, daño agudo por acetaminofén, alcoholismo crónico, etc. contribuyendo a la necrosis hepática células como las de Kupffer, las epiteliales, las estelares, los hepatocitos, entre otras que, en conjunto, liberarán diversas citocinas responsables de la progresión del daño al tejido^{1,4}.

Daño por etanol

Dado que los hepatocitos son el lugar del metabolismo primario del etanol, en un caso de alcoholismo crónico, el estrés oxidativo generado provocará daño a las células.

El etanol debe ser oxidado por el hígado, una vez llegue al sistema. Se cataboliza a acetaldehído en un 80-85% por la alcohol deshidrogenasa en el citosol. El resto del etanol es metabolizado por el sistema oxidante microsomal, el cual involucra la inducción del CYP450, específicamente el CYP2E1. Luego de ello, deberá degradarse a dióxido de carbono y agua o bien transformarse en otros compuestos a través del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo; los episodios de hepatotoxicidad en personas alcohólicas podrían deberse a la acumulación de triacilglicerol desencadenando hígado graso; a la generación de pro-oxidantes que rebasarán en concentración a los antioxidantes endógenos y con ello provocar peroxidación lipídica; el acetaldehído altera el plegamiento de proteínas; se liberan endotoxinas y citocinas activadoras de las células de Kupffer, que a su vez generarán la segregación de más compuestos como especies reactivas de oxígeno (ROS), interleucinas, Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), TGF-

β , entre otras. Todo ello activará a las células estelares hepáticas para sintetizar colágena y finalmente desencadenar el episodio de fibrosis⁴.

Cirrosis hepática

La cirrosis es un proceso difuso caracterizado básicamente por un proceso fibrogénico seguido de un cambio drástico en la arquitectura del hígado que se manifiesta por nódulos y un órgano notoriamente contraído debido a la α -SMA. La patología puede ser micronodular, si los nódulos son menores a 3mm de diámetro o macronodular, si la mayoría miden más de 3mm. Se da un evento veno-oclusivo, además de presentarse sinusoides dilatados fibrosos⁵.

Alteraciones en el lobulillo

En las patologías hepáticas generan una serie de cambios en la arquitectura del órgano entre las que se encuentran las siguientes¹:

- a) En el hepatocito pueden formarse cúmulos de grasa, evento denominado esteatosis, caracterizado también por la formación de vesículas vacías en el citoplasma de 5-6 μ m de diámetro y que desplazan al núcleo a la periferia (macrovesicular) o bien en la que se observan vesículas de menor tamaño sin provocar el desplazamiento del organelo (esteatosis microvesicular). Así, en la lesión causada por enfermedad hepática alcohólica se pueden observar vesículas pequeñas y grandes con distribución lobulillar azarosa.
- b) El aumento de glucógeno en el hepatocito hace que el citoplasma adquiera un tono claro, grande y de bordes bien definidos. De este modo, los cúmulos de este polisacárido se dan tras ocurrir alguna enfermedad como glucogenosis, adenomas y hepatocarcinomas celulares, consecuencia de la deficiencia de maltasa ácida lisosomal provocada a su vez por la misma patología.
- c) La acumulación de la bilis se puede observar mediante la tinción de H&E, adquiriendo una coloración verde, amarilla o naranja, localizándose generalmente alrededor del núcleo.

Células, moléculas y cascadas de señalización en el proceso fibrótico

Hasta este punto, se sabe que la cirrosis hepática se caracteriza por una estructura nodular del hígado y que representa el estado avanzado del daño crónico al órgano. Sin embargo, una de las manifestaciones dañinas más tempranas y que evolucionará a un evento cirrótico es la *fibrosis hepática*; entendida como una respuesta de cicatrización reversible en el hígado. Dicha proceso

se da en torno a un ciclo de daño-cura del tejido tras la estimulación continua de los agentes etiológicos, de modo que habrá una acumulación de matriz extracelular (ECM) o cicatriz en su intento por reparar las regiones dañadas. La fibrosis ocurre principalmente en las situaciones inflamatorias crónicas debidas al alcohol o virus de la hepatitis; sin embargo, puede darse la reversión gracias a las enzimas degradadoras de la ECM y sus inhibidores⁵⁻⁶.

En un hígado normal se encuentran colágenas de tipo I, III y XI; mientras que en uno fibrótico las concentraciones totales de la colágena son de 3-10 veces los valores normales y se sobreexpresan colágenas de tipo I, III, IV, V y VI, así como glicoproteínas, laminina, fibronectina, entre otras proteínas⁴⁻⁵.

El evento clave para el desarrollo de la fibrosis (Fig. 1) se da cuando los espacios de Disse tienden a ser capilarizados debido a la acumulación de la ECM, cuyo origen radica principalmente en las células estelares hepáticas (HSC) almacenadoras de vitamina A desde los espacios perisinusoidales que han sido transdiferenciadas a miofibroblastos⁷.

Células involucradas en la fibrosis

Células de Kupffer

Son activadas por una gran variedad de agentes incluyendo endotoxinas, radicales libres, sepsis, ácido araquidónico, factor de necrosis tumoral (TNF), lo cual da lugar a la producción de una variedad similar o mayor de moléculas responsables del daño al hígado tales como citocinas, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, interleucinas 1, 6 y 10, factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y prostanoïdes que solos o en combinación provocarán una disrupción de los mecanismos fisiológicos hepáticos⁸.

Células estelares y proceso fibrótico

En situaciones normales, son almacenadoras de retinoides y contienen actina y miosina provocando la contracción en respuesta a la endotelina-1 y la sustancia P. Sin embargo, tras darse el daño hepático, las células de Kupffer secretarán TGF- β y otras citocinas que activarán a las HSC causando la pérdida de la capacidad de portar retinoides, modificarán su fenotipo a miofibroblastos para sobreexpresar la α -actina de músculo liso (α -SMA), proliferarán y darán lugar a la sobreproducción de colágenas tipo I, III y IV así como laminina. Liberarán proteinasas y moléculas inhibitorias de proteinasas de matriz extracelular (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas, TIMP). A dicho evento se le denomina activación de las SHC (Fig. 1)^{1, 7}.

Una vez transdiferenciadas las HSC a miofibroblastos, la expresión de genes que codifican para proteínas de matriz extracelular aumentará, la degradación de ésta debido a la regulación negativa de las metaloproteasas (MMP) disminuye y además se regula positivamente la expresión de genes que codifican para inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), de tal forma que la acumulación de ECM se verá favorecida⁷. Así, luego de haberse secretado diferentes citocinas (TGF- β en particular) habrá una estimulación autócrina y parácrina de las HSC. Adicionalmente, se liberarán metaloproteasas que harán que se liberen factores profibrogénicos de los reservorios en ECM contribuyendo por tanto a la expansión de la señalización molecular para desencadenar el evento fibrótico⁹.

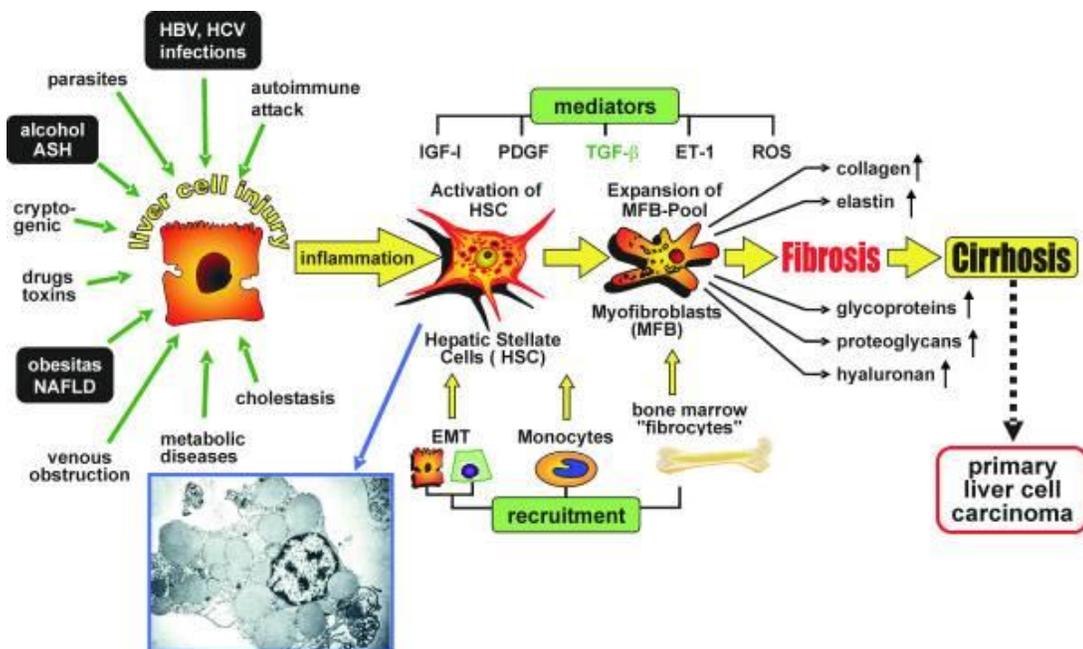


Fig. 1 Patogénesis de la fibrosis hepática. Diferentes agentes etiológicos dañarán al hepatocito provocando una respuesta inflamatoria, en la cual se liberarán diferentes mediadores, entre los que se encuentra el TGF- β , para inducir la transdiferenciación de las SHC a miofibroblastos. Consecuentemente, habrá una expansión de miofibroblastos, todos ellos generadores de las proteínas de ECM. Si el proceso es crónico puede convertirse en cirrosis e incluso en hepatocarcinoma primario. Tomado de Comparative Hepatology, 6:7, Gressner O, Weiskirchen R y Gressner AM, Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options (2007) (Disponible en línea).

La participación del TGF- β es crucial en la patogénesis fibrótica y una vez que se ha liberado de los reservorios de la ECM se unirá a su receptor heterodimérico T β RII, el cual se dimerizará con T β RI activándolo por transfosforilación. Ello controlará una vía río abajo en la que

intervendrán proteínas Smad 2/3 dimerizándose con Smad 4. Dicho complejo de Smad se translocará al núcleo para finalmente unirse y activar factores de transcripción de genes tales como colágena tipo I, α -SMA, TGF- β , TIMP-1 y TIMP2. No obstante, si bien este es el principal mecanismo por el cual el proceso fibrótico es exacerbado, otras cascadas de señalización pueden influir en la fibrogénesis^{8,10}.

Además de favorecer la acción de proteínas Smad, la actividad de serina-treonina cinasa del T β R es capaz de activar la cascada de señalización de las MAPK, empero; si bien falta evidencia de lo que sucede con esto, se sabe que la activación de las vías de Erk y JNK pueden fosforilar las proteínas Smad induciendo la expresión del ligando TGF- β ; lo cual significa que habría una amplificación de la respuesta. Por otro lado, los receptores de TGF- β pueden activar a GTPasas pequeñas como Rho -contribuyendo a la señalización por JNK-, Rac y Cdc42 que participan en la reorganización del citoesqueleto en el momento de la transdiferenciación¹¹.

Resolución de la fibrosis

Las HSC en su estado quiescente liberan una modesta cantidad de metaloproteinasas, de las cuales destaca la MMP-1 por participar en la degradación de la colágena tipo I, principal responsable de la fibrosis en el hígado. A medida que la colágena desaparece, los micronódulos muestran signos de coalición para formar macronódulos, señal de la reversibilidad del daño. Por otro lado, la producción de Smad-7 favorecerá la atenuación de la respuesta fibrogénica ya que es un represor de Smad-2/3. Por ende, en las células estelares que han sido activadas podría ser deseable su apoptosis mediante la inducción de Fas o de TNF, ambos factores para sufrir un evento mediado por caspasa 8 o bien provocar la sobreexpresión de Bax, bcl-2 y p53 para que la acción sea controlada por la caspasa-9¹². Algunas medidas farmacológicas que han estado desarrollándose se enfocan principalmente en el impedimento de la sobreproducción de la ECM o bien en aumentar su degradación mediante la inhibición de los TIMPs, en el silenciamiento del gen de colágena I, empleando moléculas antagonistas del TGF- β , entre otras herramientas⁸.

Ácido valproico como potencial terapéutico de la cirrosis

El ácido valproico es un fármaco empleado en el tratamiento de la esquizofrenia y el trastorno bipolar. Su estructura molecular es característica de un ácido graso de cadena corta (ácido 2-propilpentanoico) y a pesar de no tener esclarecido completamente su mecanismo de acción a nivel del sistema nervioso central (CNS), es capaz de aumentar las concentraciones de GABA,

bloquear los canales de Na⁺ e inhibir a neurotransmisores excitatorios. Su absorción, tras la administración por vía oral es rápida y prácticamente completa, se une fuertemente a proteínas plasmáticas y tiene una semivida alrededor de 12 horas y se metaboliza tanto por glucuronidación como por β -oxidación mitocondrial y ω -oxidación en citosol¹³.

El VPA, generalmente es bien tolerado en humanos. No obstante, algunos de los efectos adversos que ha presentado son somnolencia y confusión a dosis altas y entre los efectos más graves se encuentran la encefalopatía hiperamonémica, la pancreatitis hemorrágica así como la hepatotoxicidad inducida por VPA. Sin embargo, la incidencia de todos los casos es baja y se asocian a una mayor cronicidad del tratamiento. Debido a ello, se ha puesto en práctica la administración concomitante de L-carnitina como profiláctico de la hepatotoxicidad dada la descompensación en la lanzadera de carnitina durante el metabolismo de los ácidos grasos tras la acumulación de VPA¹⁴.

Ahora bien, es sabido que el VPA tiene propiedades teratogénicas. Phiel y cols. (2001) encontraron que los efectos teratogénicos radican en su unión con las desacetilasas de histonas (HDAC), lo cual repercutiría en la transcripción de ciertos genes dependiente de AP-1¹⁵. La acetilación del extremo N-terminal de las histonas es un evento clave para el desencadenamiento de la fibrosis. Tanto las acetiltransferasas de histonas (HAT) como las desacetilasas de histonas (HDAC) cumplen un papel relevante en el balance de los estados acetilado/desacetilado de tales proteínas, lo cual repercute en la patogénesis hepática. Sin embargo, las HAT también tienen la capacidad de acetilar proteínas no histónicas como factores de transcripción. Las HAT son las encargadas de insertar un grupo acetilo a las lisinas conduciendo a la desestabilización de la interacción entre el DNA y las histonas. Esto en consecuencia, permitirá la exposición de genes pudiéndose acoplar la maquinaria transcripcional para dar lugar a la expresión de genes correspondientes a proteínas que coadyuvarán a las resolución del daño hepático¹⁶.

Por su parte, las HDAC se encargan de hidrolizar los acetilos de las lisinas de una histona restaurando la carga positiva del aminoácido y se clasifican en diferentes grupos según su homología con las HDAC de levaduras: las de Clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8) se encuentran principalmente en el núcleo y están involucradas en la proliferación y supervivencia de células cancerígenas, las Clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) que participan en el cáncer de mama entre otros grupos cuya función se aleja de los objetivos del presente estudio. Adicionalmente, se ha

visto que las HDAC son esenciales en la generación y desarrollo de la fibrosis en órganos como pulmón y riñón¹⁶.

Dado lo anterior, ha surgido una serie de inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDACI) con el fin de hacer frente tanto a los procesos neoplásicos como a los fibróticos, éstos últimos entendidos como el enfoque del presente trabajo. Dichos agentes pueden regular la expresión génica así como el ciclo celular en las células cancerígenas y cuyo mecanismo de acción radica básicamente en su unión al sitio activo de la enzima, la cual posee un átomo de Zn^{2+} como cofactor resultando en la relajación de la heterocromatina así como en la diferenciación celular, tal es el caso del ácido valproico, el cual ha sido comparado (en cuanto a la inhibición de las HDAC se refiere) con sus análogos experimentales tricostatina (TSA) y butirato de sodio (NaB) probando su capacidad de inhibir a HDAC de las clases I y II^{16,17}. Entre los efectos finales que presentan los HDACI se encuentran la apoptosis, el detenimiento del ciclo celular en las células transformadas, la inhibición de angiogénesis, la muerte celular inducida por ROS, la diferenciación y migración celular¹⁸.

De manera particular, se han realizado estudios de expresión génica que demuestran que la ligadura del conducto biliar así como las HSC activadas con CCl_4 en medios de cultivo muestran un patrón idéntico en cuanto a la modulación positiva o negativa de genes como *Acta2*, encargado de codificar para la α -SMA¹⁹. Mannaerts y cols. (2010) evaluaron la activación de SHC en cultivos celulares así como también emplearon un modelo de fibrosis hepática crónica administrando 50 μ L de CCl_4 /100g de peso corporal durante semanas. Además, observaron los efectos con o sin VPA agregándolo al bebedero de las ratas a una concentración del 0.4% dos veces por semana iniciándolo dos días antes de comenzar a la administración de CCl_4 . Midieron las enzimas hepáticas, cuantificaron el mRNA de las células cultivadas, hicieron ensayos de proliferación celular, Western blot, entre otras mediciones. Los resultados de ese estudio fueron favorables dado que se observó que el VPA inhibió parcialmente la fibrosis inducida por CCl_4 ya que los depósitos de colágena así como la formación de septos fueron menores en las ratas con CCl_4 + VPA que en el grupo de CCl_4 . Adicionalmente, los genes *Acta2*, *TIMP-1*, entre otros fueron inhibidos a pesar de haber sido estimulados con TGF- β , lo cual contrasta con el trabajo de Young y cols. (2005) quienes no habían observado una disminución en la expresión de TIMP-1 luego de tratar a las SHC con concentraciones crecientes de VPA. En los cultivos celulares se observó que aquellas células tratadas con CCl_4 + VPA mostraban un retraso de aproximadamente 10 días en la expresión de α -SMA en comparación con el grupo de

daño, cuya presencia de la proteína indicadora de la transdiferenciación se presentaba al cuarto día. Para constatar que los efectos del VPA eran debidos a la inhibición de las HDAC, transfectaron a las SHC con genes de las HDAC I y II, resultando en la inhibición de la expresión de ambos tipos de desacetilasas luego de 4 días de exposición al fármaco. Sin embargo, no observaron un efecto considerable sobre los niveles de ALT y AST¹⁹⁻²⁰.

Previamente, Bülow y su equipo de trabajo (2007) habían encontrado que el VPA, así como sus dos análogos TSA y NaB inducían la acetilación de histonas en células estelares pancreáticas y la inhibición de colágena, medición realizada mediante la incorporación de [H³]-prolina. También, con la técnica de inmunofluorescencia observaron los depósitos de α -SMA, siendo el VPA el único agente de los tres capaz de inhibir la expresión de la proteína. Los niveles del gen de TGF- β también se vieron disminuidos en una forma dosis-dependiente después de incubar a las células estelares pancreáticas con VPA²¹.

Barter y cols. (2010) mostraron la capacidad del TGF- β de regular la expresión de aquellos genes que regulan a la matriz extracelular dependientes de ERK y PI3K, lo cual hacía que la inducción del daño tuviera vías adicionales en donde se reforzara la expresión de proteínas que favorecen la deposición de colágena. Por lo tanto, se dieron a la tarea de probar los HDACI, encontrando que el VPA era capaz de inhibir la expresión de ERK en cierto grado viéndose reflejado en la disminución de la expresión del gen *Timp-1*²².

Más recientemente, un estudio muestra en HSC el poder del VPA para atenuar la expresión de TGF- β y de α -SMA, así como de suprimir la fosforilación de las proteínas Smad2/3; lo anterior relacionado con una hiperacetilación de las histonas H3 y H4, efectos no vistos en células sin tratamiento con VPA²³.

Modelo de daño hepático crónico con tioacetamida

La tioacetamida es un hepatotóxico centrolubilular empleado en los modelos de daño hepático agudo y tóxico con una vida media corta. Es muy usado dado que posee una ventana amplia entre la necrosis celular y el fallo hepático, además de ser específico para el hígado así como regioespecífico en la zona perivenosa. Su bioactivación depende del CYP2E1 convirtiéndose en sulfóxido (TASO) y posteriormente a tioacetamida-S,S-dióxido (TASO₂) cuya vida media oscila entre 1 y 2 h luego de una administración de 200 mg/kg. La dosis letal es de 600 mg/kg y la restricción de dieta aumenta la hepatotoxicidad²⁴. Luego, la TAA disminuiría sus efectos si se tratasen células hepáticas con inhibidores del CYP2E1, de ahí la evidencia del metabolismo del

agente por parte del sistema microsomal. El efecto dañino de la TAA es característico, además de necrosis centrolobular debido a la elevación de las transaminasas y bilirrubina, fibrosis, cirrosis y apoptosis²⁵. A medida que las dosis de TAA se incrementan, se liberan más electrófilos provocando peroxidación lipídica, cuyo indicador principal, el MDA se ha encontrado incrementado considerablemente mientras que el índice GSH/GSSG disminuye^{26-26b}.

Justificación

La cirrosis hepática es la sexta causa de muerte en México en la población general y la tercera en hombres de 15 a 64 años²⁷. Según el Sistema Nacional de Información en Salud, hasta el año 2008, la cirrosis y otras enfermedades del hígado representaron el 5.8% del total de defunciones en México, el 7% se da en hombres y 3% en mujeres²⁸. La única forma de preservar la vida del paciente es mediante el trasplante de hígado, lo cual conlleva a problemas adicionales en la calidad de vida⁵. Sin embargo, las propiedades que ha mostrado el ácido valproico lo convierten en una potencial alternativa preventiva e incluso terapéutica para abordar la enfermedad a nivel clínico.

Hipótesis

El ácido valproico es capaz de revertir y prevenir la cirrosis hepática generada por la administración de tioacetamida en ratas.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto benéfico del ácido valproico en la cirrosis hepática inducida por tioacetamida en ratas.

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad del ácido valproico para revertir la cirrosis hepática experimental.
- Evaluar el efecto preventivo del ácido valproico en la cirrosis hepática crónica generada por la administración de tioacetamida en ratas.

Materiales y métodos

Materiales

Se utilizaron las siguientes sustancias en para el tratamiento de los animales:

Agente terapéutico: ácido valproico SIGMA-ALDRICH® Co.ST. Luis Mo, EUA.

Agente causal de daño hepático: Tioacetamida SIGMA-ALDRICH® Co.ST. Luis Mo, EUA.

Agente control y vehículo del agente terapéutico: agua Bonafont®

Vehículo del agente de daño: agua esterilizada

Tratamiento de los animales

Durante la experimentación se emplearon ratas Wistar macho con un peso corporal inicial de entre 120 y 150g, con una n=8 para la fase de reversión y una n=6 en la de prevención. Los animales tuvieron libre acceso a alimento (LABDIET®; PMI Nutrition International, EUA) y mantuvieron en ciclos de 12h día/oscuridad a una temperatura de 21±1°C y humedad al 50%. Las ratas fueron categorizadas en diferentes grupos según el modelo empleado, los hígados fueron extraídos cuando el animal había sido anestesiado con éter y la sangre fue colectada por punción cardíaca. Los animales se mantuvieron en resguardo en el bioterio de CINVESTAV, bajo las condiciones de cuidado establecidas en los lineamientos institucionales así como en la regulación oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que trata de las especificaciones técnicas, producción, cuidados y uso de animales de laboratorio.

Modelo de reversión de daño hepático

Las ratas fueron separadas en tres grupos y uno de ellos a su vez se subdividió en 3 categorías más. La duración de esta fase experimental fue de 12 semanas:

- Grupo 1 (control): Ratas a las que se les dejó únicamente con acceso a la comida y al agua *ad libitum* por 8 semanas.
- Grupo 2 (daño): Se trató a las ratas con tioacetamida (200 mg/kg/día i.p.) tres veces por semana durante 8 semanas para inducir cirrosis. Transcurrido este tiempo, se suspendió la administración de este agente y se formaron 3 subgrupos: el primero de ellos fue sacrificado para realizar las determinaciones correspondientes (control de daño); el segundo se dejó únicamente con acceso libre a comida y agua durante 4 semanas más para

evaluar la reversión espontánea y el tercer subgrupo fue tratado con VPA (200mg/kg/día v.o.) cada 24 horas durante 4 semanas adicionales para evaluar la reversión farmacológica.

- Grupo 3: Ratas a las que se administró VPA (200mg/kg/día v.o.) cada 24 horas durante 8 semanas a modo de constatar que el fármaco no influyera en el daño hepático (Fig.2).

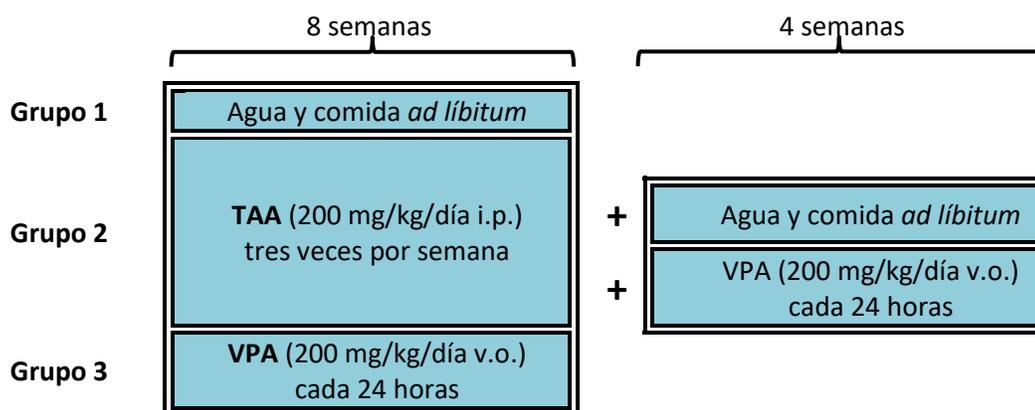


Fig. 2 Modelo de reversión. Las ratas de los grupos 1 y 3 así como del subgrupo 1 del grupo TAA fueron sacrificadas después de las 8 semanas, de tal forma que los subgrupos 2 y 3 del grupo TAA estuvieron bajo tratamiento por un total de 12 semanas. Todos los animales fueron sacrificados 48 horas después de la última administración del agente correspondiente.

Modelo de prevención de daño hepático

En este caso, las ratas fueron organizadas en 4 grupos a las cuales se les trató con el agente correspondiente durante 8 semanas para después ser sacrificadas y proceder a las determinaciones bioquímicas:

- Grupo 1 (Control): Ratas a las que se les dejó únicamente con acceso a comida y agua *ad libitum*.
- Grupo 2 (Daño): Se trató a las ratas con 200 mg/kg/día i.p. de tioacetamida tres veces por semana para inducir la cirrosis.
- Grupo 3 (Experimental): las ratas fueron tratadas concomitantemente con 200 mg/kg/día i.p. de tioacetamida tres veces por semana y 200mg/kg/día de VPA v.o. cada 24 horas.
- Grupo 4 (VPA): A las ratas les fueron administrados 200mg/kg/día de VPA cada 24 horas (Fig. 3).

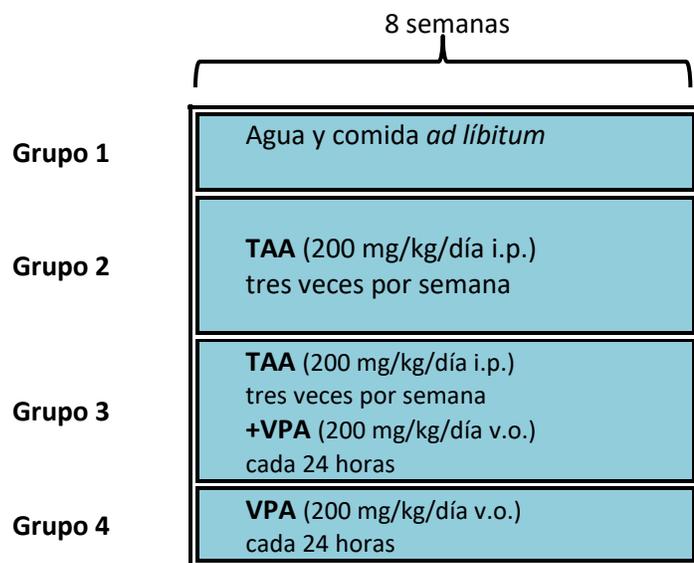


Fig. 3 Modelo de prevención. Los grupos fueron tratados según se indica durante ocho semanas. Todos los animales fueron sacrificados 48 horas después de la última administración del agente correspondiente.

Determinaciones bioquímicas e histología

Terminados los tratamientos correspondientes, los animales fueron sacrificados por punción cardíaca con ayuda de una jeringa heparinizada, previa anestesia con éter. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo el plasma, al cual se le hicieron las siguientes determinaciones:

ALT: como indicador de daño por necrosis hepática

FA y γ -GTP: indicadores de daño generado por obstrucción biliar

Por otro lado, se realizaron las siguientes determinaciones en hígado:

GSH: para predecir el daño por estrés oxidativo citosólico en el órgano

Malondialdehído (MDA): indicador de estrés oxidativo membranal

Glucógeno: indicador de la capacidad biosintética del hepatocito

Hidroxirolina: cuya cuantificación ayudó a predecir las concentraciones de colágena depositadas por cada gramo de tejido.

Enzimas antioxidantes: CAT, GPx y SOD

Tinción H&E: evaluación de la morfología y/o el daño en el tejido

Tinción tricrómica de Masson: evaluación de los depósitos de colágena

Determinación de la Alanino-aminotransferasa (ALT)

Se llevó a cabo por el método de Reitman y Frankl en el que se mide la absorbancia del complejo formado entre el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina²⁹.

Se prepararon los tubos blanco y los problema para cada muestra según la siguiente tabla.

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero Problema	---	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37°C durante 60 min.		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema.	0.050	---
6.- Incubar a 37°C durante 15 min.		
7.- NaOH 0.4 N.	2.5	2.5
8.- Lectura de los tubos a 515 nm.		

Determinación de la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP)

De las dos mezclas de reacción que describen los autores, se utilizó la actividad estimulada con glicil-glicina, con un volumen total de reacción de 1mL. En la reacción se mide la absorbancia de la p-nitroanilina que se forma cuando reacciona la γ -GTP con su sustrato γ -glutamyl-p-nitroanilida en presencia de glicilglicina, que es el aceptor del grupo γ -1-glutamyl³⁰.

En cada tubo se colocó:

- 400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
- 100 μ l de MgCl₂ 200 mM
- 100 μ l de Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200 μ l Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM.
- Se incubaron por 10 minutos a 37°C y se inició la reacción con 200 μ l de plasma.
- Se incubó a 37°C por 30 min y se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.
- Se leyó la absorbancia a 410 nm y se cuantificó la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- Se preparó un blanco sustituyendo los 200 μ l de plasma por agua.

- La reacción es lineal en el tiempo hasta la utilización de aproximadamente el 10% del sustrato (producción de aproximadamente 200 nmoles de p-nitroanilina en la mezcla de reacción).

Determinación de fosfatasa alcalina (FA)

Se empleó el método de Berger y Rudolph³¹:

- 0.25 mL de buffer de glicina 0.1 M y $MgCl_2$ 1mM, pH 10.5
- 0.25 mL de sustrato p-nitro fenilfosfato.
- Se colocó en baño maría a 37°C por 5 minutos.
- Se añadieron 50 μ l de la muestra y se mezcló suavemente.
- Se incubó 30 minutos a 37°C.
- La reacción se detuvo con 5 mL de NaOH 0.02 N y se agitó por inversión.
- Se leyó la absorbancia a 410 nm.

NOTA: El blanco fue idéntico pero colocando 50 μ l de agua en lugar de la muestra.

Preparación del sustrato: 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 mL de agua.

Evaluación colorimétrica de glutatión reducido (GSH)

La técnica fue realizada según el método de Ellman, en el cual se estima la presencia de grupos sulfhidrilo en una muestra³²:

Reactivos:

-Reactivo de Ellman (DTNB)

a) 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzónico (DTNB)

b) 100 mL de citrato de sodio al 1%

Se disolvió (a) en (b)

-Solución de fosfatos Na_2HPO_4 0.3M (disuelto en agua).

-Solución precipitante: EDTA 5mM en TCA 5%. Se disolvió el EDTA en el TCA.

- Se homogeneizaron 0.3 g de hígado
- Se centrifugaron por 20 minutos a 12,000 rpm (JA-21).
- Se tomó 0.1 mL del sobrenadante (por duplicado) + 2.1 mL de solución de fosfatos + 0.25 mL de reactivo Ellman.

- Se agitó y leyó la absorbancia a 412 nm.

Determinación de proteínas

Método de Bradford, en el que las proteínas se unirá al azul de coomassie³³.

Reactivos:

- Ácido Fosfórico al 85 % 100 mL
- Alcohol Etílico 50 mL
- Azul de Coomasie G-250 100 mg
- Aforar a un litro con agua.

- Se tomaron 100 µl del homogeneizado y se llevó a 1,000 µl con agua tridestilada (1:10).
- Se tomaron alícuotas para las proteínas y se llevaron a 100 µl con agua (20 µl de la dilución anterior + 80 µl de agua tridestilada) (2:100).
- El blanco se preparó con 100 µl de agua.
- Se añadieron 2.4 mL del reactivo de Bradford.
- Lectura de absorbancia a 595 nm.
- Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg/mL). Con alícuotas de 0, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µl y completando con agua a 100 µl.

Determinación de la peroxidación lipídica

Método del ácido tiobarbitúrico, el cual reaccionará con el MDA³⁴.

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM, pH=7.4
- Ácido tricloroacético (TCA) al 15%
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15%
- Se pesaron 0.5 g de hígado y homogeneizaron en 5mL de agua.
- Se tomaron 300 µl del homogeneizado al 10% y se agregaron 700 µl de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL
- Se incubaron a 37°C por 30 minutos.
- Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
- Se puso a ebullición por 45 minutos.
- Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y leyó el sobrenadante a 532 nm.

Cálculos: $C = \frac{A}{\xi l}$

Donde:

A= absorbancia de la muestra

L= longitud de la celda (0.75 cm para el Coleman 54) (1 cm para el Shimadzu UV 1203)

ξ = coeficiente de extinción del Malondialdehído (MDA)= $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

-Se hizo una dilución 1:10 del homogeneizado y se tomaron 20 μl para determinar proteínas.

-Los valores se expresaron como nmoles de MDA/mg proteína.

Determinación del contenido de glucógeno

Cuantificación según el método con antrona³⁵.

- Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se adicionaron 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon e hirvieron en baño de agua durante 30 minutos.
- Después de enfriar se pasó a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua y se agitó.
- Del matraz anterior se tomaron de 40 a 160 μl y se llevaron a 1 mL en tubos de 13x100 esmerilados por duplicado. Además, se preparó un tubo blanco con 1 mL de agua y otros 2 estándares con 20 μl de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se llevaron a 1 mL con agua.
- Se preparó solución de antrona 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Se añadieron 2 mL a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y se enfrió sobre hielo.
- Se cubrieron los tubos fríos y fueron puestos en baño de agua hirviendo por 15 min.
- Se enfriaron de inmediato sobre agua con hielo y se leyó a 620 nm.

CÁLCULOS:

$$\mu\text{g de glucógeno en la alícuota} = \frac{20 \times A(\text{mtra})}{1.11 \times A(\text{std})}$$

Donde:

A(mtra) = Absorbancia de la muestra

A(std) = Absorbancia del estándar

Los resultados se expresaron como los gramos de glucógeno por 100 g de hígado.

Cuantificación de colágena

Método de Rojkind y González para determinar la presencia de hidroxiprolina³⁶.

Reactivos:

Solución 1. Buffer de acetato de sodio - ácido cítrico, pH = 6.

Solución amortiguadora (Relación para un litro de buffer).

50 gr de ácido cítrico.

120 gr de acetato de sodio (3H₂O).

34 gr de hidróxido de sodio.

15 mL de ácido acético glacial.

Solución 2. Solución de cloramina T (Chloramine T). (Relación para 10 mL).

0.141 gr de cloramina - T se mezclaron con 2 mL de agua destilada, 3 mL de etilenglicol y 5mL de solución amortiguadora.

Solución 3. Reactivo de Ehrlich.

a) Se tomaron 27.4 mL de H₂SO₄ concentrado y se agregaron lentamente a 200 mL de alcohol absoluto en un vaso sobre hielo.

b) Se pesaron 120g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvieron en 200 mL de alcohol absoluto.

*La mezcla ácido-etanol (a) se agregó lentamente y con agitación a la solución (b) en hielo. Se agitó durante 15 minutos, se sacó del hielo y se continuó agitando hasta que se disolviera.

Solución 4. Solución de ninhidrina:

Pesar 2.50 g de ninhidrina, disolverlos en 60 mL de ácido acético glacial y 40 mL de ácido fosfórico 6 N.

1. Se pesaron 0.1 g de hígado previamente secado con papel filtro y se colocaron en una ampolleta.
2. Se agregaron 2 mL de HCl 6N y se sellaron con el mechero para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24 hrs.

3. Una vez hidrolizada la muestra, se rompió la ampolleta y se colocó nuevamente al horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24 hrs. o hasta que estuviera seco.
4. La muestra ya seca se resuspendió con 2 mL de solución amortiguadora (Sol. 1); se agitó vigorosamente en el vortex y se vació en un tubo de ensayo, se lavó la ampolleta con la adición de 1mL de la misma solución. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min.
5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita se depositó el sobrenadante, se agitó durante un minuto, se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, si se observó que el sobrenadante no quedara claro.
6. Se tomó 1 mL de este sobrenadante más 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T (Sol. 2). Se dejó reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente. Se preparó un blanco.
7. Transcurridos los 20 min, se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2g de NaCl. Se agitó inmediatamente para detener la reacción.
8. Se agregaron 6 mL de tolueno y se agitó 1 minuto.
9. Se extrajo la capa de tolueno y se desechó. La porción acuosa se cubrió y fue colocada en un baño hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfriaron 15 minutos. Ya fríos se les adicionó 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 min.
11. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 mL, se les agregó 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitaron fuertemente.
12. Se dejó reposar durante 30 minutos para que se llevara a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, se leyó a 560 nm.

Actividad de catalasa (CAT)

La medición de la actividad enzimática se basa en la descomposición de H₂O₂ empleando KMnO₄.

- Se preparó un homogeneizado de hígado al 10% con buffer de fosfato de potasio en frío (0.1M, pH 7.4). En seguida se agregaron 5 mL de H₂O₂ a alícuotas de 0.5 mL del homogeneizado y se dejó reaccionar tres minutos³⁷.
- La reacción fue detenida con 1 mL de H₂SO₄ 6N.
- Se agregó un exceso de KMnO₄, el cual reacciona con el H₂O₂. De esta forma la absorbancia del KMnO₄ residual se midió a 480nm.

- Se calculó la actividad como la constante de velocidad de reacción de primer orden de la descomposición del H₂O₂ $k = \frac{S_0/S_3}{2.3t}$

Donde:

K= cte. de velocidad de reacción

S₀= (Abs de estándar – Abs de blanco) → Absorbancia del sustrato al tiempo 0

S₃= (Abs de estándar – Abs de muestra)→ Absorbancia del sustrato luego de 3 minutos de reacción (t).

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Se fundamenta en la inhibición del 50% de la generación de radicales superóxido por parte de la xantina oxidasa cuando se hace reaccionar con nitroazul de tetrazolio (NBT)³⁸.

- Se preparó una mezcla de reactivos conteniendo los siguientes agentes por cada litro:
Xantina 0.1 mmol, ETAPAC 1 mmol, albúmina bovina sérica 50 mg, NBT 250 μmol, BCS 250 μmol, carbonato de sodio, pH=10.2 40 mmol.
- Se preparó un homogeneizado al 10% de hígado en buffer de fosfatos 50mM en frío. Se filtró y centrifugó a 3000 rpm durante 3 min.
- Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante y se agregaron 1.5 mL de agua destilada más 0.8 mL de la mezcla 3:5 cloroformo-etanol y se mezcló.
- La mezcla resultante se centrifugó durante 30 min a 3000 rpm (se obtuvo un segundo sobrenadante).
- Se mezclaron 2.45 mL del reactivo de trabajo más 0.5 mL del sobrenadante dos, más 50μL de xantina oxidasa (20 U/mL) a intervalos de 20 segundos.
- La mezcla se incubó durante 20 min a 25°C
- Se detuvo la reacción adicionando 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM a cada tubo por espacio de 20 segundos y se leyó la absorbancias a 560nm.
- La actividad se calculó según la actividad enzimática:

Actividad= Unidades totales/mg de proteína

Unidades totales= Unidades*mL de homogeneizado/mL alícuota

Unidades= % inhibición/-50

% inhibición= Abs blanco blanco – Abs muestra/Abs blanco blanco * 100

Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

Se siguió el método de Lawrence y Burk para determinar la actividad de GPx con hidroperóxido de cumeno como sustrato³⁹.

- Se obtuvieron 1.5mL de homogeneizado de hígado al 10% con buffer de fosfato de potasio (75mM, pH 7), se filtraron a través de una gasa y se centrifugó a 900g durante 5 min a 4°C. Dicho homogeneizado contenía 200µL del sobrenadante, 2 mL de buffer, 50 µL de glutatión (60mM), 0.1 mL de 30 U/mL-1 de glutatión reductasa, 0.1 mL de EDTA 15 mM, 0.1 mL de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 3mM y 0.3 mL de agua.
- Se inició la reacción adicionando 0.1 mL de hidroperóxido de cumeno 35mM.
- La actividad se registró a 340 nm y se refirió a la oxidación del NADPH. Esto fue durante 4 min.
- Se calculó la actividad enzimática como nmol de NADPH oxidado*min⁻¹*mg⁻¹ de proteína empleando el coeficiente de extinción de 6.22x10⁶M⁻¹cm⁻¹.

Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

Los cortes de hígado se fijaron con formol al 10% en PBS al menos durante 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y fueron embebidos en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de grosor para luego cubrirlas con silano y se realizó lo siguiente:

- Las rebanadas fueron desparafinadas y rehidratadas con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- Se aplicó hematoxilina durante 15 min.
- Se enjuagaron en agua corriente por dos minutos.
- Los cortes se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones, de tal forma que los núcleos pudieran distinguirse y el fondo fuera muy tenue o prácticamente incoloro.
- Se lavaron con agua corriente nuevamente y luego sumergidos en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones se tornaran a azul brillante.
- Se lavaron con agua corriente de 10 a 20 min y luego se tiñeron con eosina durante 15 a 20 min dependiendo del grado de contraste deseado (contratinción).
- Los cortes se lavaron con alcohol al 95% y luego con alcohol absoluto, al menos dos cambios.

- Se lavaron con xileno, dos cambios, y se montaron en el polímero de permount o bálsamo.

Tinción tricrómica de Masson

Con esta técnica se buscó teñir las bandas de colágena en color azul, el núcleo en negro y el citoplasma en rojo⁴⁰.

- Los cortes de hígados se depositaron en formaldehído al 10% como fijador y se dejaron al menos 24 h. Se lavaron con agua corriente, deshidratados con alcoholes y embebidos en parafina. Los cortes fueron de 6-7 micras de grosor y se cubrieron con silano:
- Las rebanadas fueron desparafinadas y rehidratadas con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%. Se enjuagó con agua destilada.
- Se sumergieron en el fijador de Bouin durante una hora a 56°C o bien toda la noche a temperatura ambiente.
- Fueron enfriados y lavados con agua corriente hasta que desapareciera la tonalidad amarilla. Se enjuagó con agua destilada.
- Se colocaron en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 min y enjuagados con agua corriente y después con agua destilada.
- Se sumergieron los cortes en solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich durante 15 min y se recuperó la solución.
- Se enjuagaron con agua destilada nuevamente.
- Los cortes se llevaron a la solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungstínico durante 10 a 15 min antes de la solución de anilina azul y en ácido fosfotungstínico acuoso al 5% por 15 min antes de contrastarlo con el color verde claro.
- Se colocaron en solución de anilina azul durante 10 a 15 min o con la solución verde claro durante un minuto. Se recuperó la solución.
- Se enjuagó con agua destilada, luego con agua acética al 1% durante 3-5 min y se desechó la solución.
- Se lavó con etanol al 95% y después con alcohol absoluto.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se obtuvo la desviación estándar para cada variable de medición.

Se realizó el análisis de varianza de una sola vía para cada grupo experimental (ANOVA de una vía) seguido de una prueba de Tukey considerándose que hubo una diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

Resultados

Modelo de reversión

Alanino aminotransferasa (ALT)

Como se puede observar en la figura 4, los niveles de ALT después de 8 semanas de la inducción del daño se elevan considerablemente, lo cual indica la necrosis hepatocelular. Sin embargo; cuando se discontinuó la administración de tioacetamida y se dejó a las ratas únicamente con acceso a la comida y al agua *ad libitum* por cuatro semanas más, los niveles enzimáticos regresaron a los basales, lo cual impidió observar con claridad el efecto del fármaco en la reversión de la cirrosis.

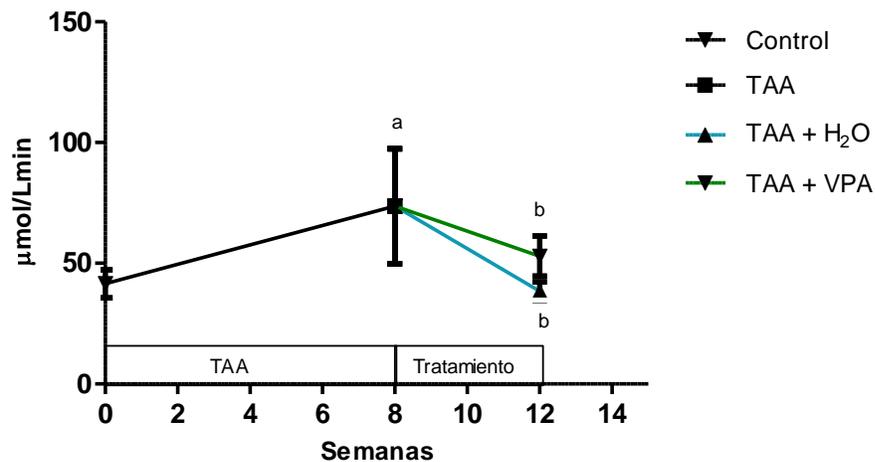


Fig. 4 Actividad de ALT. La actividad de la enzima en los grupos control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

γ -Glutamyl transpeptidasa

La actividad de esta enzima se vio marcadamente elevada luego de la administración de TAA por 8 semanas, indicio de daño hepático por obstrucción biliar. Empero, luego de 4 semanas adicionales en las que se administró el tratamiento con VPA a las ratas, no se logró observar un efecto de reversión *per se* puesto que el grupo al que se le dejó únicamente con libre acceso a agua y comida mostró también el mismo grado de reversión; $p \leq 0.05$ (Fig. 5).

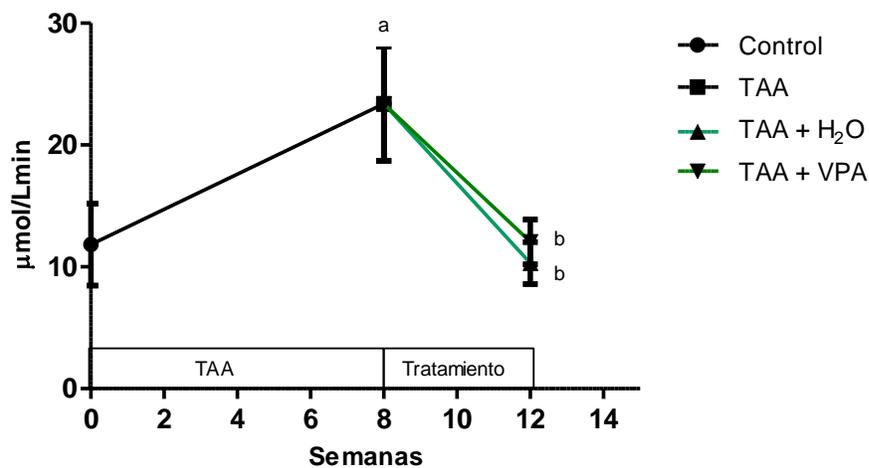


Fig. 5 Actividad de γ -GTP. La actividad enzimática en los grupos control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Fosfatasa alcalina (FA)

La actividad de la fosfatasa alcalina se observa en la figura 6. Los valores se incrementaron luego de las ocho semanas de tratamiento, cuyos niveles regresaron a la normalidad tanto en el subgrupo experimental (TAA + VPA) como en el de control de la regeneración espontánea (TAA + H₂O); $p \leq 0.05$, esto es, no hubo una diferencia estadísticamente significativa por lo cual, no es posible la visualización del efecto de reversión del HDACI.

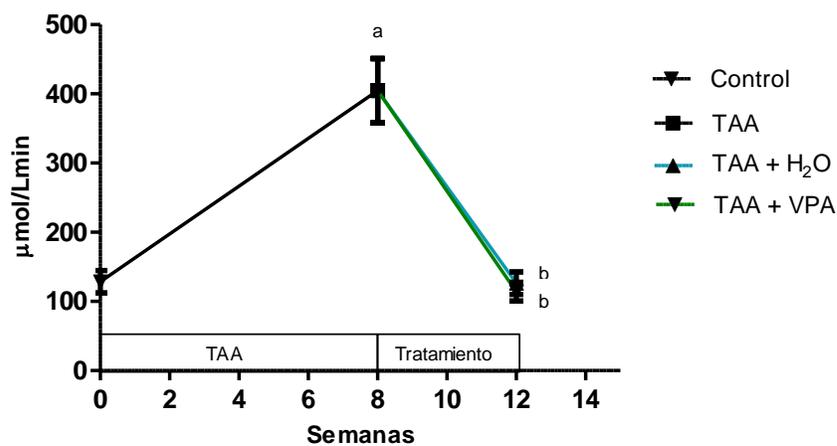


Fig. 6 Actividad de FA. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Glucógeno

Los niveles de glucógeno en el grupo control disminuyeron considerablemente tras la inducción del daño hepático durante 8 semanas; $p \leq 0.05$. Luego de suspender la administración del tóxico, se inició el tratamiento con VPA en el subgrupo experimental durante 4 semanas más, observándose que ocurre una reversión parcial, cuyo efecto fue similar al grupo de TAA + H₂O; $p \leq 0.05$. Dado que no hubo diferencia significativa entre ambos grupos, no fue posible observar la reversión *per se* del fármaco (Fig. 7).

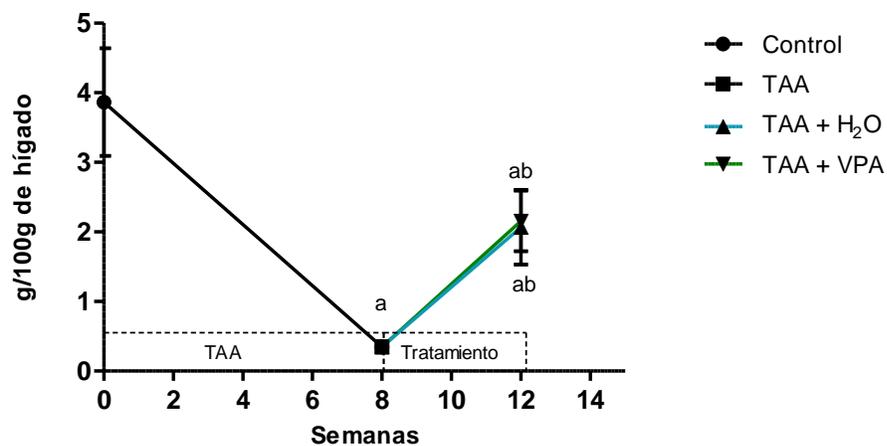


Fig. 7 Niveles de glucógeno. El contenido de glucógeno en los grupos Control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica hepática, cuantificada a partir de los niveles de MDA, fue significativamente diferente con respecto al grupo control luego de 8 semanas de haber administrado TAA; $p \leq 0.05$. Por su parte, luego de 4 semanas adicionales de tratamiento con VPA hubo una reversión total del daño a este nivel. Los niveles del grupo experimental fueron

significativamente diferentes a los del grupo de daño y de reversión espontánea, $p \leq 0.05$. Incluso, pueden observarse los niveles de MDA por debajo de los basales (Fig.8).

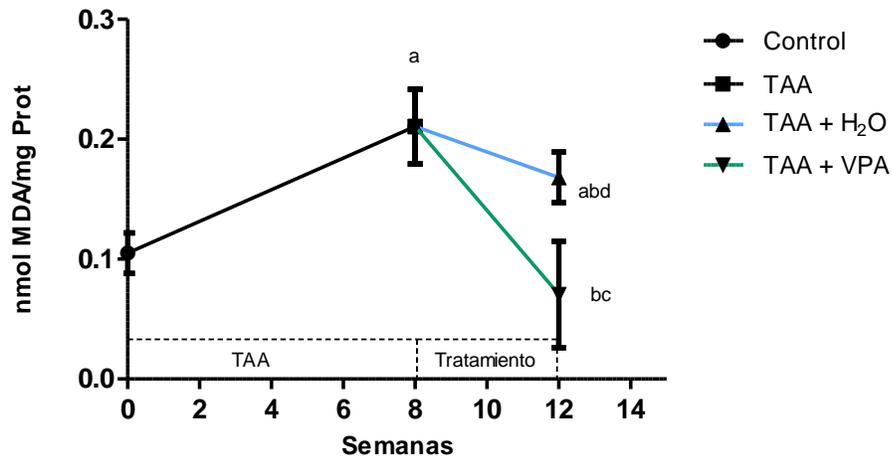


Fig. 8 Peroxidación lipídica. Los niveles de MDA en los grupos Control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo de regeneración espontánea (TAA+H₂O); d, diferencia significativa respecto al grupo experimental (TAA + VPA).

Glutati3n reducido (GSH)

Las concentraciones de GSH en el h3gado aumentaron de forma significativa con respecto al control luego de tratar a las ratas con TAA por 8 semanas. Dichas concentraciones tendieron a disminuir en el grupo experimental (TAA + VPA). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos experimental y de da3o, mientras que la regeneraci3n espont3nea permiti3 que los niveles de GSH disminuyeran casi a los niveles basales; no obstante, se observa una diferencia significativa entre este grupo y los dem3s (Fig.9).

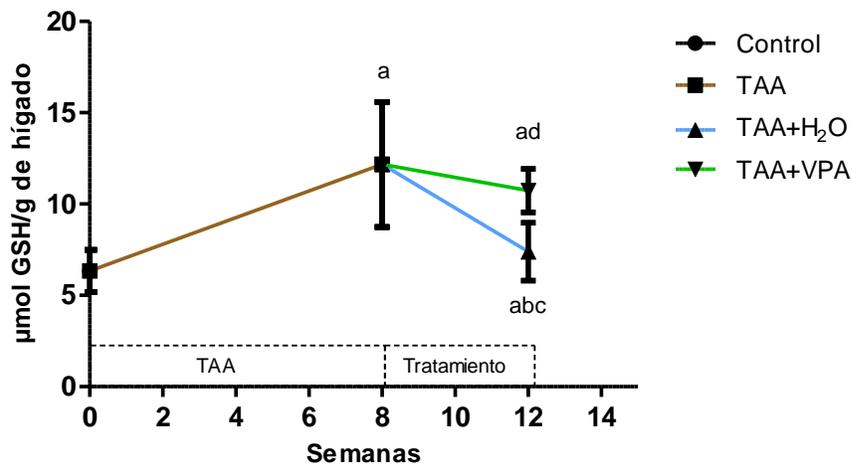


Fig. 9 GSH. Los niveles de GSH en los grupos Control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestran como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental (TAA + VPA), $p \leq 0.05$; d, diferencia significativa respecto al grupo de regeneración espontánea (TAA + H₂O), $p \leq 0.05$.

Cuantificación de colágena

El contenido de colágena fue notoriamente aumentado respecto a las condiciones basales después de administrar TAA por 8 semanas; $p \leq 0.05$. El grupo de la regeneración espontánea (TAA + H₂O) mostró una reversión parcial de forma similar al grupo experimental (TAA + VPA); $p \leq 0.05$. Por lo cual, no fue posible visualizar el efecto de reversión del VPA puesto que los valores en la concentración de colágena no mostraron diferencia estadísticamente significativa (Fig.10).

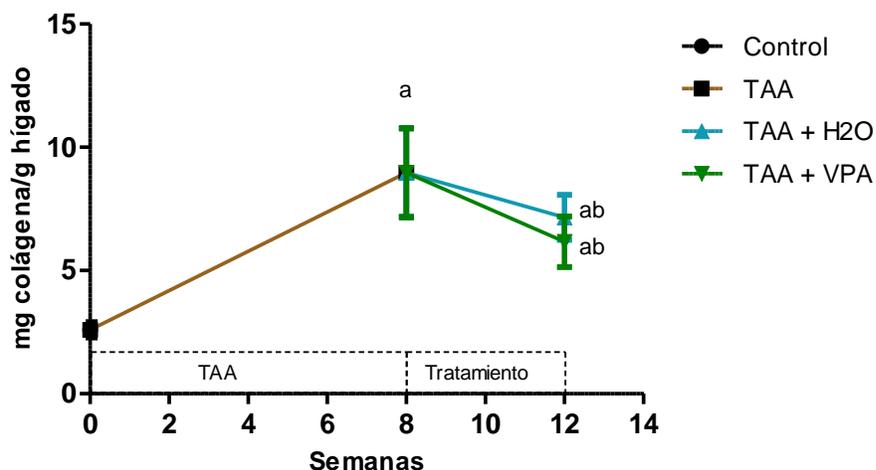


Fig. 10 Contenido de colágena. La cantidad de colágena en los grupos Control, TAA, TAA + H₂O y TAA + VPA se muestra como el promedio de 8 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Modelo de prevención

Alanina aminotransferasa (ALT)

La figura 11 muestra el comportamiento de ALT según el tratamiento dado a las ratas. Se observa que el grupo de daño presentó un aumento en la actividad de la enzima con respecto al grupo control; $p \leq 0.05$. Por su parte, el VPA fue capaz de prevenir totalmente el aumento de la enzima cuando se administró conjuntamente con TAA, ya que los niveles se mantuvieron en las condiciones basales, $p \leq 0.05$. El VPA por sí solo no influye en los cambios de niveles enzimáticos, pues no mostró diferencia significativa respecto al grupo control y al experimental.

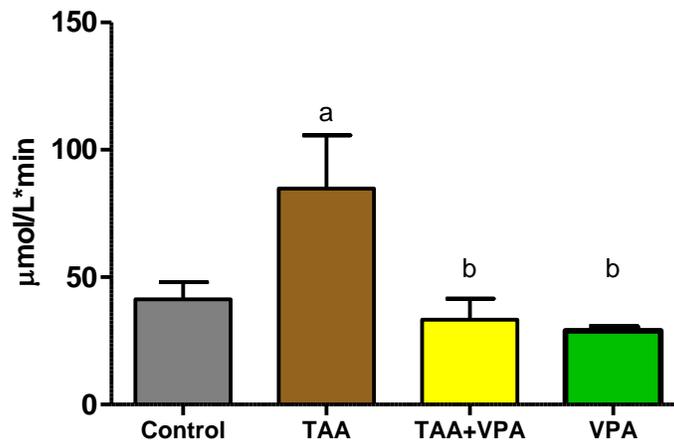


Fig. 11 Actividad de ALT. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

γ -Glutamyl transpeptidasa (γ -GTP)

Los niveles de γ -GTP aumentaron de forma significativa cuando las ratas fueron tratadas durante 8 semanas con TAA, respecto al grupo control. Por su parte, el tratamiento conjunto con TAA y VPA no mostró un efecto de reversión en los niveles enzimáticos, ya que no hay una diferencia significativa entre el grupo de daño (TAA) y el experimental (TAA + VPA). De modo particular, el VPA no influyó en la actividad de la enzima (Fig. 12).

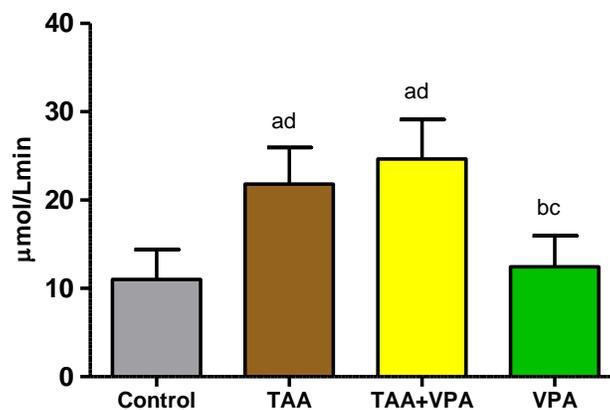


Fig. 12 Actividad de γ -GTP. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental con administración concomitante de TAA y VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$.

Fosfatasa alcalina (FA)

En la figura 13 se muestra que los niveles de la FA se incrementaron luego de la administración de TAA durante 8 semanas con respecto al grupo control. Además, el VPA fue capaz de mantener la actividad enzimática en los niveles basales cuando se administró junto con la TAA durante el mismo período, esto fue estadísticamente significativo. El grupo tratado únicamente con VPA muestra que dicho fármaco no influye en los niveles basales de la enzima.

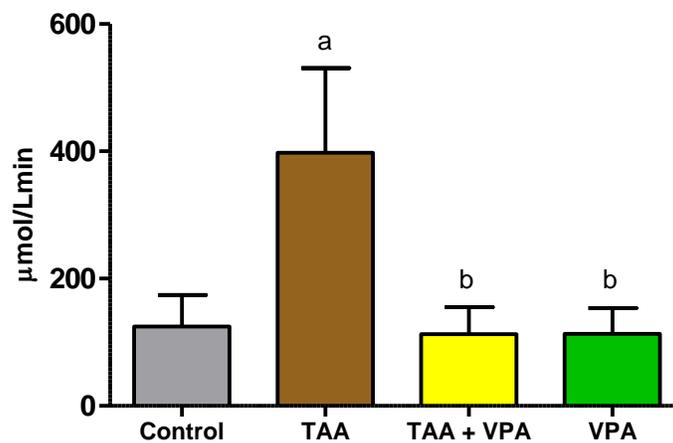


Fig. 13 Actividad de FA. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Glucógeno

Las concentraciones de glucógeno fueron casi nulas en el grupo de daño después de 8 semanas de administrarles TAA. Sin embargo; la administración junto con VPA previene de manera parcial

el contenido de glucógeno. Por su parte, el VPA tuvo la capacidad para inducir la biosíntesis de la macromolécula pues los niveles fueron superiores a los basales (Fig. 14).

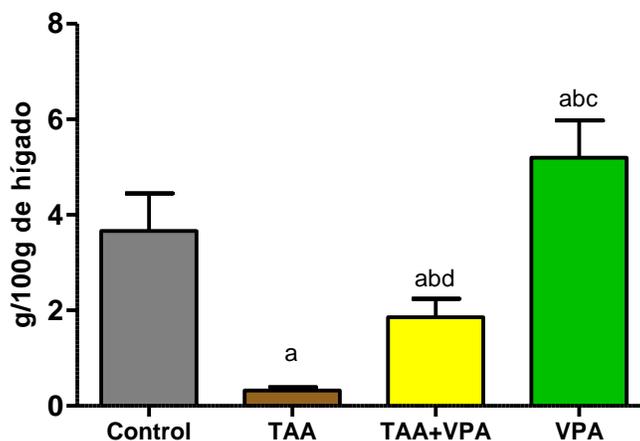


Fig.14 Niveles de glucógeno El contenido de glucógeno en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D..

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental con administración concomitante de TAA y VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$; d, diferencia significativa respecto al grupo tratado con VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$.

Peroxidación lipídica

La actividad del MDA en el grupo de TAA (daño) mostró un aumento significativamente diferente a la del grupo control después de administrar el tóxico durante 8 semanas. La administración conjunta de TAA y VPA mostró un efecto totalmente preventivo, ya que la diferencia en los niveles de MDA entre el grupo control y el experimental es estadísticamente diferente. Además, se observó que el ácido valproico *per se* presenta propiedades antioxidantes dada ya que la peroxidación lipídica en este grupo fue menor a la del control con una diferencia significativa entre ambos grupos (Fig. 15).

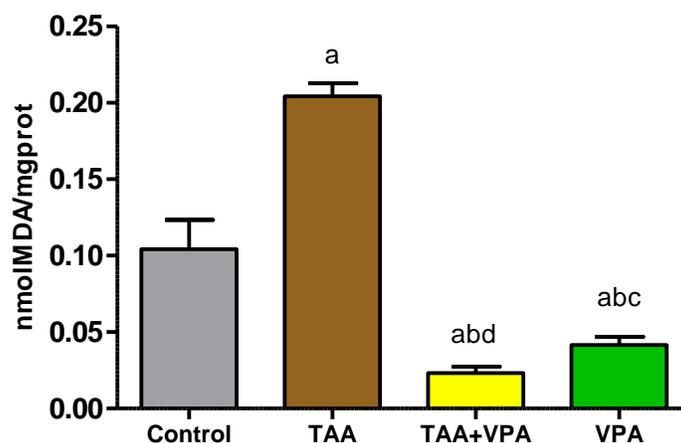


Fig.15 Peroxidación lipídica. El contenido del MDA en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental con administración concomitante de TAA y VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$; d, diferencia significativa respecto al grupo tratado con VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$.

Glutación reducido (GSH)

Los niveles de GSH aumentaron considerablemente tras inducir la cirrosis con TAA según se aprecia en la figura 16. Si bien, los valores del grupo experimental (TAA + VPA) tienden a la baja, no hubo una diferencia significativa con el grupo de daño (TAA). El grupo de VPA no mostró diferencia significativa con respecto al grupo control.

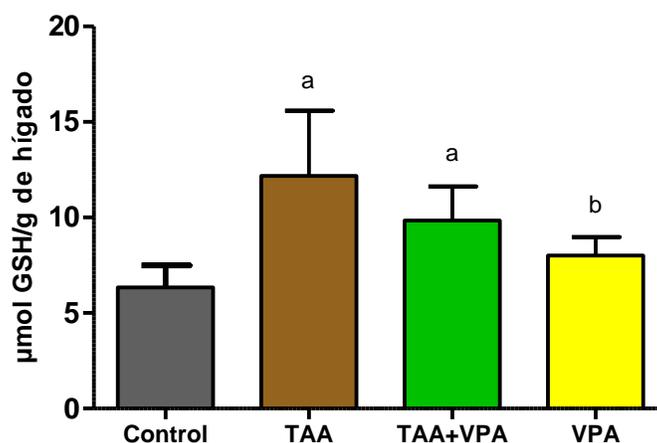


Fig.16 GSH. La estimación del GSH en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$.

Colágena

El contenido de colágena aumentó de forma notoria y estadísticamente significativa con respecto al grupo control cuando las ratas fueron tratadas con TAA durante 8 semanas. Además, se pudo observar que el VPA previno de forma parcial la acumulación de esta proteína cuando se administró concomitantemente con la TAA durante 8 semanas con una diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA). El VPA no influye en los niveles de colágena en hígado, puesto que no mostró diferencia con el grupo control (Fig.17).

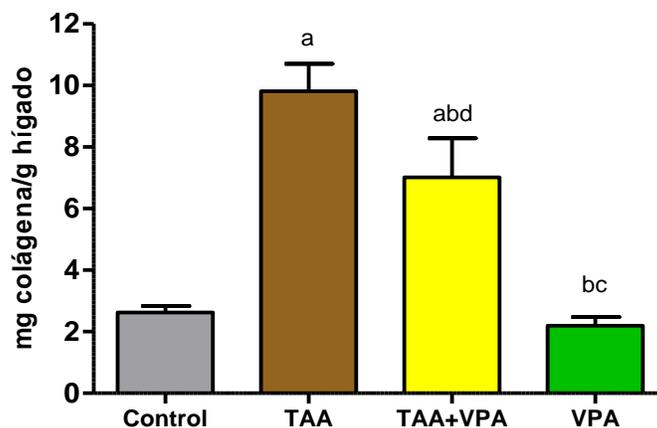


Fig.17 Contenido de colágena. El contenido de colágena en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental con administración concomitante de TAA y VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$; d, diferencia significativa respecto al grupo tratado con VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$.

Catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa del grupo control tuvo una alta variabilidad. Por su parte, los grupos de TAA, TAA + VPA y VPA no mostraron diferencia significativa entre ellos. No obstante, se observa una tendencia hacia el aumento de actividad en el grupo tratado con VPA (Fig.18).

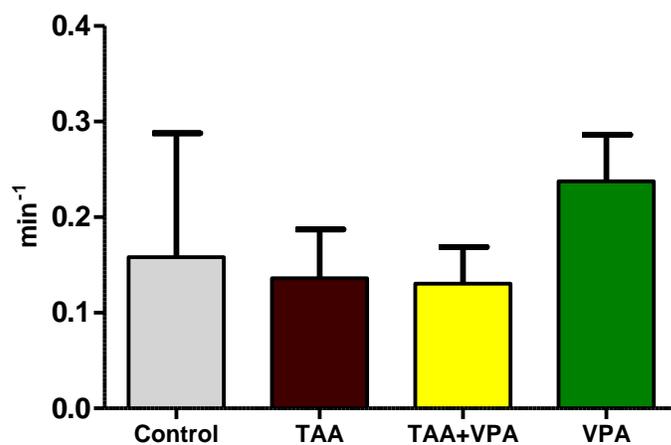


Fig.18 CAT. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D. No existe diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro grupos.

Glutación peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx mostró un patrón de tendencia creciente. El grupo de TAA no mostró una diferencia significativa en la actividad de la enzima con respecto al grupo control. Cuando se administran TAA y VPA de manera simultánea, la actividad aumenta; la cual fue aún mayor en el grupo tratado con VPA (Fig. 19).

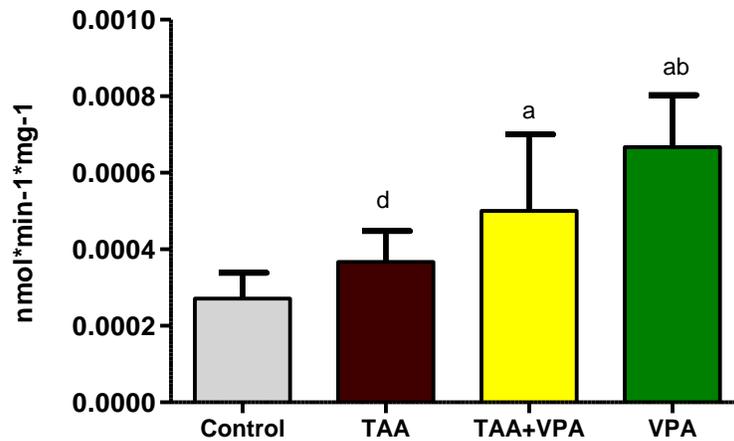


Fig.19 Actividad de GPx. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; d, diferencia significativa respecto al grupo tratado con VPA durante 8 semanas, $p \leq 0.05$.

Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD disminuyó luego de inducir la cirrosis hepática con TAA durante 8 semanas. El VPA mostró una actividad preventiva luego de que se administrara concomitantemente con TAA durante 8 semanas, mostrando una diferencia significativa con respecto al grupo de TAA. El grupo tratado con VPA durante 8 semanas no mostró diferencia significativa respecto al grupo control (Fig. 20).

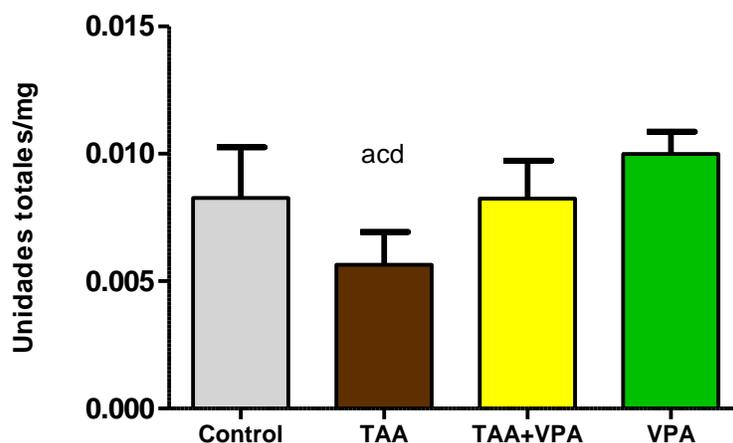


Fig.20 Actividad de SOD. La actividad de la enzima en los grupos Control, TAA, TAA + VPA y VPA se muestra como el promedio de 6 ratas \pm la S.D.

a, diferencia significativa respecto al grupo control, $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa respecto al grupo de daño administrado con TAA durante 8 semanas (daño), $p \leq 0.05$; c, diferencia significativa respecto al grupo experimental (TAA + VPA durante 8 semanas), $p \leq 0.05$.

Histologías

Arquitectura de los hígados

En la figura 21 se observan los hígados extraídos de cada grupo durante la fase de prevención. En ella se muestra el aspecto regular de un hígado del grupo control, liso, brillante y bordes definidos (A). En el caso del grupo de daño (TAA), el hígado presenta una estructura totalmente nodular, se ha retraído; lo cual indica la expresión de proteínas contráctiles como la α -SMA e incluso ha perdido el brillo tisular (B). En el panel C, se distingue a grandes rasgos que la administración conjunta de TAA + VPA mostró un fenómeno preventivo, puesto que los nódulos no son tan acentuados como en la situación de daño. Por último, el hígado extraído del grupo VPA no se vio afectado, mantuvo su conformación natural con bordes brillantes y bien definidos.

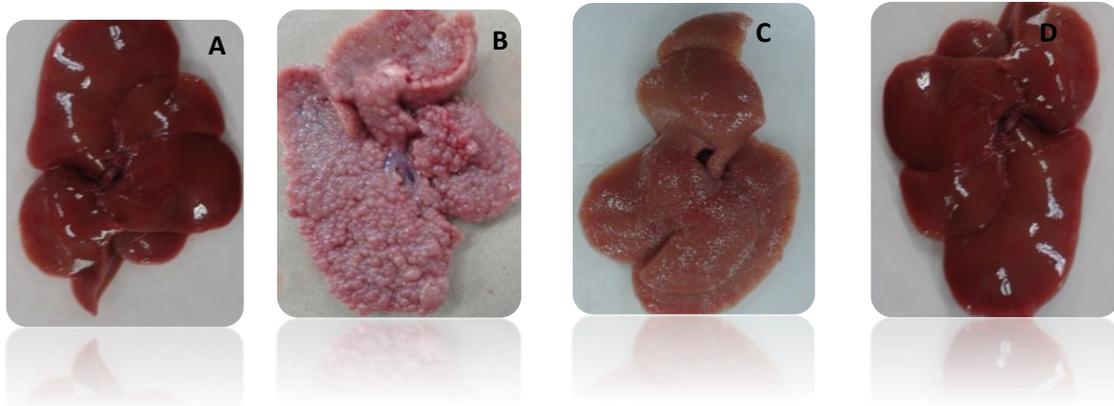


Fig.21 Arquitectura de hígados. A, Grupo control al que se le dejó únicamente con libre acceso a comida y agua; B, grupo tratado con TAA durante 8 semanas (daño); C, grupo tratado con TAA durante 8 semanas + 4 semanas con VPA; D, grupo tratado con VPA durante 8 semanas.

Tinción con H&E

Se observó la morfología de los hígados a través de la tinción de cortes con H&E a una escala de 25µm. En la fig. 22 se muestran cuatro cortes teñidos, cada uno corresponde a un hígado de cada grupo. En el panel A se muestra el corte de un hígado sano, procedente de una de las ratas del grupo control, pudiéndose observar una estructura parenquimatosa con buen acomodo, los núcleos teñidos en azul, el citoplasma en rosa y una zona centrolobulillar sin cambios. En el panel B se muestra la tinción de un corte de hígado del grupo de daño (TAA), en el que se observa de forma muy clara la presencia de nódulos con signos de neoformación celular alrededor, así como un proceso inflamatorio periportal. Se observan además, distintas áreas con lesiones necróticas, esteatosis y desarreglo en la estructura parenquimatosa de los hepatocitos; evento cirrótico. El panel C muestra el corte de un hígado del grupo experimental (TAA durante 8 semanas más VPA por 4 semanas adicionales). Aunque puede notarse una ligera disminución del daño, los nódulos siguen presentes en el tejido con inflamación periportal, se notan células aisladas con cierto grado de neoformación y distintas regiones necrosadas. En el panel D se puede ver un corte del grupo de VPA donde se observa claramente un acomodo parenquimatoso regular, sin presencia de nódulos y región centrolobulillar sin problemas.

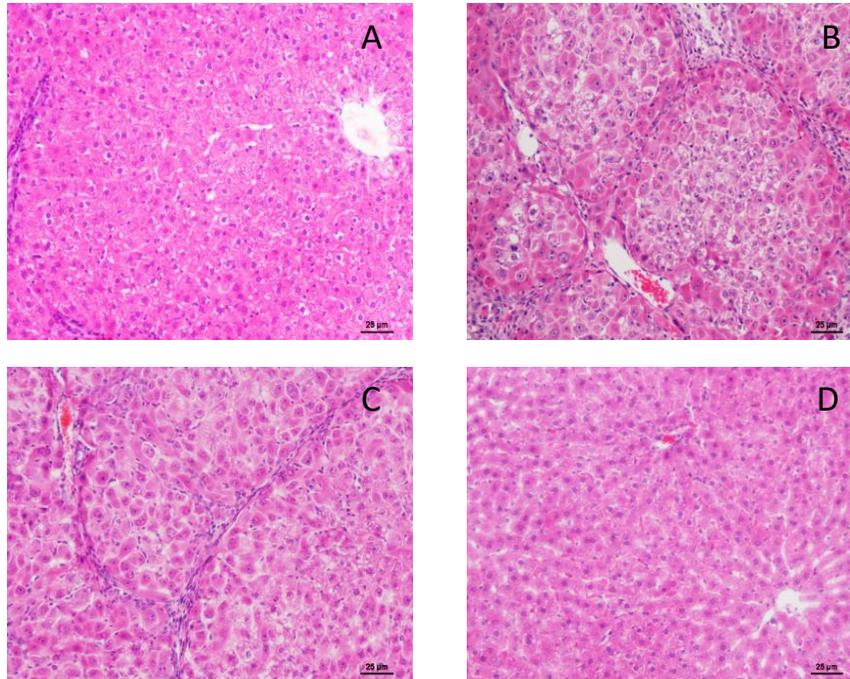


Fig.22 Tinción con H&E. Cortes de hígado teñidos con H&E y observados con microscopio óptico (20X). A, Grupo control al que se le dejó únicamente con libre acceso a comida y agua; B, grupo tratado con TAA durante 8 semanas (daño); C, grupo tratado con TAA durante 8 semanas + 4 semanas con VPA; D, grupo tratado con VPA durante 8 semanas.

Tinción tricrómica

También se realizó la tinción tricrómica de Masson de los tejidos con la finalidad de evaluar la presencia de colágena (Fig. 23). En el panel A, se observan pequeños depósitos de colágena principalmente en las regiones periportales en condiciones basales (grupo control). La coloración roja más intensa en algunas zonas se debe probablemente a una mayor concentración de proteínas. En el panel B se muestra el corte de un hígado totalmente cirrótico (grupo tratado con TAA por 8 semanas), con presencia de nódulos y una importante región necrosada, bordeados por zonas de neoformación; algunas células se encuentran en división y presenta un marcado proceso fibrótico, esto es, con abundantes depósitos de colágena en la región perivascular. El panel C muestra el corte de un hígado del grupo experimental TAA + VPA donde se pueden observar los nódulos bordeados por depósitos de colágena. En este caso, se pueden distinguir algunos hepatocitos en proliferación con un acomodo parenquimatoso desarreglado. En el panel D se aprecia una estructura parenquimatoso normal de un corte del grupo VPA, con ligeros depósitos de colágena en la región periportal; no se observan alteraciones en el tejido.

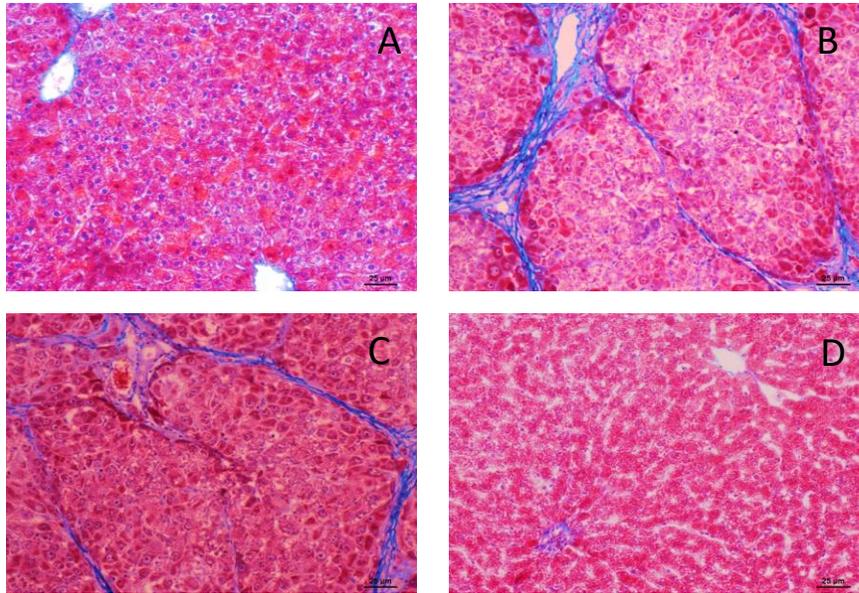


Fig.23 Tinción tricrómica. Cortes de hígado teñidos con la técnica de Masson y observados con microscopio óptico (20X). A, Grupo control al que se le dejó únicamente con libre acceso a comida y agua; B, grupo tratado con TAA durante 8 semanas (daño); C, grupo tratado con TAA durante 8 semanas + 4 semanas con VPA; D, grupo tratado con VPA durante 8 semanas.

Discusión

A diferencia de la enfermedad hepática aguda, en la cual se lesiona principalmente la región acinar, la hepatitis crónica muestra un importante episodio de inflamación portal acompañada en muchos de los casos de fibrosis portal o septal⁴¹. Se ha comentado anteriormente que la funcionalidad del hígado durante la cirrosis, la cual es un daño crónico dependerá del grado de distorsión en su arquitectura, del grado de fibrosis y de la reacción inflamatoria. Precisamente es la respuesta inflamatoria la responsable de la patogénesis y progresión del daño hepático, donde las citosinas mediadoras del proceso como el TGF- β e interleucinas, además de las ROS provocarán directa o indirectamente una serie de eventos que darán pie a los acontecimientos patológicos previamente señalados.

Modelo de reversión

Durante esta fase experimental no se logró evaluar si realmente hubo un efecto de reversión debido al fármaco (ácido valproico). Por lo tanto, no se puede concluir algo respecto a las variables medidas, excepto en el efecto sobre la peroxidación lipídica, pues los niveles de MDA alcanzaron los basales luego de tratar a las ratas durante 8 semanas con TAA seguidas de 4 semanas de tratamiento con VPA. De acuerdo con diversos estudios, el VPA es bien conocido por sus efectos hepatotóxicos, cuyo principal metabolito es el responsable de provocar el daño mediante estrés oxidativo. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo bajo distintas condiciones y con distintos modelos biológicos que se alejan del proceso real de biotransformación del fármaco, además de arrojar datos diferentes cada uno de ellos⁴². En este caso, se muestra un comportamiento distinto pues según los niveles de MDA alcanzados, el VPA podría revertir el daño hepático por la peroxidación lipídica.

En cuanto al resto de las variables, no se puede concluir algo en específico dado que la estadística no permitió observar el efecto real del fármaco. Una de las causas podría radicar en el tiempo de exposición al fármaco, lo que significa que un período más corto tendría que ser considerado para futuros ensayos con dicha sustancia, ya que se sabe que la regeneración espontánea en roedores se da en cuestión de 10 días, mientras que en humanos la regeneración de lleva a cabo en meses, en caso de hepatectomía^{43 43b}. Esto llevaría a pensar que la administración del fármaco luego de 8 semanas de inducción del daño en los animales, debería administrarse en un periodo menor a 4 semanas.

Otro aspecto curioso fue la elevación en las concentraciones de GSH luego de administrar TAA durante 8 semanas. En este caso, se esperaba que las concentraciones hubiesen disminuido debido a la gran concentración de ROS que generan los metabolitos de la TAA, lo que en consecuencia hubiese provocado el aumento de glutatión oxidado (GSSG; medición no realizada en este estudio). Sin embargo; algunos estudios han demostrado que las concentraciones del GSH muestran generalmente un patrón no certero, puesto que se ha relacionado con la cronicidad del daño, la generación de nódulos así como de la esteatosis. Por ejemplo, en algunas etapas iniciales de la cirrosis, los niveles tienden a disminuir considerablemente cuando se administra tioacetamida, mientras que pueden normalizarse o ser ligeramente superiores a los de las condiciones normales en etapas avanzadas; hecho demostrado en ratas⁴⁴, pero en este estudio, sucedió que en el modelo de daño con tioacetamida hubo un incremento del GSH y disminuyó tras haber retirado la hepatotoxina.

Modelo de prevención

Mannaerts y cols. (2010) propusieron que el ácido valproico podría ser una alternativa terapéutica para hacer frente a la cirrosis hepática; sin embargo; el modelo farmacológico empleado fue la hepatotoxina CCl₄ tanto en los cultivos celulares como en los ratones Balbc macho para estudiar la activación de HSC. En este caso, se administró el CCl₄ sólo por cuatro semanas de forma concomitante con VPA contenido en el agua de beber y encontraron que si bien se presentaban efectos antifibróticos, estos datos no correlacionaban con los marcadores bioquímicos como ALT y AST¹⁹. En cuanto al presente trabajo, se encontró que el VPA presentó propiedades preventivas antifibróticas a nivel bioquímico, cuyos principales indicios fueron la prevención total de ALT y una prevención parcial pero significativamente diferente de la acumulación de colágena en el tejido. En el primer caso se interpretaría como una prevención de la necrosis hepática tras darse un estímulo dañino y en el segundo estaría previniéndose la acumulación de colágena y con ello los daños a los que conlleva.

En cuanto a las enzimas relacionadas con el daño por obstrucción de conductos biliares, se sabe que la hepatotoxicidad con tioacetamida generalmente las aumenta con una dosis de 200mg/kg. En nuestra experimentación se encontró que los niveles de γ -GTP aumentaron luego de 8 semanas de tratamiento con la TAA. No obstante, no hubo una diferencia significativa entre los niveles mostrados por el grupo de daño y el experimental (TAA + VPA), pero los niveles de FA fueron prevenidos en su totalidad. La fosfatasa alcalina tiende a aumentar principalmente en el

daño renal, intestinal y por colestasis, mientras que la γ -GTP, aumenta cuando, adicionalmente, se presenta daño hepático, por lo tanto se deben tomar en cuenta ambas enzimas si se sospecha de daño colestásico. En este sentido, el hecho de que una de las dos enzimas mostrara un comportamiento diferente no refuerza la idea de que el VPA sea capaz de prevenir el daño por colestasis⁴.

Otra de las pruebas que daría fuerza a la acción preventiva del VPA es la de la capacidad biosintética del hígado mediante la cuantificación de glucógeno. En este caso, se dio una prevención parcial puesto que los niveles casi nulos de glucógeno que se presentaron después de la administración de TAA, se elevaron de forma parcial cuando la TAA se administró concomitantemente con VPA. Por su parte, se observó que el VPA *per se* posee la capacidad de aumentar los niveles del polímero en el hígado.

Similar a lo ocurrido en la fase experimental de reversión, el VPA mostró su capacidad preventiva de la peroxidación lipídica. De acuerdo con los niveles de MDA del grupo experimental, hubo incluso una mayor inhibición de la producción de esta molécula con respecto al grupo control. El VPA por sí sólo fue capaz de reducir los niveles de MDA por debajo de los niveles basales. Una vez más se arroja a la luz que los hallazgos en estudios anteriores son variables y que dependen de las condiciones de trabajo.

Se ha encontrado que los metabolitos del VPA se unen al GSH como un mecanismo de prevención del daño por estrés oxidativo y que en consecuencia, conduciría a una disminución de los niveles de GSH; no obstante, en este trabajo se encontró que el fármaco fue también capaz de aumentar los niveles del antioxidante endógeno⁴⁵. Sería demasiado apresurado emitir un juicio a este respecto. Sin embargo, se ha encontrado que en el caso de las células transformadas, su muerte se reduce cuando disminuyen los niveles de ROS, factor correlacionado con la presencia de peroxiredoxinas, las cuales aumentan gracias a los HDACI. Si bien en este trabajo no se trata de células transformadas, probablemente el efecto antioxidante observado del VPA tiene fundamento en el aumento de dichas peroxiredoxinas, lo que en consecuencia hace que se incrementen los niveles de GSH¹⁸.

Un paso fundamental en la realización del estudio, fue la determinación de la colágena a través de la prueba de hidroxiprolina. Si bien no se pudo observar un evento de reversión, hubo uno de tipo preventivo. Aunque se dio de manera parcial, la diferencia entre el grupo de daño y el experimental fue estadísticamente significativa. En este punto, es donde se da su principal ventaja como inhibidor de las desacetilasas de histonas. De ahí la inquietud de si se aumentara

la dosis de VPA sin llegar a la dosis tóxica en ratas, podría esperarse un efecto mucho más notorio en la prevención de la mayoría de las variables medidas⁴⁶. A pesar de ser un sistema saturable, la inhibición de las HDAC podría favorecerse y con ello incrementar el efecto observado en las variables de medición. Los HDACI son capaces de frenar el proceso fibrogénico. Sin embargo; son pocos los estudios de modelos *in vivo* cuyas condiciones en cuanto a tratamiento de las ratas se refiere, varían entre cada estudio, razón por la cual se optó por emplear la dosis de 200 mg/kg/día 3 veces por semana para tioacetamida y 200mg/kg/día cada 24 horas de VPA, a modo de trabajar bajo situaciones más controladas^{16, 20, 22}.

Young y cols. (2005) propusieron que los HDACI dejarían que las acetil transferasas actuaran sobre las histonas pero también sobre las proteínas no histónicas, entre las que se encuentra c-Jun. Cuando esto suceda, se incorporaría un acetilo a la proteína impidiendo la formación del complejo AP-1 pues el cambio conformacional en c-Jun lo haría inaccesible a c-Fos. Interrumpida tal dimerización, el complejo AP-1 no podría trascolarse al núcleo para fungir como factor transcripcional de *Timp-1*, el cual impide la acción de las MMP y por ende, favorece la formación de depósitos de colágena²⁰.

En cuanto a las enzimas antioxidantes, no se observó un efecto preventivo en la GPx. Se hubiese esperado que el grupo experimental (TAA + VPA) fuese menor o igual a la de las condiciones control pero no hubo una diferencia significativa entre el grupo de daño y el experimental. Por otro lado, la SOD mostró una actividad disminuida en el grupo de TAA, lo cual estuvo relacionado con el daño hepático exacerbado por una respuesta desencadenada por radicales libres⁴⁷. En cuanto a la CAT, no se puede concluir algo debido a la variabilidad en la actividad resultante en el grupo control. No obstante, se puede observar que no hubo diferencia significativa entre el grupo de TAA y el de TAA + VPA. Lo esperado era que la actividad de la enzima hubiese disminuido en condiciones de daño, mientras que se hubiese mantenido en las condiciones basales en el grupo de TAA + VPA, dado que la tioacetamida tiende a disminuir la actividad de dicha enzima. Dado que la lectura de la absorbancia en el ensayo de CAT corresponde al KMNO₄ residual, se entiende que los niveles del cofactor tendieron a alterarse en ambos grupos. Fatima y Mahboob (2013), observaron que la suplementación de selenio restauró los niveles de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx y que además, esto era un factor importante en la disminución de cirrosis en ratas⁴⁸.

En la sección de histología se pueden ver las estructuras macroscópicas de los hígados tanto del grupo de daño como del experimental así como los cortes teñidos. Sorpresivamente, no

correlacionaron las estructuras, puesto que a nivel macroscópico pareciese que hubo cierto grado de prevención; sin embargo, tras observar los cortes teñidos con H&E se distinguió que el daño en la estructura hepática no fue prevenido de manera importante. Contrario a lo observado, se hubiese esperado que el grupo experimental (TAA + VPA) presentara una estructura con menor número de nódulos o incluso sin ellos, así como un menor grado de necrosis parenquimatosa y de igual forma una deposición de colágena menos acentuada. En el estudio realizado por Chilakapati y cols. (2007) se evidencia que el daño que genera la tioacetamida es mayor a medida que se aumentan las dosis, lo cual contrasta con los cortes del grupo control, donde no se presenta alteración alguna en la estructura titular²⁴. Si bien, en este trabajo los cortes del grupo control tampoco presentan alteraciones en el parénquima, el grupo tratado con TAA + VPA en la fase de prevención no muestra un arreglo regular e incluso la presencia de nódulos indica que el daño no fue prevenido, si bien tienden a ser menos marcados que en el grupo de TAA incluyendo el infiltrado inflamatorio.

En la tinción tricrómica se puede notar que tuvo lugar cierto grado de regeneración hepática en el grupo de TAA + VPA dada la presencia de hepatocitos dispuestos en espacios al azar. Dicho de otra forma, se nota la formación de cavernas parenquimatosas tras la inducción del daño y que fueron ocupadas posteriormente por las células en el intento de regeneración del hígado, lo cual contrasta con la marcada región necrótica del hígado procedente del grupo de daño (TAA). Además, se aprecia una ligera disminución en la acumulación de colágena. Empero, se habría esperado que los cortes del grupo experimental en la fase de prevención se hubiesen visto con mejoras considerables puesto que la estructura de los hígados a nivel macroscópico son totalmente contrastantes, donde el hígado del grupo con cirrosis presenta una apariencia de daño total, mientras que el órgano procedente del grupo de TAA + VPA mostró una arquitectura mejor, con nódulos desvanecidos y menos contraído que el dañado.

Si bien no existen datos suficientes respecto a los efectos del ácido valproico sobre la fibrosis, se han hecho estudios donde se observa claramente la actividad de otros inhibidores de las desacetilasas de histonas como la TSA, experimento realizado con miofibroblastos de pulmón, en el cual a través de inmunofluorescencia, se demostró que la inhibición del TGF- β puede provocar una disminución en la expresión de α -SMA. En este sentido, valdría la pena realizar pruebas de biología celular como Western blot para evaluar la presencia de dicha proteína en los hígados, pues es la principal responsable de la contracción del tejido⁴⁹.

Paik y cols. (2011) demostraron, por medio de un modelo de cirrosis hepática empleando TAA, que la deposición de colágena disminuye cuando se administra a las ratas una planta con propiedades antioxidantes⁵⁰. En este trabajo, se trata de un HDACI, no obstante, dado que se están observando propiedades antioxidantes podría cumplir un efecto similar pero modificando las condiciones de trabajo. El hecho de que la apariencia macroscópica de los hígados sea muy contrastante entre el grupo de TAA y el de TAA + VPA llevó a pensar un efecto preventivo de importancia, pero al ver los depósitos de colágena, además de los otros signos de daño mediante la tinción tricrómica no se puede llegar a una conclusión acerca del efecto preventivo del VPA.

Además de las observaciones histológicas, valdría la pena realizar un conteo de miofibroblastos antes y después del daño hepático y después del tratamiento con VPA. Según Watanabe, la concentración sérica máxima tolerada de VPA a nivel clínico es de 1mM. Sin embargo; en su estudio observaron que tales concentraciones no alcanzaban a disminuir la proliferación celular en cultivos celulares de SHC. Aunque está claro que los procesos de biotransformación en un organismo completo repercuten en el efecto final de las moléculas. De esta forma, en modelos biológicos habría que esperar la disminución gradual de las células transdiferenciadas una vez se alcancen los niveles adecuados de VPA²³.

Conclusiones

1. Debido a que la estadística no muestra diferencia significativa entre el grupo tratado con ácido valproico y el grupo control de reversión espontánea, no fue posible evaluar el proceso de reversión en la cirrosis hepática.
2. El ácido valproico posee propiedades antioxidantes tras haberse logrado un control en las concentraciones de MDA; sin embargo, el mecanismo por el cual esto sucede aun no está claro.
3. El ácido valproico fue capaz de prevenir parcialmente la necrosis de los hepatocitos.
4. Falta esclarecer la actividad preventiva del ácido valproico para la formación de colágena.
5. El ácido valproico ofrece la gran ventaja de ser utilizado en la clínica, por lo cual la realización de estudios con mayor profundidad en cuanto a sus efectos sobre la fibrosis y la cirrosis hepática podría hacer que represente una nueva alternativa terapéutica que haga frente a la enfermedad hepática.

Perspectivas

- Realizar la experimentación con dosis mayores y/o con un periodo de regeneración espontánea más corto (en el caso del modelo de reversión) sin llegar a las concentraciones tóxicas en las ratas para poder observar el efecto tanto de reversión como preventivo del VPA².
- Realizar la medición de las áreas dañadas en los cortes histológicos para tener un grado más certero de la alteración tisular a nivel microscópico.
- Realizar pruebas de biología molecular donde se evalúe la expresión de TGF- β , α -SMA, interleucinas y HDAC para constatar los mecanismos farmacológicos del VPA en la fibrosis y la cirrosis hepática.

Referencias

1. Dooley JS, L. A., Burroughs A, Heathcote J., *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. 12 ed.; 2012.
2. Herrerías JM, D. A. y. J. M., *Tratado de Hepatología*. . 1996; Vol. 1.
3. Arias IM, B. J., Fausto N, Jakoby WB, Scachter D y Shafritz DA. , *The Liver. Biology and Pathobiology*. 3 ed.; 1994.
4. Schiff ER, M. W. y. S. M., *Schiff's Diseases of the Liver*. 11 ed.; Wiley-Blackwell: Reino Unido, 2012.
5. Schuppan, D.; Afdhal, N. H., Liver cirrhosis. *Lancet* **2008**, *371* (9615), 838-51.
6. Bataller, R.; Brenner, D. A., Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (2), 209-18.
7. Gressner, O. A.; Weiskirchen, R.; Gressner, A. M., Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comparative Hepatology* **2007**, *6*, 7.
8. Friedman, S. L., Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of Hepatology* **2003**, *38 Suppl 1*, S38-53.
9. Friedman, S. L., Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **2008**, *134* (6), 1655-69.
10. Leask, A.; Abraham, D. J., TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2004**, *18* (7), 816-27.
11. Derynck, R.; Zhang, Y. E., Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **2003**, *425* (6958), 577-84.
12. Kisseleva, T.; Brenner, D. A., Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2007**, *22 Suppl 1*, S73-8.
13. Lorenzo P, M. A., Leza JC, Lizasoain I y Moro MA. , *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. Panamericana 2004.
14. Lheureux, P. E.; Penaloza, A.; Zahir, S.; Gris, M., Science review: carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity - what is the evidence? *Critical Care* **2005**, *9* (5), 431-40.
15. Piel, C. J.; Zhang, F.; Huang, E. Y.; Guenther, M. G.; Lazar, M. A.; Klein, P. S., Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (39), 36734-41.
16. Pang, M.; Zhuang, S., Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2010**, *335* (2), 266-72.
17. Gurvich, N.; Tsygankova, O. M.; Meinkoth, J. L.; Klein, P. S., Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Research* **2004**, *64* (3), 1079-86.
18. Xu, W. S.; Parmigiani, R. B.; Marks, P. A., Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **2007**, *26* (37), 5541-52.
19. Mannaerts, I.; Nuytten, N. R.; Rogiers, V.; Vanderkerken, K.; van Grunsven, L. A.; Geerts, A., Chronic administration of valproic acid inhibits activation of mouse hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Hepatology* **2010**, *51* (2), 603-14.
20. Young, D. A.; Billingham, O.; Sampieri, C. L.; Edwards, D. R.; Clark, I. M., Differential effects of histone deacetylase inhibitors on phorbol ester- and TGF-beta1 induced murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression. *The FEBS Journal* **2005**, *272* (8), 1912-26.

21. Bulow, R.; Fitzner, B.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S.; Jaster, R., Antifibrogenic effects of histone deacetylase inhibitors on pancreatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology* **2007**, *74* (12), 1747-57.
22. Barter, M. J.; Pybus, L.; Litherland, G. J.; Rowan, A. D.; Clark, I. M.; Edwards, D. R.; Cawston, T. E.; Young, D. A., HDAC-mediated control of ERK- and PI3K-dependent TGF-beta-induced extracellular matrix-regulating genes. *Matrix biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* **2010**, *29* (7), 602-12.
23. Watanabe, T.; Tajima, H.; Hironori, H.; Nakagawara, H.; Ohnishi, I.; Takamura, H.; Ninomiya, I.; Kitagawa, H.; Fushida, S.; Tani, T.; Fujimura, T.; Ota, T.; Wakayama, T.; Iseki, S.; Harada, S., Sodium valproate blocks the transforming growth factor (TGF)-beta1 autocrine loop and attenuates the TGF-beta1-induced collagen synthesis in a human hepatic stellate cell line. *International Journal of Molecular Medicine* **2011**, *28* (6), 919-25.
24. Chilakapati, J.; Shankar, K.; Korrapati, M. C.; Hill, R. A.; Mehendale, H. M., Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* **2005**, *33* (12), 1877-85.
25. Hajovsky, H.; Hu, G.; Koen, Y.; Sarma, D.; Cui, W.; Moore, D. S.; Staudinger, J. L.; Hanzlik, R. P., Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology* **2012**, *25* (9), 1955-63.
26. (a) Rahman, T. M.; Hodgson, H. J., Animal models of acute hepatic failure. *International Journal of Experimental Pathology* **2000**, *81* (2), 145-57; (b) Muller, D.; Sommer, M.; Kretzschmar, M.; Zimmermann, T.; Buko, V. U.; Lukivskaya, O.; Dargel, R., Lipid peroxidation in thioacetamide-induced macronodular rat liver cirrhosis. *Archives of Toxicology* **1991**, *65* (3), 199-203.
27. Campollo O, V. J., Berumen A, Pérez MA, Panduro A y Segura J., Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el Hospital Civil de Guadalajara. *Salud Pública Méx* **1997**, *39* (3), 195-200.
28. Salud, S. N. d. I. e., Principales causas de mortalidad general. 2008 ed.; SSA: 2008.
29. Reitman, S.; Frankel, S., A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology* **1957**, *28* (1), 56-63.
30. Glossmann, H.; Neville, D. M., gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters* **1972**, *19* (4), 340-344.
31. Berger, L. y. R., G. N. , Alkaline phosphatase. *Standard Methods of Clinical Chemistry. Academic Press* **1963**, 56.
32. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, *82* (1), 70-7.
33. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-54.
34. Buege, J. A.; Aust, S. D., Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **1978**, *52*, 302-10.
35. Seifter, S.; Dayton, S.; et al., The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry* **1950**, *25* (1), 191-200.
36. Rojkind, M.; Gonzalez, E., An improved method for determining specific radioactivities of proline-14C and hydroxyproline-14C in collagen and in noncollagenous proteins. *Analytical Biochemistry* **1974**, *57* (1), 1-7.
37. Cohen, G.; Dembiec, D.; Marcus, J., Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 30-8.

38. Sun, Y.; Oberley, L. W.; Li, Y., A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* **1988**, *34* (3), 497-500.
39. Lawrence, R. A.; Burk, R. F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1976**, *71* (4), 952-8.
40. Masson, P., Trichrome stainings and their preliminary technique. *J Tech Methods* **1929**, *12*, 75-90.
41. Dancygier, H., *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. Springer: UK, 2010; Vol. 1.
42. Kiang, T. K.; Teng, X. W.; Karagiozov, S.; Surendradoss, J.; Chang, T. K.; Abbott, F. S., Role of oxidative metabolism in the effect of valproic acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidative stress in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* **2010**, *118* (2), 501-9.
43. (a) Fausto, N.; Campbell, J. S.; Riehle, K. J., Liver regeneration. *Journal of hepatology* **2012**, *57* (3), 692-4; (b) Nagino, M.; Ando, M.; Kamiya, J.; Uesaka, K.; Sano, T.; Nimura, Y., Liver regeneration after major hepatectomy for biliary cancer. *The British Journal of Surgery* **2001**, *88* (8), 1084-91.
44. Kretzschmar M, F. H., Zimmermann T, Dargel R, Klinger W., Glutathione synthesis and export in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide: relations to ultrastructural changes. *Exp Pathol* **1989**, *36* (2), 113:22.
45. Löscher, W., *Valproate*. Springer: Reino Unido, 1999.
46. Dickinson, R. G.; Harland, R. C.; Ilias, A. M.; Rodgers, R. M.; Kaufman, S. N.; Lynn, R. K.; Gerber, N., Disposition of valproic acid in the rat: dose-dependent metabolism, distribution, enterohepatic recirculation and choleric effect. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1979**, *211* (3), 583-95.
47. H. Abul, T. C. M., H. M. Dashti, a. Al-bader, Level of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Uric Acid in Thioacetamide-Induced Cirrhotic Rats. *Anat. Histol. Embryol* **2002**, *31*, 66-71.
48. Fatima, S. N.; Mahboob, T., Role of selenium in protection of liver cirrhosis. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *26* (6), 1097-102.
49. Guo, W.; Shan, B.; Klingsberg, R. C.; Qin, X.; Lasky, J. A., Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **2009**, *297* (5), L864-70.
50. Paik, Y. H.; Yoon, Y. J.; Lee, H. C.; Jung, M. K.; Kang, S. H.; Chung, S. I.; Kim, J. K.; Cho, J. Y.; Lee, K. S.; Han, K. H., Antifibrotic effects of magnesium lithospermate B on hepatic stellate cells and thioacetamide-induced cirrhotic rats. *Experimental & Molecular Medicine* **2011**, *43* (6), 341-9.