



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

“EFECTO DE LA N-ACETIL CISTEÍNA EN LA
PREVENCIÓN Y REVERSIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO
EXPERIMENTAL EN LA RATA.”

Tesis que presenta

M. en C. Marina Galicia Moreno

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Farmacología

Director de Tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

México, Distrito Federal

Abril, 2012

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología, perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Doctor Pablo Muriel de la Torre.

Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de postgrado con clave de registro: 176554

AGRADECIMIENTOS:

Al **Dr. Pablo Muriel de la Torre** por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo desde hace seis años, por compartir conmigo sus experiencias profesionales y personales que han sido de mucha ayuda para mi formación y que pese a todos los problemas que surgieron durante mi estancia, él nunca perdió la confianza en mí, muchas gracias por todo doctor.

Le doy las gracias a mis sinodales: **Dra Liliana Favari Perozzi, Dr. José Segovia Vila, Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez y Dr. Víctor M. Pérez Álvarez** por hacer a un lado por un momento sus actividades y brindarme parte de su tiempo para asistir a los seminarios y revisar esta tesis.

A la **Dra. María del Carmen García García**, le quiero agradecer que tan amablemente haya aceptado formar parte de mi comité tutorial, muchas gracias por el tiempo y los consejos brindados doctora.

A mis compañeros y amigos del laboratorio **Enrique Chávez Jiménez, Jonathan Arauz Cabrera, Horacio Rivera González y Karina Reyes Gordillo** por compartir conmigo su experiencia y conocimientos, además por el apoyo moral y personal que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio, gracias chicos.

A la **Sra. María Teresa García Camacho** y la **Srta. Flor Galván Rodríguez** por la ayuda técnica brindada para la realización del proyecto y mucho más importante, por el tiempo y el apoyo moral que siempre me ofrecieron, no tengo como pagar eso, muchas gracias Teresita y Flor.

Al **Sr. Luis Ramón Hernández Guadarrama** y al **Sr. Benjamín Salinas Hernández** por su excelente asistencia técnica en la realización de este trabajo.

A la **Sra. Verónica Cadena Miranda** por su excelente ayuda y apoyo técnico y personal, gracias Vero.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría.

DEDICATORIAS:

A mis padres **Irma Moreno Martínez** y **Samuel Galicia Méndez** por todo el apoyo, el cariño, los consejos, y cuando fue necesario, las llamadas de atención que siempre me han brindado en los proyectos que decido realizar, muchas gracias por todo papi y mami, esto es un éxito de los tres.

A mis hermanas **Berenice** y **Aleida**, y mi hermano no de sangre, pero sí de corazón **René Acevo**. No puedo tener mejor ejemplo a seguir que ustedes, muchas gracias por su cariño, sus palabras de aliento, sus consejos y su ayuda técnica brindados no sólo ahora, si no en cualquier proyecto que decido emprender, los quiero mucho.

A toda la familia Galicia y Moreno, en especial a mis tíos **Ángeles Mejía (Gelita) (†)** y **Rubén Galicia**, por sus consejos y palabras de aliento que siempre recibí de ustedes, tía Gelita, hasta donde te encuentres y tío Rubé, este trabajo se los dedico a ustedes.

A *mis abuelitas* **Chanita** y **Luisita (†)**, porque ambas desde donde se encuentren siempre me tienen presente en sus oraciones y velan por mí en todo momento.

A mis amigos de antaño **Irazú, Aldo, Edgar, Jorge, Aurora, Yury, Karla, Julieta y Lulú**, muchas gracias por estar pendiente de mis pasos desde hace más de 12 años, además por las pláticas, los consejos y los ánimos que siempre me han dado.

A mis amigos de hoy **Adriana, Madeline, Jazmín, Evelyn, Sofía, Enrique, Jonathan, Brisa, Mayra, Joel, Juan, Francisco Pinto, Francisco Alarcón, Carmen, Ana, Germán, Silvia, Refugio, Emilio, Esther, Aracely y Karina**, por que más que amigos, ustedes fueron mi familia en esta etapa, gracias por los consejos, las pláticas en los pasillos, los ratos de distracción, los regaños,

todo hizo que mi estancia en el DF y en el Cinvestav fuera mucho más llevadera, muchas gracias por todo a cada uno de ustedes.

INDICE

RESUMEN	xi
Summary.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1 Generalidades del hígado.....	1
1. 2 Lobulillo hepático.....	3
1. 3 Tipos celulares.....	4
1. 4 El flujo sanguíneo hepático desde la vena porta y la arteria hepática.	6
1. 5 Funciones del hígado.....	7
1.5.1 Almacenamiento de vitaminas	7
1.5.2 Elaboración de bilis	8
1.5.3 Metabolismo de los carbohidratos	8
1.5.4 Metabolismo de las grasas	8
1.5.5 Metabolismo de las proteínas	9
1.5.6 Detoxificación de toxinas y fármacos	9
1. 6 Daño hepático.....	10
1. 6. 1 Cirrosis hepática.....	10
1. 6. 2 Clasificación.....	10
1.6.2.1 Cirrosis micronodular	11
1.6.2.2 Cirrosis macronodular	11
1.6.2.3 Cirrosis mixta	12
1.6.2.4 Cirrosis biliar primaria	12
1.6.2.5 Cirrosis biliar secundaria	12
1.7 Cirrosis hepática en México.....	14
1.8 Citocinas y daño hepático	15
1.8.1 Tipos de citocinas	15
1.8.1.1 Interleucina-6	16
1.8.1.2 Interleucina-10	16
1.8.1.3 Factor de crecimiento transformante- β	16
1.9 Estrés oxidativo y daño hepático	17
1.9.1 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.....	18
1.9.2 Antioxidantes enzimáticos	18

1.9.3 Antioxidantes no enzimáticos	18
1.10 Modelos experimentales de daño hepático	20
1.10.1 Modelo de daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común	20
1.10.2 Modelo de reversión del daño hepático inducido por la administración de CCl ₄	22
1.11 Marcadores de daño hepático	25
1.11.1 Marcadores que detectan daño al hepatocito	26
1.11.2 Marcadores que evalúan la capacidad de biosíntesis del hígado.....	28
1.11.3 Marcadores que evalúan el daño oxidativo del hígado	28
1.11.4 Marcadores que evalúan el grado de cirrosis	30
2. Antecedentes de la N-acetil cisteína	32
3. Hipótesis.....	34
4. Objetivos.....	35
5. Justificación	36
6. Materiales y métodos	37
6.1 Materiales	37
6.2 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la N-acetil cisteína en la prevención del daño hepático crónico inducido por la LCBC	37
6.3 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la N-acetil cisteína en la reversión del daño hepático inducido por CC ₄	38
6.4 Determinaciones bioquímicas en sangre e hígado	40
6.5 Técnicas	42
6.5.1 Determinación de la actividad de la enzima γ -glutamyl transpeptidasa.....	42
6.5.2 Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa	43
6.5.3 Determinación del glucógeno hepático	44
6.5.4 Determinación del grado de peroxidación lipídica	45
6.5.6 Determinación de proteínas	46

6.5.6 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).....	47
6.5.7 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa	48
6.5.8 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.....	48
6.5.9 Determinación del contenido de colágena	49
6.5.10 Histología	51
6.5.11 Western blot	52
6.5.12 Análisis estadístico	53
7. Resultados	54
7.1 Resultados del modelo de prevención del daño hepático producido por la LCBC	54
7.1.1 Actividad enzimática de la ALT	54
7.1.2 Actividad enzimática de la γ -GTP	55
7.1.3 Contenido del glucógeno hepático	56
7.1.4 Grado de peroxidación lipídica	57
7.1.5 Contenido de GSH y GSSG	58
7.1.6 Actividad de la enzima catalasa	59
7.1.7 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa	59
7.1.8 Contenido de colágena	60
7.1.9 Western blot de las citocinas IL-6, IL-10 y TGF.....	61
7.2 Resultados del modelo de reversión del daño hepático inducido por CCl ₄	64
7.2.1 Actividad enzimática de la ALT	64
7.2.2 Actividad enzimática de la γ -GTP	64
7.2.3 Contenido de glucógeno hepático	65
7.2.4 Grado de peroxidación lipídica	66
7.2.5 Contenido de GSH y GSSG	67
7.2.6 Contenido de colágena	68
7.2.7 Tinción tricrómica	69
8. Discusión de resultados	70
9. Resumen de resultados	79
10. Conclusión.....	80

11. Perspectivas	81
12. Referencias	82

RESUMEN

Estudios diversos sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del daño hepático tanto en ratas como en humanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la habilidad de la N-acetil cisteína (NAC) para prevenir el daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCBC) durante 28 días y para revertir la cirrosis hepática inducida por la administración de CCl_4 (0.4 g/kg, i.p) en ratas Wistar macho. El daño colestático fue inducido por la LCBC durante 4 semanas y la NAC fue administrada diariamente (300 mg/kg, p.o.) por el mismo tiempo. Para revertir el daño hepático, el CCl_4 fue administrado de manera crónica durante 2 meses, cuando este fue retirado se hizo la administración de NAC (300 mg/kg, p.o.) por un mes. Se llevaron a cabo los controles respectivos. La alanina aminotransferasa (ALT) y la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) fueron cuantificadas en suero, la peroxidación lipídica, el contenido de glutatión (GSH) y las actividades de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) fueron determinadas en muestras de hígado. La fibrosis fue evaluada al cuantificar el contenido de colágena. Además, la expresión de las citocinas TGF- β , IL-6 e IL-10 fueron determinadas en hígado por la técnica de Western blot y cuantificadas densitométricamente.

La inducción del daño colestático por la LCBC estuvo asociada con un incremento en los niveles séricos de las enzimas ALT y γ -GTP. El estrés oxidativo fue evaluado también, y la peroxidación lipídica se incrementó, el contenido de GSH y las actividades de las enzimas CAT y GPx se alteraron por la LCBC. El tratamiento con NAC previno estas alteraciones. El contenido de colágena hepática aumentó por la LCBC, pero la NAC fue capaz de preservar

los niveles normales de colágena. Las citocinas TGF- β , IL-6 e IL-10 se incrementaron después de ligar el conducto biliar común durante 28 días. La administración de NAC fue efectiva para prevenir significativamente la expresión de las citocinas TGF- β e IL-6 y además aumentó la expresión de la citocina IL-10. Por otro lado, la administración de CCl₄ durante dos meses indujo un incremento en los niveles séricos de las enzimas ALT y γ -GTP, en este caso la administración de la NAC no fue capaz de revertir estos efectos. El estrés oxidativo fue evaluado al cuantificar los niveles de malondialdehído (MDA) y GSH, ambos marcadores de daño se alteraron por la administración de CCl₄ pero estas respuestas fueron modificadas por la administración de NAC. La fibrosis, evaluada por la cuantificación del contenido de colágena y también histopatológicamente, se aumentó por la administración de CCl₄, esta respuesta se logró mantener aun cuando el CCl₄ fue retirado. Importantemente, la administración de NAC revirtió parcialmente esta respuesta. Nuestros datos indican que en el desarrollo del daño hepático por la LCBC o por la administración de CCl₄, el estrés oxidativo juega un papel importante y esto a su vez permite la generación de la fibrosis. Este estudio muestra que los efectos benéficos de la NAC para prevenir o revertir la cirrosis son debidos a sus propiedades antioxidantes así como a sus propiedades inmunomoduladoras.

Summary

Several studies have suggested that oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of hepatic injury in rats and humans. The aim of this study was to evaluate the ability of N-acetylcysteine (NAC) to prevent the hepatic damage induced by bile duct ligation (BDL) for 28 days and to reverse liver cirrhosis induced by CCl₄ (0.4 g/kg, i.p) administration in male Wistar rats. Cholestatic damage was induced by 4 weeks of bile duct ligation (BDL) and NAC was administered daily (300 mg/kg, p.o.) for the same time. To reverse the liver damage, CCl₄ was chronically administered during 2 months, then it was withdrawn, and NAC (300 mg/kg, p.o.) administration began up to 1 month. Appropriate control groups were performed. Alanine amino transferase (ALT) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) were quantified in plasma, lipid peroxidation, glutathione content (GSH), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were measured in liver samples. Fibrosis was assessed by measuring liver collagen content. In addition, TGF- β , IL-6 and IL-10 were determined in liver by Western blot and quantified densitometrically.

The induction of cholestatic damage by BDL was associated with an increase in ALT and γ -GTP. Oxidative stress was also evaluated, lipid peroxidation increased, while liver GSH content and CAT and GPx activities were altered by BDL. NAC treatment prevented these alterations. Collagen content was increased by chronic BDL, but NAC preserved the normal collagen levels. After 28 days of BDL the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10 were increased. NAC was effective to significantly prevent such TGF- β and IL-6 expression but caused further augmented IL-10 expression. On the other hand, administration of CCl₄ by two months induced an increase in ALT and γ -GTP

serum activities although NAC was not capable to reverse these effects. Oxidative stress was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) and GSH levels, both liver damage markers were altered by CCl₄ administration but these responses were reversed by NAC administration. Fibrosis, quantified by measuring liver collagen content and histopathology, increased by CCl₄ administration, this outcome was maintained even when CCl₄ was withdrawn; importantly, NAC administration partially reversed this response. Our data indicate that in the development of liver damage by BDL or by CCl₄ administration, the oxidative stress plays an important role and this in turn leads to fibrosis generation. This study shows that the beneficial effects of NAC to prevent and reverse cirrhosis are due to its important antioxidant and immunomodulatory properties.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del hígado.

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso corporal en el adulto y el 5% en el neonato (Arias, 2001) y se encuentra ubicado en la parte más alta de la cavidad abdominal, en el hipocondrio derecho (Guyton y Hall, 2001; Netter, 1981) (Fig. 1).

En su parte superior, el hígado colinda con el diafragma y la duplicación peritoneal diafragmática constituye el ligamento coronario. A partir de la parte media del ligamento coronario se origina otro repliegue peritoneal, el llamado ligamento falciforme, que se extiende desde el hígado hasta la pared abdominal anterior. Su inserción en el hígado lo divide en el lóbulo derecho y el izquierdo según la anatomía clásica y dos lóbulos accesorios, el cuadrado y el caudado (Netter, 1981).

Este órgano se divide en sectores y segmentos con suministro sanguíneo aferente y eferente independientes y canales biliares sin circulación colateral entre los segmentos (Arias, 2001).

La organización estructural del hígado refleja sus funciones importantes. Este órgano segmentado en ocho, único en el cuerpo y dotado de funciones específicas está interpuesto como un guardián entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. La razón de esta interposición es porque el hígado está provisto con un suministro sanguíneo dual, recibe la sangre de la vena porta en adición a su vascularización por la arteria hepática. Para conocer las demandas específicas, se presentan los seis principios que gobiernan la estructura y función del hígado:

1. Un doble suministro de sangre, antes mencionado, incluyendo, el sistema portal entre dos lechos capilares (intestinal y hepático). El suministro hepático-específico de sangre esplácnica que permite el establecimiento de la circulación enterohepática de los solutos biliares.
2. Un arreglo arquitectónico único de las células hepáticas parenquimatosas para facilitar el máximo intercambio metabólico entre la sangre y los hepatocitos.

3. Una textura peculiar del espacio perihepatocelular para facilitar aún más el intercambio metabólico entre la sangre y los hepatocitos.
4. Composición bioquímica específica y propiedades funcionales de los organelos y membranas plasmáticas, que permiten funciones específicas e interacciones con la sangre, células vecinas y componentes de la matriz.
5. Expresión combinada de secreción exocrina y funciones metabólicas en la misma célula parenquimal.
6. Separación de un compartimento biliar del medio interno que asegura una vía exocrina (Arias, 2001).

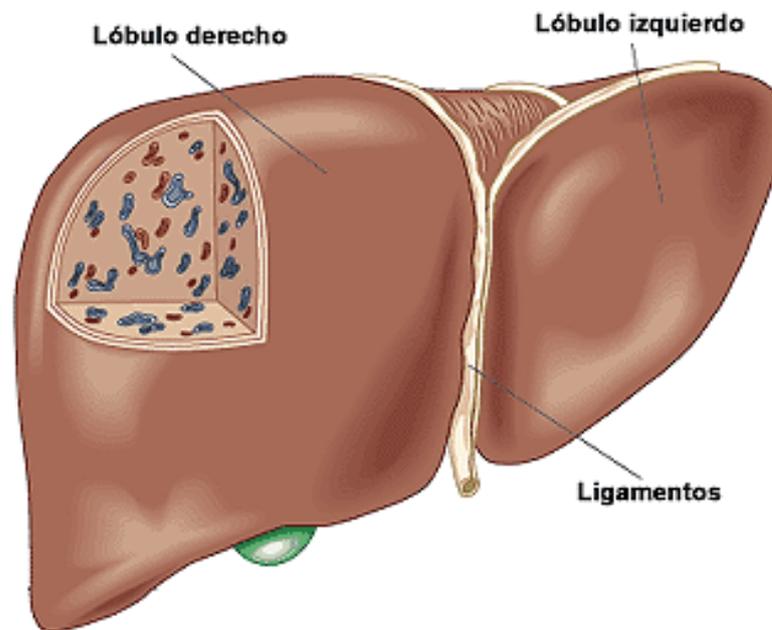


Figura 1. Imagen del hígado, el cual se divide en el lóbulo derecho e izquierdo, los cuales están separados por el ligamento falciforme.

1.2 Lobulillo hepático.

La unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro. El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos (Guyton y Hall, 2001) (Fig. 2).

El lobulillo hepático, el cual se ilustra en la figura 2, se constituye alrededor de una vena central que desemboca en las venas hepáticas y luego, en la vena cava. El propio lobulillo se compone en esencia, de placas celulares hepáticas múltiples, que se alejan de la vena central como los radios de una rueda. Cada placa hepática suele estar formada por dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los conductos biliares, en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes (Guyton y Hall, 2001).

Los tabiques también llevan vénulas portales que reciben, sobre todo, la sangre portal del tubo digestivo. Desde estas vénulas, la sangre se dirige hacia los sinusoides hepáticos planos, ramificados, ubicados entre las placas hepáticas, y después, hacia la vena central. Así pues, las células hepáticas están constantemente expuestas a la sangre venosa portal.

Además de las vénulas portales, los tabiques interlobulillares contienen arteriolas hepáticas, que suministran sangre arterial a los tejidos septales intercalados entre los lobulillos; muchas de las pequeñas arteriolas también desembocan directamente en los sinusoides hepáticos, de ordinario en los situados a un tercio de la distancia de los tabiques interlobulillares, como muestra la figura 2 (Guyton y Hall, 2001).

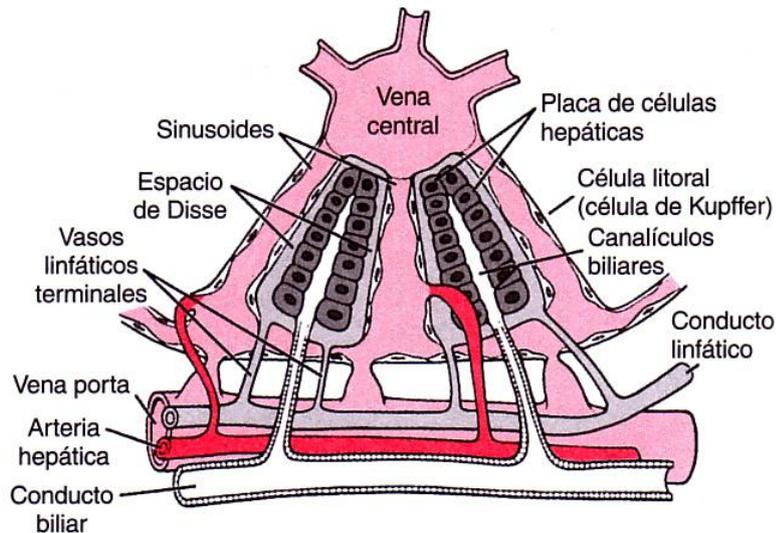


Figura 2. Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema conductor de la bilis y el sistema linfático compuesto por los espacios de Disse y los vasos linfáticos interlobulillares.

1.3 Tipos celulares.

El hígado se compone de cinco diferentes tipos celulares que abarcan cerca del 80% de su volumen, el 20% restante lo ocupan los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular.

Los **hepatocitos** son las células más grandes y las más abundantes ya que constituyen el 50 o el 60% del volumen hepático, es decir, casi alrededor de las dos terceras partes del mismo; los otros cuatro tipos celulares se conocen como células no parenquimatosas o sinusoidales y son menores en tamaño, éstas son: las células de Kupffer, las células de Pit, las células de Ito o estelares y las células endoteliales.

Los hepatocitos son células poligonales de 20-30 μ m de diámetro, se disponen laminalmente, de una o dos células de espesor. Según su localización dentro del lobulillo, manifiestan diferentes propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas. Además, no sólo hacen contacto entre ellas, sino que bordean un espacio (Espacio de Disse) y por esto se dice que el mismo hepatocito tiene distintos dominios dentro de su citoplasma. Viven alrededor de 150 días. En roedores, la capacidad regenerativa del hígado después del daño (ya sea por fármacos hepatotóxicos o resección hepática) es alrededor del 75%. Esta capacidad en humanos es mucho menor.

La función de los hepatocitos es de reserva de metabolitos, almacenan los lípidos, el glucógeno, los aminoácidos, las vitaminas, etc. Son células de secreción endógena y exógena, ya que secretan bilis hacia la vesícula biliar y muchas otras sustancias a la circulación sanguínea (Arias, 2001).

Las **células de Kupffer** son los macrófagos residentes y se cree que son migratorias ya que no establecen uniones intercelulares con las células vecinas. Se relacionan con las células del revestimiento sinusoidal.

Su función es la de receptor de toda clase de desechos o material extraño. Una vez activadas, ellas secretan numerosos productos con efectos biológicos potentes, incluidas proteasas y citocinas con influencia sobre el parénquima y otras líneas celulares sinusoidales (Arias, 2001).

Las **células de Pit**, están localizadas en el endotelio y corresponden a los linfocitos granulares grandes con actividad de asesinas naturales (NK), brindan protección contra infecciones virales (Arias, 2001).

Las **células estelares** (células de Ito) fueron identificadas originalmente por Von Kupffer en el año de 1870, redescubiertas por Ito y Remoto en 1952, y confirmadas por microscopía electrónica por Yamagishi en 1959. Estas células ocupan una localización perisinusoidal, es decir, se encuentran alrededor del sinusoides y constituyen un tercio de las células no parenquimatosas del hígado. Son las principales almacenadoras de la vitamina A en el organismo, en el hígado normal son no proliferativas, pero ante cualquier estímulo inflamatorio, se convierten en las productoras de colágeno principales.

Las células estelares (HSC) juegan un papel en el mantenimiento de la matriz extracelular por la síntesis y la secreción de sus componentes normales y su degradación por proteasas. Así, las HSC tienen cuatro funciones principales en el hígado normal: a) la producción y mantenimiento de la matriz extracelular; b) el control del tono microvascular; c) el almacenamiento de retinoides; y d) un papel en el control de la regeneración en el hígado normal y en la respuesta a la necrosis. Junto con otras células mesenquimales, las HSC son las principales productoras de la matriz extracelular en la fibrosis y cirrosis hepática y pueden modular la inflamación crónica a través de la secreción de citocinas (Arias, 2001).

Las **células endoteliales** son las células que recubren el endotelio vascular intrahepático ya que tienen numerosas funciones en varias reacciones biológicas, incluyendo el transporte activo, la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación, la respuesta inmunitaria, la regulación de la presión sanguínea, la angiogénesis, el metabolismo de lípidos, y la síntesis de componentes estromales, son similares a las células del endotelio vascular en general (Arias, 2001).

1.4 El flujo sanguíneo hepático desde la vena porta y la arteria hepática.

El hígado posee un flujo sanguíneo elevado y unas resistencias vasculares reducidas, cada minuto llegan a los sinusoides hepáticos, desde la vena porta, cerca de 1,050 mL de sangre y desde la arteria hepática, 300 mL más, lo que representa un total de 1,350 mL/min en término medio, es decir un 27% del gasto cardíaco en reposo (Guyton y Hall, 2001).

La presión en la vena porta a su llegada al hígado se acerca a 9 mm Hg y la de la vena hepática que sale del hígado para terminar en la cava suele ser de 0 mm Hg. Esta diferencia leve de presión, de tan solo 9 mm Hg, revela que la resistencia al flujo sanguíneo a través de los sinusoides hepáticos suele ser muy baja, sobre todo si se tiene en cuenta que cada minuto circulan por esta vía unos 1,350 mL de sangre (Guyton y Hall, 2001).

La cirrosis hepática aumenta mucho la resistencia al flujo sanguíneo, cuando se destruyen las células parenquimatosas del hígado y se reemplazan por tejido fibroso, que acaban contrayéndose en torno a los vasos sanguíneos, la sangre portal encuentra grandes obstáculos para su paso por el hígado. Este proceso se conoce como cirrosis hepática y casi siempre obedece al alcoholismo pero puede ocurrir después de la ingestión de toxinas como el tetracloruro de carbono, enfermedades víricas como las hepatitis infecciosas, obstrucción de los conductos biliares o procesos infecciosos en los conductos biliares (Guyton y Hall, 2001).

Además, a veces el sistema porta se tapona por un gran coágulo que surge dentro de la vena porta o de sus ramas principales. Si la obstrucción se establece de manera repentina, se dificulta enormemente el retorno a la circulación sistémica de la sangre del intestino y del bazo por el sistema portal

del hígado y la presión capilar dentro de la pared intestinal se eleva de 15 a 20 mm Hg por encima de lo normal (Guyton y Hall, 2001).

1.5 Funciones del hígado.

El hígado es un órgano muy versátil, debido a que mantiene una posición estratégica entre la circulación intestinal y general, y albergando de acuerdo con sus dimensiones, gran cantidad de sangre y líquido extracelular, el hígado ejerce una influencia principal sobre el volumen y constituyentes de la sangre circulante. El hígado actúa como una esponja que puede llenarse, congestionarse, o vaciarse y causar una sobrecarga a la circulación pulmonar (Netter, 1981).

La acción de filtro del hígado se deriva también de su peculiar localización anatómica, ya que todos los elementos nutritivos, así como materias nocivas absorbidas por los intestinos, son aportados al hígado a través del sistema portal (Netter, 1981).

El epitelio hexagonal de las células hepáticas tiene funciones múltiples y de las más diversificadas. Las células hepáticas son el lugar de las transformaciones químicas que elaboran los constituyentes del organismo a partir de los alimentos o de sus productos de desdoblamiento o digeridos, y que correlaciona las tres principales categorías de materias corporales orgánicas, por lo que la totalidad de las células hepáticas se convierten en un gran reservorio metabólico (Netter, 1981).

1.5.1 Almacenamiento de vitaminas.

En los seres humanos, el hígado actúa como el principal depósito de vitamina A, tanto que podría prevenir su deficiencia por 10 meses. El retinol (vitamina A preformada) se transporta del hígado a otros sitios del cuerpo mediante una proteína específica, la proteína fijadora de retinol (PFR). La carencia de esta proteína puede influir en el estado de la vitamina A y reducir la síntesis de la PFR (Netter, 1981).

También almacena (aunque en cantidades menores) vitamina B12 y vitamina D, pudiendo prevenir su deficiencia por 12 y 4 meses, respectivamente.

1.5.2 Elaboración de bilis.

La función secretora de este órgano consiste en la elaboración y eliminación de la bilis por las vías biliares, ésta es elaborada también por las células epiteliales hepáticas y contiene los pigmentos biliares característicos, que son las bilirrubinas, las sales de ácidos biliares, el colesterol y otros numerosos componentes. Se excreta en los capilares biliares, abandona el hígado a través del sistema de conductos biliares intrahepáticos y alcanza el duodeno a través de los conductos biliares extrahepáticos (Netter, 1981).

1.5.3 Metabolismo de los carbohidratos.

Dentro del metabolismo de los carbohidratos, el hígado es especialmente importante para el mantenimiento de la glucemia dentro de los límites normales. El almacenamiento de glucógeno permite al hígado extraer el exceso de glucosa en sangre, almacenarlo y luego devolverlo a la sangre cuando la glucemia empieza a descender de manera peligrosa. Ésta es la función amortiguadora de la glucosa del hígado (Guyton y Hall, 2001).

La gluconeogénesis hepática se ocupa, por su parte, del mantenimiento de la glucemia dentro de la normalidad, puesto que sólo se activa de forma importante cuando la concentración de glucosa desciende por debajo de los valores normales. Entonces, grandes cantidades de aminoácidos y de glicerol de los triglicéridos se convierten en glucosa y contribuyen a mantener la glucemia de forma relativamente normal (Guyton y Hall, 2001).

1.5.4 Metabolismo de las grasas.

Casi todas las células del organismo metabolizan las grasas, pero algunos aspectos de este metabolismo tienen lugar, sobre todo, en el hígado.

Para extraer energía de las grasas neutras, primero se escinde la grasa en glicerol y ácidos grasos y luego se catabolizan los ácidos grasos mediante la β -oxidación en radicales acetilo de dos carbonos que forman la acetil-coenzima A (acetil-CoA). Ésta, a su vez, ingresa en el ciclo del ácido cítrico para oxidarse y liberar cantidades ingentes de energía. La β -oxidación puede realizarse en todas las células del organismo, pero sobre todo y de manera rápida en las del hígado. El hígado, por sí mismo, no puede utilizar toda la acetil-CoA formada;

en su lugar, la acetil-CoA se transforma en ácido acetoacético, un ácido muy soluble, por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA. El ácido acetoacético de las células hepáticas pasa al líquido extracelular y es transportado por el organismo y absorbido por los demás tejidos. Estos tejidos reconvierten, por su lado, el ácido acetoacético en acetil-CoA, y luego la oxidan de la manera acostumbrada. A través de estos mecanismos, el hígado se responsabiliza de una porción esencial del metabolismo de las grasas (Guyton y Hall, 2001).

Cerca del 80% del colesterol que se sintetiza en el hígado se convierte en sales biliares que se segregan a la bilis; el resto se transporta por la sangre con las lipoproteínas por la sangre hacia las células de los tejidos. Los fosfolípidos también se sintetizan en el hígado y se transportan sobre todo con las lipoproteínas. Las células utilizan el colesterol y los fosfolípidos para formar las membranas, las estructuras intracelulares y numerosas sustancias químicas esenciales para el funcionamiento celular.

1.5.5 Metabolismo de proteínas.

La síntesis hepática de urea elimina el amoníaco de los líquidos corporales. Mediante la desaminación se producen grandes cantidades de amoniaco. Así pues, si falla el hígado para sintetizar urea, la concentración plasmática de amoníaco se eleva con rapidez y provoca un coma hepático y la muerte (Guyton y Hall, 2001). En principio, casi todas las proteínas del plasma, con excepción de algunas gammaglobulinas, se forman en las células del hígado, es decir, alrededor del 90% de todas las proteínas plasmáticas. Por otro lado, las sustancias formadas en el hígado para la coagulación son el fibrinógeno, la protrombina, la globulina aceleradora, el factor VII y algunos otros factores (Guyton y Hall, 2001).

1.5.6 Detoxificación de toxinas y fármacos.

La función de detoxificación del hígado es realizada por una variedad de reacciones químicas tales como la oxidación, la metilación, la acetilación, la esterificación y la conjugación con ácido glucurónico y glicina, de las cuales

especialmente la última ha sido utilizada en el diagnóstico funcional de las enfermedades del hígado (Netter, 1981).

1.6 Daño hepático.

1.6.1 Cirrosis hepática.

La cirrosis es una enfermedad crónica del hígado en la cual ocurren una destrucción difusa y una regeneración de las células del parénquima hepático y en donde un incremento difuso del tejido conectivo trae como consecuencia una desorganización de la arquitectura lobular y vascular (Schiff y Schiff, 1993). Se caracteriza por la presencia de los nódulos de hepatocitos regenerativos rodeados por bandas de tejido fibroso y puesto que la masa hepatocelular está disminuida y que los nódulos tienen relaciones anormales con los vasos sanguíneos y conductos biliares, la función hepática está alterada.

1.6.2 Clasificación.

La cirrosis se puede clasificar de acuerdo a criterios morfológicos, histológicos y etiológicos (Schiff y Schiff, 1993). La clasificación morfológica simplemente caracteriza la apariencia externa del hígado (Tabla 1). El diagnóstico morfológico se realiza mediante la cirugía, la laparoscopia, o la autopsia (Schiff y Schiff, 1993). La utilidad de esta clasificación es que permite el estudio epidemiológico y lo correlaciona con el agente etiológico (Schiff y Schiff, 1993).

Morfológica	Micronodular Macronodular Mixta
Histológica	Portal Postnecrótica Posthepática Obstrucción biliar Obstrucción del flujo venoso
Etiológico	Alcohol Hepatitis viral Obstrucción biliar Obstrucción del flujo venoso Hemocromatosis

Tabla 1. Clasificación de la cirrosis.

1.6.2.1 Cirrosis micronodular.

La cirrosis micronodular se caracteriza por la uniformidad en el tamaño de los nódulos, los cuales casi todos tienen menos de 3 mm de diámetro. Estos micronódulos carecen de organización lobular normal y están alrededor del tejido fibrótico.

La cirrosis micronodular se ve en el alcoholismo crónico, la obstrucción biliar, la hemocromatosis, la obstrucción del flujo venoso, etc. (Schiff y Schiff, 1993) (Fig 3a).

1.6.2.2 Cirrosis macronodular.

La cirrosis macronodular se caracteriza por una variación en el tamaño de los nódulos, muchos de ellos rebasan los 3 mm de diámetro y pueden medir varios centímetros de un extremo a otro (Schiff y Schiff, 1993).

Hay dos subtipos de cirrosis macronodular, en una el hígado está cicatrizado de manera grotesca y los grandes nódulos están alrededor del extenso septo fibrótico. En este tipo postnecrótico de cirrosis, numerosas triadas portales pueden agruparse, como consecuencia del colapso de las grandes áreas del parénquima necrótico. En el otro tipo, también llamado posthepatítico, los macronódulos están separados por escasas fibras que conectan áreas individuales con otras.

Se piensa que este tipo de cirrosis ocurre después de un solo episodio de necrosis en lugar de periodos repetitivos. El tiempo medio requerido para la conversión de la cirrosis micronodular a la cirrosis macronodular es alrededor de 2 años (Fig 3b).

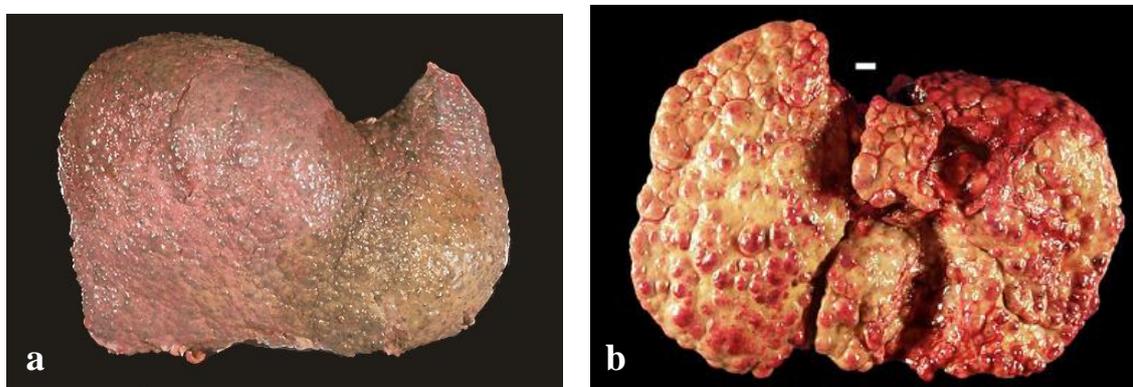


Figura 3. (a) Cirrosis micronodular y (b) cirrosis macronodular.

1.6.2.3 Cirrosis mixta.

El término de cirrosis mixta es utilizado cuando ambos tipos de cirrosis, macronodular y micronodular están presentes.

La cirrosis hepática puede ser asintomática si la disminución de la reserva funcional del hígado es suficiente para los requerimientos metabólicos habituales (cirrosis compensada). En el examen físico se encuentra generalmente una alteración del tamaño y de la consistencia del hígado (Schiff y Schiff, 1993).

La mayoría de los pacientes consulta al médico a raíz de manifestaciones de insuficiencia hepática (cirrosis descompensada) como ictericia, adelgazamiento, encefalopatía, hipoalbuminemia etc, o de la alteración circulatoria del hígado (hipertensión portal) como ascitis, sangrado por várices esofágicas, etcétera.

1.6.2.4 Cirrosis biliar primaria.

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida que afecta principalmente a las mujeres de edad media, se caracteriza por una colangitis destructiva segmental, crónica y no supurativa que envuelve los pequeños septos y ductos biliares interloburales del árbol biliar intrahepático. El daño continuo permite la colestásis y la fibrosis portal, y eventualmente, a la cirrosis biliar.

Pacientes con CBP frecuentemente exhiben enfermedades autoinmunes concomitantes. Esto, junto con una larga lista de anormalidades inmunes humorales y celulares, fuertemente implica una etiología autoinmune. 95% de los pacientes con CBP exhiben anticuerpos contra antígenos mitocondriales, anticuerpos dirigidos contra las enzimas metabólicas localizadas en el interior de la membrana mitocondrial. Nueve tipos de antígenos mitocondriales, denominados M1-M9, han sido identificados, pero sólo el subtipo M2 es específico para la CBP (Arias, 2001).

1.6.2.5 Cirrosis biliar secundaria

La cirrosis biliar secundaria se produce después de un largo periodo de obstrucción del árbol biliar extrahepático con estasis biliar (colestasis) en los

colangiomas, en donde la bilis forma trombos que se impactan en ellos causando inflamación con fibrosis que da paso a la cirrosis (Belmont, 1996).

La fisiopatología de la cirrosis puede ser explicada por la alteración de la circulación hepática causada por la presencia de tabiques fibrosos y de nódulos regenerativos, siendo el resultado neto una disminución del flujo sanguíneo efectivo en el parénquima hepático. Por una parte, los tabiques fibrosos que unen las áreas portales y las venas hepáticas terminales del acino (correspondiente al área o vena central del lobulillo hepático clásico) permiten que la sangre fluya directamente desde la arteriola hepática y vénula porta, en el espacio porta, hacia las venas centrales. Por otra parte, los nódulos comprimen las venas hepáticas y los sinusoides, determinando un aumento de la resistencia al flujo y la hipertensión portal. A consecuencia de esto, se abren colaterales extra hepáticas entre la circulación portal y la sistémica, motivo por el cual parte de la sangre portal no pasa por el hígado. La disminución del flujo sanguíneo hepático efectivo resulta en una disminución de la función hepática normal (insuficiencia hepática). Todas las funciones del hígado pueden ser alteradas por la cirrosis (síntesis de proteínas, de lípidos y de glucógeno, excreción de la bilirrubina y sales biliares, la detoxificación del amoníaco y los fármacos, etcétera) (Schiff y Schiff, 1993).

La hipertensión portal conduce al desarrollo de circulación colateral, entre el sistema venoso portal y el de la vena cava, en sitios donde ambos se comunican. Esto tiene como consecuencia el desarrollo de várices esofágicas, hemorroides y dilatación de las venas periumbilicales. El desarrollo de várices esofágicas es una complicación grave, por cuanto pueden romperse y sangrar, lo que conduce a una hemorragia digestiva con alta letalidad. También se produce esplenomegalia, que se acompaña de un aumento de la función esplénica (hiperesplenismo) conllevando a la anemia, la leucopenia y la trombocitopenia. Por otra parte, el cortocircuito de la sangre que determina la circulación colateral tiene consecuencias metabólicas como la encefalopatía y favorece el ingreso al organismo de material extraño, como bacterias y endotoxinas (Schiff y Schiff, 1993).

La encefalopatía hepática es un síndrome neuro-psiquiátrico secundario a la enfermedad hepática, que se produce por la acción de las sustancias

tóxicas sobre el cerebro, destacando entre ellas el amoniaco, que provienen de la circulación portal y que en condiciones normales son metabolizadas en el hígado. Normalmente la mayoría del amoniaco se forma en el intestino a partir de la acción de las bacterias intestinales sobre las proteínas y sobre la urea que difunde hacia el intestino. Diversos factores pueden aumentar el amoniaco sanguíneo en la cirrosis hepática:

- a) La insuficiencia hepática disminuye la síntesis de urea y la remoción de amoniaco.
- b) Las colaterales venosas porto sistémicas, secundarias a la hipertensión portal, determinan que parte del amoniaco escape del metabolismo hepático.
- c) La excesiva cantidad de material nitrogenado en el intestino (proteínas, sangre) produce un aumento de la producción de amoniaco por acción bacteriana.
- d) La alcalosis metabólica y la hipoalcalemia determinan un aumento de la producción de amoniaco por los riñones (Schiff y Schiff, 1993).

Otra complicación grave de la hipertensión portal es el desarrollo de la ascitis. Los factores que participan en la formación de ascitis son múltiples e interdependientes. El más importante es la hipertensión portal. Su efecto, sumado a la hipoalbuminemia, determina un aumento de la transudación de líquido hacia la cavidad peritoneal. Este desequilibrio es perpetuado por el aumento de la reabsorción renal de sodio y agua. Esta participación del riñón es mediada por las hormonas cuyo aumento está determinado por la hipertensión portal y en menor grado por la insuficiencia hepática (renina-angiotensina-aldosterona y otros factores hormonales). La infección del líquido ascítico es frecuente, causando peritonitis espontánea (Schiff y Schiff, 1993).

1.7 Cirrosis hepática en México.

La cirrosis hepática constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a su alta morbilidad y mortalidad. Las tasas de defunción más elevadas se registran en Moldovia (91 por 100,000 habitantes) y Hungría (85 por 100,000 habitantes), mientras que las cifras más bajas, entre 3 y 5 por 100,000 habitantes, corresponden a Irlanda, Colombia, Holanda, Singapur, Israel y Noruega. En algunos países de América Latina como Chile y México, la

cirrosis hepática ocupa, entre el 5º y 6º lugar de la causa de muerte general (Varvasovszky et al., 2000; Campollo et al., 1997; Narro-Robles et al., 1992 y Medina et al., 2002).

La cirrosis hepática es la sexta causa de muerte general y la tercera en hombres de 23 a 64 años de edad en México, es cuatro veces mayor en nuestro país que en los Estados Unidos, ya que en México se registran por esta causa, 48.6 fallecimientos por cada cien mil habitantes y en la Unión Americana 11.6 (Boletín de prensa IMSS, 2003).

Aunque la cirrosis de origen infeccioso y nutricional ha crecido en los años recientes, la exposición al consumo de alcohol explica un poco más del 50% de las muertes por esta causa, esto sin considerar que un cierto porcentaje de la cirrosis de causa no especificada puede también estar asociado al consumo de alcohol.

1.8 Citocinas y daño hepático

Las citocinas son péptidos regulatorios, pleiotrópicos que pueden ser producidos por muchas de las células nucleadas en el cuerpo (Dinarello, 1996; Tracey y Cerami, 1993). Éstas actúan como mediadores de la inflamación, la muerte de las células hepáticas, la colestasis y la fibrosis (Tilg y Diehl, 2000; Orange et al., 1997), pero paradójicamente también median la regeneración del hígado después de un daño (Akerman et al., 1992; Yamada y Fausto, 1998; Cressman et al., 1996). El hígado es un órgano importante en el metabolismo de citocinas, con la capacidad tanto de producirlas como de removerlas. Todas las células residentes del hígado son capaces de producir citocinas (Simpson et al., 1997). En los humanos, las citocinas son piezas claves en la fisiología hepática de dos procesos opuestos: en el establecimiento y la progresión del daño, así como también al curso de la regeneración (Simpson et al., 1997).

1.8.1. Tipos de citocinas

Este trabajo se enfocará en tres tipos de citocinas: la IL-6, la IL-10 y el TGF- β .

1.8.1.1 Interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 es una molécula con muchas de sus acciones sistémicas semejantes a las de la IL-1 β y el TNF- α , por lo que se le considera mayoritariamente pro inflamatoria. La IL-6 puede ser detectada en la circulación sanguínea durante la infección de gérmenes Gram negativos y se sabe que esta citocina estimula a los hepatocitos para que produzcan varias proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, complementando con ello la respuesta de fase aguda.

La IL-6 es una interleucina de aproximadamente entre 21 a 28 kDa sintetizada en respuesta a la acción de la IL-1 o el TNF- α así como por los fagocitos mononucleares, las células del endotelio vascular y los fibroblastos. Ejerce su actividad biológica a través de un receptor de membrana compuesto por dos subunidades denominadas gp80 y gp130 (Dinarello et al., 1991).

1.8.1.2 Interleucina-10 (IL-10)

La IL-10 es una proteína de 20 kDa producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T, células B, células dendríticas, células troncales y varias líneas celulares tumorales. Es una citocina con capacidad antiinflamatoria, pudiendo inhibir la síntesis de la IL-1, la IL-6 y el TNF- α (Li & He, 2004). Esta citocina posee las más amplias propiedades desactivantes sobre macrófagos y monocitos (Thompson et al., 1998), actúa sobre la producción de citocinas, la inducción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibe la síntesis de eicosanoides; además, posee propiedades hepatoprotectoras marcadas (Nelson et al., 2000).

1.8.1.3 Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)

El TGF- β 1 es la citocina profibrogénica más potente y conocida encargada de la activación de las HSC. Los efectos de esta citocina son clásicamente mediados por la vía de señalización intracelular vía proteínas SMAD (Parson et al., 2007). Al favorecer la activación de las HSC, el TGF- β incrementa la síntesis de colágena tipo I y III y otras proteínas de matriz extracelular. También incrementa la síntesis de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP) e inhibe la producción de las metaloproteinasas

(MMP), originando la acumulación de colágena en los sitios de lesión hepática (Arthur, 2000). El TGF- β 1 no sólo participa en la activación de las HSC, sino que también incrementa la expresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), por lo que indirectamente está involucrado en la proliferación de las HSC. Por último, esta citocina prolonga la sobrevivencia de las HSC al reducir la apoptosis (Saile, 1999).

1.9 Estrés oxidativo y daño hepático

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Dentro de este concepto, las formas parcialmente reducidas de oxígeno se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS), que es un término colectivo que incluye no sólo a los radicales de oxígeno, si no también a algunos derivados no radicales de oxígeno (Muriel, 2009). El estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre las moléculas oxidantes y las moléculas antioxidantes (Muriel, 2009). El estrés oxidativo generado puede causar daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, por lo tanto, las enzimas y las proteínas estructurales, las membranas celulares, el ADN y el ARN, son todos ellos susceptibles al daño oxidativo (Sies, 1985). Los sistemas biológicos poseen varios mecanismos productores de estas especies reactivas. Dentro de los sistemas endógenos, uno de los mecanismos más importantes de producción de radicales libres es la cadena respiratoria mitocondrial, pero existen otros como los mecanismos de la acción bactericida de los leucocitos y los macrófagos, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos y las reacciones catalizadas por el citocromo P450 (Beckman y Ames, 1998). Entre los mecanismo exógenos que participan en la generación de radicales libres se encuentran a los procesos de biotransformación de xenobióticos, las radiaciones ionizantes de alta energía, la radiación solar y el humo del tabaco, por mencionar algunos.

1.9.1 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar las ROS y así tratar de mantener el equilibrio entre los oxidantes y antioxidantes (Hefner y Repine, 1989; Evans y Halliwell, 2001).

La gran diversidad en la vida media de los distintos prooxidantes, desde los nanosegundos para el caso del radical hidroxilo, hasta varios segundos para los radicales peroxilo pone en evidencia la gran variedad de sistemas de defensa antioxidante necesarios para hacerles frente (Sies y Stahl, 1995).

Los mecanismos de defensa pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos.

1.9.2 Antioxidantes enzimáticos

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las ROS ($O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2). En este grupo encontramos a tres enzimas:

CATALASA (CAT): es una hemoproteína tetramérica cuya función es reducir el peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua (Nohl y Hegner, 1978).

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD): Son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno (Weiss, 1986).

GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx): Complementa la actividad de la catalasa como sistema reductor del peróxido de hidrogeno. Esta enzima clave del ciclo del glutatión actúa además sobre grandes moléculas de peróxidos lipídicos y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la lipooxigenasa.

1.9.3 Antioxidantes no enzimáticos

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula cuenta con un conjunto de mecanismos no enzimáticos que permiten contrarrestar el daño oxidativo causado por los radicales libres.

VITAMINA C.

La vitamina C o el ácido L-ascórbico es hidrosoluble, y bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas se encuentra en su forma desprotonada. Se le considera un antioxidante muy importante en los fluidos extracelulares (Stocker et al., 1991). Actúa eficientemente atrapando los radicales peroxilo en fase acuosa, antes de que éstos puedan iniciar la peroxidación lipídica. Además, la vitamina C puede llevar a cabo esta protección frente a la peroxidación aumentando la actividad del α -tocoferol (Sies y Stahl, 1995).

GLUTATIÓN.

El glutatión es un tripéptido ubicuo, γ -glutamil-cisteinil-glicina. Es el tiol no proteico, soluble en el citoplasma, más abundante en la célula y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula del glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por dos moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) (De Leve y Kaplowitz, 1991). Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol. El 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplásmico (Meredith y Reed, 1982). Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es 3:1, en el citoplasma y en la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1 (Meredith y Reed, 1982). Centrándonos en su función antioxidante, el GSH en presencia de la GSH-selenio peroxidasa dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena, como resultado de esto, el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

VITAMINA A y β -CAROTENOS.

La vitamina A y sus derivados biológicamente activos, retinal y ácido retinoico, junto con un gran número de análogos sintéticos comprenden el grupo de compuestos denominados retinoides (Evans y Kaye, 1999). La vitamina A es esencial para la visión, la diferenciación y la proliferación celular,

la reproducción, el normal desarrollo neonatal y la integridad del sistema inmune. Su naturaleza lipofílica hace que la vitamina A sea un compuesto efectivo en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidor de las reacciones en cadena (Evans y Kaye, 1999).

VITAMINA E.

El tocoferol es el compuesto principal de esta vitamina, corresponde químicamente a un derivado metil-6-hidroxicromano, con una cadena alifática de 16 carbonos laterales. La vitamina E se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, de éstos las grasas y aceites contienen más vitamina E. Otras fuentes son los cereales, aves, carnes, pescados, etc.

Esta vitamina tiene diversas funciones metabólicas, entre ellas tal vez la más importante y mejor estudiado es el papel protector de las membranas biológicas, ya sea evitando la oxidación de sus componentes celulares esenciales o evitando la formación de productos tóxicos de oxidación como los peróxidos de ácidos grasos, actuando así como estabilizador de la estructura lipídica de los tejidos (Evans y Kaye, 1999).

1.10 Modelos experimentales de daño hepático.

Los modelos de daño hepático pueden proveer herramientas útiles para el estudio de la histopatología humana. Casi todas las lesiones agudas o crónicas del hígado pueden ser inducidas experimentalmente. Estas incluyen necrosis (local, masiva o difusa), esteatosis, lesión venular hepática, y cirrosis de diferentes tipos morfológicos. Lesiones específicas tales como los cuerpos acidofílicos “libres” sinusoidales (cuerpos apoptóticos), anormalidades nucleares y nucleolares, y megalocitos pueden ser producidos por diferentes modelos experimentales de daño hepático. Un proceso de colestasis también puede ser producido experimentalmente (Muriel, 2007).

1.10.1 Modelo de daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común (LCBC).

En 1984, Kountouras y colaboradores, reportaron un estudio sistemático de una ligadura del conducto biliar común (LCBC) como un modelo de cirrosis

en la rata. Las ratas eran sujetas a una doble ligadura del conducto biliar común, con un corte entre las dos ligaduras. Los animales eran estudiados después de 5 a 52 días de la LCBC. Después de 5 días de la LCBC se produjo la proliferación de los conductos biliares, edema leve y una reacción inflamatoria en el área portal. La fibrosis fue leve y limitada a las regiones donde había formaciones de ductos biliares nuevas. También se observó un ligero infiltrado de leucocitos y neutrofilos alrededor de los ductos biliares. Los hepatocitos contenían figuras mitóticas numerosas y también se observaron áreas necróticas en ellos. La LCBC durante 10 días o más estuvo acompañada por fibrosis y la proliferación del conducto biliar hasta el área portal. La obstrucción biliar durante 15 días indujo la producción de septos fibrosos desde las áreas portales hasta el interior de los lóbulos. Después de 28 días de la obstrucción del flujo biliar, la mayoría de los animales presentaban una cirrosis. Todas las ratas ligadas por 30 días o más mostraron una cirrosis acompañada de ascitis (Kountouras, et al., 1984). Como se mencionó anteriormente, el método más comúnmente utilizado para inducir una cirrosis experimental es la administración crónica de CCl_4 este modelo comparte diversas características con la cirrosis alcohólica en los humanos, pero también muestra algunas diferencias importantes (Pérez-Tamayo, 1983). Además, la respuesta individual de los animales es variable, la mortalidad es alta y el método es relativamente largo, ya que toma de 8-12 semanas producir la cirrosis (Muriel et al., 2005). Además, en la actualidad la intoxicación con CCl_4 en el hombre es poco común. En el modelo de la LCBC, los cambios morfológicos son comparables con los de una cirrosis biliar humana. También, en el modelo de la LCBC no se requiere una bioactivación previa de alguna toxina exógena, como en el caso del CCl_4 . Este modelo de obstrucción parece tener algunas ventajas sobre el de CCl_4 y puede ser una herramienta útil para el estudio de la cirrosis humana (Fernández-Martínez et al., 2006) y para probar posibles fármacos antifibróticos (Fernández-Martínez et al., 2001).

1.10.2 Modelo de reversión del daño hepático inducido por la administración del CCl₄.

El tetracloruro de carbono (CCl₄) ha sido utilizado extensamente como disolvente, así como limpiador tanto industrial como de uso doméstico. Hoy en día, el CCl₄ muestra ser un modelo muy útil para el estudio de ciertos efectos hepatotóxicos (Muriel, 1997; Muriel et al., 2003; Moreno y Muriel, 2006). Este agente consistentemente produce daño hepático en muchas especies, incluyendo primates no humanos.

La toxicidad inducida con CCl₄, dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, cubre una variedad de efectos. A bajas dosis prevalecen efectos transitorios, como la pérdida de la homeostasis de Ca²⁺ (Muriel y Mourelle, 1990), la peroxidación lipídica (Muriel, 1997), la liberación de citocinas nocivas y benéficas (Kyung-Hyun et al., 2006; Muriel, 2007), y los eventos apoptóticos seguidos por una regeneración. Otros efectos, con altas dosis o un tiempo largo de exposición, son más serios y se desarrollan en periodos largos de tiempo, como la degeneración de ácidos grasos, la fibrosis, la cirrosis, e incluso el cáncer. Además, la intoxicación aguda con altas dosis de CCl₄, cuando la necrosis hepatocelular excede la capacidad regenerativa del hígado, resulta en una falla fatal del hígado. Dosis extremas de CCl₄ resultan en una depresión del sistema nervioso central, la falla respiratoria y la muerte (Berger et al., 1986).

El metabolismo del CCl₄ comienza con la formación del radical libre triclorometilo, CCl₃•, por la acción del sistema citocromo P450 oxigenasa del retículo endoplásmico. Este proceso involucra una ruptura reductiva de un enlace carbono-cloruro. Ha sido observada la activación del radical libre del CCl₄ en la mitocondria y puede contribuir significativamente a su toxicidad. La isoenzima del citocromo principal que ejecuta la biotransformación del CCl₄ es el CYP2E1, pero se ha visto que el CYP2B1 y el CYP2B2 transforman también la molécula de CCl₄. En el hombre, el CYP2E1 domina el metabolismo del CCl₄, pero altas concentraciones de CCl₄, otros citocromos, particularmente el CYP3A también contribuyen importantemente. El radical triclorometilo, CCl₃•

reacciona con varias sustancias biológicas como ácidos grasos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y aminoácidos (Muriel, 2007).

El radical triclorometilo, en presencia de oxígeno es transformado en el radical triclorometil peroxil, $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$. Este radical es más reactivo y tiene un tiempo de vida más corto que el radical $\text{CCl}_3\bullet$. El tiempo de vida del radical $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$ está en un intervalo de milisegundos y desaparece del tejido al reaccionar con sustratos adecuados que completen su par de electrones. Es más probable que el radical $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$ atrape hidrógenos de los ácidos grasos poliinsaturados, que el radical $\text{CCl}_3\bullet$ permitiendo la peroxidación lipídica. La sustracción de hidrógenos de los ácidos grasos poliinsaturados comienza una serie de reacciones que finaliza en la completa desintegración de las moléculas de ácidos grasos con la consecuente formación de aldehídos, carbonilos y alcanos en un proceso llamado peroxidación lipídica. Es importante señalar que la peroxidación lipídica puede producir daño, comprometiendo la integridad de la membrana y por la unión covalente de intermediarios reactivos a moléculas biológicas importantes (Muriel, 2007).

Los productos de la peroxidación lipídica pueden producir un daño hepático adicional. Estos pueden inhibir enzimas, dañar al DNA, y bloquear la secreción de lipoproteínas. Los aldehídos reactivos aparecen en el hígado cerca de 6 horas después de la intoxicación, mostrando un máximo a las 24 horas, y desaparecen 36 o 76 horas después (Muriel, 2007).

La reactividad de aldehídos, en especial del 4-OH-2,3-trans-nonenal, se ve favorecida y se forman a altas concentraciones después de la exposición de las células al CCl_4 . Estos compuestos inhiben varias enzimas incluyendo la adenilato ciclasa. También hay evidencia de que el 4-hidroxinonenal disminuye la actividad del citocromo P450, e inhibe la actividad de las ATPasas de Ca^{2+} y de la Na^+/K^+ , y la actividad de las fosfatasa y las proteínas cinasas. Los efectos de los haloalcanos derivados del CCl_4 en las actividades de estas enzimas pueden contribuir a la toxicidad inducida por CCl_4 (Muriel, 2007).

También es bien conocido que el CCl_4 incrementa los niveles de calcio intracelular en los hepatocitos. Este efecto compromete la disponibilidad de la célula porque la concentración de calcio intracelular es mantenida cerca de

cuatro órdenes de magnitud más bajo que el del espacio extracelular (Muriel, 2007).

Un efecto temprano se observa sólo 15 minutos después de la administración de CCl_4 en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico de los hepatocitos por que el sistema uniporte mitocondrial y del retículo endoplásmico y la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico llega a inactivarse, lo cual incrementa el Ca^{2+} citosólico. Como sea, las mitocondrias y el retículo endoplásmico pueden ser responsables de determinar los niveles de calcio intracelular en periodos cortos, pero estos organelos no pueden continuar acumulando calcio dentro de ellos mismos indefinidamente, en periodos largos la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática puede ser responsable de mantener el nivel máximo de calcio dentro de la célula y el CCl_4 inhibe fuertemente la actividad de la ATPasa. Un aumento en los niveles de Ca^{2+} en las estructuras destruidas del citoesqueleto celular y la activación de varias enzimas catabólicas como las endonucleasas, proteasas y fosfolipasas, trae como resultado la muerte celular vía apoptosis o la necrosis (Muriel, 2007).

Lamson y Wing (1926) fueron los primeros en reportar que la intoxicación con CCl_4 producía cirrosis, después Cameron y Karanaratne publicaron un estudio que establecía la morfología y mostraba las condiciones experimentales estándar del modelo. Hoy en día, la cirrosis inducida con CCl_4 es el modelo más utilizado para reproducir cirrosis en ratas y ratones. Para producir una cirrosis experimental, es necesario dar dosis repetidas de CCl_4 sin importar el animal o la ruta de administración. El intervalo de tiempo entre cada dosis no debe ser muy largo, debido a que el hígado puede recuperarse del daño ya que en ese caso el efecto de la toxina no sería acumulativo (Cameron y Karunaratne, 1932; Muriel, 2007).

En nuestro laboratorio, la cirrosis es inducida en ratas Wistar macho con un peso inicial de aproximadamente 100g, el CCl_4 es disuelto en petrolato líquido y se administra tres veces por semana intraperitonealmente en una dosis de 0.4 g/kg de peso. La cirrosis se observa dos meses después y la severidad de la enfermedad se incrementa tras tres meses de tratamiento; y

después de cuatro meses la mortalidad es muy alta (arriba del 80%) (Muriel et al., 2005).

1.11 Marcadores de daño hepático.

Las pruebas de laboratorio, algunas veces referidas como pruebas de funcionamiento hepático, son útiles en la evaluación y el manejo de los pacientes con alguna disfunción hepática, ya que cumplen con varios objetivos. Primero, éstas proporcionan un método de exploración sensible y no invasivo para detectar la presencia de una disfunción hepática. Esto es particularmente importante en pacientes ictericos quienes pueden tener desórdenes como hepatitis, cirrosis, o una obstrucción parcial del conducto biliar. En segundo lugar, una vez que la presencia de la disfunción hepática es reconocida, las pruebas de laboratorio patrón nos permiten reconocer el tipo de desorden hepático en general. Por ejemplo, las pruebas de laboratorio usualmente permiten distinguir un desorden hepatocelular como la hepatitis viral, de síndromes colestáticos como una cirrosis biliar primaria, y una obstrucción del conducto biliar. En tercer lugar, las pruebas de laboratorio permiten evaluar la severidad de la disfunción hepática y ocasionalmente, permiten predecir el resultado temprano en el curso de la enfermedad. Finalmente, las pruebas de funcionamiento hepático permiten seguir el curso de la enfermedad, evaluar la respuesta al tratamiento y ajustar éste cuando sea necesario (Schiff y Schiff, 1993).

Estas pruebas se suelen agrupar en varias categorías generales:

- a) *Pruebas que detectan la capacidad del hígado para transportar diferentes aniones orgánicos y metabolizar diferentes compuestos:* Se incluyen en este grupo todas las bilirrubinas séricas, bromosulfaleína, verde de indocianina, ácidos biliares séricos, cafeína sérica, entre otras.
- b) *Pruebas que detectan daño a los hepatocitos:* En estas se incluyen todas las pruebas enzimáticas, de las cuales las aminotransferasas y la γ -glutamil transpeptidasa en suero son las más utilizadas; dentro de estas pruebas también se determina el grado de peroxidación lipídica, a través de la medición del malondialdehído, aunque no se trate de una determinación enzimática.

- c) *Pruebas que miden la capacidad biosintética del hígado:* Incluidas en este grupo están la albúmina sérica, el glucógeno, la ceruloplasmina, la ferritina- α , la antitripsina, las lipoproteínas y los factores de coagulación.
- d) *Pruebas que detectan inflamación crónica del hígado:* como las inmunoglobulinas, y auto-anticuerpos específicos, que aunque son proteínas sintetizadas por los linfocitos y no por los hepatocitos, se considera que son bastante específicas para ciertas enfermedades hepáticas (Schiff y Schiff, 1993).

1.11.1 Marcadores que detectan daño al hepatocito.

El hígado contiene miles de enzimas, algunas de las cuales también están presentes en suero a muy bajas concentraciones. Estas enzimas no tienen una función conocida en el suero y se comportan como otras proteínas séricas.

Estas pruebas enzimáticas séricas pueden ser agrupadas en dos categorías: 1) enzimas cuya elevación en suero reflejan daño generalizado a los hepatocitos, y 2) enzimas cuya elevación en suero reflejan colestasis.

Enzimas que detectan necrosis hepatocelular. Se considera que las aminotransferasas (o transaminasas) son indicadores sensibles de daño hepático y permiten el reconocimiento de enfermedades agudas hepatocelulares, como la hepatitis. Las determinaciones de las actividades enzimáticas más frecuentemente empleadas son: la alanina aminotransferasa (ALT), y la aspartato aminotransferasa (AST). Estas enzimas catalizan la transferencia de los grupos α -amino de la alanina y el aspártico, al ácido α -cetoglutarico, generándose los ácidos pirúvico y oxalacético, respectivamente. La AST se encuentra en hígado, corazón, músculo esquelético, y en menor concentración en riñones, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos, y eritrocitos; en tanto la ALT está presente en grandes concentraciones en hígado (Boyde y Latner, 1961; Rej, 1978). El aumento en los niveles séricos de estas enzimas se relaciona con el daño o la destrucción del tejido rico en aminotransferasas, o bien a cambios en la permeabilidad de la membrana que

permiten su salida. Normalmente, ambas transferasas se encuentran en suero, y sus valores son menores a 30 o 40 UI/L (Schiff y Schiff, 1993).

Las aminotransferasas suelen elevarse en todos los desórdenes hepáticos, como hepatitis crónica, cirrosis, mononucleosis infecciosas, insuficiencia hepática aguda y crónica, carcinoma metastático y alcoholismo (Zimmerman y West, 1963; Ellis, 1978). Los aumentos ocho veces por encima de los límites normales son inespecíficos, y pueden hallarse en cualquiera de los padecimientos antes mencionados. Las elevaciones más altas se encuentran asociadas a la lesión hepatocelular extensa, como en el uso de drogas, hepatitis viral, insuficiencia hepática aguda o en la exposición a hepatotóxicos como el CCl₄. Los valores de ALT y AST pueden elevarse hasta el orden de los miles dentro de las primeras 24 o 48 horas después de una obstrucción aguda, pero rápidamente declinan a sus valores normales; igualmente se elevan en la mayoría de las entidades hepatobiliares, aunque la ALT parece ser más sensible y específica en el daño agudo hepatocelular que la AST, por lo que suele emplearse para conocer la incidencia de la hepatitis viral en estudios epidemiológicos (Schiff y Schiff, 1993).

Hay que señalar que se considera que existe una correlación pobre entre la extensión de la necrosis del tejido hepático y la elevación de las aminotransferasas, puesto que puede tener poco valor diagnóstico la disminución de los valores séricos en la hepatitis fulminante, ya que sólo reflejaría la destrucción masiva y la pérdida de hepatocitos viables.

Enzimas que detectan colestasis. Entre estas se encuentran la γ -glutamil transpeptidasa.

γ -glutamil transpeptidasa. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo γ -glutamil de los péptidos γ -glutamil, tal como el glutatión a otros péptidos y L-aminoácidos. Dentro de los métodos utilizados para su determinación, se usa a la γ -L-glutamil-p-nitroanilida como sustrato y a la glicilglicina como aceptor, liberándose el grupo cromógeno p-nitroanilida que puede ser medido espectrofotométricamente. La enzima se encuentra presente en muchos tejidos incluidos los riñones, el páncreas, el hígado, el bazo, el corazón y las vesículas seminales; se considera que participa en el transporte de aminoácidos, a través de las membranas como parte del ciclo del γ -glutamil (Schiff y Schiff, 1993).

La actividad sérica se encuentra elevada en las enfermedades hepáticas, de las vías biliares y del páncreas, de la misma manera como se ve afectada la fosfatasa alcalina, la leucina aminopeptidasa y la 5'-nucleotidasa, aunque algunos autores consideran más sensible a la γ -glutamyl transpeptidasa que a las otras (Lum y Gambino, 1972). El mayor valor clínico recae en el hecho de su especificidad orgánica, ya que no aumenta en enfermedades óseas, como la fosfatasa alcalina (Betro, 1973; Lum y Gambino, 1972).

1.11.2 Marcadores que evalúan la capacidad de biosíntesis del hígado.

Glucógeno.

El hígado actúa como el mayor almacén de carbohidratos en forma de glucógeno y juega un papel importante en el mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre por medio de la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Guyton y Hall, 2001).

El glucógeno hepático es cuantificado en muestras de hígado por medio de la técnica de la antrona con la que reacciona en un medio ácido y desarrolla una reacción colorida (Seifter et al., 1950). Durante el daño hepático la disfuncionalidad hepática para sintetizar glucógeno es observable y en pocas horas la cantidad de glucógeno hepático disminuye severamente.

1.11.3 Marcadores que evalúan el daño oxidativo del hígado.

Peroxidación lipídica. Es bien conocido el papel que juega el oxígeno en las células vivas, sin embargo también se ha demostrado que puede ser una de las causas de la muerte celular. Durante el metabolismo normal del oxígeno en plantas y animales superiores, la mitocondria produce constantemente una pequeña cantidad de radicales libres. Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones sin aparear en sus orbitales más externos, por lo que son muy reactivos. Suelen reaccionar con proteínas y lípidos alterando las funciones membranales, como en algunas condiciones patológicas y provocar la muerte celular. Los organismos son casi siempre capaces de atrapar estos radicales, ya que han desarrollado efectivos sistemas antioxidantes, pero no si son producidos en exceso.

Los lípidos poliinsaturados son parte estructural de las membranas, incluidas las membranas plasmáticas, del retículo endoplásmico y de la mitocondria; las alteraciones a sus propiedades estructurales tienen serias consecuencias sobre la función celular. Se ha considerado que el mayor impacto de los radicales libres es sobre los lípidos, ya que causan peroxidación de ellos, por lo que los métodos para medir el daño causado, generalmente se llevan acabo midiendo sus productos de reacción con los lípidos. Los radicales libres tienen gran afinidad por los enlaces covalentes ricos en electrones, tales como los que se encuentran en los ácidos grasos poliinsaturados, el resultado de esta reacción es la generación de un radical libre de los ácidos grasos poliinsaturados (Muriel, 1997). Una vez formado el radical libre, éste tiene varias posibilidades; puede tomar una configuración más estable que puede dar lugar a una reacción en cadena de peroxidación lipídica provocando así alteraciones en la fluidez membranal; otra posibilidad, es unirse a otro radical libre lipídico o bien a un antioxidante (atrapador de radicales libres) y formar un complejo no reactivo. A causa de la reactividad de los radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados, el proceso suele auto-propagarse, por lo que el resultado final es la ruptura de los componentes integrales celulares, lo que puede facilitar la unión adicional de otros radicales libres o bien de otros productos tóxicos. En el proceso de peroxidación lipídica se pueden dañar las células por efectos directos sobre las membranas celulares, la generación de segundos mensajeros o por la depleción del glutatión reducido (GSH), el cual predispone a las células al estrés oxidativo (Muriel, 1997).

Glutatión reducido (GSH).

El glutatión (γ -glutamilcisteínilglicina; GSH) es el antioxidante celular principal y se encuentra en concentraciones altas en la mayoría de las células de los mamíferos. El glutatión intracelular se mantiene en su forma tiol como glutatión reducido (GSH). El GSH tiene diversas funciones, participa en el metabolismo, transporte, catálisis (como coenzima), y mantiene la forma reducida de otras moléculas como la cisteína, coenzima A, y antioxidantes como el ácido ascórbico. El GSH participa enzimáticamente (por acción de la glutatión S-transferasa) y no enzimáticamente en la protección contra

compuestos tóxicos. Quizá una de las funciones más importantes es en la protección contra el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno, muchas de las cuales son generadas durante el metabolismo normal. El GSH puede reaccionar no enzimáticamente con especies reactivas de oxígeno catalizando la destrucción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos (Helmut, 1997).

El GSH es sintetizado intracelularmente por la acción consecutiva de la γ -glutamilcisteína (1) y la GSH sintetasa (2):



La síntesis de GSH es limitada por la disponibilidad de sustratos: la cisteína es usualmente el sustrato limitante (Helmut, 1997).

Actividad enzimática de la CAT y la GPx. Una forma de defensa ante el daño oxidativo hepático es a través de la remoción de peróxidos, en donde se incluyen tanto el peróxido de hidrogeno así como los hidroperóxidos lipídicos que son producidos durante la peroxidación lipídica. Enzimas como la CAT, que está localizada principalmente en los peroxisomas, actúa sobre el peróxido de hidrogeno, mientras que la GPx, concentrada en el citosol de las células, actúa tanto contra el peróxido de hidrogeno así como contra hidroperóxidos de ácidos grasos (Elvir, 1994).

1.11.4 Marcadores que evalúan el grado de fibrosis.

Colágena.

La fibrosis hepática ocurre en la lesión hepática crónica y se caracteriza por la producción excesiva y el depósito de componentes de la matriz extracelular (MEC), fundamentalmente de colágena de tipo I y tipo III. Las células estelares hepáticas (HSC) son las responsables de la producción excesiva de matriz extracelular durante la fibrosis. La activación de las HSC, constituye el paso fundamental del desarrollo de la fibrosis hepática y está mediada por citocinas específicas y especies reactivas de oxígeno que liberan los hepatocitos dañados, las células de Kupffer y las HSC activadas (Urtasun y Nieto, 2007).

Un rasgo fundamental de la activación de las HSC es la producción incontrolada de colágena tipo I y III con una escasa degradación. La colágena es una proteína heterotrimérica que se compone de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, formando una triple hélice (Urtasun y Nieto, 2007).

Estudios numerosos han demostrado que el hígado fibrótico humano o en el de la rata se pueden producir cantidades importantes de colágena (Rojkind y Pérez Tamayo, 1983), y suele acompañarse de cambios en las vías biosintéticas, como el incremento en las cantidades de prolina libre, en la concentración de ARNt, en el ARNm, para colágena tipo I y de otros tipos de colágena.

La colágena contiene fibras polipeptídicas que se componen de diversos aminoácidos unidos, entre los que se encuentran la prolina y la hidroxiprolina. La cuantificación de la hidroxiprolina por medio de una reacción con cloramina T y seguida de una reacción con el reactivo de Erlich, indica de la cantidad de hidroxiprolina presente y proporcionalmente de la presencia de colágena en la fibrosis desencadenada por el daño hepático (Urtasun y Nieto, 2007).

2. ANTECEDENTES DE LA N-ACETIL CISTEÍNA (NAC).

La NAC es el derivado acetilado del aminoácido L- cisteína y es un fármaco ampliamente utilizado en la clínica como el antídoto para la sobredosis de paracetamol (Millea, 2009), además es uno de los antioxidantes más extensamente investigados, ha mostrado efectos benéficos en varios estadios de enfermedades en las cuales los radicales libres han estado involucrados (Cotgreave, 1997; Tepel et al., 2000) (Fig. 4).

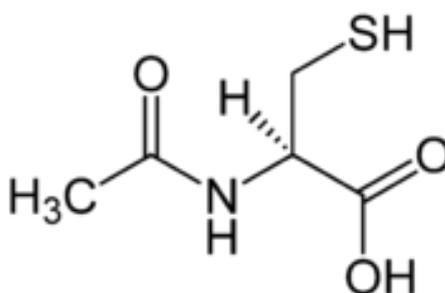


Figura 4. Estructura química de la N- acetil cisteína

Sus aplicaciones clínicas se deben a que este fármaco representa un aporte antioxidante para el organismo durante el estrés oxidativo que puede sufrir éste. La suplementación con NAC ha mostrado un incremento en los niveles de GSH, la defensa antioxidante más importante del cuerpo (Dekhuijzen, 2004). Tres son los aminoácidos que componen el GSH (glutamato, glicina y cisteína), de estos el aminoácido cisteína es el de más baja concentración intracelular (Dickinson, 2003). Debido a que la síntesis *de novo* del GSH es el mecanismo primario por el cual el glutatión es remplazado, la disponibilidad de la cisteína puede limitar el índice de la síntesis de GSH durante el estrés oxidativo (Dekhuijzen, 2004). Al corregir o prevenir la depleción, la NAC puede mejorar muchas enfermedades relacionadas con el daño oxidativo.

Estudios diversos han mostrado que la NAC es un agente con potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer (Kobrinisky et al., 2005), enfermedades cardiacas (Rodrigues et al., 2004), colitis (Akgun et al., 2005), y pancreatitis (Yagci et al., 2004), caracterizado por el daño oxidativo inducido por radicales libres.

Resultados obtenidos de estudios a corto plazo, utilizando dosis orales e intravenosas de NAC en pacientes con fibrosis pulmonar han demostrado su capacidad para mejorar el nivel antioxidante del pulmón al elevar los niveles de glutatión, así también restaura la función pulmonar (Meyer et al., 1994, 1995; Behr et al., 1997).

Por otro lado, en experimentos realizados durante la tesis de maestría se pudo observar que la NAC fue capaz de prevenir el daño hepático crónico utilizando como modelo de daño experimental la administración de CCl₄, al prevenir el incremento de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT), γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) que son marcadores séricos de daño, así también fue capaz de prevenir el aumento en los niveles de malondialdehído y previno la disminución de los niveles de GSH, lo que demostró sus excelentes propiedades antioxidantes. De manera importante se pudo observar los buenos efectos antifibróticos de este compuesto al ver que éste previno el incremento en los niveles de colágena y la expresión de la citocina profibrogénica TGF- β (Galicía-Moreno et al., 2009).

Con todos estos antecedentes se puede pensar que la NAC será capaz de prevenir el daño hepático utilizando un modelo de daño en donde el estrés oxidativo no es el principal mecanismo de acción para generarlo y además será capaz de revertir el daño hepático experimental.

3. HIPOTESIS

La NAC, un compuesto ampliamente reconocido por su actividad antioxidante, será capaz de prevenir el daño hepático crónico inducido mediante la obstrucción del conducto biliar común y de revertir el daño hepático inducido por la administración crónica de CCl₄ en la rata.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad de la NAC para prevenir la cirrosis producida por la LCBC y para revertir la fibrosis inducida mediante la administración crónica de CCl₄.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Evaluar el efecto de la NAC en la prevención del daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común en la rata.
- 2) Evaluar el efecto de la NAC en la reversión del daño hepático inducido por CCl₄ en la rata.
- 3) Evaluar el papel del efecto antioxidante de la NAC ante el daño hepático producido por la LCBC durante 28 días.
- 4) Evaluar la expresión de las citocinas: IL-10, IL-6 y TGF- β mediante la técnica de Western Blot en el modelo de prevención para relacionar el efecto hepatoprotector del compuesto con su efecto inmunomodulador.

5. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis hepática es la cuarta causa de muerte general y la segunda en hombres de 23 a 64 años de edad en México, (Sistema Nacional de Información en Salud, 2008).

Estudios diversos *in vitro* como *in vivo* han mostrado la eficacia de los antioxidantes para tratar diversas enfermedades hepáticas. La N-acetil cisteína (NAC) es un compuesto ampliamente utilizado en la clínica y su seguridad ha sido comprobada. Estudios previos nos han demostrado el buen efecto de este fármaco ante un daño originado por los radicales libres, ahora se quiere estudiar el efecto de este compuesto ante un daño hepático en donde el proceso oxidativo no es el mecanismo de acción principal para generarlo y más aún evaluar el efecto de este compuesto para revertir el daño hepático una vez que éste fue establecido.

Hasta el momento no existe un tratamiento farmacológico efectivo para este padecimiento y los pocos fármacos existentes sólo minimizan los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, el realizar estudios para evaluar el efecto de la NAC en la prevención y la reversión del daño hepático puede ofrecer resultados relevantes para poder ser considerado una buena opción en el tratamiento de esta enfermedad.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales

La N-acetil cisteína (NAC) utilizada en este trabajo fue obtenida de Sigma Chemical Co. ST. Luis Mo, USA., el resto de los reactantes utilizados fueron de la mejor calidad comercial posible.

En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho del bioterio del CINVESTAV.

6.2 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la N-acetil cisteína en la prevención del daño hepático crónico inducido por la LCBC.

Se utilizaron ratas Wistar macho con una n final de 6 con una masa aproximada de 200 a 250 g y el procedimiento se hizo de la siguiente manera:

A las ratas previamente anestesiadas con éter etílico se les hizo una incisión media en la región abdominal, se localizó el duodeno y se extrajo de la cavidad para visualizar el conducto biliar común. Una vez localizado el conducto se realizó una ligadura del extremo que va del hígado hacia el intestino y una ligadura del extremo más distal que va hacia el intestino, posteriormente el conducto biliar común se cortó entre ambas ligaduras para asegurar la obstrucción. Una vez realizados estos procedimientos se afrontaron los planos, el músculo se suturó con hilo catgut crómico 4-0 y la piel con hilo nylon monofilamento 4-0.

El mismo procedimiento se efectuó para las ratas sometidas a una operación falsa (SHAM), sólo que a ellas no se les ligó el conducto biliar común.

Los grupos se organizaron de la siguiente manera:

- Grupo 1. Ratas a las cuales se les realizó la operación falsa (SHAM).
- Grupo 2. Ratas que se ligaron del conducto biliar común (LCBC).
- Grupo 3. Ratas que se ligaron del conducto biliar común (LCBC) y que recibieron 300 mg/kg de NAC disuelta en carboximetil celulosa al 0.5% p.o., diariamente después de la cirugía.

- Grupo 4. Ratas a las cuales se les realizó la operación falsa (SHAM) y que recibieron 300 mg/kg de NAC disuelto en carboximetilcelulosa al 0.5% p.o., diariamente después de la cirugía.

Con la finalidad de evaluar el papel que juega el estrés oxidativo en la generación del daño hepático por la LCBC, se optó por evaluar a la par el efecto de otro compuesto ampliamente conocido por sus propiedades antioxidantes, el Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, por lo que se formaron dos grupos experimentales más:

- Grupo 5. Ratas que se ligaron del conducto biliar común (LCBC) y que recibieron 50 mg/kg de Trolox disuelto en carboximetilcelulosa al 0.5% p.o., diariamente después de la cirugía.
- Grupo 6. Ratas a las cuales se les realizó la operación falsa (SHAM) y que recibieron 50 mg/kg de Trolox disuelto en carboximetilcelulosa al 0.5% p.o., diariamente después de la cirugía.

Todos los tratamientos tuvieron una duración de 28 días (Fig 5).

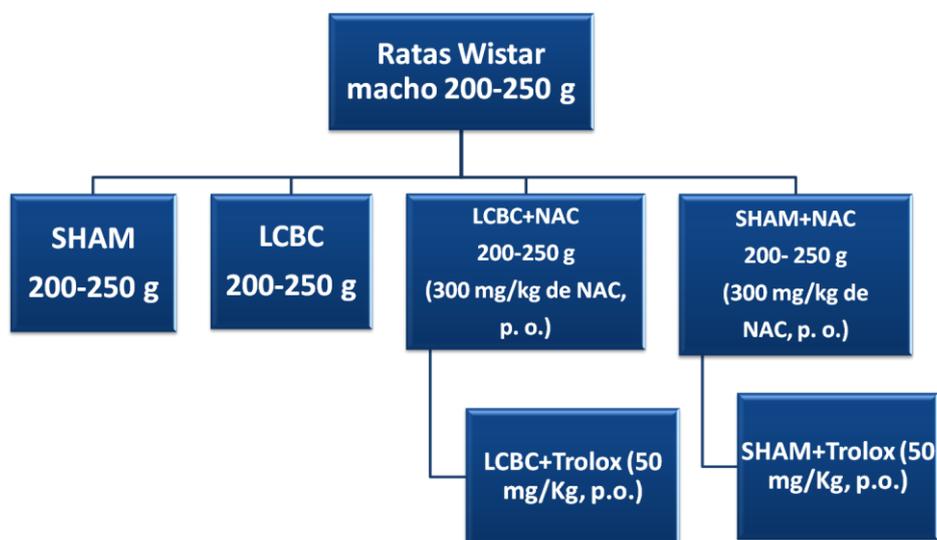


Figura 5. Esquema de tratamiento para el modelo de daño hepático inducido por la LCBC.

6.3 Diseño experimental para evaluar la capacidad de la N- acetil cisteína en la reversión del daño hepático inducido por CCl₄.

Se utilizaron ratas Wistar macho con una n final de 6 con un peso inicial aproximado de 100 a 110 g de la siguiente manera:

- Grupo 1. Ratas a las cuales se les administró 0.25 mL de petrolato líquido i.p. tres veces por semana durante 8 semanas.
- Grupo 2. Ratas a las cuales se les administró 0.4 g/kg de CCl₄, i.p., 3 veces por semana durante 8 semanas.
- Grupo 3. Ratas a las cuales se les administró 0.25 mL de petrolato líquido i.p. tres veces por semana durante 8 semanas y culminado este tratamiento fueron administradas con 0.5 mL de CMC (Carboximetilcelulosa) 0.5%, p.o., diariamente durante 4 semanas.
- Grupo 4. Ratas a las cuales se les administró 0.4 g/kg de CCl₄, i.p., 3 veces por semana durante 8 semanas y culminado este tratamiento fueron administradas con 0.5 mL de CMC 0.5%, p.o., diariamente durante 4 semanas.
- Grupo 5. Ratas a las cuales se les administró 0.4 g/kg de CCl₄, i.p., 3 veces por semana durante 8 semanas y culminado este tratamiento fueron administradas con 300 mg/Kg peso de NAC, p.o., diariamente durante 4 semanas.
- Grupo 6. Ratas a las cuales se les administró 0.25 mL de petrolato líquido i.p. 3 veces por semana durante 8 semanas y culminado este tratamiento fueron administradas con 300 mg/kg peso de NAC p.o., diariamente durante 4 semanas.

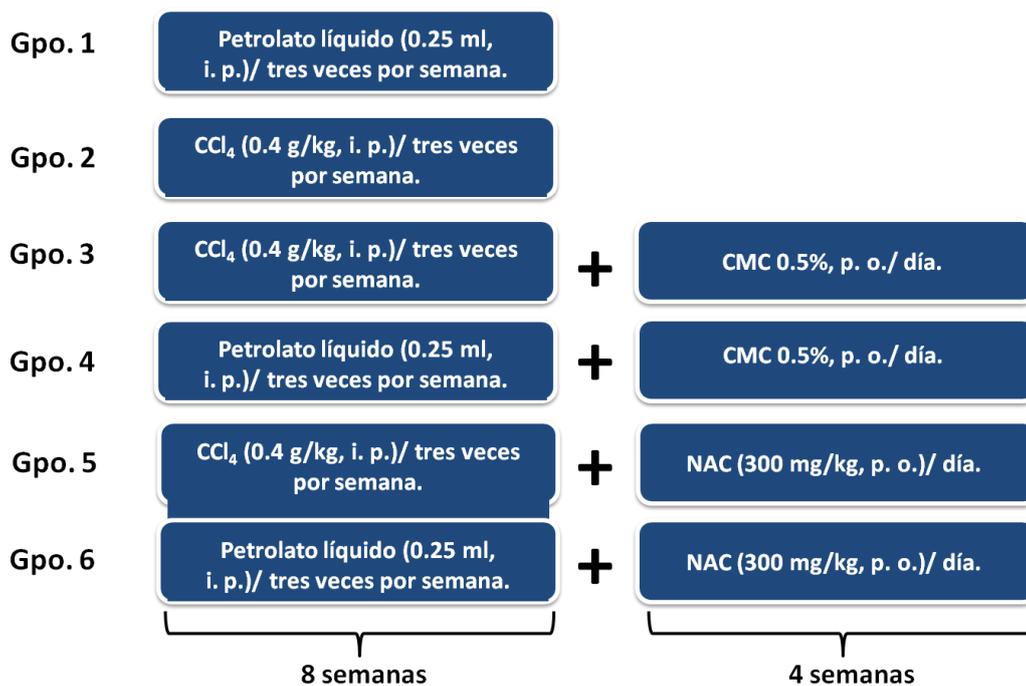


Figura 6. Esquema de tratamiento para el modelo de reversión del daño hepático inducido por la administración de CCl₄.

6.4 Determinaciones bioquímicas en sangre e hígado.

Los animales fueron sacrificados por exanguinación por punción cardiaca y bajo anestesia de éter etílico 28 días después de haber realizado la operación falsa o la LCBC en el caso del modelo de daño hepático por colestasis o en el caso del modelo de reversión una vez culminados los tratamientos.

Por punción cardiaca con jeringa heparinizada se obtuvo la mayor cantidad de sangre, la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma a partir del cual se determinaron los siguientes marcadores bioquímicos: se cuantificó la actividad de las enzimas γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) y alanina aminotransferasa (ALT).

En el hígado se determinó el contenido de glucógeno, el grado de peroxidación lipídica, el contenido de GSH y GSSG, la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx, y se cuantificó el contenido de hidroxiprolina.

Se tomaron muestras de hígado para llevar a cabo el análisis histológico mediante la tinción tricrómica de Masson, para evaluar el grado de fibrosis que fue generada durante el daño hepático.

También a partir de muestras de hígado se realizó la extracción de proteínas para posteriormente evaluar, mediante la técnica de Western Blot, la expresión de citocinas como: el TGF- β y la IL-6 así como la expresión de la citocina anti inflamatoria IL-10 (Fig 7).

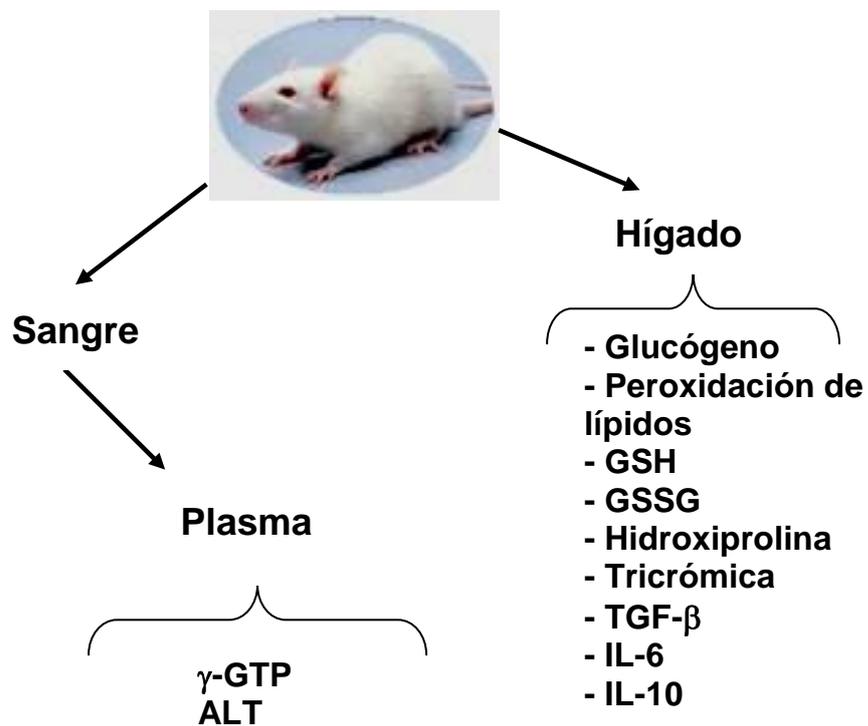


Figura 7. Determinaciones experimentales

6.5 Técnicas

6.5.1 Determinación de la actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP).

El fundamento de la determinación de la actividad enzimática de la enzima γ -GTP es que el sustrato, la glutamil-p-nitroanilida, en presencia de la enzima γ -glutamil transpeptidasa y del receptor del grupo γ -1-glutamil, como lo es la glicil-glicina, produce la γ -1-glutamilglicina y p-nitroanilina que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossmann y Neville, 1972).

En cada tubo se colocan:

400 μ L de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2

100 μ L $MgCl_2$ 200 mM

100 μ L Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2

200 μ L Gamma-glutamil-p-nitroanilida 10 mM.

- Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200 μ l de plasma.
- Se incuba a 37°C por 30 min. y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M.
- Se lee a 410 nm y se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- Se hace un blanco sustituyendo los 200 μ L de suero 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).

6.5.2 Determinación de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT).

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determina por el método de Reitman y Frankel (1957), en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2, 4 dinitrofenilhidrazina, que se absorbe a 515 nm. Se rotulan los tubos blanco y problema para cada muestra.

La determinación se realiza de la siguiente manera:

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Plasma problema	---	0.05
3.- Se mezcla y se agita suavemente, se incuba a 37°C durante 60 min.		
4.- Reactante cromógeno	0.25	0.25
5.- Plasma problema.	0.050	---
6.- Se incuba a 37°C durante 15 min.		
7.- NaOH 0.4 N.	2.5	2.5
8.- Se leen los tubos a 515 nm.		

6.5.3 Determinación del glucógeno hepático.

La determinación del glucógeno hepático se realiza con la técnica de la antrona (Seifter et al., 1950)

1) Se pesan 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se les adiciona 1.5 ml de KOH al 30%, se tapan y se hierven en baño de agua durante 30 minutos.

2) Después de enfriar los tubos, se pasa la solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, y se afora con agua agitando muy bien.

3) Del matraz anterior se toman de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, llevándolo a 1 mL en tubos esmerilados de 13x100, por duplicado, se prepara además un tubo blanco con 1 mL de H₂O y otros 2 estándares con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml) y se llevan a 1 mL con agua.

4) Se prepara una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2 mL a cada tubo enfriando sobre hielo agitando suavemente (con ayuda de una bureta).

5) Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 min.

6) Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo. Se leen a 620 nm.

CÁLCULOS

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

A(mtra) = Absorbancia de la muestra.

A(std) = Absorbancia del estándar.

Se expresan los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

6.5.4 Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico que reacciona con el malondialdehído y sus subespecies reactivas oxidadas (Buege y Aust, 1978).

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM pH=7.4
- Acido tricloroacético (TCA) al 15%
- Acido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (se prepara en el momento, la cantidad necesaria).

Procedimiento:

1. Se pesan 0.5 g de hígado.
2. Se homogeinizan en 5 mL de agua.
3. Se toman 300 μ L del homogenizado al 10% y se le agregan 700 μ L de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL.
4. Se incuban a 37°C por 30 minutos.
5. Se agregan 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
6. Los tubos se ponen a ebullición por 45 minutos.
7. Se centrifugan a 3000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.

6.5.5 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Esta determinación se efectúa por el método de Bradford (Bradford, 1976), en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomasie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas.

Reactivos:

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

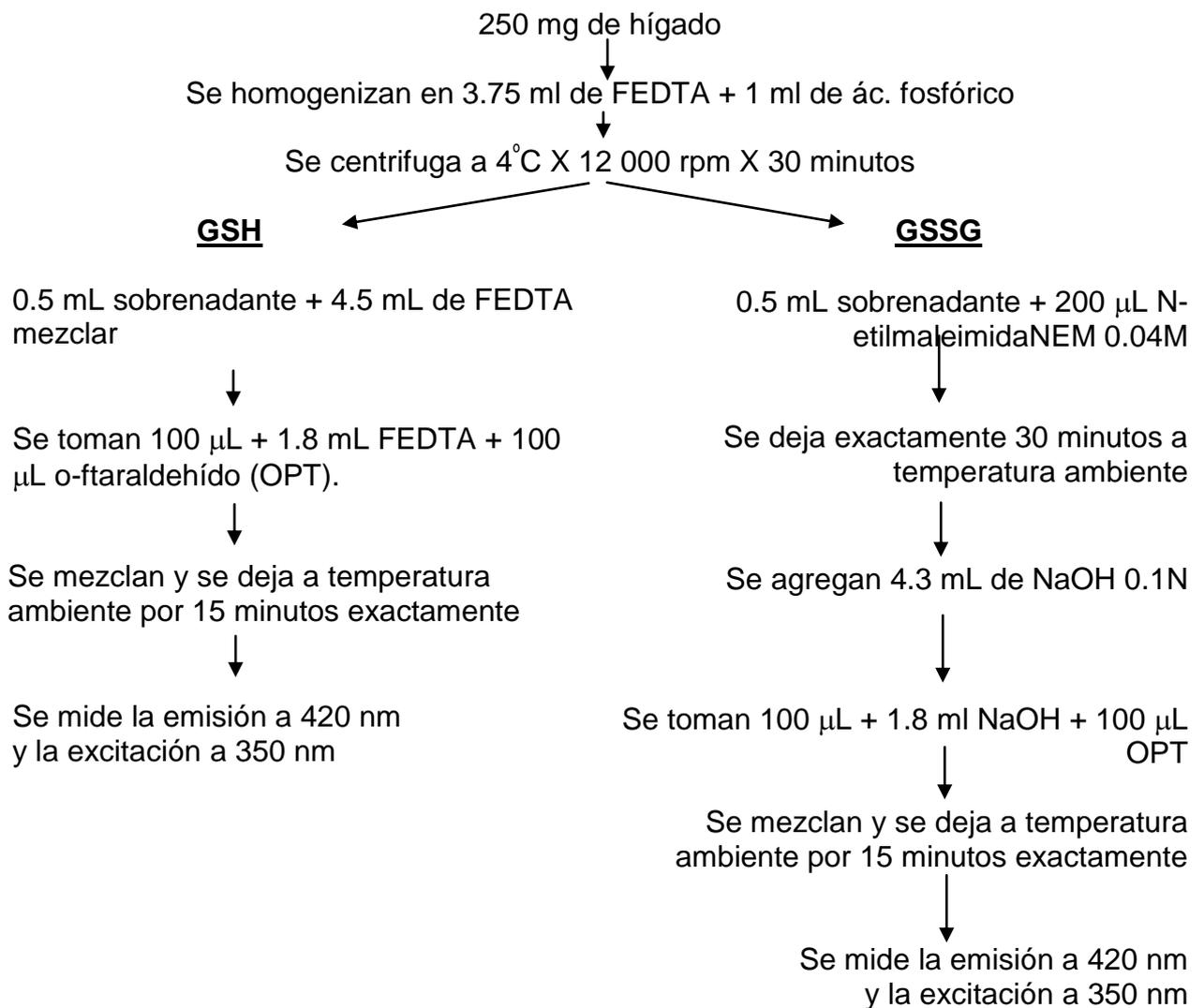
Procedimiento:

1. Se toman 100 μ L de homogenizado de hígado y se lleva a 1,000 μ L con agua tridestilada.
2. Se toman alícuotas para proteínas y se llevan a 100 μ L con agua (de la dilución anterior se toman 20 μ L + 80 μ L de agua tridestilada).
3. El blanco se prepara con 100 μ L de agua.
4. Se añaden 2.4 mL del reactivo de Bradford
5. La absorbancia se lee a 595 nm.
6. Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg/mL) con: 0, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μ L, de esta solución.
7. Los tubos se aforan con agua a 100 μ L.

6.5.6 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en hígado.

Este parámetro fue evaluado como indicador de estrés oxidativo a nivel citoplasmático.

La determinación se lleva a cabo de la siguiente manera:



6.5.7 Determinación de la actividad enzimática de la CAT.

Para determinar la actividad hepática de la CAT, se mide el consumo de H_2O_2 a 480 nm (Cohen, 1970). Un homogenizado de hígado al 10% con buffer de fosfato de potasio frío (0.1M, pH 7.4) fue realizado usando un homogenizador motor-driver. Brevemente, 5 mL de H_2O_2 frío se añadieron a alícuotas de 0.5 mL del homogenizado de hígado frío. Después de 3 minutos se paró la reacción con 1 mL de H_2SO_4 6N. El H_2O_2 reacciona con un exceso de KMnO_4 , el KMnO_4 residual se midió a 480 nm. La actividad de la CAT fue calculada como la constante de velocidad de reacción de la descomposición del H_2O_2 de primer orden ($K \times 10^2 \text{ min}^{-\text{min}}$).

6.5.8 Determinación de la actividad enzimática de la GPx.

El método de Lawrence y Burk (Lawrence y Burk, 1976) fue utilizado para analizar la actividad de la GPx con hidroperóxido de cumeno como sustrato. Una alícuota de 1.5 mL del homogenado de hígado al 10% con buffer de fosfato de potasio (75 mM, pH 7) se filtró a través de muselina y se centrifugó a 900 g por 5 min a 4°C. La mezcla de reacción contenía 200 μL del sobrenadante obtenido de la centrifugación del homogenado, 2 mL de buffer de fosfato de potasio (75mM, pH 7), 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 dinucleotido fosfato (NADPH) (3 mM) y 0.3 mL de agua. La reacción se inició con la adición de 0.1 mL de hidroperóxido de cumeno (35 mM). La oxidación de NADPH se registró a 340 nm durante 4 minutos y la actividad enzimática se calculó como los nmol de NADPH oxidado $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar de $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6.5.9 Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina).

La técnica se basa en el método de Rojkind y González (1974).

1. Se pesa 0.1 g de hígado previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2 mL de HCl 6N y se sellan las ampolletas con el mechero o soplete, posteriormente se colocan a 100° C en el horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se destapan las ampolletas y se colocan nuevamente en el horno a temperatura de 60° C aproximadamente 24 h o hasta que se sequen.
4. Las muestras ya secas se resuspenden con 2 mL de solución amortiguadora (sol.1); se agitan vigorosamente en el vortex y se vacían en tubos de ensaye, las ampolletas se lavan con la adición de 1 mL de la misma solución.

Se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min.

5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita (carbón activado) se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, se centrifugan a 3000 rpm por 15 min, si el sobrenadante no queda claro se repite este paso.
6. Se toma 1 mL del sobrenadante más 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T (sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 min a temperatura ambiente. Se hace un blanco.
7. Transcurridos los 20 min, se adicionan 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitan inmediatamente para detener la reacción.
8. A cada tubo se le agregan 6 mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto. La fase de tolueno no se utiliza para la determinación de prolina, pero la fase acuosa se utiliza para la cuantificación de hidroxiprolina
9. Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se tapa y se coloca en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfrían 15 minutos, preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adiciona 6 mL de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
11. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1 mL y se les agrega 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitan fuertemente.

12. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, se leen a 560 nm.

6.5.10 Histología.

La técnica utilizada fue la tinción tricrómica de Masson (TM) donde se busca teñir a las bandas de colágena hepática en color azul, el núcleo celular en color negro y el citoplasma de color rojo (Masson, 1929). Se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

Los cortes de hígado se depositan en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación es de 24 horas. Los cortes se lavan con agua corriente, se deshidratan en alcoholes y se embeben en parafina. Se hacen cortes de 6-7 micras de grosor y se cubren con silano. Se realiza lo siguiente:

- 1) Las rebanadas se desparafinan y rehidratan con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- 2) Se enjuagan con agua destilada.
- 3) Se sumergen en el fijador de Bouin por 1 hr a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 4) Se enfrían y lavan con agua corriente hasta que el color amarillo desaparece.
- 5) Se enjuagan con agua destilada.
- 6) Se sumergen en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min. Se enjuagan con agua corriente el mismo tiempo.
- 7) Se enjuagan con agua destilada.
- 8) Se sumergen en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min. Se recupera la solución.
- 9) Se enjuagan con agua destilada.
- 10) Se colocan en la solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungstínico por 10 a 15 min antes de la solución de anilina azul y en ácido fosfotungstínico acuoso al 5% por 15 min antes del contraste verde claro. Se desecha la solución.
- 11) Se colocan en la solución de anilina azul por 5 a 10 min o con la solución verde claro por 1 min. Se recupera la solución.
- 12) Se enjuagan con agua destilada.
- 13) Se lavan con agua acética al 1% por 3 a 5 min. Se desecha la solución.
- 14) Se lavan con alcohol al 95%.
- 15) Se lavan con alcohol absoluto (dos cambios de alcohol).

- 16) Se lavan con xileno (dos cambios de alcohol).
- 17) Se montan en el polímero Permout o bálsamo.

6.5.11 Western Blot de las citocinas TGF- β , IL-6 e IL-10.

El reactante “Tripure™ Isolation Reagent (ROCHE)” fue utilizado para aislar la proteína total de muestras de tejido de hígado; de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la obtención de una fracción enriquecida en proteínas en la cual se determinó la concentración de éstas por el método del ácido bicinconínico. Posteriormente, 50 μ g de proteína de cada muestra fue cargada en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% para su separación por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Una vez hecho este proceso, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana PVDF (BIO-RAD) por medio de una cámara de transferencia semi-húmeda. Posteriormente, las membranas fueron tratadas durante 30 minutos con solución de bloqueo de leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.05%. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos primarios dirigidos contra las citocinas TGF- β , IL-6 e IL-10 (TGF- β , MAB1032 de Millipore Corp; IL-6, ARC0962 de Invitrogen Corpe e IL-10, ARC9102 de Invitrogen Corp) y diluido 1:2000 para el TGF- β y 1:10000 para la IL-6 e IL-10 con solución de bloqueo. Después, las membranas fueron lavadas y posteriormente expuestas al anticuerpo secundario, que en este caso se trató de un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Zymed) y diluido 1:4000 para el caso del TGF- β y 1:20000 para la IL-6 e IL-10. Finalmente, la detección de las bandas de interés se llevó a cabo con un kit de quimioluminiscencia (Amersham). La intensidad de las bandas de señal para la proteína de interés fueron digitalizadas y analizadas por densitometría utilizando el software lab Works 4.0 imaging. Se llevaron a cabo correcciones de la cantidad de proteínas cargadas al gel utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína estructural β -actina a una dilución 1:2000 (Pérez-Severiano et al., 2002).

6.5.12 Análisis estadístico.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se obtuvo la media y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamientos.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Tukey. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del modelo de prevención del daño hepático producido por la LCBC.

7.1.1 Actividad enzimática de la ALT.

La ALT es una enzima citosólica presente en los hepatocitos, un incremento en los niveles séricos de ésta enzima refleja un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática y por lo tanto un daño a los hepatocitos. En la Figura 8 podemos observar como la actividad de esta enzima se incrementó significativamente por la LCBC durante 28 días ($p \leq 0.05$). Los tratamientos con NAC y trolox previnieron el incremento en la actividad de esta enzima ($p \leq 0.05$). Las ratas operadas Sham y que fueron administradas con NAC y trolox, respectivamente, mostraron valores similares al grupo de ratas no tratadas con NAC.

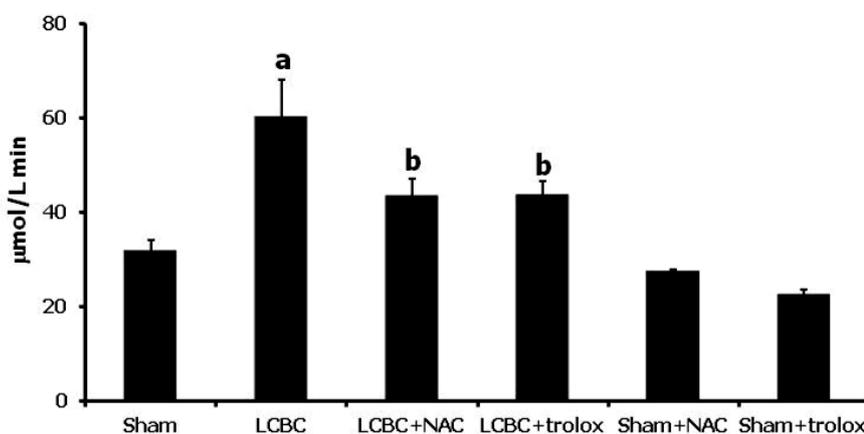


Figura 8. Actividad enzimática de la Alanino aminotransferasa (ALT).

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

7.1.2 Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP).

La enzima γ -GTP es una enzima que se encuentra embebida en la membrana plasmática de los hepatocitos, principalmente en el dominio canalicular. Un aumento en los niveles séricos de ésta indican un daño colestático y por lo tanto un daño al hígado.

La Figura 9 muestra como en el grupo de ratas LCBC, los niveles de esta enzima incrementaron significativamente al compararlos con los niveles obtenidos en el grupo Sham. Se puede observar también como ni la NAC ni el trolox fueron capaces de prevenir este aumento.

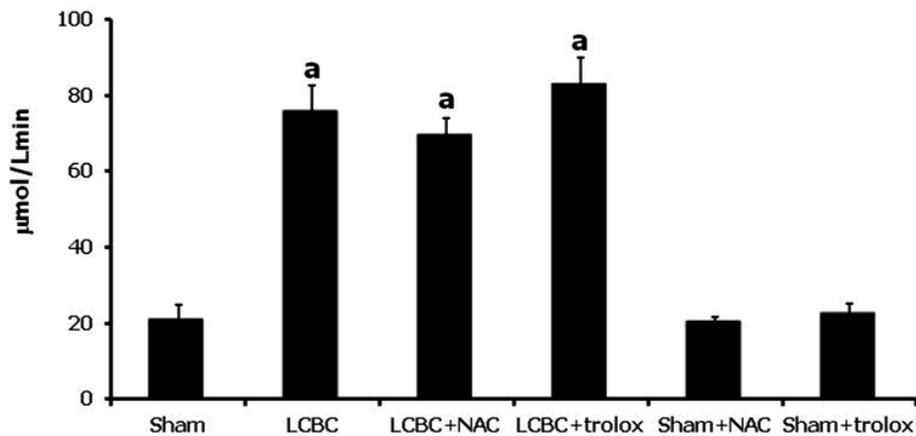


Figura 9. Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP).

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

7.1.3 Contenido de glucógeno hepático.

En la Figura 10 se observa cómo en el grupo dañado por la LCBC los niveles de glucógeno disminuyeron significativamente al compararse con los niveles presentes en el grupo de ratas Sham, también se observa que ni la administración de NAC y ni la de trolox fue capaz de prevenir esta depleción.

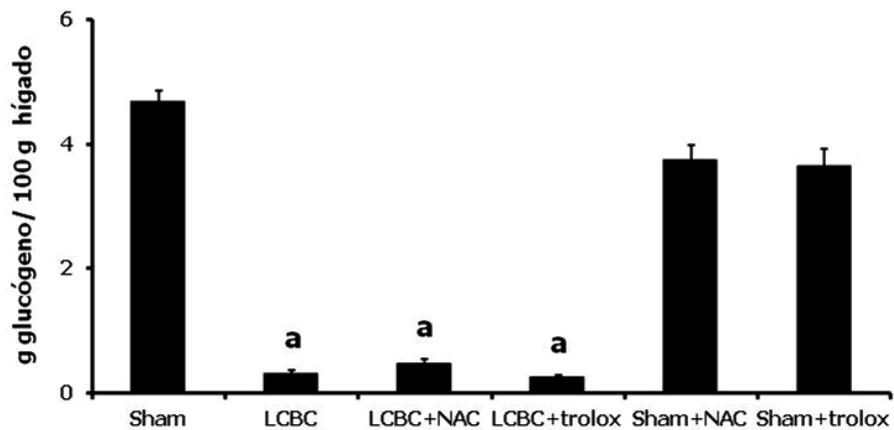


Figura10. Determinación del contenido de glucógeno.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

7.1.4 Grado de peroxidación lipídica.

El grado de peroxidación lipídica indica el daño ocasionado a las membranas celulares por la acción de los radicales libres y de la actividad detergente de los ácidos biliares en la colestasis (Muriel, 1997). Uno de los productos finales de este proceso de daño es el malondialdehído (MDA), por lo que la cuantificación de éste nos ayuda a evaluar este proceso. En la Figura 11 se puede apreciar cómo la LCBC durante 28 días, incrementó en los niveles de MDA, también se puede observar como la administración de NAC abolió de manera total el incremento de MDA, así también la administración de trolox pudo prevenir de manera parcial pero significativa el incremento de este marcador de daño.

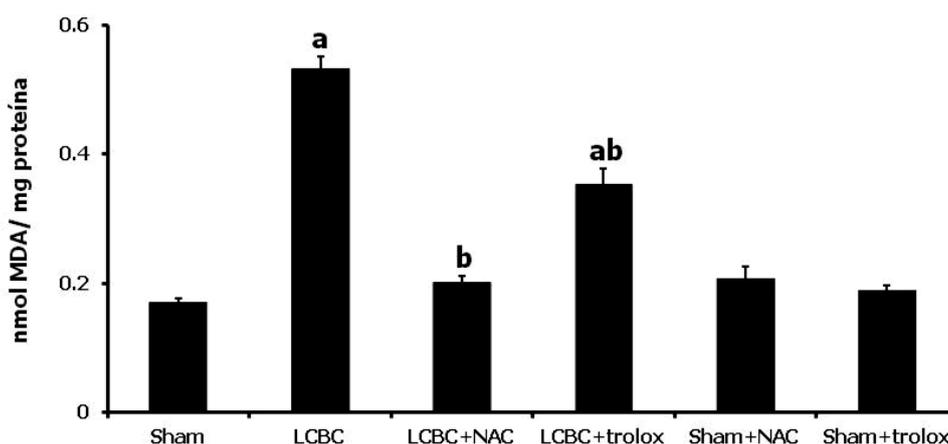


Figura 11. Grado de peroxidación lipídica.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

7.1.5 Contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en hígado.

Los niveles de glutatión reducido y oxidado se representan en la Figura 12. Se puede observar que en el grupo con la LCBC, los niveles de GSH tuvieron una disminución significativa al compararlos con los del grupo Sham, también se observa que tanto la NAC como el trolox fueron capaces de prevenir esta disminución. En cuanto a los niveles de GSSG, se puede ver que en el grupo de animales dañados los niveles de este marcador aumentaron de manera significativa, la administración de NAC y trolox lograron prevenir este aumento.

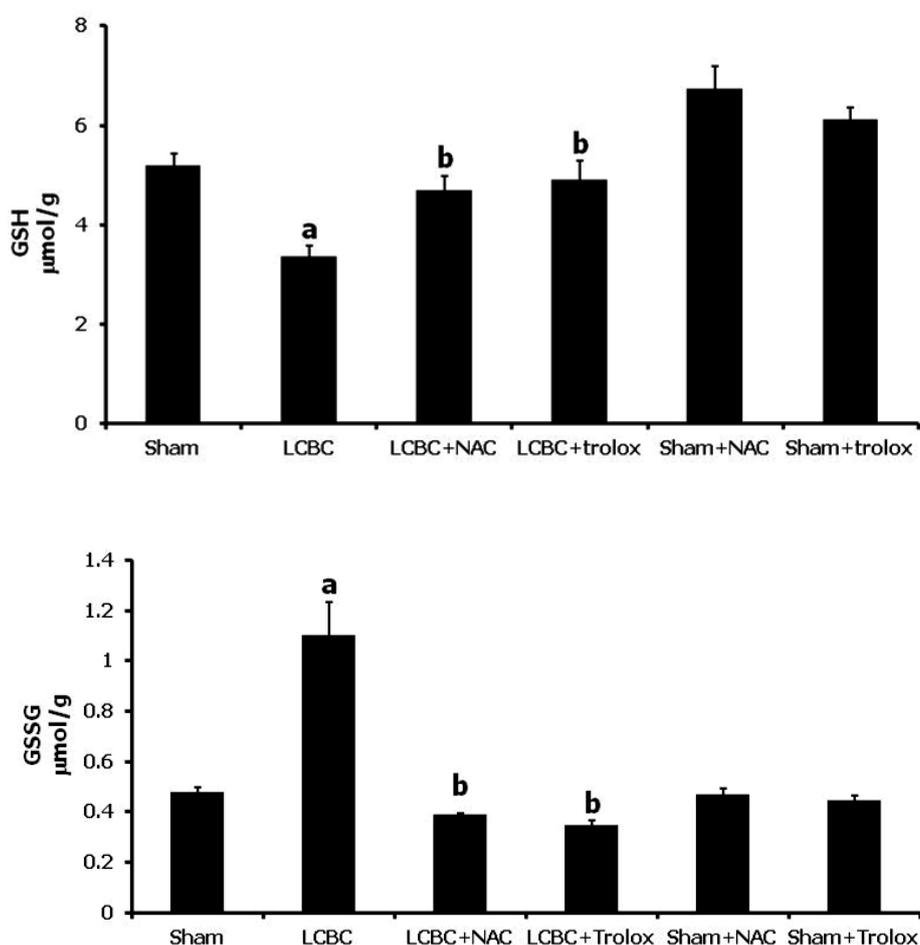


Figura 12. Contendo de Glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

7.1.6 Actividad de la enzima catalasa (CAT).

Para evaluar la actividad de la enzima antioxidante CAT se midió el consumo de H_2O_2 en muestras de hígado. Como se observa en la Figura 13 en el grupo de animales LCBC la actividad de esta enzima incrementó más que en las ratas operadas Sham, contrario a esto, la administración de NAC y trolox, respectivamente, logró prevenir este efecto.

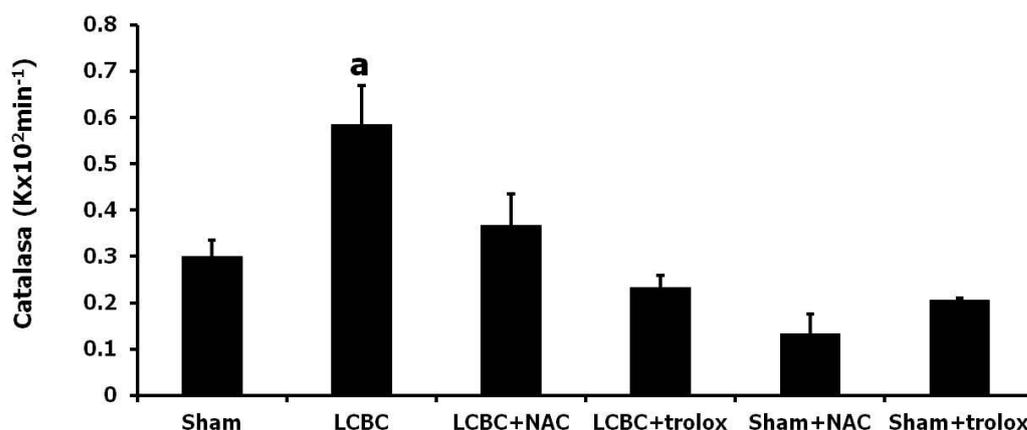


Figura 13. Actividad enzimática de la Catalasa (CAT).

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

7.1.7 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx).

La GPx es la enzima responsable de catalizar la reducción de Peróxido de hidrogeno, los hidroperóxidos orgánicos y los peróxidos lipídicos utilizando glutatión reducido, protegiendo a las células contra el daño oxidativo. La Figura 14 muestra como en el grupo de ratas ligadas (LCBC), la actividad de esta enzima disminuyó en comparación con el grupo de ratas Sham. La administración de NAC no fue capaz de prevenir esta respuesta, mientras que la administración de trolox mostró una tendencia a evitar este efecto.

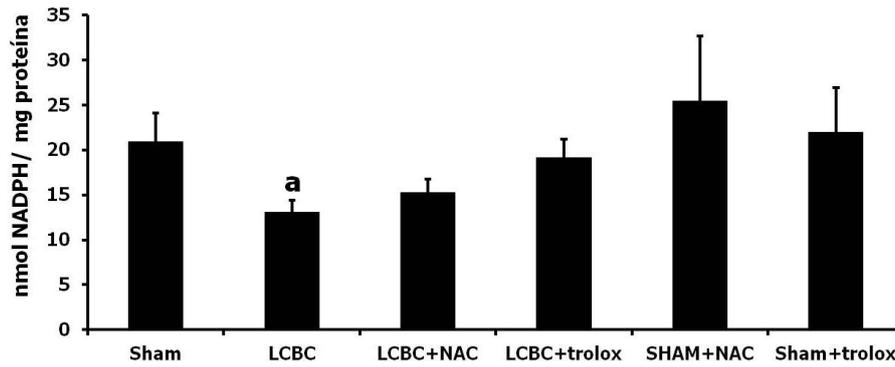


Figura 14. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx).

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

7.1.8 Contenido de colágena.

El daño provocado por la LCBC incrementó cerca de 3 veces el contenido de colágena en los hígados de las ratas dañadas, con respecto al grupo de ratas Sham. Este efecto fue evitado por la administración de NAC y trolox, en ambos casos se obtuvo una diferencia significativa (Figura 15).

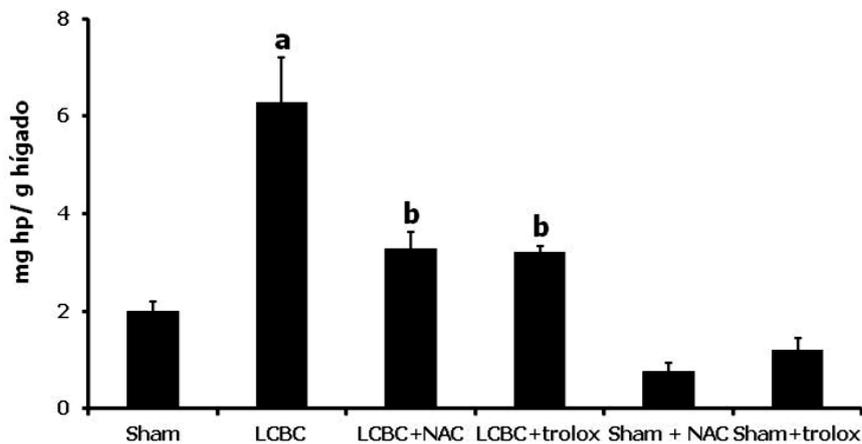


Figura 15. Contenido de colágena.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

7.1.9 Western blot de las citocinas TGF- β , IL-6 e IL-10.

La LCBC durante 28 días logró incrementar significativamente la expresión de las citocinas TGF- β e IL-6, un caso similar ocurrió con la expresión de la citocina IL-10 (Figuras 16, 17 y 18); sin embargo, cuando las ratas fueron tratadas con NAC o trolox, se logró impedir el incremento en la expresión del TGF- β y la IL-6, mientras que ambos fármacos lograron incrementar aún más la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10.

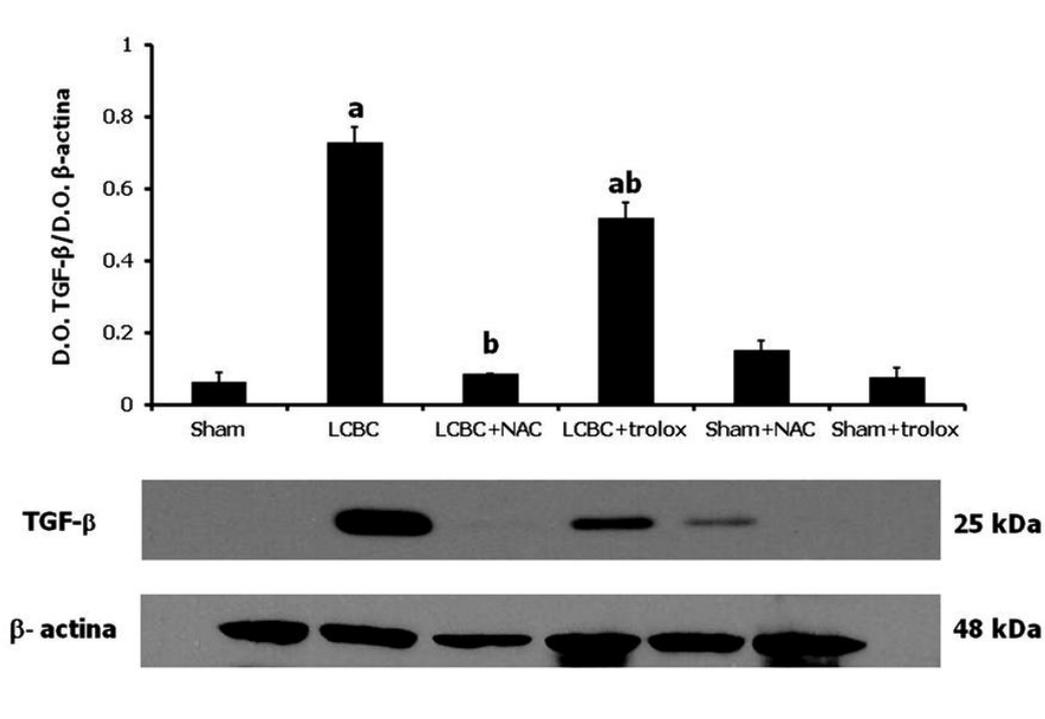


Figura 16. Western blot de la citocina TGF- β .

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

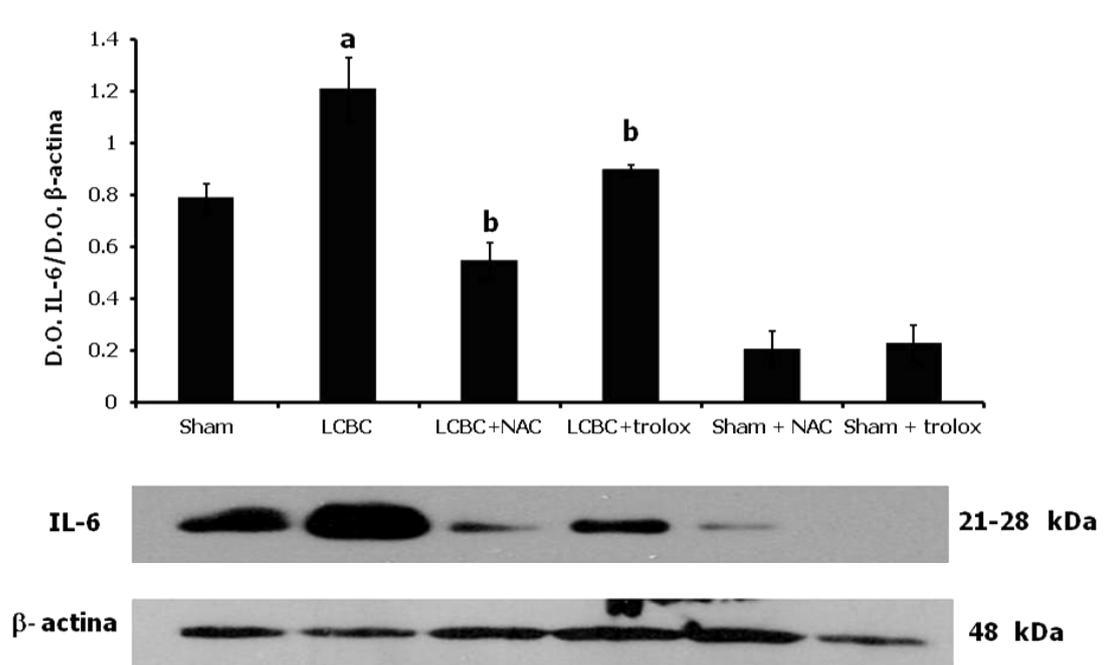


Figura 17. Western blot de la citocina IL-6.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

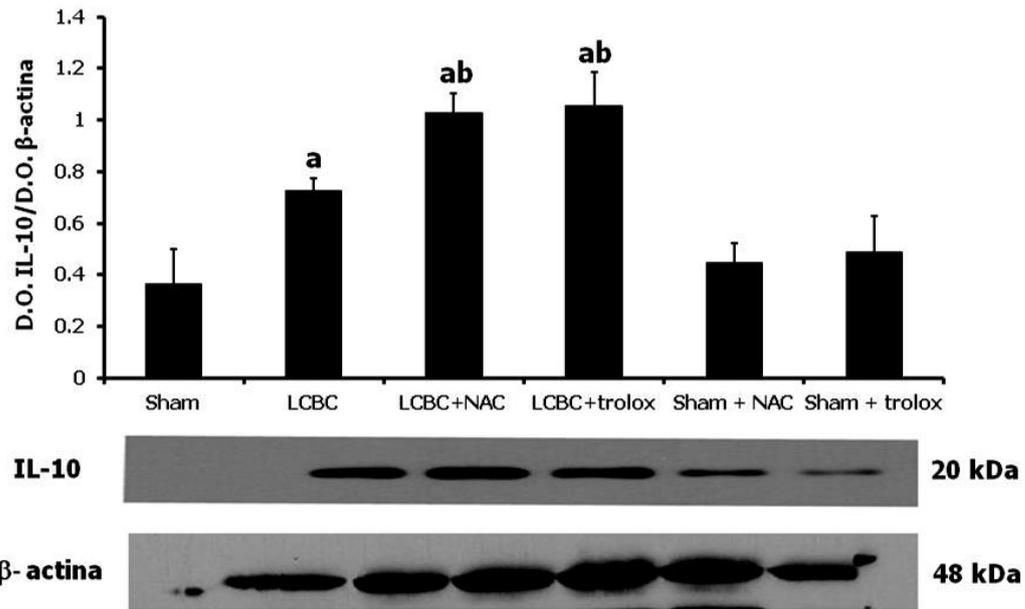


Figura 18. Western blot de la citocina IL-10.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

NAC: N-acetil cisteína; LCBC: ligadura del conducto biliar común.

a, diferencia significativa con respecto al grupo Sham, $p \leq 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de ratas LCBC, $p \leq 0.05$.

7.2 Resultados del modelo de reversión del daño hepático inducido con CCl₄.

7.2.1 Actividad enzimática de la ALT.

Como indicador de necrosis se cuantificaron los niveles séricos de la enzima ALT.

En la Figura 19 se puede observar que tras inducir el daño hepático por la administración de CCl₄ durante 8 semanas, los niveles de esta enzima se incrementaron de manera significativa, sin embargo, cuando se detuvo la administración de CCl₄, los niveles de esta enzima recuperaron su valor normal, esta respuesta impidió ver el posible efecto antinecrótico de la NAC.

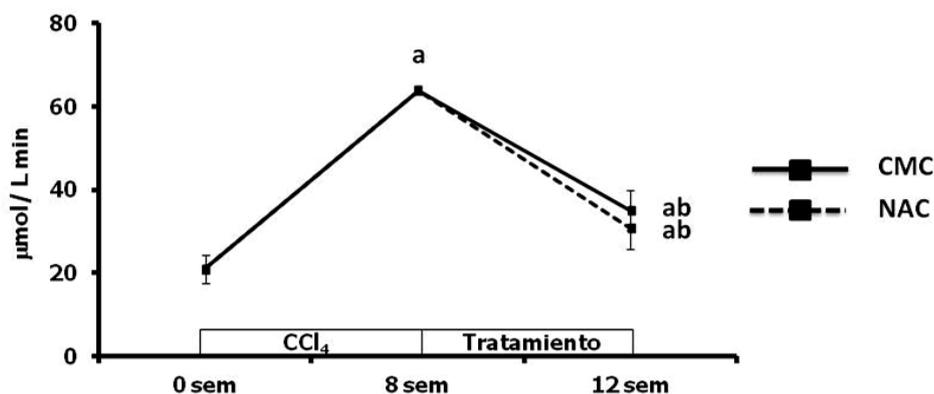


Figura 19. Actividad sérica de la enzima ALT.

Determinaciones realizadas en el plasma de ratas administradas con CCl₄ durante 8 semanas (CCl₄), administradas con carboximetil celulosa por 4 semanas después de haber discontinuado la administración de CCl₄ durante 8 semanas (CMC) y ratas tratadas con N-acetilcisteína durante 4 semanas después de haber discontinuado el tratamiento con CCl₄ (NAC). Los resultados son mostrados como el valor promedio de 8 ratas ± el E.S.

a, diferencia significativa con respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl₄ por 8 semanas, $p \leq 0.05$.

7.2.2 Actividad enzimática de la γ -GTP.

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación sérica de la enzima γ -GTP. Los niveles séricos de la γ -GTP se incrementaron de manera significativa tras la administración de CCl₄ por 8 semanas. La

detención de la administración de CCl_4 produjo una reversión del daño al regresar la γ -GTP a valores normales, lo que impidió observar el posible efecto hepatoprotector del compuesto.

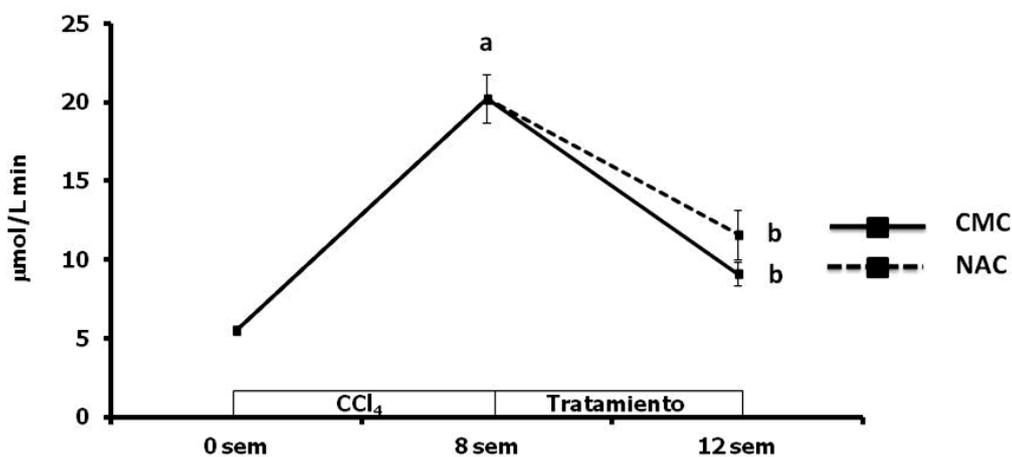


Figura 20. Actividad sérica de la enzima γ -GTP.

Determinaciones realizadas en el plasma de ratas administradas con CCl_4 durante 8 semanas (CCl_4), administradas con carboximetilcelulosa por 4 semanas después de haber discontinuado la administración de CCl_4 durante 8 semanas (CMC) y ratas tratadas con N-acetilcisteína durante 4 semanas después de haber discontinuado el tratamiento con CCl_4 (NAC). Los resultados son mostrados como el valor promedio de 8 ratas \pm el E.S.

a, diferencia significativa con respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl_4 por 8 semanas, $p \leq 0.05$.

7.2.3 Contenido de glucógeno hepático.

El glucógeno hepático disminuyó de manera significativa tras la administración crónica de CCl_4 , después de suspender la administración de CCl_4 durante 4 semanas, los niveles de glucógeno se mantuvieron por abajo del grupo control (tiempo 0) (Figura 21). La administración de NAC durante 4 semanas después de administrar el CCl_4 logró revertir parcialmente esta respuesta.

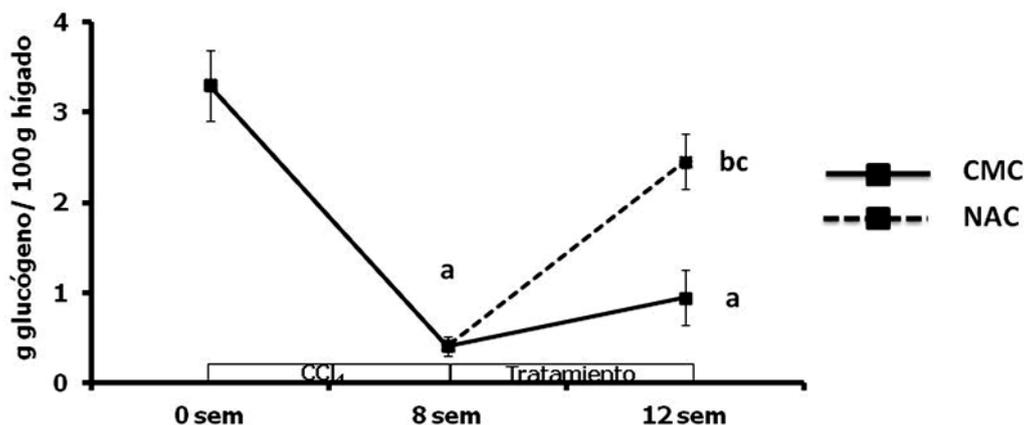


Figura 21. Contenido de glucógeno hepático.

Determinaciones realizadas a partir de hígados de ratas administradas con CCl₄ durante 8 semanas (CCl₄), administradas con carboximetilcelulosa por 4 semanas después de haber discontinuado la administración de CCl₄ durante 8 semanas (CMC) y ratas tratadas con N-acetilcisteína durante 4 semanas después de haber discontinuado el tratamiento con CCl₄ (NAC). Los resultados son mostrados como el valor promedio de 8 ratas \pm el E.S.

a, diferencia significativa con respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl₄ por 8 semanas, $p \leq 0.05$ y c, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl₄ por 8 semanas y una vez culminado este tratamiento, administradas con carboximetilcelulosa durante 4 semanas (CMC).

7.2.4 Grado de peroxidación lipídica.

Tras la administración crónica de CCl₄, los niveles de MDA tuvieron un incremento significativo comparado con el grupo control (tiempo 0), tras suspender la administración de CCl₄ durante dos meses los niveles de MDA lograron mantenerse por arriba de los valores normales. La administración de NAC por 4 semanas después de haber administrado de manera crónica el CCl₄ logró disminuir el daño oxidativo generado por el CCl₄ (Figura 22).

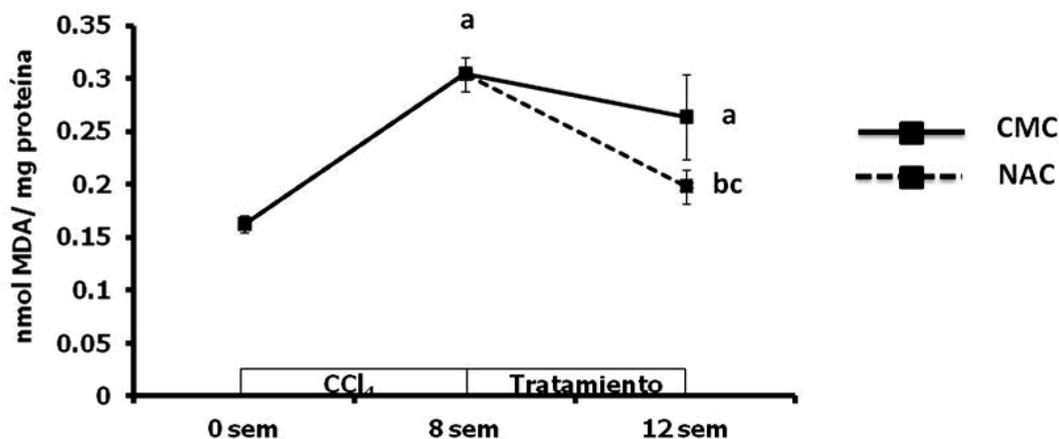


Figura 22. Grado de peroxidación lipídica.

Determinaciones realizadas a partir de homogeneizados de hígados de ratas administradas con CCl_4 durante 8 semanas (CCl_4), administradas con carboximetilcelulosa por 4 semanas después de haber discontinuado la administración de CCl_4 durante 8 semanas (CMC) y ratas tratadas con N-acetilcisteína durante 4 semanas después de haber discontinuado el tratamiento con CCl_4 (NAC). Los resultados son mostrados como el valor promedio de 8 ratas \pm el E.S.

a, diferencia significativa con respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl_4 por 8 semanas, $p \leq 0.05$ y c, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl_4 por 8 semanas y una vez culminado este tratamiento, administradas con carboximetilcelulosa durante 4 semanas (CMC).

7.2.5 Contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en hígado.

La cuantificación de los niveles de GSH y GSSG en hígado evalúa el estrés oxidativo a nivel citosólico y es representado en la Figura 23.

Se puede observar que en el grupo de ratas administradas con CCl_4 los niveles de GSH se mantuvieron estables durante las 8 semanas del tratamiento pero una vez suspendido éste, el GSH disminuyó de manera significativa durante las 4 semanas siguientes a ese tratamiento, lo mismo ocurre con el contenido total de glutatión (GSH+GSSG). La relación GSH/GSSG muestra que tras la inducción del daño durante 8 semanas este cociente disminuyó de manera significativa al compararlo con los valores obtenidos del grupo control (tiempo 0). La administración de NAC durante las 4 semanas posteriores al tratamiento con CCl_4 logró revertir la disminución del GSH, el contenido total GSH+GSSG y la relación GSH/GSSG, lo demuestra las excelentes propiedades antioxidantes del fármaco.

7.2.6 Contenido de colágena.

Después de la administración crónica de CCl_4 , el contenido de colágena incrementó de manera significativa al compararlo con el grupo control (tiempo 0). Al suspender la administración de CCl_4 y al administrar carboximetilcelulosa durante 4 semanas, el incremento de este marcador de daño logró mantenerse estable. La administración de NAC durante 4 semanas logró revertir de manera parcial pero significativa el incremento de este marcador de fibrosis hepática (Figura 24).

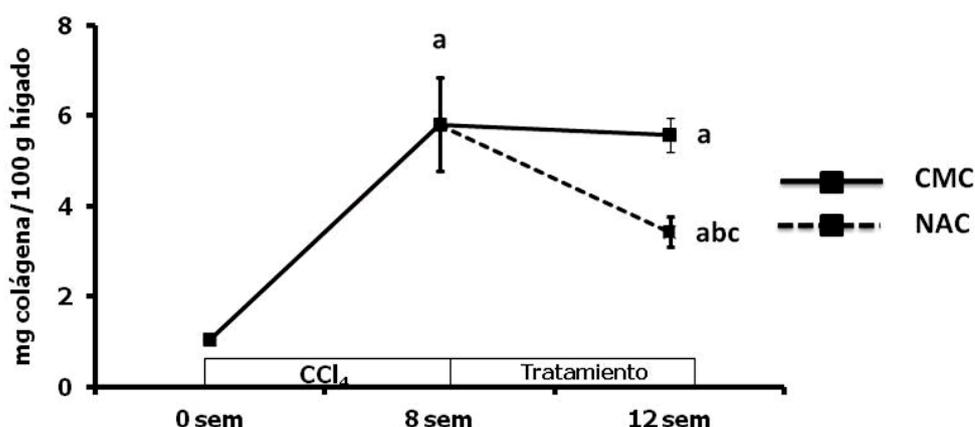


Figura 24. Contenido de colágena.

Determinaciones realizadas a partir de muestras de hígados de las ratas administradas con CCl_4 durante 8 semanas (CCl_4), administradas con carboximetilcelulosa por 4 semanas después de haber discontinuado la administración de CCl_4 durante 8 semanas (CMC) y las ratas tratadas con N-acetilcisteína durante 4 semanas después de haber discontinuado el tratamiento con CCl_4 (NAC). Los resultados son mostrados como el valor promedio de 8 ratas \pm el E.S.

a, diferencia significativa con respecto al grupo control (tiempo 0), $p \leq 0.05$; b, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl_4 por 8 semanas, $p \leq 0.05$ y c, diferencia significativa con respecto al grupo administrado con CCl_4 por 8 semanas y una vez culminado este tratamiento, administradas con carboximetilcelulosa durante 4 semanas (CMC).

7.2.7 Tinción tricrómica.

La tinción tricrómica pone en evidencia la presencia de colágena y la formación de la matriz extracelular. En la Figura 25 se observa en el panel A un corte histológico de un hígado de una rata del grupo control, donde hay una homogeneidad del tejido hepático y ausencia de fibras de colágena. Por otro lado, el panel B muestra el corte histológico de una rata administrada con CCl_4 durante 8 semanas, se observa una formación excesiva de fibras de colágena, las cuales están teñidas de color azul. El panel C representa al hígado de una rata administrada con CCl_4 durante 8 semanas y culminado este tiempo fue administrada con carboximetilcelulosa por 4 semanas, se observa que la excesiva formación de fibras de colágena teñidas de color azul logró mantenerse. El panel D muestra que la administración de NAC durante 4 semanas fue capaz de revertir parcialmente el daño ocasionado por la administración previa de CCl_4 durante 8 semanas.

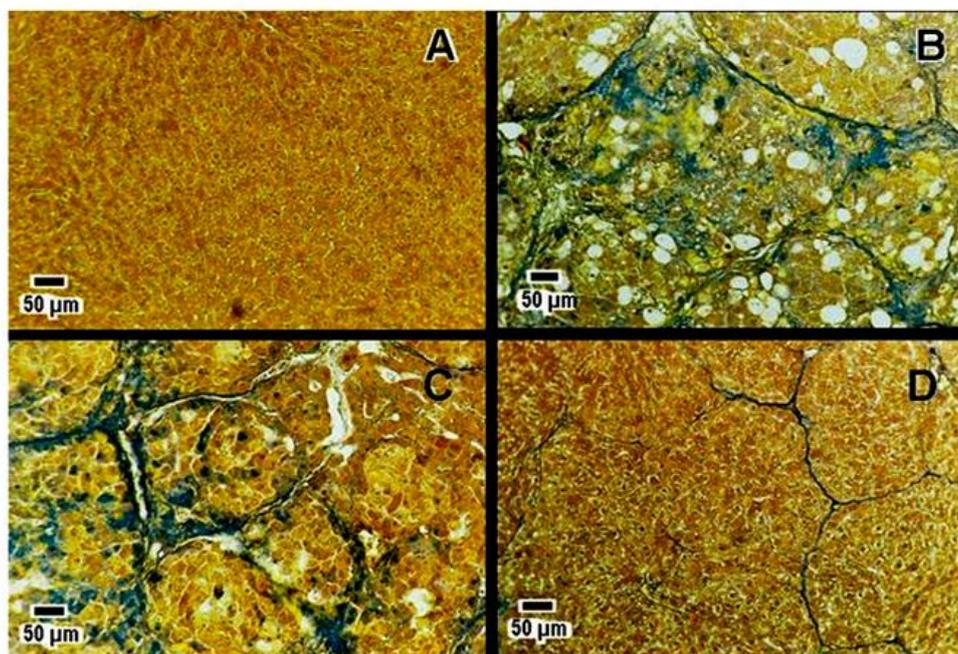


Figura 25. Tinción tricrómica.

Tinción tricrómica de las secciones de hígado de ratas después de ser administradas con petrolato líquido durante 8 semanas (A), ratas administradas con CCl_4 durante 8 semanas (B), ratas administradas con CCl_4 durante 8 semanas y posteriormente con carboximetilcelulosa por 4 semanas (C) y ratas tratadas con CCl_4 durante 8 semanas y posteriormente tratadas con NAC (D).

8. Discusión de resultados.

En este estudio se demuestra que la NAC fue capaz de prevenir el daño hepático inducido por la LCBC durante 28 días, así como de revertir el daño hepático crónico inducido por la administración de CCl_4 en la rata. La NAC es un fármaco con múltiples aplicaciones terapéuticas. Este compuesto ha demostrado mejorar la oxigenación tisular en pacientes con falla hepática fulminante (Harrison et al., 1991). Otras excelentes características de este compuesto es su capacidad de atravesar fácilmente las membranas celulares donde es hidrolizado a cisteína, aminoácido que usualmente limita la síntesis de GSH (Wu et al., 2004). Estas propiedades convierten a la NAC en un candidato ideal para estudiar sus efectos tanto en la prevención como en la reversión del daño hepático.

8.1 Prevención del daño hepático inducido por la LCBC.

La cirrosis biliar debida a la obstrucción del conducto biliar común es un desorden hepático caracterizado por una función afectada, una hipertensión portal y otras complicaciones que causan una gran mortalidad (Hunt, 1980).

La retención y acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos como el ácido quenodeoxicólico y el ácido deoxicólico, en el interior de los hepatocitos ha sido durante mucho tiempo implicado como la causa principal de daño hepático en esta enfermedad (Attili et al., 1986). Experimentalmente los ácidos biliares hidrofóbicos son conocidos por inducir daño en los hepatocitos aislados, los hepatocitos en cultivo y en el hígado íntegro (Spivey et al., 1993), pero los mecanismos relacionados con su toxicidad aún no están bien esclarecidos.

Los ácidos biliares pueden destruir las membranas celulares gracias a su acción detergente sobre los componentes lipídicos (Billington et al., 1980) y promover la generación de ROS, que a su vez podría modificar oxidativamente lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, y eventualmente causaría la muerte de los hepatocitos (Sokol et al., 2001). Además, ellos pueden activar a las células de Kupffer al generar las ROS, contribuyendo al daño hepático (Ljubuncic et al., 1996).

La acumulación de los ácidos biliares dentro de los hepatocitos puede resultar en el daño y la muerte celular de estos a través de dos mecanismos: bajas concentraciones de los ácidos biliares inducen la apoptosis celular (Yerushalmi, et al., 2001; Patel et al., 1994, Rodriguez et al., 1998 y Rodrigues et al., 1999), mientras que las altas concentraciones inducen la necrosis (Sokol et al, 1995), sin embargo en ciertos modelos de toxicidad producida por los ácidos biliares en el ratón, se ha reportado que la necrosis de los hepatocitos es la forma predominante de la muerte celular (Fickert et al., 2005).

En los hepatocitos de rata, la necrosis celular se caracteriza por una hinchazón y la disrupción de las membranas intracelulares y plasmáticas. El daño hepatocelular inducido por los ácidos biliares ha sido atribuido a un daño membranal directo debido a las propiedades detergentes de los ácidos hidrofóbicos en los componentes lipídicos (Billington et al., 1980) también se promueve la generación de ROS que, a su vez, oxidativamente modifica a los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, causando la muerte de los hepatocitos. La administración de NAC una vez establecido el daño colestático pudo prevenir que se generara un daño necrótico aún mayor, esto gracias a su acción antioxidante ejercida por sí misma. El trolox a su vez, ejerció una respuesta similar a la de la NAC al prevenir el incremento de la actividad de la ALT sugiriendo que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el daño hepático colestático.

Por otro lado, al cuantificar la actividad de la enzima γ -GTP, ni la NAC ni el trolox fueron capaces de prevenir el incremento de este marcador de daño, esta misma respuesta ya había sido observada por Barón y Muriel en el año 1999 (Barón y Muriel, 1999) lo que confirma nuevamente que el estrés oxidativo no es el principal mecanismo involucrado en la generación del daño hepático, sino más bien es una consecuencia de éste.

Los procesos bioquímicos como la gluconeogénesis y la glucogenólisis, que son los responsables de mantener los niveles normales de glucosa en sangre, son llevados a cabo por el hígado (Guyton y Hall, 2001), la cuantificación del contenido de glucógeno nos permite evaluar la capacidad biosintética de este órgano. Tras la obstrucción del conducto biliar común de las ratas, el contenido de glucógeno disminuyó, respuesta que también fue observada en el año 1999 por Baron y Muriel. La administración crónica de la

NAC no fue capaz de prevenir la depleción del contenido de este marcador de daño. Una explicación a esta respuesta podría darse tomando en cuenta el papel del óxido nítrico (NO), mediador químico producido por una variedad de células, gracias a la inducción de la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), en el hígado. Se ha observado que las células de Kupffer y los hepatocitos, inducen la expresión de iNOS (Billiar et al. 1990). Algunas citocinas, como lo son el TNF- α , la interleucina-1 β y el interfero- γ , son mediadores importantes de la producción de NO y tal vez las citocinas estudiadas en este trabajo, también puedan favorecer la expresión de esta enzima, el NO es capaz de inhibir totalmente la movilización de la glucosa y los procesos bioquímicos como la glucogenólisis y la gluconeogénesis, conllevando esto a una disminución en los niveles de glucosa en los hepatocitos (Horton et al., 1994; Fernández-Martínez et al., 2008). En el 2003, Efrati y colaboradores en el 2003, pudieron observar que la administración de NAC logró incrementar los niveles de óxido nítrico a nivel renal, quizá esta respuesta también se presenta a nivel hepático, lo que nos conllevaría a una modificación de estos procesos metabólicos y así los niveles de glucógeno no pudieron ser recuperados.

Estudios diversos han sugerido que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del daño hepático durante la colestasis en la rata (Sokol et al., 1991) y en humanos (Togashi, et al., 1990). El daño colestático inducido provocó un incremento en los niveles del MDA, uno de los principales productos de la peroxidación lipídica, y una disminución en el contenido de GSH, mostrando que efectivamente se generó un estrés oxidativo. La administración de la NAC provocó una disminución en los niveles de MDA y logró prevenir la depleción de los niveles de GSH y previno el incremento del GSSG. Cuando las ROS atacan a los lípidos de las membranas plasmáticas, se genera un proceso de daño conocido como peroxidación lipídica, el cual destruye las membranas celulares permitiendo así la muerte celular de los hepatocitos. Uno de los productos finales de este proceso es el MDA. La administración de NAC fue capaz de prevenir esta respuesta gracias a su efecto antioxidante ejercido por ella misma. Este compuesto puede donar hidrógenos del grupo sulfhídrido presente en su estructura al radical peróxido (ROO^*) convirtiéndolo en un hidroperóxido lipídico, terminando con la reacción

en cadena (Millea, 2009). Por otro lado, el efecto de la NAC en la prevención de la depleción del GSH y el incremento del GSSG puede ser explicado debido a que la NAC es la precursora del aminoácido L-cisteína, el cual a su vez es precursor de GSH, la principal molécula detoxificante contra metabolitos tóxicos (Li et al., 2004; Millea, 2009), lo que permitió que el hígado tuviera suficientes defensas antioxidantes para poder disminuir el daño hepático inducido por la LCBC.

Las enzimas antioxidantes son mecanismos de defensa importantes contra el daño hepático, entre las cuales podemos mencionar a la CAT, la cual convierte H_2O_2 en H_2O , y a la GPx, que es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de H_2O_2 utilizando como agente reductor el GSH. En procesos colestáticos, los diferentes mecanismos pueden contribuir a disminuir la actividad de ambas enzimas (Blum y Fridovich, 1985). Se ha demostrado que la NAC protege a las ratas ligadas del conducto biliar común al restaurar la actividad de la CAT (Pastor et al., 1997), efecto que también fue observado en nuestro trabajo, sin embargo, al evaluar la actividad enzimática de la GPx, la administración del fármaco no logró prevenir la disminución de la actividad de esta enzima antioxidante. Hay algunas razones que pudieran explicar este efecto: durante los procesos crónicos de daño hepático, este órgano sufre una depleción en sus niveles de selenio, independientemente de la etiología del daño, esto lo observo Thuluvath y Triger en 1992, y si tomamos en cuenta de que la GPx es una enzima dependiente de selenio, quizá esta sea la causa por la que solamente se observo la tendencia del fármaco para prevenir la disminución en la actividad de esta enzima antioxidante. En ambas determinaciones, tanto la NAC como el trolox generaron respuestas similares, lo que nos indica que efectivamente el estrés oxidativo fue generado durante el daño colestático provocado y que el uso de antioxidantes disminuye la peroxidación lipídica y mantiene niveles adecuados de las defensas antioxidantes.

Se sabe que la ligadura del conducto biliar trae como resultado un cambio en el balance antioxidante/prooxidante, lo que da lugar al llamado estrés oxidativo (Singh, 1992) además datos clínicos actuales indican que el estrés oxidativo está asociado con la activación de las HSC, las cuales son mediadores centrales de la patogénesis de la fibrosis y la síntesis de colágena

(Svegliati et al., 1998) y aunque se ha cuestionado que las HSC pueden no ser directamente sometidas al estrés oxidativo en la fibrosis experimental (Montosi et al., 1998), la exposición de cultivos de HSC humanas o de rata a sistemas prooxidantes o medios que contienen productos liberados de hepatocitos sometidos al daño oxidativo, traen consigo un incremento en la expresión del gen y de la síntesis de la procolágena tipo I. Estos efectos fueron prevenidos por el uso de antioxidantes (Parola et al., 1993), en este caso, el uso de NAC durante 28 días de la LCBC pudo prevenir la síntesis de colágena y por lo tanto la fibrosis hepática.

Muchas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento están relacionadas con el desarrollo de la fibrosis, el TGF- β se considera la citocina profibrogénica más potente. El TGF- β estimula la producción de las ROS en varios tipos celulares, y las ROS, a su vez, activan y median muchos efectos del TGF- β .

En los últimos años ha crecido el número de evidencias que indican que las ROS juegan un papel central en la actividad fibrogénica del TGF- β , sin embargo los mecanismos exactos no ha sido dilucidados. El TGF- β incrementa la producción de las ROS en muchos tipos celulares de células no fagocíticas como las células endoteliales, las células epiteliales, las células del musculo liso y los fibroblastos. Thannickal y colaboradores reportaron que el TGF- β estimula la producción de ROS a través de la activación de las oxidasas asociadas a la membrana celular, lo cual permite un incremento en la liberación de H₂O₂ al espacio extracelular en fibroblastos de pulmón humano y en células endoteliales de la arteria de pulmón en los bovinos (Thannickal et al., 2000, 1995 y 2003). Por su parte Yoon y colaboradores reportaron que TGF- β inducía una producción prolongada de las ROS mitocondrial al modificar la actividad del complejo IV en células Mv1Lu, una línea celular de epitelio de pulmón (Yoon et al., 2005). Albright en el año 2003, demostró que las mitocondrias y los microsomas son las fuentes principales de las ROS en hepatocitos de ratones tratados con TGF- β . Además de estimular la producción de las ROS, algunas evidencias demuestran que TGF- β suprime la expresión de algunas enzimas antioxidantes, incluyendo la CAT, la GPx y la superóxido dismutasa (Kayanoki et al., 1994).

No obstante con lo anteriormente mencionado, existen evidencias de que las ROS también juegan un papel importante en la fibrosis. Un mecanismo potencial por el que las ROS promueven la fibrosis es activando a la forma latente del TGF- β . Las isoformas de TGF- β son secretadas de algunas células como un complejo latente que consiste en el TGF- β y una proteína asociada de latencia (LAP) (Saharinen et al., 1998). La liberación del TGF- β de su LAP, ocurre en un proceso llamado activación del TGF- β latente, el cual es requerido para que el TGF- β se una a su receptor y favorezca la fibrosis (Barcellos-Hoff et al., 1996). Dado que la NAC es un antioxidante poderoso y tomando en cuenta lo anteriormente descrito, este puede ayudar a prevenir la activación del TGF- β , así mismo la activación de las HSC y por lo tanto previene la fibrosis hepática.

Cuando se presenta una lesión hepática cualquiera que sea su etiología, se activa la producción de citocinas, que son mediadores clave del daño hepático, las células de Kupffer y los monocitos derivados de los macrófagos que infiltran el hígado ante cualquier lesión y son la fuente primaria de la producción de citocinas con función pro-inflamatoria como la IL-6, y otras con función anti-inflamatoria como la IL-10, entre otras (Ramadori y Armbrust; 2000 y 2001).

La IL-6 juega un papel importante en la señalización hepática de la respuesta inflamatoria aguda (Zhang et al., 1996), ella favorece la aparición de la autoperpetuación de los eventos como la peroxidación lipídica, la disrupción de las membranas celulares con la consecuente muerte celular, la inflamación de las células hepáticas, la fibrosis y la proliferación de los ductos biliares (Marucci et al, 1993; Martínez et al., 1993). Por otro lado, la IL-10 es la citocina anti-inflamatoria por excelencia, esta actúa como un modulador endógeno de la inflamación en diversos tejidos y órganos y en diferentes contextos fisiológicos y patológicos (Moore, 2001). Nuestros resultados muestran que la NAC previene la expresión de la IL-6 e incrementa la expresión de la IL-10, ayudando así a contrarrestar el daño hepático.

8.2. Reversión del daño hepático crónico.

Muchas son las etiologías por las cuales el hígado puede ser dañado y en la actualidad se cuenta con múltiples estrategias experimentales que

ayudan a reproducir en animales, modelos de daño hepático muy semejantes a los que ocurren en el humano. Uno de estos modelos es el de la inducción del daño hepático por la administración de CCl_4 , este modelo experimental es uno de los más antiguos y más utilizados, su mecanismo de acción está asociado con el estrés oxidativo y es el modelo que más se asemeja a una cirrosis alcohólica en el hombre (Muriel, 2007).

La fibrosis y la cirrosis una vez que han sido establecidas se consideran procesos irreversibles, aún después de eliminar al agente etiológico que las produjo. En el año 2005, Muriel y colaboradores diseñaron un modelo experimental para estudiar el efecto de diversos compuestos en la reversión del daño hepático. Ellos pudieron demostrar que era posible inducir un daño y una vez instaurado, mantenerlo para posteriormente evaluar el efecto de diversos compuestos en la reversión del daño. Este diseño resulta interesante ya que en la práctica clínica generalmente ocurre que los pacientes llegan con el daño hepático ya establecido en busca de una cura a su enfermedad. Hoy en día no existe ningún tratamiento farmacológico que sea capaz de revertir la cirrosis hepática, por lo que los estudios donde se pruebe la eficacia de un fármaco ante este mal resulta de mucho interés.

El daño hepático provocado por la administración de CCl_4 durante 8 semanas y luego durante 4 semanas más, no se administró el agente etiológico, estuvo acompañado de un incremento en los niveles séricos de la enzimas ALT y γ -GTP, indicando un daño hepático a nivel celular. Sin embargo, tras suspender la administración del CCl_4 los niveles séricos de ambas enzimas regresaron a sus valores normales. Existen dos posibilidades para este efecto: se toma en cuenta que la vida media de la circulación en sangre de la ALT es de 47 horas (Giannini et al., 2005), y de la γ -GTP es de 96 horas, se puede pensar que al dejar de inducir el daño durante un mes, las enzimas presentes en sangre fueron depuradas, lo que impidió observar el buen efecto hepatoprotector del fármaco. Cabe otra posibilidad para explicar estas respuestas: la administración de CCl_4 durante 8 semanas pudo traer consigo una pérdida muy grande de masa hepática funcional, lo que trajo como consecuencia que una vez suspendida la administración del agente hepatotóxico, el hígado no tuviera oportunidad de sintetizar ambas enzimas y

esto impidió cuantificar niveles elevados de ellas en sangre (Friedman, 2004) y por lo tanto, evaluar el efecto hepatoprotector de la NAC.

Una de las funciones más importantes que realiza el hígado es la de mantener los niveles normales de la glucosa en sangre, a través de procesos bioquímicos como la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Se pudo observar que la administración de CCl_4 durante ocho semanas produjo una disminución importante del contenido de glucógeno hepático, cabe señalar que esta depleción se mantuvo por debajo de los valores normales por un mes más, tras suspender la inducción del daño. La administración de la NAC durante 4 semanas trajo como resultado una reversión del daño. Itinose y colaboradores (1994) pudieron observar que la NAC estimuló un incremento la tasa de depósito de glucógeno tras inducir un daño con paracetamol, lo que nos vuelve a demostrar el buen efecto hepatoprotector de nuestro compuesto.

Mucho se ha hablado acerca del efecto antioxidante de la NAC, el cual fue comprobado nuevamente en este trabajo. En este estudio, la administración de CCl_4 durante 8 semanas trajo consigo un incremento en los niveles de malondialdehído, marcador que evalúa el grado de peroxidación lipídica a nivel membranal, así como también provocó una depleción en los niveles de GSH, defensa antioxidante citosólica principal de las células. La administración de NAC logró revertir ambas respuestas. La NAC ha demostrado mejorar la oxigenación tisular en los pacientes con falla hepática fulminante (Harrison et al., 1991) y mejorar la microcirculación después del trasplante hepático (Koeppel et al., 1996). También se ha reportado que la NAC disminuye el daño causado por una sobredosis de paracetamol en humanos (Prescot, 1983) y disminuye el daño hepático y previene la depleción de glutatión en el plasma y el hígado en el ratón (Bray et al., 1992). La NAC tiene varios mecanismos por los cuales puede ejercer su efecto antioxidante 1) se considera un precursor del aminoácido cisteína, el cual es el aminoácido limitante para la síntesis de GSH y 2) posee un grupo sulfhidrilo con el cual es capaz de terminar la reactividad de las ROS (Lauteburg et al., 1983), debido a esto era de esperarse que la administración de NAC para salvaguardar o incrementar la capacidad de proteger al hígado contra el daño oxidativo iba a ser positiva.

Por último en este trabajo también se evaluó la capacidad antifibrogénica del compuesto al cuantificar el contenido de colágena tanto bioquímicamente

como histológicamente. Existen evidencias de que el estrés oxidativo ha sido detectado en casi todas las condiciones de la enfermedad hepática crónica tanto clínica como experimental con diferentes etiologías e índices de progresión de la fibrosis (Pietrangelo, 1998; Poli y Parola, 1997; Parola et al., 1999), éste representa un estímulo pro-fibrogénico directo o indirecto para la activación de las HSC, lo cual es sugerido por que en diversos estudios el empleo de antioxidantes previenen el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y la fibrosis hepática (Parola et al., 1992; Pietrangelo et al., 1995; Galicia-Moreno et al., 2009). Por otra parte, señales de estrés oxidativo y peroxidación lipídica son concomitantes o preceden la activación de las HSC y el depósito de colágena (Tsukamoto, 1995). Aunque se ha cuestionado que las HSC no pueden ser directamente sujetas al estrés oxidativo en una fibrosis experimental (Montosi et al., 1998), la exposición de cultivos humanos o de rata de HSC a sistemas pro-oxidantes o a un medio que contenga productos liberados de hepatocitos bajo un estado oxidativo, trae como resultado un incremento de la expresión génica y de la síntesis de la procolagena tipo I y estos efectos son bloqueados por el uso de antioxidantes (Parola et al., 1993; Casini et al., 1997).

Por otro lado, el TGF- β es la citocina pro-fibrogénica principal, reportes diversos han mostrado una interrelación entre la señalización del TGF- β y la formación de ROS en modelos in vitro (De Bleser et al., 1999; García-Trevijano et al., 1999; Herrera et al., 2004; Albright et al., 2004). A su vez, las ROS pueden mediar muchos de los efectos pro-fibrogénicos del TGF- β facilitando la activación de la forma latente de éste (Barcellos-Hoff y Dix, 1996). Se puede pensar que al impedir la activación del TGF- β así como ejerciendo su excelente efecto antioxidante, la NAC puede revertir la fibrosis inducida por la administración crónica de CCl₄.

9. Resumen de resultados

1. La administración de NAC de manera crónica fue efectiva para prevenir el daño hepático inducido por la LCBC, así como también mostro respuestas favorables para revertir una cirrosis previamente establecida mediante la administración crónica de CCl_4 .
2. En el daño hepático inducido por la ligadura del conducto biliar común, efectivamente el estrés oxidativo no es el mecanismo principal para inducirlo, pero sin embargo juega un papel importante para la exacerbación de éste.
3. La NAC no sólo mostró sus buenos efectos antioxidantes ante el daño colestático, también se observaron sus efectos inmunomoduladores excelentes al prevenir la expresión de las citocinas TGF- β , IL-6 y al incrementar la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10.
4. La administración de la NAC como de trolox lograron provocar respuestas semejantes ante un daño colestático, lo que vuelve a confirmar el papel tan importante que tiene el estrés oxidativo en el daño hepático inducido por la LCBC.
5. En cuanto a la reversión del daño hepático, la NAC logró mostrar buenos efectos, relacionados a sus efectos antioxidantes pero más a su buen efecto antifibrótico, quizá por la capacidad que tiene de impedir la expresión de la citocina profibrótica por excelencia, el TGF- β .

10. Conclusión

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este proyecto y considerando la terapéutica actual con la que se cuenta para el tratamiento de la cirrosis hepática podemos señalar a la NAC como una posible alternativa para su evaluación en estudios clínicos y posteriormente, un buen fármaco para el tratamiento de esta enfermedad.

11. Perspectivas

1. Debido al buen efecto que tiene ambos compuestos sobre la expresión de las citocinas: el TGF- β , la IL-6 y la IL-10 se podría evaluar la capacidad de la NAC en la expresión de otras citocinas que participan en el proceso de daño hepático como el TNF- α , la IL-1 β entre otras, y no solo su expresión, si no ver cuál es el efecto que tiene el compuesto a nivel de ARNm en estas y las otras citocinas, para ver si su respuesta se debe a cambios a nivel transcripcional o traduccional.
2. Tomando en cuenta que la NAC fue capaz de prevenir y revertir la cirrosis hepática podemos pensar que podría ser candidato para poder ser evaluado en estudios clínicos.

12. Referencias

- Arias I, Boyer J, Chisari F, Fausto N, Schachter D, Shafritz D. 2001. *The Liver Biology and Pathobiology*, 4^a edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, PA.
- Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. 1992. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol*; 263: 579-85.
- Akgun E, Caliskan C, Celik HA, Ozutemiz AO, Tuncyurek M, Aydin HH. 2005. Effects of N- acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. *J Int Med Res*; 33: 196-206.
- Albright CD, Salganik RI, Craciunescu CN, Mar MH, Zeisel SH. 2003. Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. *J Cell Biochem*; 89: 254-61.
- Arthur MJ. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 279: 245-49.
- Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. 1986. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses*; 19: 57-69.
- Barcellos-Hoff M, Dix T. 1996. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta1. *Mol Endocrinol*; 10: 1077-83.
- Baron V, Muriel P. 1999. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys Acta*; 1475: 173-80.
- Barcellos-Hoff M, Dix TA. 1996. Redox-mediating activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol*; 10: 1077-83.
- Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*; 78: 547-581.
- Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C. 1997. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*; 156: 1897-1901.

- Belmont AD. Capítulo 59: Cirrosis hepática: etiopatogenia y diagnóstica, en Tratado de Hepatología de Herrerias, G. et al.; tomo 1, Ed. Universidad de Sevilla, Sevilla 1996.
- Berger LM, Bhatt H, Combes B, Estabrock RW. 1986. CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. *Hepatology*; 6: 36-45.
- Betro M. 1973. Gamma-glutamyl transpeptidase in diseases of the liver and bone. *Am J Clin Pathol*; 60: 672.
- Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL. 1990. Kupffer cells: hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res*; 48: 349-53.
- Billington D, Evans CE, Godfrey PP, Coleman R. 1980. Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. *Biochem*; 188: 321-27.
- Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*; 240: 500-08.
- Boyde T, Latner A. 1961. Starch gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and serum. *Biochem J*; 82: 52.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-54.
- Bravo M, Puratic O, Stephan R, Oviedo I. 1976. Vitamina E. *Rev Chil Pediatr*; 47: 402-408.
- Bray GP, Treger JH, Williams R. 1992. S-adenosylmethionine protects against acetaminophen hepatotoxicity in two mouse models. *Hepatology*; 15: 297-301.
- Buege J, Aust S. 1978. *Methods in Enzymology*; 30: 302.
- Cameron GR, Karunaratne WAE. 1932. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol*; 42: 1-21.
- Campollo O, Valencia-Salina J, Berumen-Arellano. 1997. Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el Hospital Civil de Guadalajara. *Salud Pública de Guadalajara*; 39: 195-200.
- Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. 1997. Neutrophil-derived superoxide anion induces

lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*; 25: 361-67.

- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*; 34: 30-38.
- Cotgreave I. 1997. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. In *Antioxidants in Disease: Mechanisms and Therapy*. Adv Pharmacol Academic Press New York, NY; 38: 205-27.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. 1996. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukine-6-deficient mice. *Science*; 274: 1379-83.
- Crofton P. 1982. Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci*; 16: 161.
- De Bleser P, Xu G, Rombouts K, Rogiers V, Geerts A. 1999. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor- β signaling in activated rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*; 274: 33881-87.
- De Leve L, Kaplowitz N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*; 52: 287-305.
- Dekhuijzen PN. 2004. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*; 23: 629-36.
- Dickinson DA, Moellering DR, Iles KE, Patel RP, Levonen AL, Wigley A, Darley-Usmar VM, Forman HJ. 2003. Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem*; 384: 527-37.
- Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*; 87: 2095-147.
- Efrati S, Averbuck M, Blatt A, Krakover R, Weisgarten J, Morrow J, Stein M, Golik A. 2003. The effect of N-acetylcysteine on renal function, nitric oxide, and oxidative stress after angiography. *Kidney Int*; 64: 2182-87.
- Ellis G. 1978. Serum enzyme test in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol*; 70: 248.
- Elvir Mairena JR. 1994. Free radicals, alcoholism and hepatic damage. *Rev Med Hondur*; 62: 76-82.

- Evans P, Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit J Nutr*; 85: S67-74.
- Evans TRJ, Kaye SB. 1999. Retinoids: present role and future potential. *British J Cancer*; 80: 1-8.
- Fernández-Martínez E, Morales-Rios MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. 2001. Effects of thalidomide and 3-phtalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *Drug Dev Res*; 54: 209-18.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Álvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. 2006. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*; 58: 49-58.
- Fernández-Martínez E, Wens-Flores I, Moreno MG, Ortíz MI, Muriel P, Pérez-Álvarez V. 2008. Short-terms effects of thalidomide analogs on hepatic glycogen and nitric oxide in endotoxin-challenged rats. *Gen Physiol Biophys*; 27: 203-10.
- Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, Zollner G, Wagner M, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H. 2005. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. *J Hepatol*; 42: 378-85.
- Friedman SL. 2004. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*; 1: 98-105.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*; 2000: 2247-50.
- Galicia-Moreno M, Rodríguez-Rivera A, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. 2009. N-acetylcysteine prevents carbón tetrachloride-induced liver cirrosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 21: 908-14.
- García-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Domínguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rokjind M. 1999. Transforming growth factor beta 1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*; 29: 960-70.

- Giannini EG, Testa R, Savarino V. 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*; 172: 367-79.
- Glossman M, Neville D. 1972. Gamma-glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett*; 19: 340-44.
- Guyton A, Hall J. 2001. *Tratado de Fisiología Médica*, 10^a edición. Mc Graw-Hill Interamericana México D.F.
- Harrison PM, Wendon JA, Gimson AE, Alexander GJ, Williams R. 1991. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med*; 324: 1852-57.
- Heffner JE, Repine JE. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir*; 140: 531-54.
- Helmut S. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. In *Advances in pharmacology*. Academic Press. San Diego, California.
- Herrera B, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Beltrán J, Fernández M, Fabregat I. 2004. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes. *Free Radic Biol Med*; 36: 16-26.
- Horton RA, Ceppi ED, Knowles RG, Titheradge MA. 1994. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic shock. *Biochem J*; 299: 735-39.
- Hunt DR. 1980. The identification of risk factors and their application to the management of obstructive jaundice. *Aust N J Surg*; 50: 476-80.
- Itinois AM, Doi-Sakuno ML, Bracht A. 1994. N-acetylcysteine stimulates hepatic glycogen deposition in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*; 83: 87-92.
- Kaplan M. 1972. Alkaline phosphatase. *Gastroenterology*; 62: 452.
- Kayanoki Y, Fujii J, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. 1994. Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor beta 1 in rat hepatocytes. *J Biol Chem*; 269: 15488-92.
- Kessova I, Cederbaum A. 2003. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med*; 3: 509-18.
- Kobrinsky NL, Sjolander DE, Goldenberg JA, Ortmeier TC. 2005. Successful treatment of doxorubicin and cisplatin resistant hepatoblastoma in a child

- with Beckwith-Wiedemann syndrome with high dose acetaminophen and N-acetylcysteine rescue. *Pediatr Blood Cancer*; 45: 222-25.
- Kountouras J, Barbara H, Billing H, Scheuer PJ. 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path*; 65: 305-11.
- Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. 1996. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthopedic liver transplantation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*; 61: 1397-402.
- Kyung-Hyun-Chul K, Mee-Yul H, Hoon-Kyu O, Tae Sung L, Young Chae C, Ho-Jung S, Nam-Hee W, Kwan-Kyu P. 2006. The antifibrotic effect of TGF- β 1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Comm*; 343: 1072-1078.
- Lamson PD, Wing R. 1926. Early cirrhosis of the liver produced in dogs by carbon tetrachloride. *J Pharmacol Exp Therap*; 29: 191-202.
- Lauteburg BH, Corcoran GB, Mitchell JR. 1983. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats *in vivo*. *J Clin Invest*; 71: 980-91.
- Lawrence RA, Burk R. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*; 71: 952-58.
- Li MC, He SH. 2004. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *W J Gastroenterology*; 10:620-25.
- Li MK, Crawford JM. 2004. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis*; 24: 21-24.
- Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. 1996. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut*; 39: 475-78.
- Lum G, Gambino S. 1972. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem*; 18: 358.
- Martinez OM, Villanueva JC, Greshwin ME, Krams SM. 1993. Cytokine patterns and cytotoxic mediators in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*; 21: 113-19.

- Marucci L, Svegliati Baroni G, Mancini R, Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. 1993. Cell proliferation following extrahepatic biliary obstruction. *J Hepatol*; 17: 163-69.
- Masson PJ. 1929. Trichromic staining of collagen. *J Tech Methods*; 12: 75-90.
- Medina E, Kaempffer A. 2002. Cirrosis hepática en Chile. *Revista Chilena de Salud Pública*; 6: 3.
- Meredith MJ, Reed DJ. 1982. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem*; 257: 3747-53.
- Meyer A, Buhl R, Magnussen H. 1994. The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*; 7: 431-36.
- Meyer A, Buhl R, Kampf S, Magnussen H. 1995. Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normal. *Am J Respir Crit Care Med*; 152: 1055-60.
- Millea PJ. 2009. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician*; 80: 265-69.
- Montosi G, Garuti C, Martinelli S, Pietrangelo A. 1998. Hepatic stellate cells are not subjected to oxidant stress during iron-induced fibrogenesis in rodents. *Hepatology*; 27: 1611-22.
- Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*; 19: 683-765.
- Moreno MG, Muriel P. 2006. Inducible nitric oxide synthase is not essential for the development of fibrosis and liver damage induced by CCl₄ in mice. *J Appl Toxicol*; 26: 326-332.
- Muriel P, Mourelle M. 1990. The rol of membrane composition in ATPases activities of cirrhotic rats. Effect of silymarin. *J Appl Toxicol*; 10: 281-284.
- Muriel P. 1997. Peroxidation of lipids and liver damage. In oxidants and free radicals, Baskin SI, Salem H eds. Taylor & Francis: Washington; 237-257.
- Muriel P, Escobar Y. 2003. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J. Appl Toxicol*; 23: 103-108.
- Muriel P, Moreno MG, Hernández MC, Chávez E, Alcázar LK. 2005. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of the treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicine acid. *Basic & Clin Pharmacol & Toxicol*; 96: 275-280.

- Muriel P. 2007. Some experimental models of liver damage. In Sahu S, editor. Hepatotoxicity : from genomics to in vitro and in vivo models. John Wiley & Sons LTD, West Sussex, UK.
- Muriel P. 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int*; 3: 526-536.
- Narro-Robles J, Gutiérrez-Ávila J, López-Cervantes M. 1992. La mortalidad por cirrosis hepática en México: características epidemiológicas relevantes. *Salud Publica de México*; 34.
- Nelson DR, Lauwers GY, Lau J, Davis GL. 2000. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: A pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology*; 118: 655-60.
- Netter F.1981. Colección Ciba de Ilustraciones médicas, Sistema digestivo: hígado, vías biliares y páncreas. Tomo 3.3 Ed científicas y técnicas (Masson-Salvat de Medicina), Barcelona.
- Nohl H, Hegner D. 1978. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. *FEBS Lett*; 253: 5051-63.
- Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Buron CA. 1997. Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J Virol*; 71: 9248-58.
- Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, Albano E, Biocca ME, Poli G, Dianzani MU. 1992. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*; 16: 1014-21.
- Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Dianzani MU. 1993. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen $\alpha 1(I)$ gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 194: 1044-50.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 1999. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular bases and pathophysiological implications. *Antioxidant Redox Signaling*; 1: 255-84.
- Parson CJ, Takashima M, Rippe RA. 2007. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*; 22: S79-84.

- Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. 1997. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol*; 27: 33881-87.
- Patel T, Bronk SF, Gore GJ. 1994. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest*; 94: 2183-92.
- Pérez-Severiano, Escalante B, Vergara P. 2002. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res*; 951: 36-42.
- Pérez-Tamayo R. 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*; 3: 112-20.
- Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccareli D, Gallesi D, Giovannini F, Gasparetto A, Masini A. 1995. Antioxidant activity of silybin in vivo during chronic iron overload in rats. *Gastroenterology*; 109: 1941-49.
- Pietrangelo A. 1998. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J Hepatol*; 28: 8-13.
- Poli G, Parola M. 1997. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*; 22: 287-305.
- Prescot LF. 1983. Paracetamol overdose: pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*; 25: 290-314.
- Ramodori G, Armbrust T. 2000. Cytokines and the liver. 2000. En: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2^a edición. Bircher J, McIntyre N, Oxford.
- Ramodori G, Armbrust T. 2001. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13: 777-84.
- Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*; 28: 56-63.
- Rej R. 1978. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. *Clin Chem*; 24: 1971.
- Rodrigues AJ, Evora PR, Schaff HV. 2004. Protective effect of N-acetylcysteine against oxygen radical-mediated coronary artery injury. *Braz J Med Biol Res*; 37: 1215-24.

- Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. 1998. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*; 101: 2790-99.
- Rojkind M, González E. 1974. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Anal Biochem*; 57: 1-7.
- Saharinen J, Taipale J, Monni O, Keski-Oja J. 1998. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta binding protein, LTBP-4. *J Biol Chem*; 273: 18459-69.
- Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. 1999. Transforming growth factor and tumor necrosis factor inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*; 30: 196-202.
- Schiff L, Schiff E. 1993. Diseases of the liver, Vol 27^a edition. J. B. Lippicott Company, Philadelphia, PA.
- Seifter S, Seymour B, Novic B, Muntwyler E. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*; 25: 191.
- Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N, Blesa S, Martinez M, Cortijo J, Estrela J, Morcillo E, Bulbena O. 2003. In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Brit J Pharmacol*; 138: 1037-48.
- Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative Stress*. Sies Ed, Academic Press, London.
- Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidant. *Am J Clin Nutr*; 62: 1315S-21S.
- Singh S, Shackleton G, Ah Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. 1992. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology*; 103: 1625-29.
- Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. 1993. Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest*; 92: 17-24.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala RA. 1991. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *J Lipid Res*; 32: 1349-57.
- Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM Jr. 1995. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology*; 109: 1249-56.

- Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, Elkins N, Everson G. 2001. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res*; 49: 519-31.
- Stocker R, Bowry VW, Frei B. 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci*; 88: 1646-50.
- Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, ferreti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. 1998. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*; 20: 720-26.
- Tepel M, Van Der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. 2000. Prevention of radiographic contrast agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med*; 343: 180-4.
- Thannickal VJ, Hassoun PM, White AC, Fanburg BL. 1993. Enhanced rate of H₂O₂ release from bovine pulmonary artery endothelial cells induced by TGF-beta1. *Am J Physiol*; 265: L622-26.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 1995. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblast by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem*; 270: 30334-38.
- Thannickal VJ, Day RM, Klinz SG, Bastien MC, Larios JM, Fanburg BL. 2000. Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-β. *FASEB*; 14: 1741-48.
- Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJP, Sheron N. 1998. Primary rat and mouse hepatic stellate cells Express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *in vitro*. *Hepatology*; 28: 1518-24.
- Thuluvath PJ, Triger DR. 1992. Selenium in chronic liver disease. *J Hepatol*; 14: 176-82.
- Tilg H, Diehl AM. 2000. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*; 343: 1467-76.
- Togashi H, Shinzawa H, Wakabayashi H, Nakamura T, Yamada N, Takahashi T, Ishikawa M. 1990. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J Hepatol*; 11: 200-05.

- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*; 339: 1217-27.
- Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Brittenham GM. 1995. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest*; 96: 620-30.
- Urtasun R, Nieto N. 2007. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig*; 99: 223-230.
- Varvasovszky Z, McKee M. 2000. Problem drinking among hospitalized patients in Hungary. *Alcohol & Alcohol*; 35: 574-79.
- Venkatakrisnan K, Greenblatt D. 2001. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol*; 41: 1149-79.
- Weiss SJ. 1986. Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol Scand*; 548: 9-37.
- Weiss, S.J. (1986). Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol. Scand.* 548: 9-37
- Woodman D. 1988. Assessment of hepatic function and damage in animal species: a review of the current approach of the academic, governmental and industrial institutions represented by the animal clinical chemistry association. *J App Tox*; 8: 249-54.
- Wu D, Cederbaum A. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*; 27: 277-84.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*; 134: 489-92.
- Yagci G, Gul H, Simsek A, Buyukdogan V, Onguru O, Zeybek N, Aydin A, Balkan M, Yildiz O, Sen D. 2004. Beneficial effects of N-acetylcysteine on sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *J Gastroenterol*; 39: 268-76.
- Yamada Y, Fausto N. 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol*; 152: 1577-89.
- Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. 2001. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*; 33: 616-26.

- Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G. 2005. TGF beta 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mi1Lu cells. *Oncogene*; 24: 1895-1903.
- Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I. 1996. STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem*; 271: 9503-9.
- Zimmerman H, West M.1963. Serum enzyme levels in the diagnosis of hepatic disease. *Am J Gastroenterol*; 40: 387.