

30
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**EFEECTO DE LA COLCHICEINA Y DEL ACIDO URSODESOXICOLICO SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LAS ATPasas DE Na'/K' Y Ca'' EN MEMBRANAS PLASMATICAS
DE HEPATOCITOS Y DE ERITROCITOS DE RATAS CIRROTICAS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARTHA PATRICIA GONZALEZ GARCIA**

**TESIS CON
FALLA LE ORIGEN**

CUAUTITLAN ZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	i
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. Organización de la Microcirculación.....	3
I.2. El Tetracloruro de Carbono como Agente Hepatotóxico.....	6
I.3. Cirrosis y Hepatitis.....	10
I.4. Las Membranas Celulares y el Daño Hepático.....	16
I.5. La Membrana Plasmática del Eritrocito.....	24
I.5.1. Las Enfermedades Hepáticas y los Lípidos del Eritrocito.....	26
I.6. Fármacos Utilizados en el Tratamiento del Daño Hepático Agudo (Hepatitis Tóxica).....	26
I.7. Fármacos Utilizados en el Tratamiento del Daño Hepático Crónico (Cirrosis).....	28
I.8. Evaluación del Daño Hepático.....	37
II. OBJETIVOS.....	40
III. MATERIALES Y METODOS.....	41
III.1. Intoxicación Crónica con CCl ₄ , de acuerdo al Método de Ehrinpreis y colaboradores	41
III.2. Tratamientos Orientados a Evaluar la Reversión de la Cirrosis.....	42
III.3. Esquema de tratamientos.....	43
III.4. Esquema del protocolo experimental.....	44

III.5.	Obtención de las Membranas Plasmáticas de los Hepatocitos.....	45
III.6.	Obtención de las Membranas Plasmáticas de los Eritrocitos.....	46
III.7.	Determinación de los Fosfolípidos Totales en las Membranas de los Hepatocitos.....	47
III.8.	Determinación de los Fosfolípidos Totales en las Membranas de los Eritrocitos.....	47
III.9.	Determinación de Colesterol en Membranas de Hepatocitos.....	48
III.10.	Determinación de Colesterol en Membranas de Eritrocitos.....	48
III.11.	Determinación de Proteínas.....	49
III.12.	Medición de la Actividad de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ del Hepatocito por el Método Colorimétrico de Ames.....	49
III.13.	Medición de la Actividad de la ATPasa de Ca ²⁺ de Alta Afinidad de la Membrana Plasmática de los Hepatocitos.....	50
III.14.	Medición de la Actividad de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ de los Eritrocitos.....	50
III.15.	Determinación de la ATPasa de Ca ²⁺ en Membranas de Eritrocitos.....	51
III.16.	Tratamiento Estadístico de los Datos y Significado de las Diferencias.....	51
IV.	RESULTADOS.....	52
V.	DISCUSION.....	69

VI.	CONCLUSIONES.....	79
VII.	REFERENCIAS	81

RESUMEN

El estudio del CCl_4 , como agente hepatotóxico ha despertado desde hace mucho tiempo gran interés, debido a que la exposición a este tóxico produce a corto plazo efectos devastadores sobre varios tipos celulares.

Después de la intoxicación con CCl_4 , uno de los eventos que se presenta es el deterioro en la membrana plasmática de los hepatocitos, esto se ve reflejado en cambios en la composición lipídica de la misma. La actividad de varias enzimas de membrana es sensible a cambios en su microambiente lipídico, estos cambios se han sugerido como una explicación de las alteraciones en la actividad de las enzimas embebidas en la membrana plasmática. Se ha reportado que la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} está reducida significativamente en las membranas plasmáticas de los hepatocitos de ratas cirróticas.

Además, existen evidencias en la literatura de que los cambios que ocurren en las membranas plasmáticas de los hepatocitos están claramente reflejados en las membranas plasmáticas de los eritrocitos.

Se ha demostrado que la colchicina puede prevenir el daño hepático y las alteraciones producidas por la administración crónica con CCl_4 . El tratamiento con colchicina reduce de manera significativa el contenido de colágena de ratas cirróticas.

El ácido ursodesoxicólico ha sido utilizado en el tratamiento de diferentes padecimientos hepáticos en la clínica, para disolver

cálculos biliares y en la cirrosis biliar primaria.

Por tal motivo, se decidió estudiar las alteraciones producidas por el CCl_4 en las membranas de estos dos tipos celulares. Además de determinar si la administración de la colchicina y del ácido ursodesoxicólico son capaces de revertir las alteraciones producidas por el CCl_4 , así como determinar si existe correlación entre los cambios que ocurren en las membranas de los hepatocitos con los de los eritrocitos en la intoxicación con CCl_4 .

Para tal efecto, los animales fueron divididos en 6 grupos experimentales: el grupo 1 recibió solamente el vehículo (aceite mineral Sigma) por vía intraperitoneal (i.p.), se denominará grupo Control. El grupo 2 se utilizó como control de colchicina (COLCH) administrándose en dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal por vía oral (p.o.). Al grupo 3 se le administró ácido ursodesoxicólico (AUDC) en una dosis de 25 mg/kg de peso corporal p.o., este grupo se referirá como control de AUDC. El grupo 4 recibió CCl_4 (0.4 g/Kg) disuelto en aceite mineral (Sigma) i.p.. En el grupo 5 se administró la misma dosis de CCl_4 por vía intraperitoneal durante un periodo de 8 semanas, en las 5 semanas posteriores se les administró simultáneamente CCl_4 y COLCH. El grupo 6 recibió un tratamiento semejante al del grupo 5, pero en las últimas 5 semanas además del tetracloruro recibió AUDC en lugar de COLCH.

Una vez concluidos los tratamientos se procedió a realizar las determinaciones de los marcadores de daño ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , colesterol y fosfolípidos. Encontrándose una marcada disminución en

la actividad de las ATPasas en hepatocitos y eritrocitos en el grupo tratado únicamente con CCl₄, mientras que en los grupos tratados con COLCH y con AUDC la actividad de estas enzimas se mantiene en niveles normales.

El contenido de colesterol en las membranas de los hepatocitos y de los eritrocitos aumentó significativamente después de la intoxicación con CCl₄, no así en los grupos que recibieron COLCH y AUDC además del CCl₄, donde se observaron valores normales. El contenido de fosfolípidos en los dos tipos celulares no presentó modificación alguna en ninguno de los grupos. En cuanto al cociente colesterol/fosfolípidos se obtuvo un incremento significativo como consecuencia en el aumento del contenido de colesterol en el grupo cirrótico. Los tratamientos con COLCH y con AUDC fueron capaces de revertir el incremento de dicho cociente.

Por otra parte, el estudio histológico mostró que la administración crónica de CCl₄ produjo una intensa necrosis centrolobulillar y la arquitectura normal del hepatocito se perdió, mientras que en el grupo control no se observó ningún cambio histológico. Los cortes histológicos de los animales tratados con colchicina y con ácido ursodesoxicólico además del CCl₄ presentaron un efecto mucho menor en las células, las bandas de colágena son más delgadas y la estructura normal del hepatocito se encontró mejor preservada que el grupo que sólo recibió CCl₄.

Como puede observarse la colchicina así como el ácido ursodesoxicólico fueron capaces de revertir las alteraciones producidas por el CCl₄, ya que poseen efectos benéficos sobre la

composición y funcionalidad de las membranas plasmáticas de los hepatocitos así como de los eritrocitos. Estos fármacos podrían ser potencialmente útiles en el tratamiento de la cirrosis en el humano. En el presente trabajo se observó un comportamiento muy similar a lo reportado en la literatura, ya que se encontró una relación inversa entre la actividad de las ATPasas y el cociente molar colesterol/fosfolípidos, es decir, al aumentar dicho cociente la actividad enzimática disminuyó en el grupo cirrótico. Los resultados de este estudio sugieren que las alteraciones en la composición lipídica y en la funcionalidad de las membranas plasmáticas están fuertemente vinculadas con las hepatopatías crónicas.

I. INTRODUCCION

El hígado es un órgano que se encuentra presente en todos los animales vertebrados. En el hombre comprende del 2 al 3% del peso corporal (1) y se encuentra localizado en la cavidad abdominal por debajo del diafragma. Presenta cuatro lóbulos separados de manera incompleta y su superficie externa está revestida por una fina cápsula de tejido conjuntivo (cápsula de Glisson). El hilo está bien definido y por él entran los vasos y salen los conductos hepáticos (2).

Este órgano recibe cerca de una cuarta parte del gasto cardíaco en los adultos en reposo (1,500 ml/min) (3, 4) a través de un doble sistema de irrigación sanguínea. La vena porta lleva sangre que ha pasado por los lechos capilares del tubo digestivo, bazo y páncreas. Esta suministra aproximadamente el 75% de la sangre que llega al mismo (4), es rica en sustancias nutritivas, pero relativamente pobre en oxígeno. Por otra parte la arteria hepática transporta sangre bien oxigenada. Ambos sistemas de aporte sanguíneo se mezclan al pasar por los sinusoides de los lobulillos (Fig. 1). La sangre de los sinusoides fluye hacia el centro de cada lobulillo donde es recogida por la vena central.

La unidad estructural clásica del órgano es el lobulillo hepático, un prisma poliédrico de tejido, que contiene placas anastomosadas de células parenquimatosas y un sistema laberíntico de sinusoides sanguíneos. Las ramas de los vasos sanguíneos aferentes y de los conductos hepáticos corren a lo largo de los

bordes del poliedro y la vena central pasa por el centro de éste (Fig. 1) (2).

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

El hígado es esencial para la vida y los mamíferos sobreviven a la hepatectomía parcial fundamentalmente porque las células tienen una extraordinaria capacidad de regeneración y la facultad de soportar grandes aumentos de exigencias metabólicas.

Este órgano funciona como una glándula exócrina y como una glándula endócrina. Secreta bilis que fluye hacia el duodeno y que tiene, entre otros componentes, sales biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos biliares. La lecitina (fosfatidilcolina), que es el fosfolípido más importante y el colesterol son insolubles en agua, y forman micelas mixtas con las sales biliares permitiendo así que se lleve a cabo la emulsificación de las grasas facilitando su digestión (2). La sangre portal lleva los alimentos digeridos al órgano, donde se almacenan carbohidratos (glucógeno), proteínas, vitaminas y algunos lípidos.

Las sustancias almacenadas que no son utilizadas por el hepatocito pueden ser liberadas a la circulación general, ya sea directamente como la glucosa o bien ligadas a un transportador

como los triglicéridos que salen formando parte de una lipoproteína. El hígado también sintetiza muchas sustancias en respuesta a las demandas del organismo: albúmina y otras proteínas plasmáticas, glucosa (para la glucogenólisis), ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Metaboliza compuestos exógenos como fármacos e insecticidas y compuestos endógenos como esteroides (2).

A causa de su gran capacidad vascular, sirve como reservorio sanguíneo. Durante la embriogénesis y en ciertas enfermedades del adulto tiene actividad hematopoyética. Finalmente, la abundancia de macrófagos hace del hígado uno de los principales filtros para las partículas extrañas, especialmente bacterias y antígenos provenientes del intestino (2).

I.1. Organización de la Microcirculación

La organización de las unidades microcirculatorias del hígado influye en el mecanismo responsable de muchos procesos patológicos (2). Rappaport (5) ha mencionado que el hepatocito no está organizado alrededor de la vena central (lobulillo clásico), sino que la unidad estructural y funcional del hígado es el acino (Fig. 2) hepático.

En ciertos aspectos esta unidad es semejante al lobulillo portal y a menudo se describe como la unidad funcional más pequeña del hígado. El acino hepático simple se define como una masa irregular de tejido parenquimatoso no encapsulado que se encuentra entre dos o más vénulas hepáticas terminales (venas centrales).

El eje de esta unidad llamado espacio portal, contiene una raíz del canal portal principal, una vénula portal terminal, una arteriola hepática, un conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios (Fig. 2) (5).

Rappaport y cols. (6) encontraron que el acino recibe sangre de los vasos de su propio espacio portal. Las células parecen agruparse en zonas concéntricas alrededor del eje del acino y las más próximas al eje y a los vasos aferentes y terminales (zona 1) son las primeras que reciben sangre y sustancias nutritivas, las últimas que mueren y las primeras en regenerarse.

Las células en la zona 3 están situadas en la periferia del acino y reciben sangre que ha intercambiado gases y metabolitos con las células en las zonas 1 y 2. Este anillo parenquimatoso es más sensible al daño debido a cambios circulatorios (isquemia, anoxia o congestión) y deficiencias nutricionales. El concepto de zonas circulatorias acinosas ha sido extendido por Rappaport (6) para explicar la apariencia histológica de muchas alteraciones patológicas en el hígado. Los cambios en la microcirculación hepática que se observan in vivo después de una intoxicación son debidos principalmente al daño de los hepatocitos producido por una sustancia endógena o exógena.

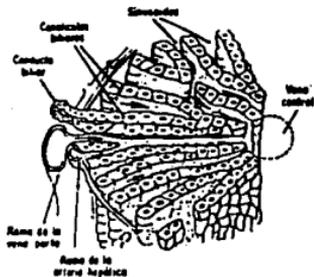


Fig. 1. Dirección de los flujos sanguíneos y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vénula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situada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

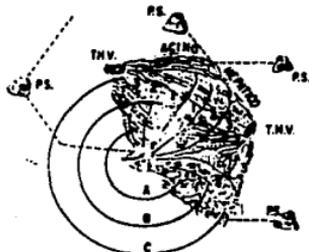


Fig. 2. Irrigación de una acina hepática simple. La tensión de oxígeno y el nivel de los principales nutrientes de la sangre disminuyen en los sinusoides desde la zona 1 hasta la 3. Las zonas 1, 2 y 3 indican volúmenes correspondientes de una porción de una unidad acinosa somatostática. El círculo A encierra la zona comúnmente conocida como "periportal", mientras que la zona B y la C representan las zonas más periféricas al espacio porta (P.S.). T.M.V. vénulas hepáticas terminales. Fig. 1 de Rappaport et. al. Anat. Record, 119:11, 1954.

Las sustancias tóxicas se empiezan a metabolizar en la zona 1 (Fig. 2) dañando los microvasos aferentes, produciendo un incremento en la permeabilidad y, en ocasiones microhemorragia.

La distribución inicial del daño a partir del espacio portal a las zonas 1, 2 y 3 (Fig. 2) parece confirmar la correlación funcional de la estructura acinar propuesta por Rappaport.

El daño hepático inducido por sustancias químicas es un problema de gran importancia en toxicología. Las lesiones observadas en el hígado no solamente dependen de las características del agente químico sino también del período de exposición. Por ejemplo, después de una exposición aguda se pueden observar ya sea acumulación de lípidos, necrosis celular o disfunción hepatobiliar, mientras que en la exposición crónica se observa generalmente cirrosis o cambios neoplásicos. Las diferentes alteraciones bioquímicas que se presentan como consecuencia del daño celular ayudan a entender los posibles cambios patológicos que ocurren en el órgano. La aparición de cambios degenerativos en el hepatocito no ocurren como resultado de un mecanismo tóxico único.

1.2. El Tetracloruro de Carbono como Agente Hapatotóxico

El estudio del CCl_4 , como agente hepatotóxico ha despertado desde hace mucho tiempo gran interés en los laboratorios de patología debido a que con exposiciones a corto plazo produce efectos devastadores sobre varios tipos celulares. El CCl_4 , se usó

como agente anestésico (7) pero debido a que su administración producía atrofia aguda del hígado tal uso fue abandonado. El CCl₄ como un veneno industrial preocupó a las generaciones de médicos de finales del siglo XIX y principios del XX. En el año 1921 se empezó a usar como antihelmíntico y ésto ocasionó problemas en la población tratada. Durante los primeros años del presente siglo los estudios estuvieron enfocados principalmente a las condiciones dietéticas que aminoraban o aumentaban el daño producido por el CCl₄ (8). Sin embargo, se plantearon interrogantes tales como: ¿porqué es el hígado el órgano preponderantemente afectado?, ¿cuál es la lesión inicial?, ¿a qué se deben la infiltración grasa y la necrosis hepatocelular con su peculiar distribución centrolobulillar y mediozonal?

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

1. Un mayor aporte de sustratos capaces de convertirse en lípidos.
2. Una disminución de la exocitosis de lípidos por parte del hepatocito.
3. Un incremento en la biosíntesis de lípidos
4. Una disminución de la oxidación intrahepática de lípidos.

El estudio del mecanismo de acción del CCl₄ ha creado controversias. Dianzani (9) estudió el daño producido por el CCl₄ y propuso que el origen del mismo se debía a una lesión en las mitocondrias (hipótesis mitocondrial). Se observó una desorganización del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la mitocondria desde los 10 a 15 minutos después de la intoxicación por CCl₄. También demostró que la fosforilación oxidativa se encontraba desacoplada y atribuyó los cambios observados a la pérdida de los nucleótidos de nicotinamida, citocromo C, iones fosfato y otros componentes celulares aunado a la inactivación de ATPasas. Morfológicamente, las mitocondrias expuestas al CCl₄ se observan hinchadas tal como se ha demostrado mediante microscopía electrónica.

La validez de la hipótesis mitocondrial fue cuestionada por otros trabajos. Calver y Brody (10) señalaron que la inactivación de la ATPasa dependiente de magnesio de las mitocondrias hepáticas, ocurría un fenómeno tardío en la intoxicación por CCl₄. Así también encontraron en algunos experimentos que la acumulación lipídica en el hepatocito precedía al daño mitocondrial, y descartaron la hipótesis mitocondrial como una alteración primaria en el mecanismo de acción del CCl₄.

Otra de las hipótesis enunciadas es la de las catecolaminas (10), que atribuye los fenómenos subsecuentes a la intoxicación por CCl₄, a la descarga simpática ocasionada por un efecto sobre el sistema nervioso central, de índole no determinada.

Se supone que esta descarga produciría:

- a). Disminución en el flujo arterial hepático.
- b). Hipoxia centrolobulillar.
- c). Incremento en la movilización de ácidos grasos periféricos.

Consecuentemente resultó lógico pensar que la destrucción de la médula adrenal disminuiría el daño. Sin embargo no resultó así.

Los bloqueadores simpáticos del tipo de la reserpina tampoco protegieron contra el CCl₄, como se esperaba, y existía aún una infiltración grasa significativa. Por todo esto se encontró que esta hipótesis no era del todo satisfactoria.

Otra de las hipótesis planteadas para explicar los efectos del CCl₄, se basó en que este tóxico disminuye la síntesis protéica.

Muchos estudios indican que el retículo endoplásmico es afectado en las primeras horas después de la administración del CCl₄ (7). Otros estudios efectuados con isótopos radioactivos demostraron una disminución en la incorporación de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La disminución en la síntesis de proteínas produciría incapacidad para que los triglicéridos salieran de la célula hepática ya que estos componentes dejan la célula unidos a proteínas como lipoproteínas de baja densidad (11).

Esta hipótesis perdió valor por el hecho de que otro tipo de agentes que también disminuyen la síntesis de proteínas no producen alteraciones del tipo de la infiltración grasa. Por lo tanto la disminución de la síntesis de proteínas no es, por sí sola, la causante de la acumulación de lípidos.

En la actualidad la teoría de la lipoperoxidación (12) ha tomado gran impulso. Se ha demostrado la formación de radicales libres (CCl_2^*) a partir de las moléculas de CCl_4 en el retículo endoplásmico liso, los que reaccionarían con las cadenas de ácidos grasos poliénoicos. Se sabe que las reacciones producidas por los radicales libres son autocatalíticas (Fig. 3) (13) y los radicales libres generados son por sí mismos compuestos con propiedades tóxicas (14, 15) puesto que se unen covalentemente a macromoléculas, tales como enzimas modificando así su actividad.

I.3. Cirrosis y Hepatitis

Cuando el daño hepatocelular producido es masivo, la pérdida súbita del parénquima funcional estimula la regeneración hepática (16) (Fig. 4). La regeneración hepática es un proceso coordinado que incluye regeneración celular, síntesis y degradación de colágena que da lugar a la remodelación del tejido. Si el daño es único y el paciente sobrevive debido al buen funcionamiento de las células hepáticas remanentes o por las medidas médicas utilizadas, el hígado regenera rápidamente y en pocas semanas se restablece su integridad anatómica y funcional (17, 18). En estos casos no es posible encontrar depósitos de colágena anormales en el hígado.

Cuando el daño es de menor intensidad y el número de células destruidas es pequeño, no se estimula la regeneración y sólo se produce una pequeña cicatriz. Si el estímulo lesivo es único, existe remodelación y reabsorción del tejido cicatricial. Cuando la

lesión se vuelve a producir, ya sea porque el agente inductor esté presente o porque se estimulen mecanismos inmunológicos que perpetúan la enfermedad, tales como la producción de anticuerpos contra lipoproteínas de la membrana de los hepatocitos, antígenos virales, proteínas contráctiles del citoplasma, etc., el proceso cicatricial continúa, produciéndose primero fibrosis y posteriormente cirrosis hepática (Fig. 4). Bajo estas condiciones la regeneración hepática es mínima o inexistente, y el proceso cicatricial predomina (19, 20).

El mecanismo exacto de la estimulación de la respuesta fibrogénica se desconoce; sin embargo hay datos experimentales que sugieren que los macrófagos desempeñan un papel preponderante en el proceso. Los agentes etiológicos actuando directamente, o a través de sustancias liberadas por los hepatocitos dañados, son capaces de producir una serie de compuestos químicos de diversa naturaleza que estimulan la producción de colágena, produciendo cambios importantes en el metabolismo del tejido conjuntivo en general (21, 22) y del glucógeno en particular (23).

Por otra parte, se ha encontrado que la glucoproteína llamada fibronectina que también se libera de los hepatocitos, es un agente quimiotáctico que puede dirigir la llegada de fibroblastos al sitio de la lesión (24). El cambio en los elementos celulares (aumento de fibroblastos y células inflamatorias), así como la modificación en la matriz extracelular producida localmente pueden estimular la producción de tejido conjuntivo cicatricial.

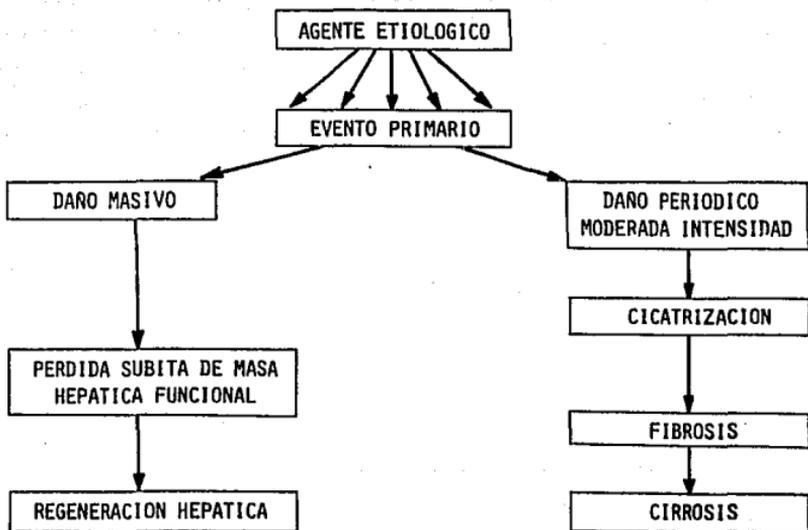


Fig. 4. Efecto de agentes hepatotóxicos.

Todos los tipos de colágena hepáticos se encuentran aumentados en la cirrosis. En cuanto a su distribución, se ha observado que todos los tipos se encuentran mezclados en prácticamente todos los sitios. En especial, en las bandas de tejido conjuntivo que rodean a los hepatocitos se han demostrado todas las variedades genéticas propias del hígado (19-22).

El aumento del contenido de tejido conjuntivo hepático puede deberse a un incremento en su síntesis, a una disminución en su degradación, o a una combinación de ambos factores. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que durante las fases iniciales del proceso, la acumulación de colágena se debe preferentemente a un aumento en su biosíntesis. Tanto en hígados humanos como en hígados de animales tratados con CCl₄ o infectados con esquistosomas, la incorporación de prolina en la colágena (19-24) está aumentada. La actividad colagenolítica puede encontrarse normal o incluso aumentada (25, 26).

El estudio de la regeneración hepática se ha centrado en la búsqueda de los factores que regulan tal respuesta hepática y en los cambios que puedan ser usados como un patrón del estado proliferativo.

Seis o quizá siete hormonas y algunos aminoácidos parecen regular la proliferación de las células hepáticas (27). Entre estas hormonas se encuentran la insulina, el glucagon, el factor de crecimiento epidérmico, la hormona paratiroidea, la calcitonina, las iodotironinas y los gluco-corticoides.

Hace muchos años que se conocen los efectos opuestos que presentan la insulina y el glucagon sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos en el hígado. Aunque el glucagon presenta efectos catabólicos y la insulina anabólicos, ambas hormonas actúan en forma sinérgica favoreciendo la proliferación celular del hígado.

El glucagon parece tener un papel importante en la síntesis de las fosfatidilcolinas estimulando la actividad de una metiltransferasa que cataliza la conversión de fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina (28) utilizando S-adenosilmetionina como donador de metilos (29, 30). Esta estimulación no se sabe si es un efecto directo del glucagon o es causado por la formación de AMPC mediada por la hormona. Lo interesante es que la acción del glucagon sobre el hepatocito pueden modificar las relaciones entre los lípidos de la membrana.

Si se considera la acción de la insulina, hasta hace poco tiempo se desconocía el mecanismo de acción. Algunos autores (31-33) sugieren la existencia de un segundo mensajero para la insulina, el cual parece ser un péptido cuyo peso molecular es aproximadamente 1000-2000 y que se genera cuando la insulina se une a su receptor; el péptido mimetiza algunas funciones de la insulina. Sin embargo, hay muchas otras explicaciones acerca del mecanismo de acción de insulina y al presente se requieren más experimentos para aclarar este problema.

I.4. Las Membranas Celulares y el Daño Hepático

La membrana plasmática es el organelo que controla la entrada de nutrientes y la salida de sustancias de desecho en la célula.

Además del papel clave en la comunicación célula-célula. La presencia de receptores embebidos le confiere un papel importante en la respuesta hormonal. Las membranas plasmáticas intervienen en la fagocitosis y endocitosis y también en la locomoción celular, aunque esta última tiene poca importancia en el hígado. Por lo tanto, las membranas celulares y sus lesiones determinan el comportamiento social y restringen a la célula. Este punto es particularmente importante en la regulación de la función hepatocelular que depende muy poco, si es que lo hace, de la inervación. Además, las alteraciones de la membrana celular son cruciales en los fenómenos clave de las enfermedades hepáticas.

En el mecanismo de la colestasis, la lesión de la membrana canalicular del hepatocito, se ha convertido en el centro de la patogénesis (34) y en los últimos años se han producido observaciones interesantes.

Un problema clave en el estudio de las enfermedades hepáticas es conocer el mecanismo que conduce a la muerte a los hepatocitos.

La degeneración y la necrosis celular son los hallazgos más frecuentes, tanto en el daño hepático agudo como en la falla hepática crónica. Un tratamiento adecuado para estas disfunciones se puede desarrollar únicamente si el mecanismo que las produce es entendido en su totalidad. Se conocen ya muchos eventos

responsables de la iniciación del proceso necrótico.

Independientemente del agente lesivo, se sabe que existe un evento terminal común en todo proceso necrótico que es la falla funcional y la subsecuente destrucción de la membrana plasmática (34-36).

Existen numerosas evidencias en la literatura en donde se muestra que el hígado cirrótico presenta alteraciones no sólo en el metabolismo del tejido conjuntivo sino también en las células parenquimatosas. Con relación a las alteraciones que se presentan en los hepatocitos, en nuestro laboratorio se han reportado diversas anomalías en sistemas enzimáticos incluidos en la membrana plasmática. Así, se ha observado un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa y en el contenido de AMPc y como consecuencia una disminución del contenido de glucógeno hepático (23). Nuestro grupo también reportó una reducción significativa en la actividad de las ATPasas de sodio-potasio y de calcio que pueden ser responsables de las severas alteraciones en el transporte de iones y de sustratos (37) que se presentan en los hepatocitos del hígado cirrótico.

Algunas investigaciones sugieren la presencia de componentes de colágena en la base de la membrana inclusive en el hígado normal (38) y su formación dinámica y desaparición después del daño hepático agudo (39). Originalmente, se pensó que estas membranas basales sólo servían de soporte, de igual manera se consideró a la membrana plasmática como un soporte celular y compartamental.

Convencionalmente en la membrana plasmática del hepatocito se

reconocen varios dominios. El primero es la porción perisinusoidal, la más grande en longitud debido a la presencia de microvellosidades irregulares que está dotada de receptores, está en contacto con el espacio perisinusoidal donde se lleva a cabo el intercambio entre el hepatocito, el fluido tisular y la sangre. Su constitución química, así como su anatomía y función han sido más estudiadas que los otros dominios. Su longitud varía de tal manera que puede extenderse entre los hepatocitos hasta la fisura intercelular (o membrana contigua) como un espacio pericelular también dotado de microvellosidades. En algunas condiciones, tales como regeneración, cirrosis (40) o colestasis (41) sólo permanece una pequeña fisura. Estas fisuras son muy estrechas con excepción de pequeños sitios de comunicación célula-célula llamados desmosomas. La fisura intercelular está separada de la luz del canalículo por un elaborado complejo de unión, llamado unión estrecha. Sin embargo, hay evidencia de que estas uniones son permeables en cualquier dirección a fluidos que contienen electrolitos, aunque probablemente la transferencia más importante es del espacio perisinusoidal a la bilis (42). La presencia continua de mitocondrias en los desmosomas sugiere que esa transferencia requiere de energía (43).

El cuarto dominio diferenciado es el canalículo biliar, el cuál está casi completamente cubierto de microvellosidades con forma digital. Las microvellosidades de alrededor de la unión estrecha parecen ser diferentes de las del canalículo puesto que se deforman menos cuando existe colestasis (44).

Hay dos procesos claves en las membranas: el movimiento y la estabilidad de sus componentes. La membrana en sí consiste de una bicapa lipídica en la cual macromoléculas de diferente forma y ensamblaje están incorporadas. Estas macromoléculas embebidas en la membrana incluyen lipoproteínas y glicoproteínas y tienen funciones específicas tanto para mantener la integridad estructural de la membrana, como para el transporte de iones, ácidos biliares y metabolitos.

De los lípidos que constituyen las membranas, los más abundantes son el colesterol y los fosfolípidos. La proporción normal de estos lípidos mantiene la fluidez membranal que requieren los diferentes sistemas enzimáticos para su óptimo funcionamiento (45), así por ejemplo ciertos fosfolípidos son esenciales para el buen funcionamiento de una gran variedad de enzimas microsomales como la glucosa-6-fosfatasa (46), las ATPasas (47, 48), la UDP-glucuroniltransferasa (47) y el sistema de oxidasas múltiples metabolizante de drogas (49-53). Por lo tanto, resulta obvio que el CCl₄ como agente hepatotóxico produzca un abatimiento de la actividad de estos sistemas enzimáticos no sólo por peroxidar los fosfolípidos y por alterar la conformación de las proteínas sino también porque modifica la proporción de determinados fosfolípidos, que abate la actividad de las enzimas incluídas en la membrana paralelamente a los cambios en la microviscosidad de la membrana (48, 54, 55).

Se ha demostrado (53) que una disminución en la relación colesterol/fosfolípidos disminuye la microviscosidad de las

membranas al igual que un incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos. También se sabe que un incremento en la relación de fosfatidiletanolamina (FEA) y fosfatidilcolina (FC) incrementa la microviscosidad (56) y que la remodelación de las proteínas en las bicapas de fosfolípidos disminuye la microviscosidad (57).

Weddle y Hornbrook (58) han comprobado que el CCl₄ disminuye el contenido relativo de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos del hígado. También se ha demostrado en homogenado de hígado (59) que el CCl₄ aumenta la relación de FEA/FC.

Lamb y Schwartz (60) recientemente demostraron que el CCl₄ también activa a la fosfolipasa C, conduciendo al deterioro de los fosfolípidos. Por otra parte, Moore (61) comprobó que el CCl₄ altera el contenido de calcio citosólico, asociado con la pérdida de calcio del retículo endoplásmico con lo que se activaría la metilación de los fosfolípidos y la actividad de las fosfolipasas, alterándose de esta manera la composición lipídica de la bicapa y como consecuencia la actividad de los sistemas embebidos en ella.

Uno de los sistemas enzimáticos membranales que juega un papel preponderante en las células es el de las ATPasas. Estas enzimas membranales son muy sensibles a cambios en la estructura de la bicapa y se ha demostrado que pequeños cambios en el microambiente que las rodea son capaces de modificar sus actividades (62-72).

En las células hepáticas estas enzimas tienen gran importancia ya que además de regular los gradientes de cationes también controlan el transporte de nutrientes indispensables para el

hepatocito (aminoácidos y azúcares) y el transporte de ácidos biliares, pues estos últimos se acoplan al transporte de sodio.

Dada la gran actividad metabólica que desarrolla el hígado ésto es de gran importancia.

La ATPasa de Na^+/K^+ es una proteína incorporada a la membrana celular con una orientación asimétrica fija. El transporte activo de Na^+ y de K^+ involucra cambios conformacionales protéicos asociados con movimiento de los sitios que unen los cationes, cambiando la accesibilidad a los sitios de la superficie opuesta de la membrana (73). Esta enzima acopla la hidrólisis de ATP a un flujo de cationes en contra de gradientes electroquímicos. La enzima actúa entonces como transductor que convierte reversiblemente energía química en gradientes electroquímicos de cationes (74). La estequiometría de la reacción es de 2 K^+ introducidos por cada 3 Na^+ liberados de la célula y una molécula de ATP hidrolizada.

En 1973, Stein y col. (75) propusieron un modelo tetramérico alfa, y beta, para la bomba de Na^+ y K^+ (Fig. 5). La subunidad alfa (catalítica) podría representar el polipéptido de alto peso molecular, mientras que la subunidad beta a la glicoproteína.

Ambas subunidades alfa y beta están parcialmente embebidas en los lípidos de la bicapa y poseen segmentos transmembranales. La subunidad beta es una proteína intrínseca de la membrana y aunque es catalíticamente inactiva, estudios recientes han sugerido que juega un papel de referencia para la orientación asimétrica correcta de la subunidad α en la membrana (76).

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

En el hepatocito una función importante de la ATPasa de Na^+/K^+ es la secreción activa de Na^+ hacia los canaliculos biliares, dirigiendo el flujo de agua a través de la membrana canalicular (77, 78).

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

A pesar de que el Ca^{2+} entra continuamente en forma pasiva a la célula, la concentración intracelular de calcio (0.1 a 1 μM) se mantiene de 3 a 4 órdenes de magnitud más baja que la del medio externo. Este hecho involucra la existencia de sistemas activos para la salida de calcio, como la ATPasa de alta afinidad de la membrana plasmática (79). Mediante estudios cinéticos se ha demostrado la existencia de 2 sitios catalíticos para esta enzima (80). Es evidente que el exceso de Ca^{2+} intracelular es perjudicial para cualquier tipo celular y que los mecanismos de defensa frente a la entrada masiva de Ca^{2+} incluyen la baja permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} y la actividad de la ATPasa que bombea Ca^{2+} hacia el exterior celular (79).

MODELO PROPUESTO PARA LA Na^+, K^+ -ATPasa

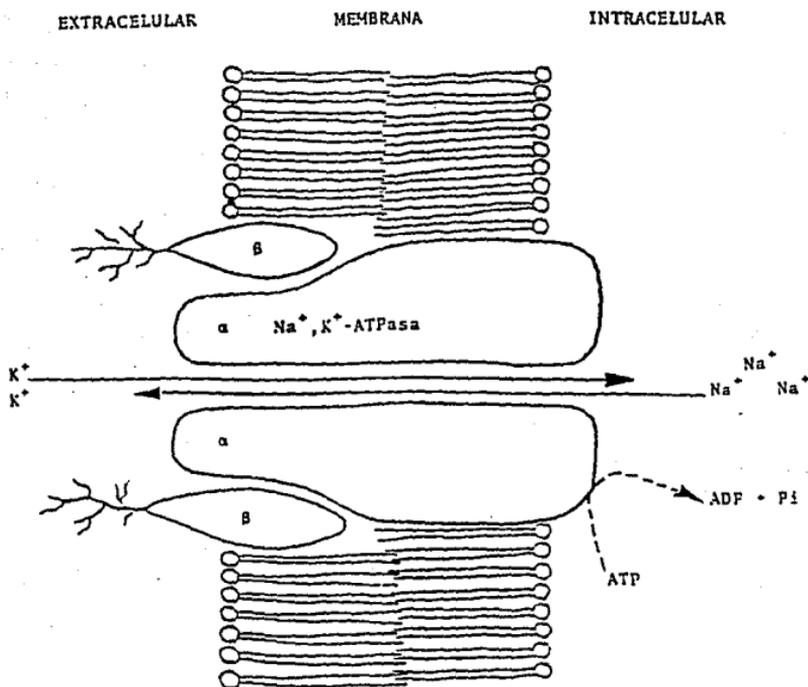


Fig. 5. Modelo propuesto por Stein y col. para el sistema tetramérico $\alpha_2 \beta_2$ de la ATPasa de Na^+, K^+ .

1.5 La Membrana Plasmática del Eritrocito

Indudablemente la célula más popular para estudiar la membrana ha sido el eritrocito de los mamíferos. Existen razones lógicas que justifican esta selección tales como: fácil disponibilidad en cantidades suficientes, no tiene organelos subcelulares y el aislamiento de la membrana plasmática es relativamente sencillo. Aunque existe la opinión de que el eritrocito no es una célula típica, ya que carece de organelos subcelulares, esta crítica no está fundamentada. La membrana plasmática del eritrocito de los mamíferos cataliza reacciones similares a las de otras células, por ejemplo mantiene el equilibrio osmótico, lleva a cabo el transporte de cationes monovalentes y divalentes mediante las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} .

También se encarga del transporte de sustratos, etc. Además, el contenido de lípidos y proteínas de esta membrana en general es muy similar al de otras membranas plasmáticas de mamíferos, tales como las del hígado o del corazón (81).

Los lípidos que se encuentran en mayor proporción en la membrana del eritrocito son el colesterol y los fosfolípidos.

Estos últimos representan aproximadamente el 70% (p/p) de todos los lípidos y el cociente molar colesterol/fosfolípidos tiene un valor aproximado de 0.6 (82). Los glicoesfingolípidos representan solo un 2% de los lípidos totales.

El colesterol es el lípido neutro más abundante (99% p/p) en la membrana del eritrocito (83) y se encuentra en forma no

esterificada. Se ha demostrado que las células rojas maduras no poseen la habilidad de sintetizar colesterol a partir de acetato (84, 85). Hagerman and Gould (86) demostraron que el colesterol de las células rojas se encuentra en equilibrio con el colesterol de lipoproteínas séricas. Esta observación fue confirmada en muchos estudios posteriores en sistemas in vivo e in vitro (87, 88). El equilibrio total entre el colesterol plasmático y el membranal, tanto in vivo como in vitro, ocurre en aproximadamente 8 horas.

Las membranas de los glóbulos rojos contienen tanto glicerofosfolípidos como esfingomielina. La mayoría de los glicerofosfolípidos contienen un ester del ácido fosfórico unido al tercer carbono y ácidos grasos de cadena larga unidos al primero y segundo carbonos. Sin embargo, en algunos fosfolípidos un ácido graso está reemplazado por un éter de vinilo (plasmalógeno) y en algunos no existe ácido graso en el primero o en el segundo carbono (lisofosfolípido). El ácido fosfatídico contiene un grupo fosfato libre en vez de un éster del ácido fosfórico. Los glicerofosfolípidos están subclasificados de acuerdo a la composición de su éster de ácido fosfórico: fosfatidilcolina (FC) o lecitina, fosfatidiletanolamina (FEA), fosfatidilserina (FS) y fosfatidilinositol (FI). La esfingomielina no contiene glicerol sino esfingosina y un ácido graso unido por un éster fosfórico a un grupo colina. La variedad de clases de fosfolípidos y el amplio rango de ácidos grasos y éteres de vinilo que cada uno puede tener hace que el número de posibilidades estructurales sea muy grande, además la opción de la configuración *cis* o *trans* en las dobles

ligaduras de los ácidos grasos introduce mayor variabilidad estructural (82).

1.5.1. Las Enfermedades Hepáticas y los Lípidos del Eritrocito.

Pacientes con hepatitis o cirrosis contienen eritrocitos con un contenido de colesterol y fosfolípidos altos (89, 90). Aunque existe variabilidad interindividual el porcentaje de aumento en fosfolípidos es aproximadamente la mitad del incremento en porcentaje de colesterol lo que trae como consecuencia un aumento en la relación molar colesterol/fosfolípidos. El aumento en fosfolípidos totales no se distribuye en todos los fosfolípidos, sino que más bien se debe a un aumento en el contenido de fosfatidilcolina (lecitina). Debido a que el incremento en lecitina excede al de colesterol, el cociente colesterol/lecitina disminuye en las enfermedades hepáticas (89, 90).

En animales tratados con CCl_4 , los radicales libres, productos del metabolismo del CCl_4 , pueden atacar a los lípidos de la membrana de los eritrocitos y producir alteraciones similares a las que se presentan en la membrana plasmática del hepatocito.

1.6. Fármacos Utilizados en el Tratamiento del Daño Hepático Agudo (Hepatitis Tóxica)

La lipoperoxidación producida por los metabolitos del CCl_4 , tales como el radical CCl_3^{\bullet} , ha motivado profundas investigaciones

que han conducido al descubrimiento de sustancias que aportan protección contra el proceso de lipoperoxidación destructiva. Se han descubierto una gran variedad de sustancias que no guardan ninguna relación química entre sí y que protegen del proceso de lipoperoxidación por diversos mecanismos. Entre otras destacan las siguientes:

1. Tocoferoles (vitamina E) (55, 91, 92).
2. Etilendiaminotetra-acetato (EDTA) (93).
3. SKF-525A (94, 95).
4. Propilgalato (96).
5. Cistamina (97).
6. Dietilditiocarbamato (DEDTC) (98).
7. Selenio (99, 100).
8. Metionina (101).
9. Adenosina (102).
10. Teofilina (101).
11. Prometazina (103).
12. Difenil-p-fenilendiamina (DPPD) (103, 104).
13. Acido ascórbico (105).
14. Cimetidina (106).
15. Dietilen-triamino-penta-acetato (DETAPAC) (107).
16. Glutación (108).
17. Colchicina (109).
18. Silimarina (54).
19. Colchiceína (110).

1.7. Fármacos Utilizados en el Tratamiento del Daño Hepático Crónico (Cirrosis)

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

Estos se basan fundamentalmente en la observación descrita en la literatura de los resultados obtenidos en estudios experimentales en animales y en humanos (21, 111).

Al demostrarse que uno de los mecanismos comunes a través del cual diversos agentes etiológicos pueden dar lugar a una cirrosis es la producción aumentada de tejido fibroso. Se han empleado diversos agentes con probable actividad antifibrogénica en el manejo terapéutico de los pacientes con cirrosis (19, 20). Los agentes terapéuticos empleados incluyen:

1. Análogos de Prolina

Estos compuestos compiten con la prolina por el transporte de aminoacilación del ARNT. Se incorporan en número limitado en la colágena en vez de los residuos de prolina. No se hidroxilan e interfieren con la hidroxilación de otros residuos por cambiar el eje de su hélice. Como consecuencia no se forma la triple hélice y la colágena no se transporta a velocidad normal hacia el espacio extracelular, sino que se degrada intracelularmente (112, 113).

2. Agentes Quelantes de Hierro

Estos agentes inhiben la hidroxilación de los residuos de prolina y de lisina de la colágena. No hay glucosilación. Se inhibe la formación de la triple hélice y el movimiento transcelular de la procolágena (113).

3. Agentes Latirogénicos

Son agentes que inhiben a la enzima lisil-oxidasa y por lo tanto no se forman los enlaces intra ni intermoleculares en la molécula de colágena (113).

4. Penicilamina

Este fármaco se combina con los grupos aldehído de la molécula de colágena por lo que no se forman los enlaces intra e intermoleculares. A elevadas concentraciones también inhibe a la enzima lisil-oxidasa (112, 113).

5. Corticosteroides

Los corticosteroides tienen un efecto antiinflamatorio general y también son capaces de inhibir a la enzima prolina hidroxilasa. Inhibe la síntesis de colágena pero también inhibe la activación de procolagenasa en colagenasa, la cual es estimulada

por enzimas proteolíticas (113).

6. Silimarina

La silimarina es una mezcla de sustancias extraídas del cardo mariano, Silibum marianum, cuyo uso se remonta a la antigüedad.

Vogel fue el primero en demostrar el efecto hepatoprotector de la silimarina en el daño hepático experimental provocado por faloidina (114).

En cuanto al mecanismo de acción de la silimarina se sabe poco, sin embargo, por lo menos uno de los efectos farmacológicos de la silimarina es a nivel de la membrana (54, 115).

7. Sulfo-Adenosil-L-Metionina (SAM)

La sulfo-adenosil-L-metionina (SAM) es una molécula descubierta por Cantoni en 1950 que se encuentra presente en los mamíferos en condiciones fisiológicas (116).

En hepatopatías experimentales, inducidas por la intoxicación con CCl₄, alcohol alílico, alcohol etílico, bromobenceno y por una dieta hiperlipídica/hipoprotéica, la síntesis de SAM disminuye considerablemente (117). La reducción en la síntesis del SAM en los sujetos cirróticos conduce a un déficit de las transmetilaciones biológicas que dependen de él.

Un posible tratamiento farmacológico de la cirrosis consiste en elevar los niveles de SAM endógenos con la administración

exógena de ésta, por encima de la Km de las enzimas que utilizan SAM como sustrato (118).

8. Colchicina

Entre los distintos compuestos con actividad antifibrogénica, la colchicina es la que en la actualidad se considera con mayores posibilidades de éxito. Este compuesto es un alcaloide natural derivado de la planta Colchicum autumnale y ha sido usado desde hace varios siglos en el tratamiento de varios padecimientos, principalmente en el de la gota. Se ha visto que el uso durante tiempo prolongado no se ha acompañado de efectos adversos serios (111).

La colchicina posee varios efectos farmacológicos que resultan benéficos para el tratamiento de la cirrosis hepática, tiene la propiedad de impedir la polimerización de la tubulina para formar los microtúbulos y como consecuencia inhibe el transporte transmembranal de las proteínas de exportación, en especial de la colágena (119, 120, 121). Aumenta in vitro la producción de colagenasa, enzima responsable de la degradación extracelular de la colágena (122). Incrementa la liberación de procolagenasa activada por proteasa.

Como consecuencia de su efecto antiinflamatorio la colchicina estabiliza las membranas lisosomales, inhibe la movilización, adherencia y quimiotaxis de los neutrófilos; inhibe la toxicidad mediada por neutrófilos dependiente de anticuerpos, inhibe la

liberación de histamina de los leucocitos e inhibe in vitro la liberación de cininas plasmáticas (123, 124). Se ha visto que la colchicina protege las membranas plasmáticas y estabiliza las enzimas con grupos -SH en su centro activo (123, 124).

Se ha reportado que este fármaco es capaz de modificar el sistema de adenilato ciclasa del hígado y como consecuencia los niveles de AMPc (23, 73, 125). Este efecto sobre las membrana es el que probablemente explica la elevación de la fosfatasa alcalina que se observa cuando se administra colchicina crónicamente (21, 23, 126).

De los datos reportados por Mourelle y colaboradores (23), se observa que en el modelo de cirrosis experimental con CCl₄ en ratas, el tratamiento con la colchicina regresa a valores normales los niveles de glucagon, T₃, T₄ y de AMPc que se encuentran alterados en la cirrosis, además el glucógeno hepático que está disminuido como consecuencia de la elevación del AMPc también recupera los valores normales (23).

9. Colchiceína

La acción hepatoprotectora de la colchicina no se encuentra totalmente explicada todavía y la protección puede ser atribuida a las acciones de este fármaco por sí mismo o por alguno de sus metabolitos. La colchiceína, uno de los metabolitos de la colchicina formado in vivo (Fig. 6), ha mostrado algunas acciones celulares similares a la colchicina. Sin embargo, la colchiceína

es más lipofílica y realiza interacciones específicas con los grupos tioles y con cationes divalentes. Posee baja toxicidad y su afinidad por la tubulina es mucho menor que la de la colchicina (127).

En nuestro grupo se ha demostrado que la colchiceína puede prevenir el daño hepático agudo inducido por CCl₄ en la rata (110) y también disminuye las alteraciones producidas por la administración crónica con CCl₄ (cirrosis experimental) (127). El tratamiento con colchiceína reduce significativamente el contenido de colágena de ratas cirróticas (127). En cuanto al efecto de la colchiceína en los hepatocitos se ha demostrado que es capaz de reducir las alteraciones de las actividades enzimáticas a nivel de la membrana plasmática (127). Estos resultados sugieren que los efectos benéficos de la colchicina pueden deberse al efecto de su metabolito, la colchiceína que se forma en el hígado.

Químicamente se diferencia de su precursor, por poseer en su anillo de tropolona un grupo hidroxilo libre. Puesto que este anillo de tropolona representa un ácido vinílico, la colchiceína puede ser formada por una hidrólisis suave de la colchicina o bien por desmetilación oxidativa en los microsomas hepáticos en presencia de NADPH y oxígeno molecular. La velocidad de formación y la proporción relativa de la colchiceína varía de acuerdo a la especie y al método que se utilice para la preparación de los microsomas (128). En un inicio se pensó que la colchiceína posea débil actividad biológica por tener un fuerte carácter lipofílico, lo que sugería que era atrapada por las membranas celulares, y de

esta manera no alcanzaba los sitios intracelulares para ejercer su actividad biológica (129). En contraste con la colchicina, la colchiceína previene eficientemente la oxidación del glutatión. Así mismo, se ha observado que la colchiceína evita la inactivación de varias enzimas con grupos sulfhidrilo presentes en su centro activo (130).

10. Fármacos coleréticos

Los fármacos denominados coleréticos provocan un aumento de volumen de la secreción biliar por el hígado. De acuerdo a la acción de estos fármacos sobre el volumen y los constituyentes biliares, se clasifican en:

- a) Hidrocoleréticos, que aumentan el contenido acuoso de la bilis y de esta manera disminuyen la concentración de sus constituyentes.
- b) Los coleréticos verdaderos, que aumentan la síntesis de los constituyentes biliares.

Los principales fármacos coleréticos son los ácidos biliares, los ácidos biliares se clasifican en naturales y semisintéticos; a su vez, los ácidos biliares naturales se subclasifican en:

- a) Ácidos biliares naturales conjugados.
- b) Ácidos biliares naturales no conjugados.

Dentro de este último grupo, se encuentran los ácidos cólicos que existen en la bilis en pequeñas cantidades como sales sódicas, las sales biliares, las cuales son: el ácido litocólico, el ácido quenodesoxicólico o quénico (Chenofalk)[™], el ácido ursodesoxicólico

(Ursofalk)[™], el ácido desoxicólico y el ácido cólico. Estos fármacos provocan la emulsión de las grasas, con lo que facilitan la actividad de la lipasa pancreática, también son necesarios para una adecuada absorción de las grasas, en especial los ácidos grasos y monoglicéricos, colesterol y las vitaminas liposolubles A,D,E y K en forma de complejos solubles (solución micelar) con las sales biliares (acción hidrotrópica). En lo que se refiere a la potencia colerética relativa de estos fármacos, la potencia del ácido dehidrocólico > ácido ursodesoxicólico > ácido cólico > ácido taurocólico > ácido quenodesoxicólico > ácido desoxicólico > ácido glicocólico. Los ácidos biliares no conjugados se absorben bien por todas las vías, especialmente en el tracto digestivo (131).

El ácido ursodesoxicólico (AUDC) (Fig. 7) es preferentemente absorbido en el íleon, a diferencia de los otros ácidos biliares, también es el menos tóxico para los hepatocitos cuando se acumula en el plasma (132).

Durante la administración oral del ácido ursodesoxicólico, éste reemplaza las sales biliares tóxicas favoreciendo su eliminación, del mismo modo que reduce su absorción en el íleon.

A diferencia de otros ácidos biliares, el AUDC produce una disminución de la secreción y la concentración biliar de colesterol, lo que constituye su modo de acción principal, pues en esta forma disminuye la saturación del colesterol en la bilis y permite la disolución de los cálculos. Los ácidos biliares son sustancias relativamente tóxicas, pero a las dosis ordinarias y aun algo superiores no producen mayores trastornos (131).

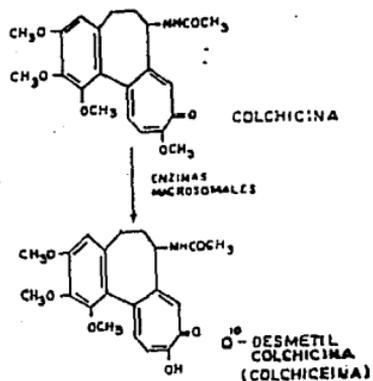


Fig. 6. Representación esquemática de las estructuras de la colchiceína y de su precursor la colchicina.

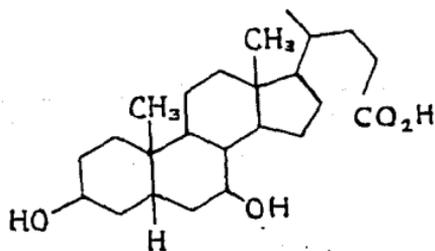


Fig. 7. Representación esquemática de la estructura del ácido ursodesoxicólico.

I.8. Evaluación del Daño Hepático

Las funciones normales del hepatocito dependen de la integridad de sus membranas: de la membrana plasmática y las de organelos como la mitocondrias, el retículo endoplásmico, los lisosomas, etc. Las toxinas pueden alterar los procesos membranales normales al unirse a los componentes de la membrana, por tener efectos tensoactivos o por inducir peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana. Consecuentemente, la fluidez de la membrana puede modificarse alterándose así la permeabilidad e inactivarse las enzimas unidas a membranas causando la muerte celular.

Después de la intoxicación aguda con CCl_4 , uno de los eventos que se presenta es el deterioro en la membrana plasmática, esto se ve reflejado en cambios en la composición lipídica de la misma.

La actividad de varias enzimas de membrana es sensible a cambios en su microambiente lipídico (23), estos cambios en la composición lipídica se han sugerido como una explicación de los cambios que ocurren en la actividad de las enzimas embebidas en la membrana plasmática (23). Se ha reportado que la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} está reducida significativamente en las membranas de los hepatocitos de ratas cirróticas (37).

Ames (133) ha descrito un método sencillo para la cuantificación de la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} como marcador de daño hepático. La determinación de éstas enzimas es una de las herramientas más útiles en el estudio de la hepatotoxicidad.

Se ha demostrado en una serie de experimentos (118, 134) que la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , en las membranas de los hepatocitos y de los eritrocitos, disminuye significativamente durante la cirrosis.

En lo que se refiere a la composición lipídica se ha establecido que existe una correlación entre la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} y el cociente colesterol/fosfolípidos (C/FL) (118, 134).

Para la determinación de la composición lipídica se utilizaron técnicas sencillas descritas por Ames (133) y Abell (135), para la cuantificación de fosfolípidos (como fósforo inorgánico) y para la cuantificación de colesterol, respectivamente.

En resumen, como puede verse, las técnicas para la detección del daño hepático inducido químicamente en animales de laboratorio son sencillas. Se ha postulado que la composición lipídica de las membranas biológicas es un factor que regula su fluidez y, como consecuencia de esta característica, los receptores de membrana podrían responder de diferente manera a hormonas ó a fármacos (136); además la composición lipídica modula la actividad de las enzimas de membrana así como los procesos de transporte con los cuales está asociada (137, 138, 139).

Es por esto que es de suma importancia el estudio de las alteraciones estructurales y funcionales de las membranas biológicas.

La pérdida total o parcial de las funciones que llevan a cabo estos importantes componentes celulares, podría llevar a un

desequilibrio celular tal que pueda conducir a la necrosis.

De tal suerte, que el presente trabajo está enfocado principalmente al estudio de sistemas enzimáticos que son de gran importancia en el equilibrio osmótico y, como consecuencia también lo son para mantener la integridad celular: ATPasas de Na^+/K^+ y ATPasas de Ca^{2+} ; así como al estudio del microambiente lipídico, que está íntimamente relacionado con los cambios funcionales de la célula: colesterol y fosfolípidos.

Además, existen evidencias de que los cambios que ocurren en las membranas plasmáticas de los hepatocitos están claramente reflejados en las membranas plasmáticas de los eritrocitos (140).

Siendo esto una gran ventaja, ya que la información derivada de las membranas de los eritrocitos podría ser utilizada cuando no se recomienda realizar una biopsia por representar peligro para el paciente (140); sin embargo, se requiere de un mayor número de investigaciones para elucidar si verdaderamente el eritrocito puede ser un marcador de daño totalmente confiable para diagnosticar un padecimiento hepático como es la cirrosis.

II. OBJETIVOS

Estudiar las alteraciones producidas por el CCl_4 en la membrana plasmática de los hepatocitos y de los eritrocitos en la cirrosis hepática.

Determinar si la colchicina y el ácido ursodesoxicólico son capaces de revertir las alteraciones en la funcionalidad y composición de las membranas plasmáticas de los hepatocitos y de los eritrocitos producidas por la intoxicación crónica con CCl_4 en la rata.

Determinar si existe correlación entre los cambios observados en las membranas plasmáticas de los hepatocitos con los de eritrocitos en la intoxicación crónica con CCl_4 en la rata y después del tratamiento con colchicina y ácido ursodesoxicólico.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Intoxicación Crónica con CCl₄ de acuerdo al método de Ehrinpreis y colaboradores (141).

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 50-75 g de peso al inicio del tratamiento, a las que se les administró por vía intraperitoneal 0.25 ml de una solución de CCl₄ en aceite mineral (Sigma) 3 veces por semana, por lo menos 8 semanas ininterrumpidas.

La dilución CCl₄/aceite fué aumentando para compensar la dosis con el crecimiento del animal de la siguiente manera:

Primera semana: CCl₄:aceite 1:7

Segunda semana: CCl₄:aceite 1:6

Tercera semana: CCl₄:aceite 1:5

Cuarta semana: CCl₄:aceite 1:4

Quinta semana en adelante: CCl₄:aceite 1:3

Los animales fueron sacrificados por lo menos una semana después de la última dosis.

III.2. Tratamientos Orientados a Evaluar la Reversión de la Cirrosis.

Los animales fueron divididos en 6 grupos experimentales: el grupo 1 recibió solamente el vehículo (aceite mineral Sigma) por vía intraeritoneal (i.p.), se denominará grupo Control. El grupo 2 se utilizó como control de colchicina (COLCH) administrándose en dosis de 300 µg/Kg de peso corporal por vía oral (p.o.). Al grupo 3 se le administró ácido ursodesoxicólico (AUDC) en una dosis de 25 mg/Kg de peso corporal p.o., este grupo se referirá como control de AUDC. El grupo 4 recibió CCl₄ (0.4 g/Kg) disuelto en aceite mineral (Sigma) i.p.. En el grupo 5 se administró la misma dosis de CCl₄ por vía intraperitoneal durante un periodo de 8 semanas, en las 5 semanas posteriores se les administró simultáneamente CCl₄ y COLCH. El grupo 6 recibió un tratamiento semejante al del grupo 5, pero en las últimas 5 semanas además del tetracloruro recibió AUDC en lugar de COLCH. Ver esquema de tratamientos.

Después de 8 semanas de tratamiento con CCl₄ los animales presentan una cirrosis ya establecida (23).

Al término de los tratamientos los animales fueron anestesiados con éter para obtener sangre por punción cardiaca, que se utilizó para aislar las membranas de los eritrocitos. Los animales fueron luego sacrificados y los hígados removidos rápidamente para aislar las membranas de los hepatocitos, una vez obtenidas las membranas tanto de eritrocitos como de hepatocitos se determinaron los parámetros bioquímicos que posteriormente se describen.

III.3. ESQUEMA DE TRATAMIENTOS

Se hicieron 6 grupos de 10 ratas cada uno:

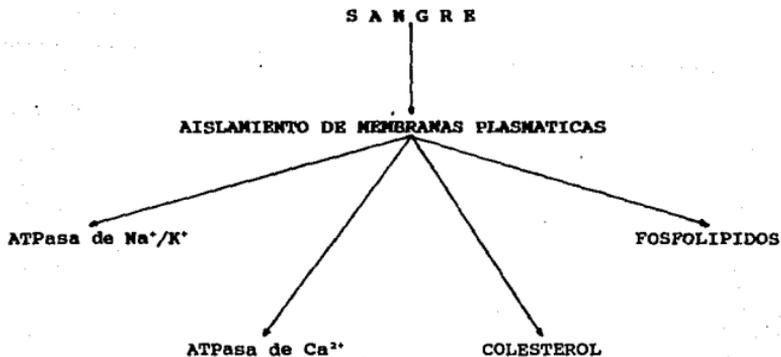
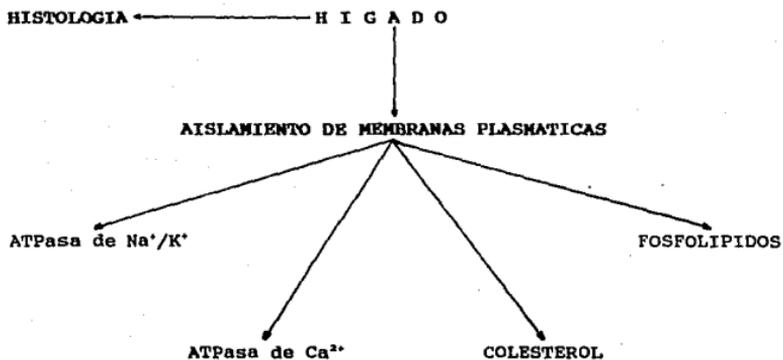
1.	VEHICULO	
2.	COLCH	
3.	AUDC	
4.	CCl ₄	CCl ₄ + VEHICULO
5.	CCl ₄	CCl ₄ + COLCH
6.	CCl ₄	CCl ₄ + AUDC

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

SEMANAS

Los animales se sacrificaron una semana después de la última dosis.

III.4. ESQUEMA DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL



III.5. Obtención de las Membranas Plasmáticas de los Hepatocitos

El procedimiento se lleva a cabo según ha descrito Neville (142).

Las ratas previamente anestesiadas con éter etílico, se les extrae la sangre por punción cardiaca, para eliminar la mayor cantidad de sangre contenida en el hígado, y rápidamente éste es removido y colocado sobre hielo. Se quita el tejido conectivo adyacente y se corta con tijeras lo más finamente posible, los fragmentos de hígado se pasan a un homogenizador Dounce de émbolo flojo con 25 ml de NaHCO₃ 1 mM + CaCl₂ 0.5 mM y se homogenizan con 8 golpes del émbolo. El homogenado se lleva a 250 ml de la misma solución de bicarbonato frío, se agita durante 3 minutos y se filtra a través de 2 capas de gasa. Este filtrado se pasa ahora a través de 4 capas de gasa. El nuevo filtrado se coloca en botellas de centrifuga de 250 ml y se centrifuga a 1000 x g a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se desecha y la pastilla se resuspende en un volúmen mínimo, las pastillas resuspendidas se homogenizan mediante 3 golpes suaves usando el mismo homogenizador. Una proporción de 48 ml de este homogenado se mezcla con 62 ml de sacarosa al 70% ajustando a una concentración de 48% ± 0.1% de sacarosa usando un refractómetro ABBE, con la suspensión formada se llenan aproximadamente dos quintas partes del volúmen de los tubos decentrífuga (Rotor SW 28) cuya capacidad es de 38.5 ml; el volúmen restante se llena cuidadosamente de la siguiente manera: 8 ml de

sacarosa al 45%, 10 ml de sacarosa al 41% y de 3 a 4 ml de sacarosa al 37% con el objeto de formar una serie de gradientes en los que se distribuirán los diferentes componentes celulares. Se centrifuga durante 120 minutos a 100,000 x g a 4°C utilizando una ultracentrifuga Beckman modelo L8-70 y posteriormente se sacan cuidadosamente para mantener los gradientes. Con una jeringa se toma la porción que se encuentra entre la primera y segunda bandas de sacarosa (37% y 41%), correspondiente a las membranas purificadas. Esta fracción se resuspende en Tris-HCl 10 mM + EGTA 0.1 mM y se centrifuga 15 min a 12,000 x g con el fin de lavar el exceso de la sacarosa. Se descarta el sobrenadante y las pastillas se resuspenden en un volumen mínimo de sobrenadante, se toman alícuotas de 0.2 ml para colocarlos en viales que se almacenan en un congelador Revco a -70°C hasta su utilización.

III.6. Obtención de las Membranas Plasmáticas de los Eritrocitos de acuerdo al método de Reinols y colaboradores (143)

Se obtiene la sangre por punción cardíaca con una jeringa heparinizada y se centrifuga a 1000 x g durante 15 minutos, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende con 5-10 volúmenes de solución salina (NaCl 0.9%). Se centrifuga a 15,000 x g 20 minutos, se descarta el sobrenadante y se repite esta operación 2 veces más. Se toman 3 ml del paquete y se le agregan 30 ml de una solución que contenga Tris-HCl 10 mM pH 7.4 + EGTA

0.1 mM. Se agita fuertemente y se centrifuga a 15,000 x g durante 20 minutos, se descarta el sobrenadante, se repite el último paso 2 veces más. Se resuspende la pastilla en 1 ml de la solución Tris HCl + EGTA antes mencionada. Se congela en nitrógeno líquido y se lleva rápidamente a un baño de agua a 37°C, este paso se repite 3 veces más. Las membranas se guardan a -70°C para su posterior utilización.

III.7. Determinación de los Fosfolípidos Totales en las Membranas de los Hepatocitos

Se toma una muestra de membrana plasmática de aproximadamente 40 µg de proteína, se calcina con Mg(NO₃)₂ al 10% en etanol con el fin de que todo el fósforo de los fosfolípidos se transforme a fósforo inorgánico (Pi) y se lleva a cabo la reacción de Ames (133).

Se hace la curva estándar y se calcula el contenido de fósforo inorgánico en las muestras (que es equivalente a la cantidad molar total de los fosfolípidos presentes).

III.8. Determinación de Fosfolípidos Totales en las Membranas de los Eritrocitos.

Con el fin de determinar el contenido de fosfolípidos totales se procede como en la técnica anterior, una muestra de aproximadamente 40-60 µg de proteína se calcina con Mg(NO₃)₂ al 10%

con el fin de que todo el fósforo de los fosfolípidos se transforme en fósforo inorgánico. Posteriormente se desarrolla el color mediante la reacción de Ames (133). El contenido de fósforo inorgánico se determina mediante una curva estándar, el cual es equivalente a la cantidad molar total de fosfolípidos presentes.

III.9. Determinación de Colesterol en Membranas de Hepatocitos

A una muestra de 300-700 μ l de membrana se le agraga KOH 33%, se agita y se incuba a 37°C durante 55 minutos; se extrae con éter de petróleo, se avapora una alícuota bajo corriente de N₂ y se le agrega 1 ml del reactivo de Lieberman-Buchar de acuerdo a la técnica de Abell et al (135). Se hace la curva estándar y se calcula el contenido de colesterol en las muestras.

III.10. Determinación de Colesterol en Membranas de Eritrocitos

A una muestra de membranas de eritrocitos se le agrega KOH 33% se agita y se incuba a 37°C durante 55 minutos; se extrae con éter de petróleo, se evapora una alícuota bajo corriente de N₂ y se realiza el procedimiento descrito por Abell et al. (135), utilizando el reactivo de Lieberman-Buchard. Se calcula el contenido de colesterol de acuerdo a una curva estándar.

III.11. Determinación de Proteínas

Las proteínas se determinan por el método de Bradford (144), utilizando albumina bovina sérica como estandar, con la que se construye una curva estándar. De una dilución 1:10 de membranas se toma una alícuota de 20 μ l, se lleva a 100 μ l y se le agrega el reactivo de Bradford. El contenido de proteínas es directamente proporcional a la intensidad del color formado.

III.12. Medición de la Actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ del Hepatocito por el Método Colorimétrico de Ames

El medio estándar para cuantificar la actividad total de ATPasa contiene en 0.5 ml, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP, 60 a 80 μ g de proteína membranal y 20 mM de imidazol, como amortiguador, el pH de la solución se ajusta a 7.4. La ATPasa activada por Mg²⁺ se mide en un medio idéntico que incluye 1 mM de ouabaina. Se incuba a 37°C durante 30 min. Con el fin de detener la reacción se agregan ácido tricloroacético al 35% (p/v).

La diferencia entre las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺. El fósforo se mide colorimétricamente mediante la formación de un complejo colorido con molibdato de amonio en presencia de ácido ascórbico (133).

III.13. Medición de la Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de Alta Afinidad de la Membrana Plasmática de los Hepatocitos

El medio de incubación contiene en 0.5 ml, 0.4 mM CaCl_2 , 0.4 mM EGTA, 0.25 mM de ATP, Tris-HCl 50 mM a pH=7.4 y de 60 a 80 μg de proteína membranar. Otro medio de incubación es idéntico pero sin Ca^{2+} . La diferencia entre las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de alta afinidad (145). La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 30 min. La reacción se detiene agregando ácido tricloroacético 35%. El fósforo inorgánico se determina con la reacción de Ames (133).

III.14. Medición de la Actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ de los Eritrocitos

La ATPasa de Na^+/K^+ de los eritrocitos se mide de manera similar que la de la membrana plasmática de los hepatocitos (III.12), pero utilizando diferentes concentraciones de reactivos en la reacción enzimática, de acuerdo al siguiente protocolo: NaCl 800 mM, KCl 280 mM, MgCl_2 90 mM, EGTA 2.5 mM, Imidazol 200 mM ajustado a pH=7.4, Ouabaina 5 mM en Imidazol (en el caso de la ATPasa de Mg^{2+}) y sin Ouabaina en el caso de la ATPasa total, membranas de eritrocitos (20-40 μg de proteína) y ATP 12.5 mM.

El volumen final del medio es de 0.5 ml. La reacción se detiene agregando de ácido tricloroacético al 35%. El fósforo inorgánico liberado se determina por el método de Ames (133).

La diferencia entre las dos reacciones representa la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ .

III.15. Determinación de la ATPasa de Ca^{2+} en Membranas de Eritrocitos

El medio de ensayo contiene NaCl 800 mM, KCl 280 mM, MgCl_2 90 mM, CaCl_2 5 mM, EGTA 2.5 mM, Ouabaina 5 mM en imidazol, Imidazol 200 mM ajustado a un pH de 7.4, membranas de eritrocitos (20-40 μg de proteína), ATP 12.5 mM, el volumen final del medio es 0.5 ml; la reacción se detiene agregando ácido tricloroacético (35%).

El fósforo inorgánico se determina por el método de Ames (133). La actividad de la ATPasa de Ca^{2+} se calcula restando la reacción en ausencia de calcio de la reacción en presencia de calcio.

III.16. Tratamiento Estadístico de los Datos y Significancia de las Diferencias

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo de ratas fueron promediados obteniéndose la media (M) y el error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre el grupo control y los tratados se compararon estadísticamente utilizando la prueba "t" de student para muestras no pareadas (146).

Se tomó como diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

En la figura 1 se observa la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ determinada en las membranas de eritrocitos, en los diferentes grupos experimentales. Como puede observarse, la actividad de esta enzima se encuentra disminuida en el grupo tratado crónicamente con CCl₄, en aproximadamente un 50% comparado con los grupos controles, encontrándose una diferencia significativa $p < 0.05$. Esta disminución se revirtió totalmente en los grupos tratados con colchicina y con ácido ursodesoxicólico. En las membranas de hepatocitos (figura 2) se apreció un comportamiento muy similar, ya que la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ también disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) en el grupo intoxicado con CCl₄. Además cuando los animales fueron tratados con colchicina y con ácido ursodesoxicólico también se observa reversión total a niveles normales de la actividad de ésta enzima.

La actividad de la ATPasa de Ca²⁺ en las membranas de eritrocitos, representada en la figura 3, disminuyó en el grupo tratado con CCl₄, aproximadamente a la mitad del valor que presentaron los grupos controles en esta determinación. Sin embargo, los grupos que recibieron tratamiento con colchicina y ácido ursodesoxicólico además del CCl₄, no mostraron una reversión total como se observó en las figuras 1 y 2; en este caso solamente se observó una reversión parcial, pero significativa, mientras que en las membranas de hepatocitos la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ sí volvió a niveles normales después del tratamiento con éstos dos hepatoprotectores (figura 4).

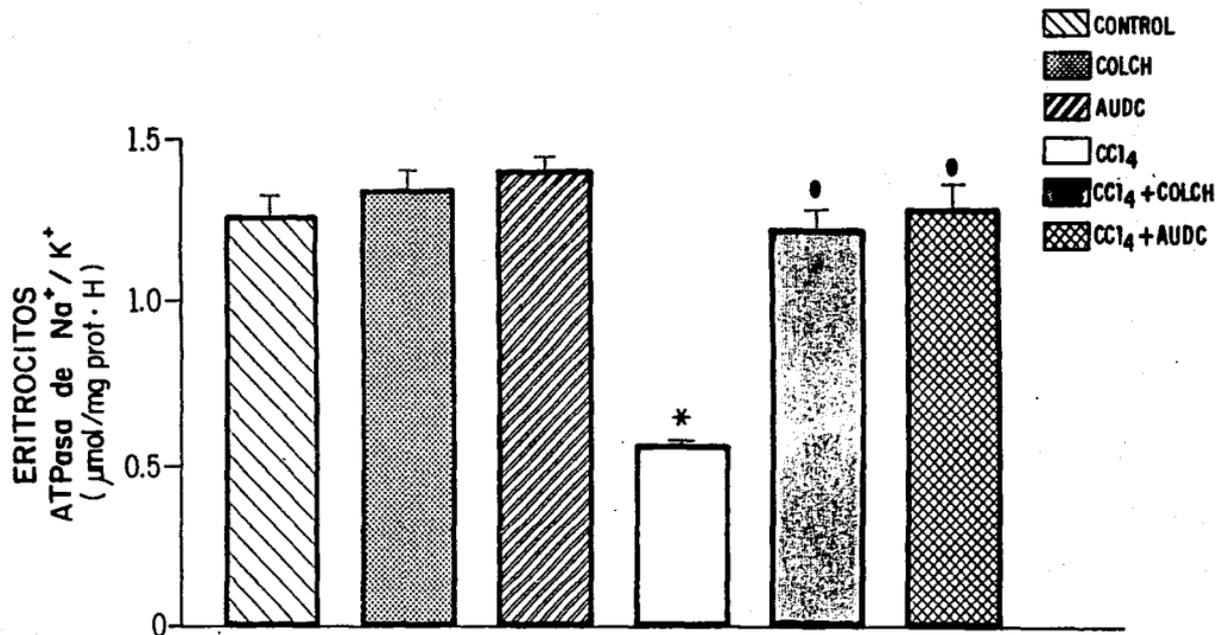


Fig. 1. Actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ determinada en membranas de eritrocitos aislados de ratas tratadas con CCl_4 , colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media \pm EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs CONTROL.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl_4 .

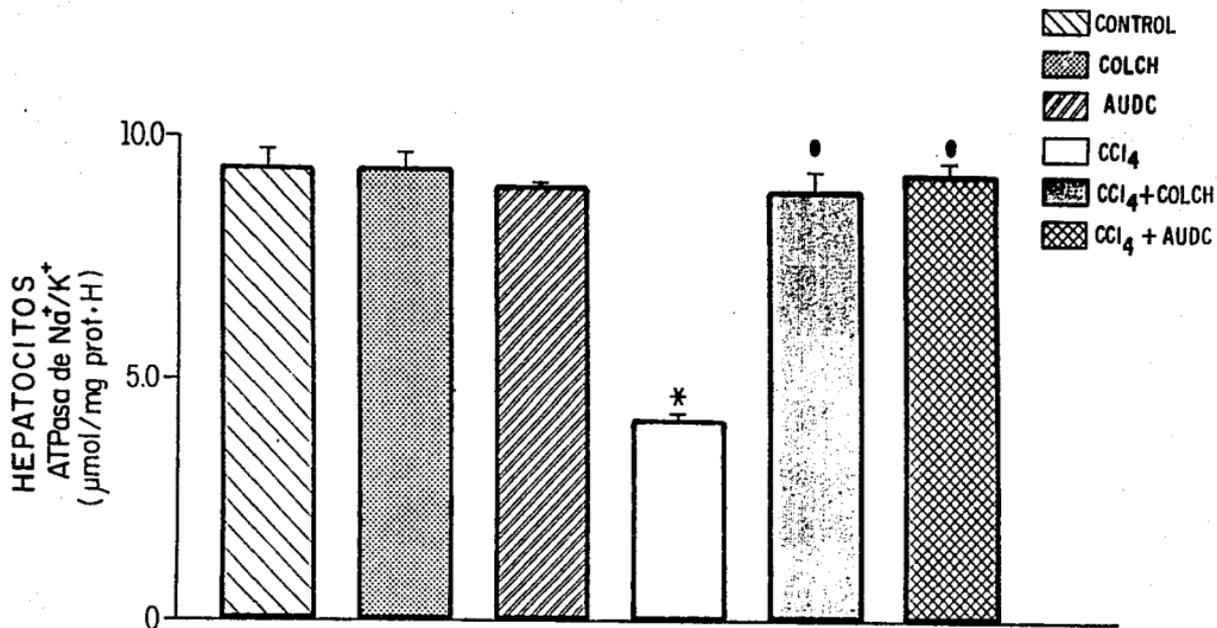


Fig. 2. Actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ determinada en membranas de hepatocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media \pm EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl₄.

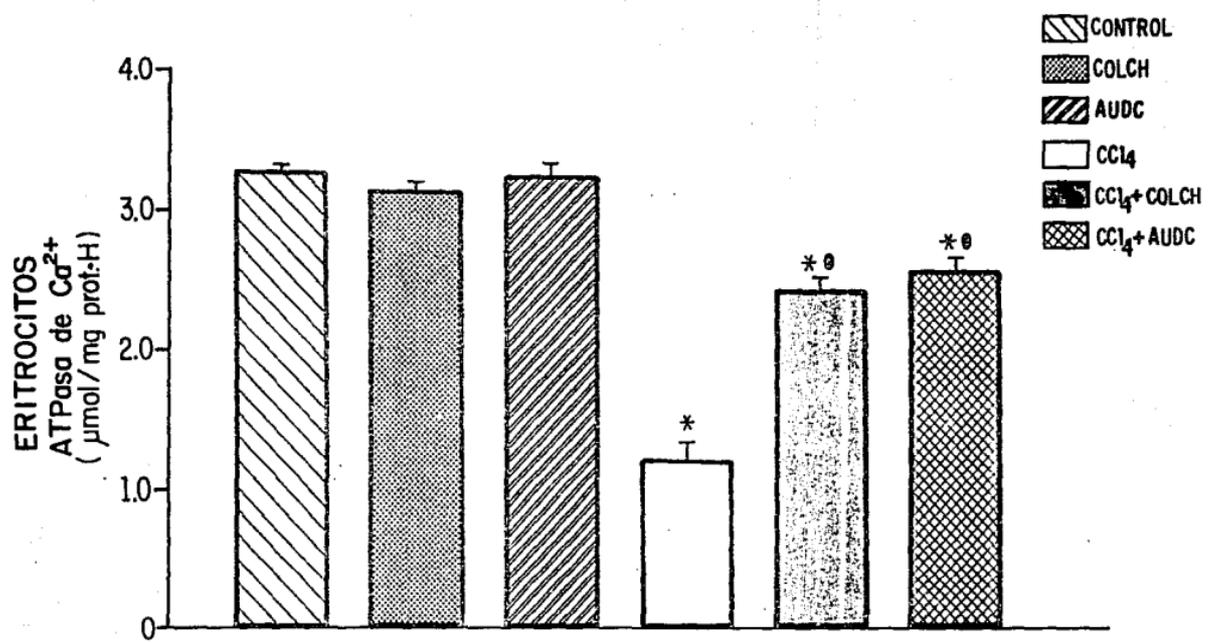


Fig. 3. Actividad de la ATPasa de Ca²⁺ determinada en membranas de eritrocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media ± EEM.

* Significa p < 0.05 vs Control.
● Significa p < 0.05 vs CCl₄.

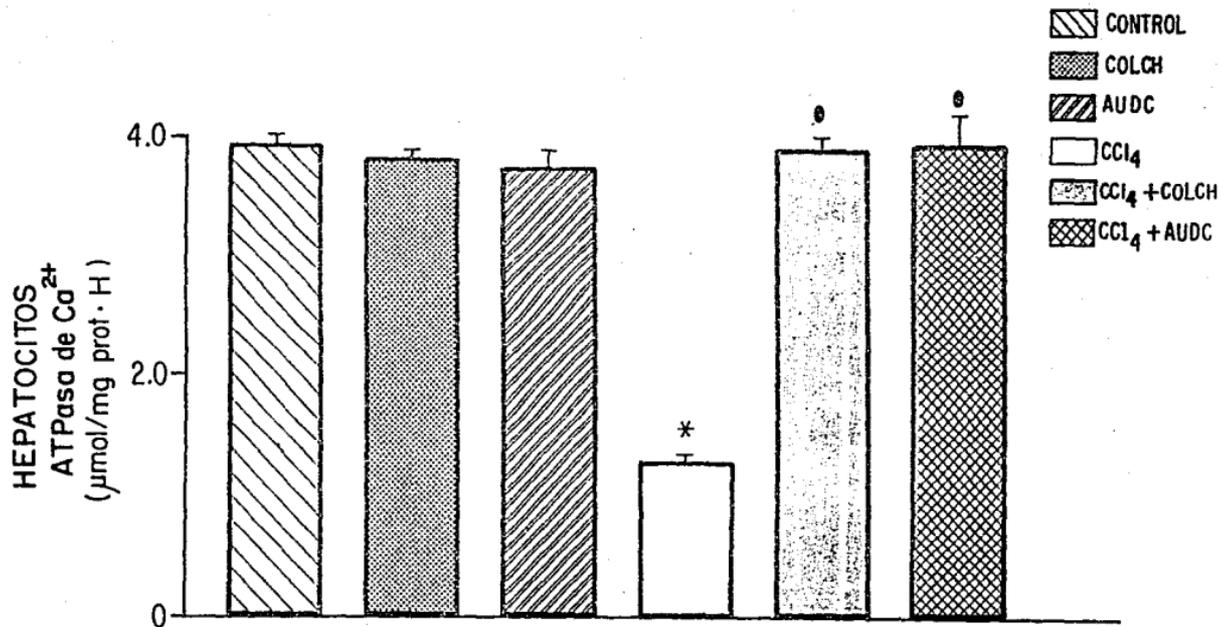


Fig. 4. Actividad de la ATPasa de Ca²⁺ determinada en membranas de hepatocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUGC). Cada barra representa la media ± EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl₄.

El contenido de colesterol en las membranas de eritrocitos (figura 5) aumentó significativamente, $p < 0.05$, después de la intoxicación con CCl_4 , no así en los grupos que recibieron colchicina y ácido ursodesoxicólico además del CCl_4 , donde se observaron valores normales. Se encontró un resultado muy similar en las membranas de hepatocitos, figura 6, pero el incremento del contenido de colesterol en el grupo cirrótico fué menor, de aproximadamente un 30% mientras que en el caso anterior el incremento fué de aproximadamente el 50%; no obstante el incremento resultó ser significativo con respecto a los grupos controles, además de que los grupos tratados con los hepatoprotectores + CCl_4 no presentan alteración alguna en el contenido de colesterol.

En las figuras 7 y 8 se muestra el contenido de fosfolípidos en las membranas de eritrocitos y de hepatocitos, respectivamente; en éstas se observa que no hubo modificación en el contenido de fosfolípidos en ninguno de los grupos, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura.

En cuanto al cociente molar colesterol/fosfolípidos (C/FL), se obtuvo un incremento significativo como consecuencia del aumento en el contenido de colesterol, en las membranas de eritrocitos (figura 9) el incremento observado fué del doble con respecto a los grupos controles. Los tratamientos con colchicina y con ácido ursodesoxicólico fueron capaces de prevenir el incremento del cociente colesterol/fosfolípidos.

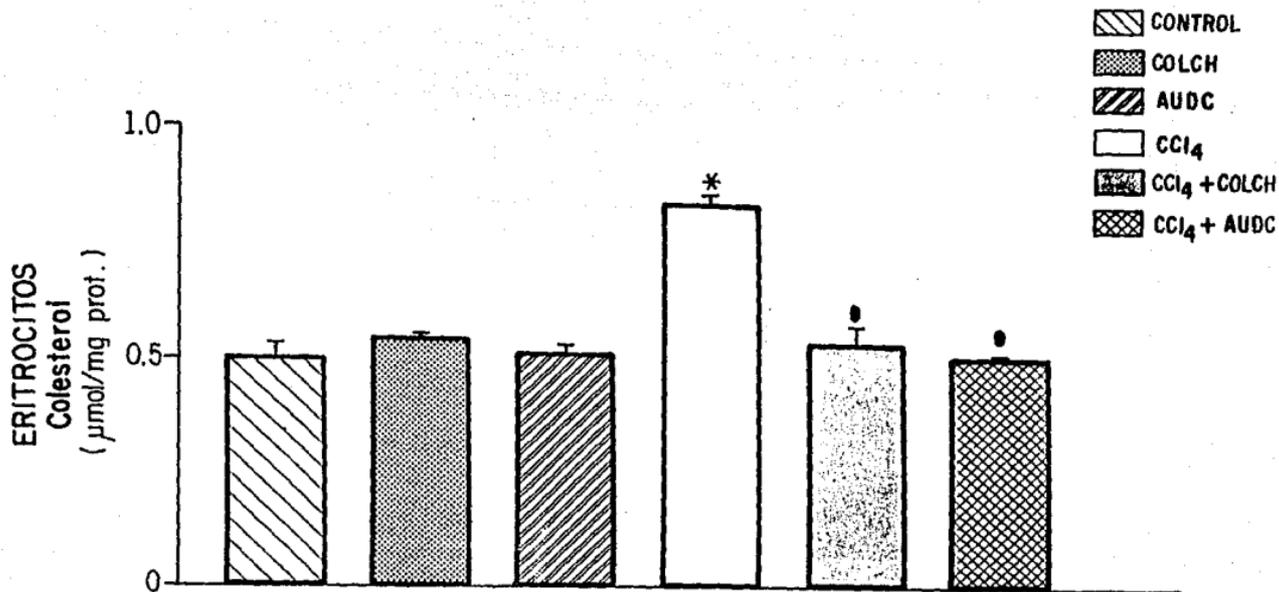


Fig. 5. Contenido de colesterol determinado en membranas de eritrocitos aislados de ratas tratadas con CCl_4 , colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUGC). Cada barra representa la media + EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl_4 .

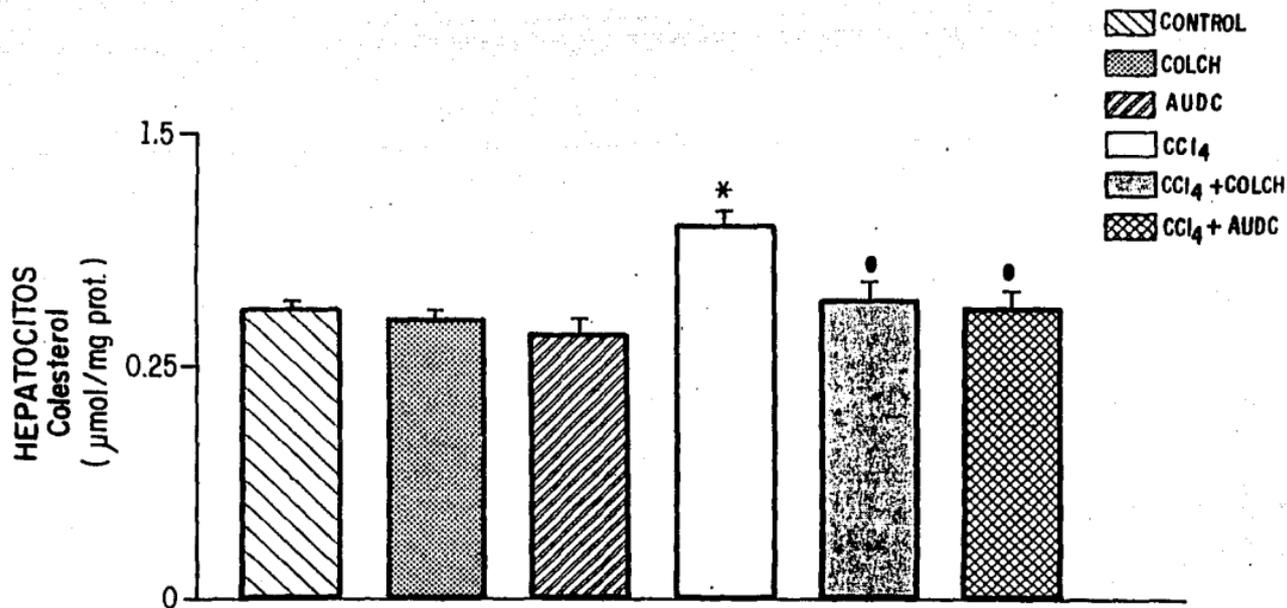


Fig. 6. Contenido de colesterol determinado en membranas de hepatocitos aislados de ratas tratadas con CCl_4 , colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media \pm EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl_4 .

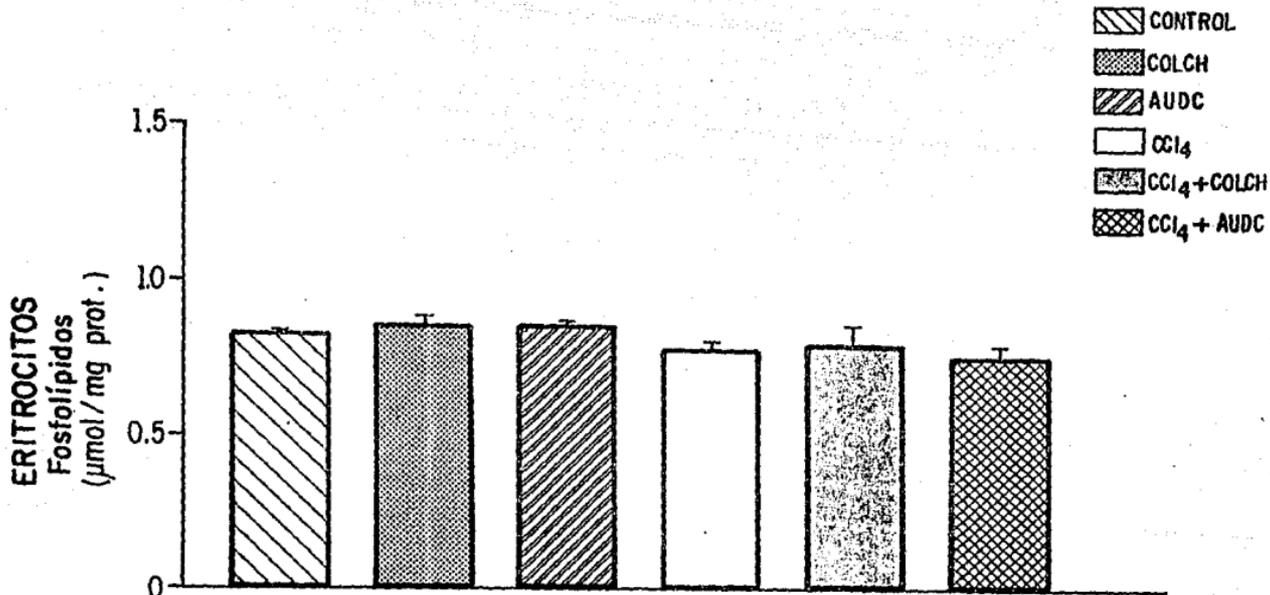


Fig. 7. Contenido de fosfolípidos determinado en membranas de eritrocitos aislados de ratas tratadas con CCl_4 , colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media \pm EEM.

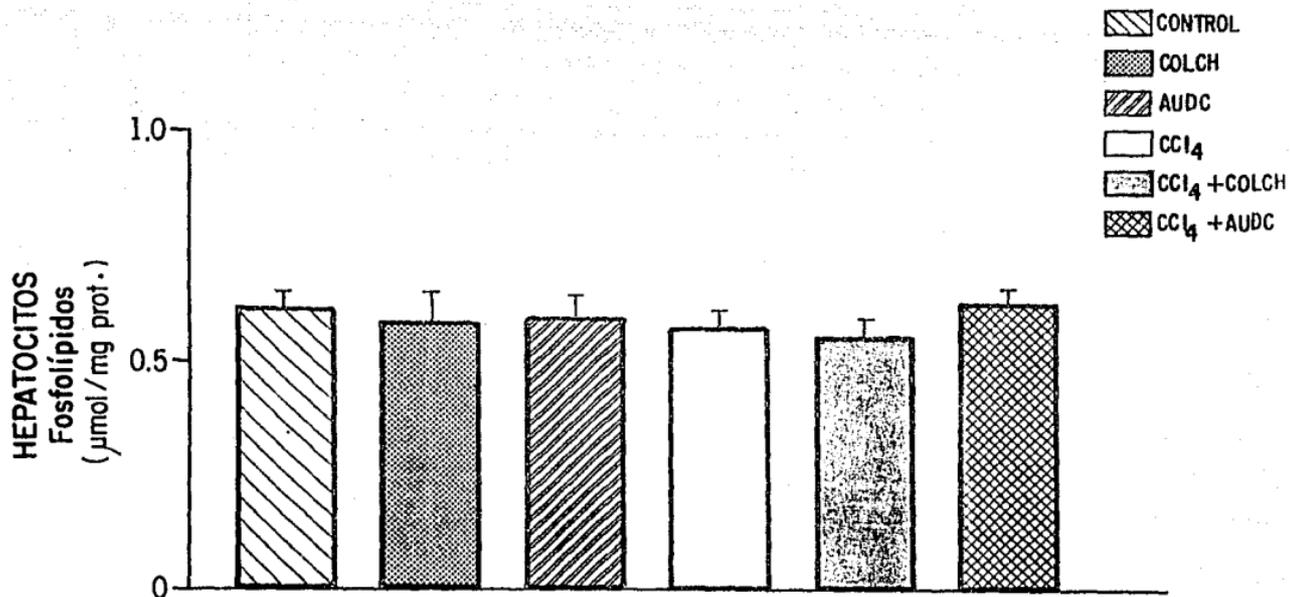


Fig. 8. Contenido de fosfolípidos determinado en membranas de hepatocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUCD). Cada barra representa la media \pm EFM.

En las membranas de los hepatocitos se presentó un incremento menor de aproximadamente 30% con respecto al valor control, pero significativo en el cociente C/FL, y al igual que en el caso de los eritrocitos, los hepatocitos de los grupos intoxicados con CCl₄ y tratados con colchicina y con ácido ursodesoxicólico no presentaron el incremento en el cociente molar C/FL (figura 10).

Como se puede apreciar, con excepción de la figura 3, los cambios observados en todas las determinaciones son muy similares tanto en hepatocitos como en eritrocitos, lo que sugiere que existe una correlación entre éstos dos tipos celulares y que además son de gran importancia como evidencia del daño causado por un agente tóxico como es el CCl₄.

El estudio histológico mostró que la administración crónica de CCl₄ produjo una intensa necrosis centrolobulillar y la arquitectura normal del hepatocito se perdió (figura 12). En el grupo control no se observó ningún cambio histológico (figura 11).

Los cortes histológicos de los animales tratados con colchicina y con ácido ursodesoxicólico además del CCl₄, presentaron un efecto mucho menor en las células, las bandas de colágena son más delgadas y la estructura normal del hepatocito está más preservada que el grupo que sólo recibió CCl₄ (figuras 13 y 14, respectivamente).

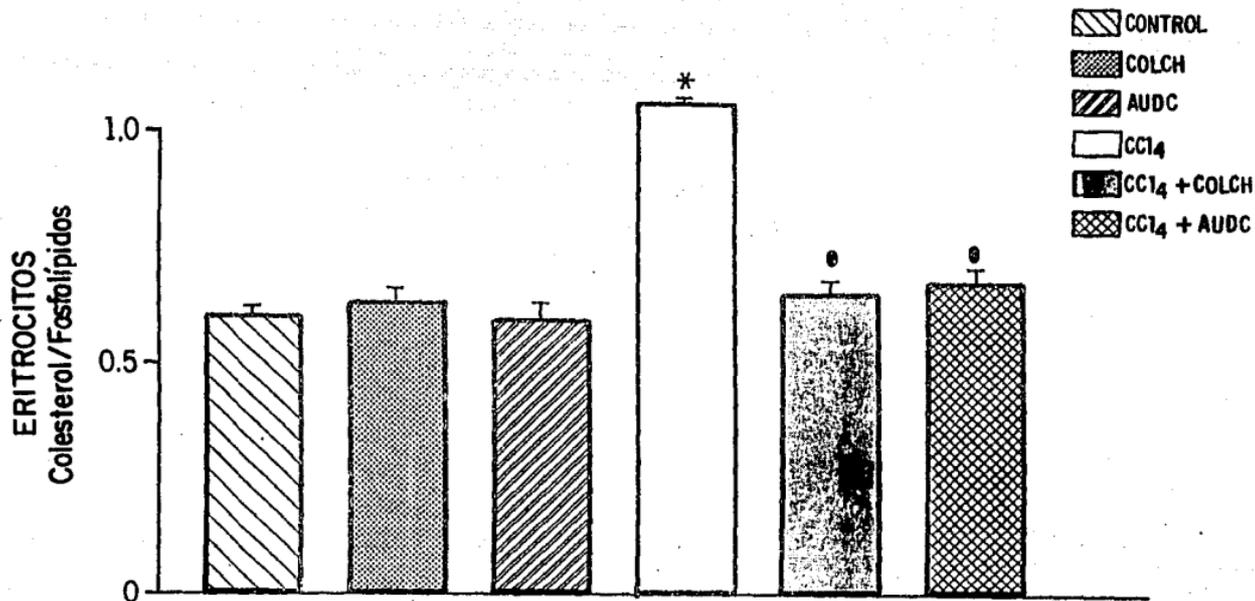


Fig. 9. Cociente colesterol/fosfolípidos determinado en membranas de eritrocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUDC). Cada barra representa la media \pm EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl₄.

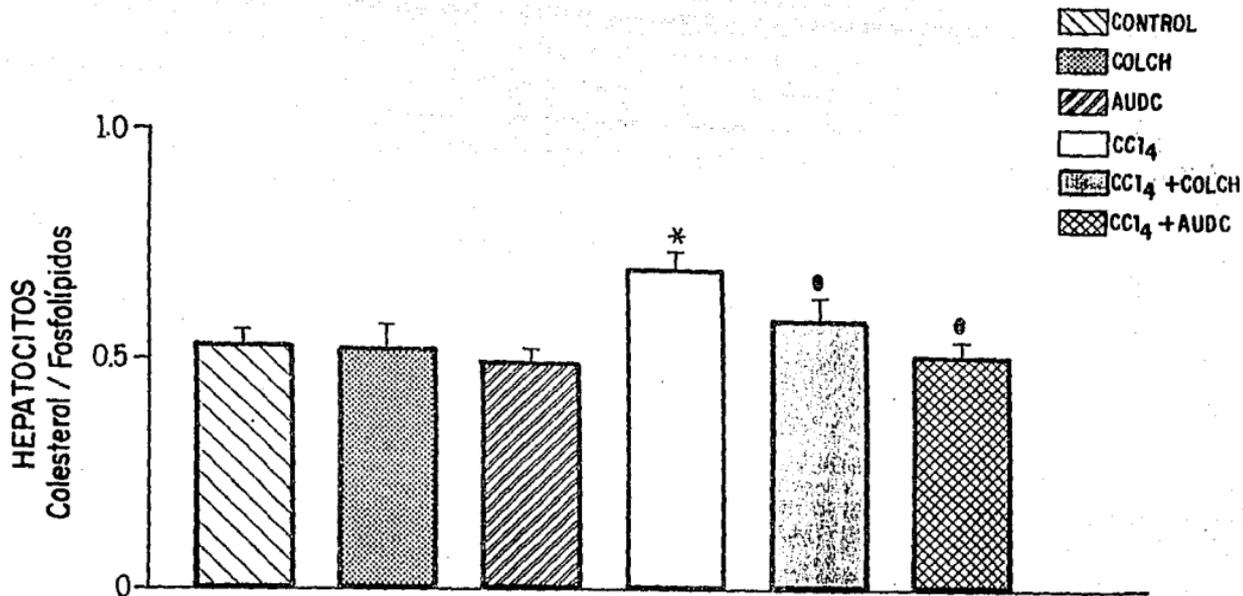


Fig. 10. Cociente colesterol/fosfolípidos determinado en membranas de hepatocitos aislados de ratas tratadas con CCl₄, colchicina (COLCH) o ácido ursodesoxicólico (AUGC). Cada barra representa la media \pm EEM.

* Significa $p < 0.05$ vs Control.

● Significa $p < 0.05$ vs CCl₄.

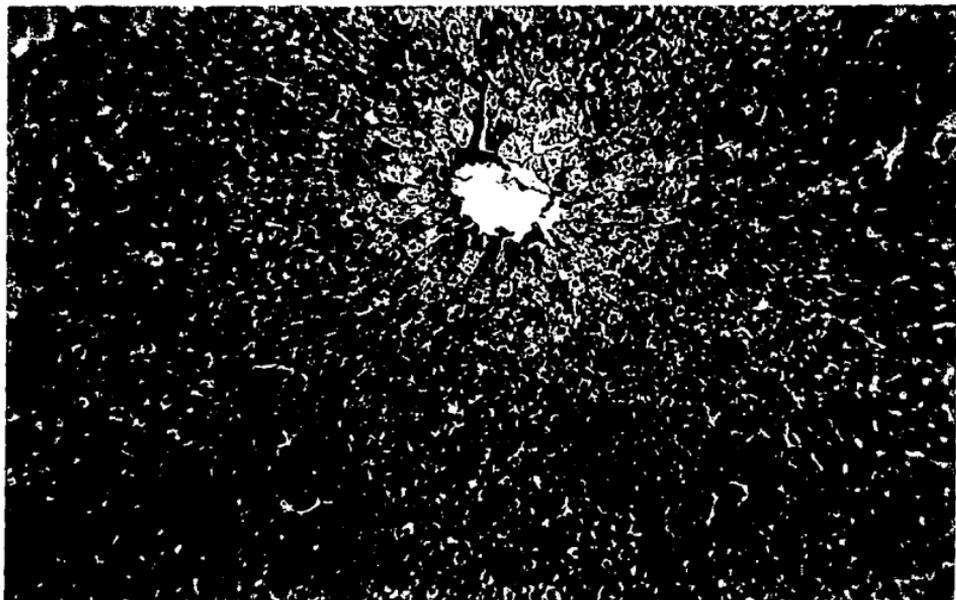


Fig. 11. Corte de un hígado de rata control teñido con la técnica tricrómica de Mallory. Amplificación 125 X.

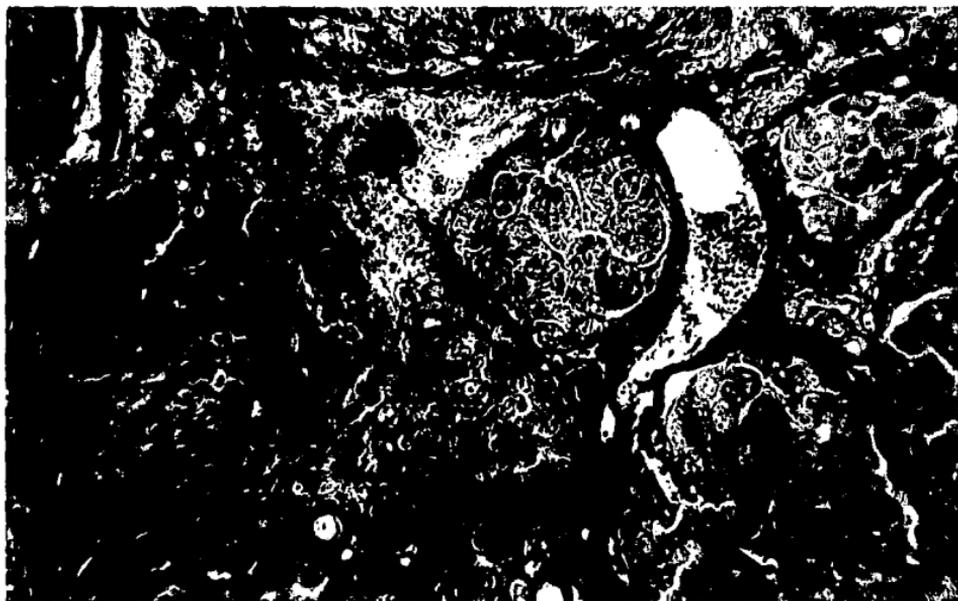


Fig. 12. Corte de un hígado de rata tratada crónicamente con CCl_4 (0.4 g/Kg) i.p. durante 13 semanas, teñido con la técnica tricrómica de Mallory. Amplificación 125 X.

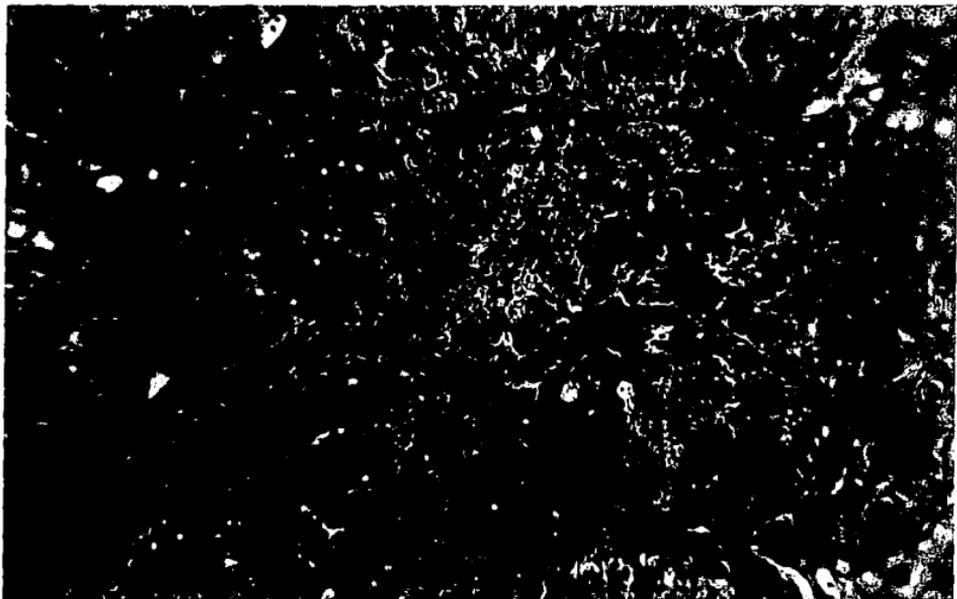


Fig. 13. Corte de un hígado de rata intoxicada con CCl_4 (0.4 g/Kg) i.p. durante 8 semanas, posteriormente recibió colchicina (300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) p.o. hasta completar 13 semanas sin suspender el CCl_4 . Tinción tricrómica de Mallory, ampliación 125 X.

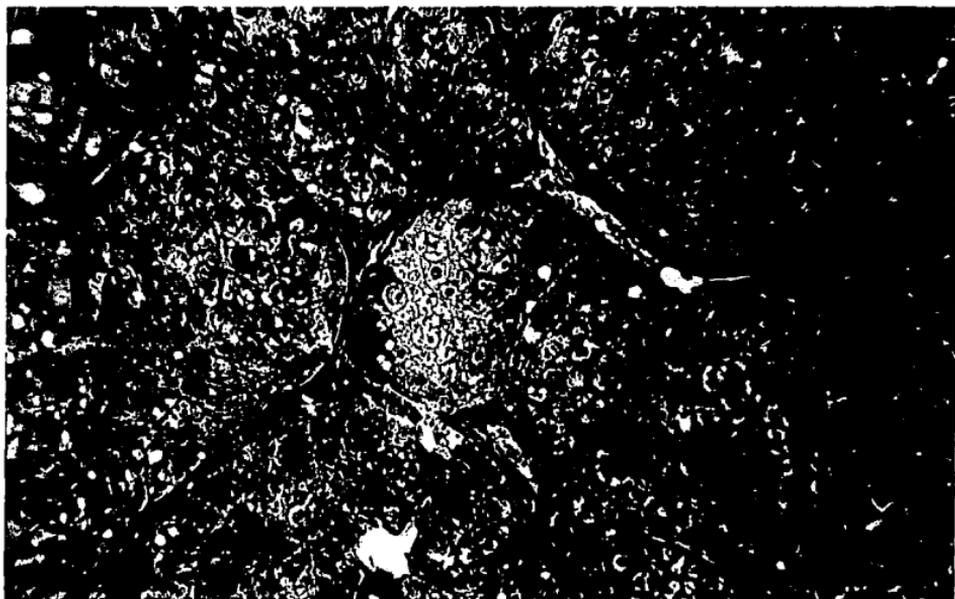


Fig. 14. Corte de un hígado de rata intoxicada con CCl_4 (0.4 g/Kg) i.p. durante 8 semanas, posteriormente recibió ácido ursodesoxicólico (25 mg/Kg) p.o. hasta completar 13 semanas sin suspender el CCl_4 . Tinción tricrómica de Mallory, amplificación 125 X.

V. DISCUSION

El esquema de tratamiento con CCl₄ utilizado para inducir cirrosis hepática produjo el patrón de alteraciones histológicas y bioquímicas característico de esta enfermedad.

Una función muy importante de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en el hepatocito es la secreción activa de sodio hacia el canaliculo biliar, lo que lleva consigo paso de agua a través de la membrana canalicular (147). Este proceso ha sido llamado flujo biliar independiente de acidos biliares, se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ hepática y el flujo biliar (147), basado en la hipótesis de que este componente del flujo biliar esta regulado por la bomba de sodio.

Se ha reportado que en la intoxicación crónica con CCl₄ se presenta una disminución significativa en la actividad de las ATPasas de Na⁺/K⁺ y Ca²⁺ así como un incremento en el cociente colesterol/fosfolípidos (C/FL) (138), en el presente trabajo se observó un comportamiento muy similar ya que se encontró una relación inversa entre la actividad de las ATPasas y el cociente molar C/FL, es decir, al aumentar dicho cociente la actividad enzimática disminuyó en el grupo cirrótico. Los resultados de este estudio sugieren que las alteraciones en la composición lipídica y en la funcionalidad de las membranas plasmáticas están fuertemente vinculadas con las hepatopatías crónicas.

Al administrar colchicina (COLCH) y ácido ursodesoxicólico (AUDC) se preservó la actividad de las ATPasas en los niveles normales así como el contenido de colesterol y de fosfolípidos, lo que sugiere que la actividad enzimática sí está siendo modulada por su microambiente lipídico en la membrana plasmática. La reducción en la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ puede ser resultado de un decremento en su función o en el número de enzimas presentes (147).

El eritrocito ha sido utilizado como un modelo celular para el estudio del transporte transmembranal de cationes (148), como son Ca^{2+} , Na^+ y el K^+ . La ATPasa de Ca^{2+} , en las células rojas del humano, es responsable del transporte activo del calcio a través de la membrana plasmática (149).

Se ha demostrado que las alteraciones en el metabolismo del calcio son resultado de la intoxicación con agentes hepatotóxicos, varios autores han demostrado que este disturbio en el metabolismo del calcio es un evento temprano de la necrosis celular en la intoxicación hepática con CCl_4 (150).

En otros estudios referentes a la ATPasa de Ca^{2+} se ha encontrado que esta enzima es sumamente sensible a cambios en la composición lipídica en los hepatocitos así como en los eritrocitos (151), cuando hay un cambio en la composición lipídica se ven alterados significativamente el transporte de Ca^{2+} y la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} . Los resultados de este trabajo muestran una correlación entre los cambios en las membranas plasmáticas de los eritrocitos con los que ocurren en las de los hepatocitos, tanto en la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{2+} como en el

cociente C/FL. El hecho de que las alteraciones en las membranas de los hepatocitos se reflejen en los eritrocitos sugiere que con una simple muestra de sangre puede inferirse el estado de las membranas plasmáticas de los hepatocitos. Otras de las ventajas que posee el estudio de las membranas de los eritrocitos son: las membranas se aíslan fácilmente pues el eritrocito no contiene otros organelos celulares, la muestra de sangre que se obtiene es representativa de todo el tejido sanguíneo que está en contacto con todo el hígado; además los marcadores clásicos de daño hepático como bilirrubinas o enzimas séricas (152) se pueden obtener de la misma muestra de sangre de donde se aíslan las membranas simplificando más aún el proceso de evaluación del daño hepático.

Es una característica esencial de la membrana plasmática poseer una bicapa lipídica compuesta primariamente de fosfolípidos y colesterol, este microambiente lipídico influencia de manera significativa la actividad de varias enzimas de membrana (147).

El mecanismo molecular por el cual la composición lipídica de la membrana altera la actividad enzimática no está bien elucidado, pero es posible sugerir que la microviscosidad lipídica juega un papel muy importante en el control de la actividad de las ATPasas de Na⁺/K⁺ (148) y Ca²⁺ (151). Estudios anteriores indican que existe una correlación significativa entre el decremento de la actividad de las ATPasas de Na⁺/K⁺ y Ca²⁺ y el incremento de la relación C/FL (137, 140); los resultados presentados, en este sentido, son congruentes con lo reportado ya que se observó una relación inversa entre el cociente C/FL y la actividad de las ATPasas en el grupo

cirrótico. También se encontró que la administración de colchicina y de ácido ursodesoxicólico preservó la actividad de las ATPasas así como el cociente C/FL en las membranas de los hepatocitos y de los eritrocitos. Es bien sabido que el cociente C/FL está relacionado inversamente con la fluidez de la membrana (138).

La composición de las membranas biológicas es el factor más importante que regula la fluidez de las mismas, la fluidez de la membrana ha sido estudiada en diferentes células así como en varias patologías con el fin de definir el papel de la membrana sobre el mecanismo de diferentes enfermedades (153).

Es bien sabido que los cambios en la composición lipídica de las membranas biológicas afecta su fluidez, su permeabilidad y la actividad de las enzimas asociadas a ella así como a los sistemas de transporte (137).

El colesterol es un constituyente esencial de la membrana plasmática de las células eucarióticas. Aunque su significado funcional no está totalmente aclarado, posee la habilidad de modular la fluidez de la bicapa (154), de suprimir el transporte pasivo de sustancias polares a través de ella (155) y de crear dominios discretos dentro de la bicapa (156), presumiblemente en virtud de su interacción preferencial con ciertos fosfolípidos (157). El cociente colesterol/fosfolípidos (C/FL) sólo se altera significativamente en enfermedades tales como la cirrosis hepática (115) y bajo regímenes dietéticos estrictos. Es de esperarse entonces que el incremento en el cociente C/FL observado en el grupo cirrótico modifique la actividad de los sistemas embebidos en

la membrana. La COLCH previno totalmente el incremento en el cociente C/FL y también normalizó las actividades de las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{++} .

El ácido ursodesoxicólico (AUDC) ha sido utilizado en el tratamiento de diferentes padecimientos hepáticos en la clínica, para disolver cálculos biliares (158) y en la cirrosis biliar primaria (159), la administración oral del AUDC reduce el índice de saturación del colesterol. No se sabe si el efecto sobre el índice de saturación es causado por un incremento en la masa total de las sales biliares y fosfolípidos en la vesícula biliar, a decremento en el contenido de colesterol o a una combinación de estos efectos (159), se ha visto que durante el tratamiento con AUDC el contenido de sales biliares aumenta, el contenido de colesterol no se altera y el contenido de fosfolípidos aumenta.

El ácido ursodesoxicólico se ha estudiado principalmente en el modelo de cirrosis biliar primaria inducida por la obstrucción del conducto biliar común, en estos estudios se ha encontrado que el AUDC posee efectos benéficos sobre las alteraciones producidas por esta enfermedad a nivel de enzimas séricas, bilirrubinas, etc.. Sin embargo, en el modelo de cirrosis hepática inducida por CCl_4 , no se han realizado estudios por lo que el mecanismo por el cual revierte estas alteraciones no se ha descrito.

El ácido ursodesoxicólico no se ha descrito como captador de radicales libres por lo que se puede descartar que la acción protectora sea a un nivel similar al que ejerce la colchicina (COLCH), al captar el metabolito principal del CCl_4 , el CCl_3^{\cdot} que es

causante del daño celular en el hígado (139).

No obstante, el ácido ursodesoxicólico tuvo un efecto similar al de la colchiceína, pues las bandas de colágena fueron mucho más delgadas, además aumentó significativamente la actividad de las ATPasas y el cociente colesterol/fosfolípidos, comparado con el grupo cirrótico.

En la cirrosis biliar primaria la concentración de ácidos biliares totales en suero se incrementa, estando en mayor proporción los ácidos cólico y quenodesoxicólico (160), cuando los pacientes reciben AUDC la concentración de estos ácidos biliares varía considerablemente. La concentración de los ácidos cólico y quenodesoxicólico decrece y el AUDC empieza a predominar, esto sugiere la probabilidad de que el AUDC impide la absorción de los otros ácidos biliares implicando que su posible mecanismo de protección está relacionado con cambios en el metabolismo de los ácidos biliares.

Debido a que el posible mecanismo de estos dos fármacos hepatoprotectores es diferente, cabe la posibilidad de que se administren conjuntamente y su efecto hepatoprotector se vea potenciado. Para comprobar que tal agonismo existe, es necesario administrarlos juntos, lo que constituye el objetivo de futuras investigaciones.

La colchiceína, uno de los metabolitos de la colchicina formado in vivo, ha mostrado algunas acciones biológicas similares a las de su precursor, se ha demostrado que la colchiceína puede prevenir el daño hepático inducido por el CCl₄ en la rata (110). La

colchiceína protege eficazmente de la oxidación del glutation (161), además posee baja toxicidad y su afinidad por la tubulina es mucho menor comparada con la colchicina (162). La colchiceína se ha estudiado en modelos experimentales donde se encontró que es capaz de reducir las alteraciones en la actividad enzimática a nivel de la membrana plasmática (127), aunque no se conoce exactamente el mecanismo de protección de la colchiceína se cree que ésta actúa como atrapador de radicales libres, que es el principal producto del metabolismo del CCl_4 , de esta manera puede prevenir el daño inducido por este hepatotóxico (110).

La colchiceína fué capaz de revertir las alteraciones producidas por el CCl_4 , se aprecia que el tamaño de las bandas de colágena es menor comparado con el grupo que recibió solamente CCl_4 ; este hecho puede atribuirse a una reducción en su síntesis, a un incremento en su degradación o a ambos factores (127).

Se encontró también que la colchiceína tuvo efecto benéfico sobre las alteraciones en la actividad enzimática a nivel de membrana plasmática ya que las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} recobraron su actividad normal después del tratamiento con colchiceína. La consecuencia de este efecto es muy importante considerando el papel de estas enzimas para el funcionamiento de las células.

La ATPasa de Na^+/K^+ es responsable del movimiento de estos cationes a través de la membrana celular, este gradiente no solamente mantiene la homeostasis celular sino que también juega un papel central en el movimiento de diferentes solutos como amino ácidos, azúcares y ácidos biliares a través de las barreras

celulares.

La ATPasa de Ca^{2+} de alta afinidad se describe como responsable de la regulación del contenido de calcio en los hepatocitos; un decremento en su actividad podría conducir a un aumento en el contenido de calcio intracelular y provocar necrosis por exceso de este ión, a la vez que se provocarían alteraciones en otros procesos como la glucogenólisis y la gluconeogénesis donde el calcio es responsable de la actividad de las enzimas que participan en estos procesos.

La colchiceína también mantuvo en niveles normales el cociente colesterol/fosfolípidos lo que sugiere que la acción farmacológica de este hepatoprotector sobre el hígado es capaz de preservar en niveles normales el cociente C/FL y consecuentemente la actividad de las ATPasas.

Los resultados del presente trabajo indican que la colchiceína podría ser potencialmente útil en el tratamiento de la cirrosis humana en el futuro, considerando que es tan potente como la colchicina pero con menor toxicidad (163, 164). Si bien los efectos benéficos de la colchicina son múltiples y han sido probados en animales y en humanos no podemos ignorar que la acción de la colchicina sobre los microtúbulos podría ser la causa de la diarrea observada durante tratamientos prolongados cuando se administra a pacientes cirróticos. De igual manera el AUDC podría ser considerado como un posible tratamiento para la cirrosis hepática en la clínica, ya que al igual que la COLCH presenta efectos benéficos sobre las alteraciones producidas por esta enfermedad.

El estudio de las membranas de los hepatocitos debería ser de gran importancia para la evaluación de estas enfermedades en la clínica. Sin embargo, una biopsia hepática no resulta suficiente para aislar la cantidad de membrana plasmática necesaria. Además, la invasión masiva (biopsia hepática) no es recomendable como práctica de rutina por el riesgo asociado, y solamente se lleva a cabo en casos especiales. Otro inconveniente de las biopsias es que la muestra que se obtiene puede no ser representativa de todo el órgano, pues el daño puede no ser homogéneo.

Es bien sabido que un sólo marcador de daño hepático no es suficiente para establecer un diagnóstico y que se requiere de una batería de indicadores ya que cada uno indica una alteración en particular (165).

Además, se ha reportado que existe una falta de correlación entre los datos histológicos y los bioquímicos (140, 166), los marcadores de daño hepático convencionales (fosfatasa alcalina, bilirrubinas, etc.) pueden estar en niveles normales cuando el hígado está dañado para liberarlos al suero. Esta podría ser la explicación de la falta de correlación entre la histología y las pruebas hepáticas comunes (140, 166).

El estudio de las membranas de los eritrocitos agrega mayor información para el diagnóstico de una enfermedad hepática, su evolución o el efecto de algún tratamiento farmacológico, sin riesgo alguno para el paciente. Además debe considerarse el tipo de información que nos da el estudio de la membrana del eritrocito, no es para nadie desconocida la importancia de la regulación de los

gradientes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

La desventaja del estudio de la membrana del eritrocito es que es un marcador indirecto de lo que pasa en el hepatocito y debe tenerse cuidado de que factores no hepáticos estén modificando al eritrocito. Teniendo la precaución de descartar otras enfermedades ó fármacos que afecten al tejido sanguíneo, el estudio de la membrana del eritrocito es un buen indicador de lo que sucede en el hepatocito y debe considerarse seriamente como una herramienta útil en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. CONCLUSIONES

1. La administración crónica del CCl₄ (cirrosis) produjo:
 - a) Disminución de la actividad de las ATPasas de Na⁺/K⁺ y Ca⁺ en las membranas de los hepatocitos y de los eritrocitos.
 - b) Aumento del contenido del colesterol y del cociente colesterol/fosfolípidos en las membranas plasmáticas de los hepatocitos y de los eritrocitos.
2. Las alteraciones en la membrana plasmática de los hepatocitos y de los eritrocitos, a nivel enzimático, están relacionadas con los cambios que ocurren en su microambiente lipídico.
3. El tratamiento con la colchicina así como con el ácido ursodesoxicólico revirtió las alteraciones producidas por el CCl₄.
4. La colchicina y el ácido ursodesoxicólico poseen efectos benéficos sobre la composición y funcionalidad de las membranas plasmáticas de los hepatocitos así como de los eritrocitos.

5. Estos fármacos pueden ser potencialmente útiles en el tratamiento de la cirrosis en el humano.

6. Nuestros resultados indican una correlación entre los cambios observados en las membranas plasmáticas de los hepatocitos y las de los eritrocitos, lo que sugiere que el eritrocito puede servir para inferir la composición y la funcionalidad del hepatocito.

VII. REFERENCIAS

1. Hans, E. and Sherrick, J.C. Morphology of the liver. Academic Press, New York, 1969.
2. Sobotta, J. and Hammersen, F. Histology. Color atlas of microscopic anatomy, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 1978.
3. Charles, L., Witte, M.D. and Marlys, H. Hepatic circulation In: The Liver. Normal and abnormal functions. Part A. Edited by Frederick, F. Becker, Interscience, New York, 1974.
4. Ganong William, F. Manual de Fisiología Médica, Ed. El Manual Moderno, México, 1976.
5. Rappaport, A.M. Physioanatomical basis of liver injury. In: Toxic injury of the liver. Part A, Ed. by Farber M. and Fisher M.M. Marcel Dekker, I.N.C., New York, 1979.
6. Rappaport, A.M. Anatomic considerations in Diseases of the liver. Ed. by Shiff, L. and Lippincott, I.B. Company, Philadelphia, 1969.
7. Recknagel, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol Rev 2:145, 1967.
8. Wells, H.G. Chemical Pathology, Saunders, W.B., Philadelphia, 1925.
9. Dianzani, M.V., Baccino, F.M. and Comporti, M. The direct effect of carbon tetrachloride on subcellular particles. Lab. Invest. 15:149, 1966.

10. Calbert, D.N. and Brody, T.M. Role of the sympathetic nervous system in CCl₄ hepatotoxicity. *Amer. J. Physiol.* 198:669, 1960.
11. Seakins, A. and Robinson, D.E. The effect of the administration of CCl₄ on the formation of plasma lipoproteins in the rat. *Biochem. J.* 86:401, 1963.
12. Witschi, H. and Plaa, G.L. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Toxicol. Pharmacol.* 16:125, 1976.
13. Stacey, M.H. and Klaassen, C.D. Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 58:8, 1981.
14. Demopoulos, H.B. Control of free radicals in biologic systems. *Fed. Proc.* 32:1903, 1973.
15. Pryor, N.A. The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. *Photochem. Photobiol.* 28:787, 1978.
16. Plaa, G.L. and Hewitt, W.R. *Toxicology of the liver*, Raven Press, New York, 1982.
17. Bucher, N.L.R., and Malt, R.A. In regeneration of liver and kidney. Ed. by Little Brown, Boston, 1971.
18. Rabes, H.M. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. *Progress in Liver Disease* 5:83, 1976.

19. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Fibrosis and cirrhosis. In: The Liver Annual I. Ed. by Arias, I.M., Frenker, M., y Wilson, J.H.P. Excerpta Medica. Amsterdam, Oxford-Princeton, 1981.
20. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Hepatic Fibrosis. Clinics in Gastroenterology 10:737, 1981.
21. Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. J. Biol. Chem. 255:2843, 1980.
22. Rojkind Fibrogenesis. The Liver: Biology and Pathobiology, Ed. by Arias, I., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D.A. Raven Press, New York, 1982.
23. Mourelle, M., Rojkind, M. and Rubalcava, B. Colchicine improves the alterations in the liver adenylate cyclase system of cirrhotic rats. Toxicology 21:213, 1981.
24. Dunn, M.A., Kamel, I.A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. Gastroenterology 76:978, 1979.
25. Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. The presence of collagenase in kupffer cells of the rat liver. Biochim. Biophys. Res. Commun. 54:531, 1973.
26. Maruyama, K., Feinman, L., Okazaki, I., Lieber, Ch.S. Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and human liver. Biochim Biophys Acta 658:124, 1981.

27. Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T. and Rubalcava, B. Hormonal control of rat liver regeneration. *Gastroenterology* 76:1470, 1979.
28. Castano, J.G., Alemany, S., Nieto, A. and Mato, J.M. Activation of phospholipid methyl transferase by glucagon in rat hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 255:9041, 1980.
29. Bremer, J. and Greenberg, D.M. Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). *Biochim. Biophys. Acta* 46:205, 1961.
30. Gibson, K.D., Wilson, J.D. and Underfriend, S. The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J. Biol. Chem.* 236:673, 1961.
31. Kiechle, F.L., Jarett, L., Kotagal, N. and Popp, D.A. Partial purification from rat adipocyte plasma membranes of a chemical mediator which simulated the action of insulin on pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 256:2945, 1981.
32. Saltiel, A.R., Doble, A., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. Putative mediators of insulin action regulate hepatic acetyl CO A carboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:789, 1983.
33. Seals, J.R. and Czech, M.P. Evidence that insulin activates an intrinsic plasma membrane protease in regenerating a secondary chemical mediator. *J. Biol. Chem.* 255:6529, 1980.
34. Popper, H., Bianchi, L., Reutter, W. *Membrane Alterations as Basis of Liver Injury.* MTP Press Limited, Lancaster, 1976.

35. Fomesu, A. Changes in energy transformation as an early response to cell injury. In: *The Biochemical Response to Injury* Ed. by Stoner, H.B. and Threlfall, C.I. Springer, Vienna, 1960.
36. Eppinger, H., Kaunitz, H. and Popper, H. *Die Seröse Entzündung. Eine Permeabilitäts-Pathologie.* Springer, Vienna, 1935.
37. Yahuaca, P., Amaya, A., Rojkind, M. and Mourelle, M. Cryptic adenosine triphosphatase activities in plasma membranes of CCl₄-cirrhotic rats. Its modulation by changes in cholesterol/phospholipid ratios. *Lab. Invest.* 53(5):541, 1985.
38. Chung, E., Rhodes, R.K. and Miller, E.J. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:1167, 1976.
39. Cossel, L. Über akutes auftreten von basalmembranen und den lebersinusoiden (Beitrag zur kenntnis der kapillaren basalmembran). *Beitr. Pathol. Anat.* 134:103, 1966.
40. Phillips, M.J. and Steiner, J.W. Electron microscopy of liver cells in cirrhotic nodules. I. The lateral cell membrane. *Am. J. Pathol.* 46:985, 1965.
41. Compagne, J. and Grisham, J.W. Electron microscopy of extrahepatic biliary obstruction. *Arch. Pathol.* 97:348, 1974.
42. Diamond, J.M. Tight and leaky junctions of epithelia: a perspective on kisses on the dark. *Fed. Proc.* 33:2220, 1974.

43. Sternlieb, I. Mitochondrion-desmosome complexes in human hepatocytes. *Z. Zellforsch.* 93:219, 1969.
44. Vial, J.D., Simon, F.R. and Mackennon, A.M. Effect of bile duct ligation on the ultrastructural morphology of hepatocytes. *Gastroenterology.* 70:85, 1976.
45. Schachter, D. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. *Hepatology* 4:140, 1984.
46. Duterea, S.M., Byrne, W.L. and Ganoza, M.C. Studies on the phospholipid requirement of glucosa-6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 243:2216, 1968.
47. Martonosi, A., Donley, J. and Halpin, R.A. Sarcoplasmic reticulum. III. The role of phospholipids in the adenosine triphosphatase activity and Ca⁺⁺ transport. *J. Biol. Chem.* 243:61, 1968.
48. Murial, P. and Mourelle, M. The role of membrane composition in ATPases activities of cirrhotic rats. Effect of silymarin. *J. Appl. Toxicol.* 10:281, 1990.
49. Graham, A.B. and Wood, G.C. The phospholipid dependence of UDP-glucuronyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37:567, 1969.
50. Chaplin, M.D. and Mannering, G.J. Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabolizing system. *Mol. Pharmacol.* 6:631, 1970.

51. Glende, E.A., Jr. On the mechanism of carbon tetrachloride toxicity-coincidence of loss drug metabolizing activity with peroxidation of microsomal lipid. *Biochem. Pharmacol.* 21:2131, 1972.
52. Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Hidema, J. and Coon, M.J. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 245:4851, 1970.
53. Wills, F.D. Effects of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 123:983, 1971.
54. Muriel, P. and Mourelle, M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute liver damage. *J. Appl. Tox.* 10:275, 1990.
55. Martínez-Calva, A., Campos-Apáez, E., Rosales-Vega and Mourelle, M. Vitamin E improves membrane lipid alterations induced by CCl₄ intoxication. *J. Appl. Tox.* 4:270, 1984.
56. Esko, J.D., Gilmore, J.R. and Glover, M. Use of a fluorescent probe to determined the viscosity of L.M. Cells membrane with altered phospholipid composition. *Biochemistry* 16:1881, 1977.
57. Jaiswal, R.K., Rama, B.V. and Landon, E.J. Changes in microsomal membrane microviscosity and phospholipid methyltransferases during rat liver regeneration. *Pharmacology* 24:355, 1982.

58. Weddle, C.C., Hornbrook, K.R. and McCay, P.B. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to CCl₄. J. Biol. Chem. 251:4973, 1976.
59. Sugano, M., Cho, S., Imaizumi, K., and Wada, M. Hepatotoxicity and lipid metabolism. III. Changes in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine during hepatic injury caused by CCl₄. Biochem. Pharmacol. 19:2325, 1970.
60. Lamb, R.G. and Schwartz, D.W. The effects of bromobenzene and CCl₄ exposure "in vitro" on the phospholipase C activity of rat liver cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 63:216, 1982.
61. Moore, L. Inhibition of liver microsomes calcium pump by "in vivo" administration of CCl₄, CHCl₃, and 1,1-dichloroethylene (vinylidene chloride). Biochem. Pharmacol. 29:2505, 1980.
62. Korlish, S.J.D. Protein conformational changes in (Na⁺, K⁺) ATPase and the role of cation occlusion in active transport. Annals N.Y. Acad. of Sci. 402:226, 1982.
63. Erlinger, S. Dhumeaus, D. and Binhamou, J.P. Effect on bile formation of inhibitors of sodium transport. Nature (London), 223:1276, 1969.
64. Gimon, F.R., Sutherland, E., Accatino, L. Stimulation of hepatic sodium and potassium activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital. J. Clin. Invest. 59:849, 1977.
65. Hokin, L.E. and Hexum, J.D. Studies on the characterization of the sodium potassium transport adenosine triphosphatase. Arch. Biochem. 151:453, 1972.

66. Keith, A.D., Sharnoff, M. and Cohn, G.E. A summary and evaluation of spin levels used as probes for biological membrane structure. *Biochem. Biophys. Acta* 300:379, 1973.
67. Kimelberg, H.K. and Papahadjopoulos, D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺, K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249:1071, 1974.
68. Karlisch, S.J.D. Protein conformational changes in [Na⁺, K⁺]-ATPase and the role of cation occlusion in active transport. *Annals N.Y. Acad. of Sci.* 402:226, 1982.
69. Kyte, J. Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250:7443, 1975.
70. Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membranes. *Physiol. Rev.* 45:596, 1965.
71. Tanaka, R. and Strickland, K.P. Role of phospholipid in the activation of Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase of beef brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:583, 1965.
72. Uesugi, S., Dulak, N.C., Dixon, J.F., Hufum, T.D., Dahl, J.L., Perdue, J.F., and Hokin, L.E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase VI. Large scale partial purification and properties of a lubrol-solubilized bovine brain enzyme. *J. Biol. Chem.* 246:531, 1971.
73. Nicholson, G.K., Poste, G. and Ji, T.H. Dynamic aspects of cell surface, *Excerta Médica, Amsterdam*, 1977.

74. Skou, J.C. The $[Na^+, K^+]$ -ATPase: Coupling of the reaction with Na^+ and K^+ . *Biochim. Biophys. Acta* 23:394, 1957.
75. Stein, W.D., Lieb, W.R., Karlisch, S.J.D. and Eilam, Y. A model for the active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70:275, 1973.
76. Jorgensen, R.L., Skriver, E., Hebert, H. and Maunsbach, A.B. Structure of the Na^+ , K^+ pump: Crystallization of pure membrane bound Na^+ , K^+ -ATPase and identification of functional domains of the alfa-subunit. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 402:207, 1982.
77. Boyer, J.L. Canalicular-bile formation in the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 221:1156, 1971.
78. Erlinger, S., Dhumeaus, D. and Binhamou, J.P. Effect on bile formation of inhibitors of sodium transport. *Nature (London)* 223:1276, 1969.
79. Lotersztajn, S., Hanoune, J. and Pecker, F. A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. Dependence on an endogenous protein activator distinct from calmodulin. *J Biol Chem* 56:11209, 1981.
80. Pecker, F., Lotersztajn, S. The liver plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 402:438, 1982.
81. Hanahan, D.J. The erythrocyte membrane variability and membrane enzyme activity. *Biochem. Biophys. Acta* 300:319, 1973.
82. Weed, R.I., Jaffe, E.R. and Miescher, P.A. The red cell membrane. Grune and Stratton, 1971.

83. Nelson, G.J. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals. *J. Lipid Res.* 8:374, 1967.
84. Marks, P.A., Gellhorn, A., and Kidson, C. Lipid synthesis in human leukocytes, platelets, and erythrocytes. *J. Biol.Chem.* 235:2579, 1960.
85. Rowe, C.E., Allison, A.C. and Lovelock, J.E. Synthesis of lipids by different human blood cell types. *Biochim. Biophys. Acta* 41:310, 1960.
86. Raven, H.M. y Schriewer, H. La acción antihepatotóxica de la silimarina en las lesiones hepáticas provocadas experimentalmente en ratas mediante tetracloruro de carbono, D-galactosamina y alcohol etílico. *Arzneim Forsch (Drug. Res.)* 21(8):1194, 1971.
87. Ashworth, L.A.E. and Green, C. The transfer of lipids between human alfa-lipoprotein and erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 84:182, 1964.
88. Spritz, N. Effect of fatty acid saturation on the distribution of the cholesterol moiety of very low density lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 44:339, 1965.
89. Brun, G.C. Cholesterol content of the red blood cells in man. *Acta Med. Scand. Suppl.* 99:1, 1939.
90. Westerman, M.P., Balcerzak, S.P. and Heinle, E.W., Jr. Red cell lipids in Zieve's syndrome: their relation to hemolysis and to red cell osmotic fragility. *J Lab Clin Med* 72:663, 1968.

91. Cawthorne, M.A., Bunyan, J., Sennitt, M.V. et al. Vitamin E and hepatotoxic agents. 3. Vitamin E. synthetic antioxidants and carbon tetrachloride toxicity in the rat. *Br. J. Nutr.* 24:357, 1970.
92. Gallagher, C.H. The effect of antioxidants on poisoning by CCl₄. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40:241, 1962.
93. Uehleke, H., Hellmer, K.H. and Tabarelli, S. Binding of ¹⁴CCl₄ to microsomal proteins "in vivo" and formation of C₂Cl₂ by reduced liver microsomes. *Xenobiotica* 3:1, 1973.
94. Glende, E.A. Jr. and Recknagel, R.O. Microsomal electron transport and "in vitro" CCl₄ induced lipoperoxidation. *Fed. Proc.* 29:755, 1970.
95. Marchand, C., McLean, S. and Plaa, G.L. The effect of SKF-525A on the distribution of carbon tetrachloride in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 174:232, 1970.
96. Ugazio, G. and Torrielli, M.V. Effect of propyl gallate on CCl₄ induced fatty liver. *Biochem. Pharmacol.* 18:2271, 1969.
97. Castro, J.A., Cignoli, E.V. de Castro, C.R. et al. Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by CCl₄. *Biochem. Pharmacol.* 21:49, 1972.
98. Lutz, L.M., Glende, E.A. Jr. and Recknagel, R.O. Protection by diethyldithiocarbamate against CCl₄ lethality in rats and against CCl₄-induced lipoperoxidation "in vitro". *Biochem. Pharmacol.* 22:1729, 1973.

99. Dillard, C.J., Dumelin, E.E. and Tappel, A.L. Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipids* 12:109, 1977.
100. Masukama, T., Nishimura, T. and Iwata, H. Differential changes of glutathione-S-transferase activity by dietary selenium. *Biochem. Pharmacol.* 33:2635, 1984.
101. Hove, E.L. Interrelation between tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl₄ poisoning in rats. *Arch. Biochem.* 17:467, 1948.
102. Hernández-Muñoz, R., Glender, W., Díaz-Muñoz, M. et al. Effects of adenosine on liver cell damage induced by CCl₄. *Biochem. Pharmacol.* 33:2599, 1984.
103. Sasame, H.A., Castro, J.A. and Gillette, J.R. Studies on the destruction of the liver microsomal cytochromes P-450 by carbon tetrachloride administration. *Biochem. Pharmacol.* 17:1759, 1968.
104. Diluzio, N.R. and Costales, R. Inhibition of the CCl₄ induced fatty liver by antioxidants. *Fed. Proc.* 23:520, 1964.
105. Younes, M. and Siegers, C.P. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.* 33:2001, 1984.
106. Homann, J., Rotter, S., Kratz, F. et al. Influence of cimetidine on CCl₄-induced liver injury and survival in rats. *Biochem. Pharmacol.* 34:415, 1985.

107. Ekstrom, G. and Ingelman-Sundberg, M. Cytochrome P-450 dependent lipid peroxidation in reconstituted membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 33:2521, 1984.
108. Gravela, E., Gabriel, L. and Ugazio, G. Protection by glutathione and propyl gallate on the impaired "in vitro" amino acid incorporation into liver microsomal protein of CCl₄-poisoned rats. *Biochem. Pharmacol.* 20:2065, 1971.
109. Mourelle, M., Villalón, C. and Amezcua, J.L. Protective effects of colchicine on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* 6:337, 1988.
110. Mourelle, M., Fraginals, R., Rodríguez, L., et al. Protective effect of colchicine against acute liver damage. *Life Sci.* 45:891, 1989.
111. Kershenobich, D., Uribe, M., Suárez, G.I. et al. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double randomized trial. *Gastroenterology* 77:535, 1979.
112. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Liver extracellular matrix: fibrosis and cirrhosis. *Liver Annual* 2:1982.
113. Rojkind, M. and Kershenobich, D. Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis en la cirrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología.* 1:37, 1982.
114. Lecomte, J. Les propriétés pharmacologiques generales de la silybine et de la silymarina. *Revue Medicale de Liege* 30:110, 1975.

115. Mourelle, M., Muriel, P., Favari, L. et al. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fund. Clin. Pharmacol.* 3:183, 1989.
116. Cantoni, G.L. The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosintriphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 2942, 1952.
117. Gibson, K.D., Wilson, J.D. and Udenfriend, S. The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J. Biol. Chem.* 236:673, 1961.
118. Muriel, P. Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. Role of S-adenosyl-L-methionine. *J. Hepatol.* 14:16-21, 1992.
119. Ehrlich, H.P., Ross, R. and Bornstein, P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. *J. Cell Biol.* 62:390, 1974.
120. Rojkind, M. Inhibition of liver fibrosis by L-azotidine-2-carboxylic acid in rats treated with CCl₄. *J. Clin. Invest.* 52:2451, 1973.
121. Olmstead, J.B. and Borisky, G.G. Microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 42:507, 1973.
122. Harris, E.D. and Krane, S.M. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. *Arth. Rheum.* 14:669, 1971.
123. Malech, H.L., Root, R.K. and Gallin, J. Structural analysis of human neutrophil migration. *J. Cell Biol.* 75:666, 1978.

124. Epilberg, I., Mandell, B. and Mehta, J. Mechanism of action of colchicine in acute urate-crystal-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 64:775, 1979.
125. Leoni, S., Spanguolo, S. and Conti de Virgilis, L. Effect of colchicine on rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 596:451, 1980.
126. Kimimitsu, O. and Ikehara, Y. Inhibitory effect of colchicine on translocation of alkaline phosphatase to the plasma membrane concomitant to its induction in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 640:398, 1981.
127. Mourelle, M., Favari, L., Rodriguez, L., et al. Colchicine treatment prevents CCl₄-induced rat liver cirrhosis. *En prensa en Life Sci Adv. in Bioch. Pharmacol.* 1991.
128. Schongarting, M. et al. The metabolism of colchicine by mammalian liver microsomes, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 355:1371, 1974.
129. Rosner, H. et al. Bindug von colchicein and isolier ganglioside and gangliosidhaltique membranen, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 358:915-23, 1977.
130. Schenell, E. et al. Inhibition of phosphatases by the metabolyte O⁶-demethylcolchicine and their reactivations by divalent cations, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 357:567-75, 1976.
131. Litter, M. *Compendio de farmacologia.* Ed. Ateneo, 1989.

132. Heller, F.R. et al. The rationale for using ursodeoxycolic acid in chronic liver disease. Service de Médecine Interne et Département de Gastro-entérologie, Hôpital de Jolimont, 1990.
133. Ames, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphates and phosphatases. Anal. Biochem. 117:136, 1981.
134. Mourelle, M. Erythrocyte defects precede the onset of CCl₄-induced liver cirrhosis. Protection by silymarin. Life Sciences 48:1083-90, 1991.
135. Abell, L.L., Levy, B.B., Brodie, B.B. et al. A simplified method for the estimation of cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J. Biol. Chem. 195:367, 1951.
136. Mourelle, M. and Reyes, J.L Plasma membrane lipids modulate the response to water deprivation in rat kidney. Fundam Clin Pharmacol 3:199, 1989.
137. Mourelle, M. and Franco, T. Erythrocyte defects precede the onset of CCl₄-induced liver cirrhosis. Protection by silymarin. Life Sci 48:1083, 1991.
138. Muriel, P. and Mourelle, M. The role of membrane composition in the ATPase activities of cirrhotic rat liver: effect of silymarin. J of Applied Toxicology 1:1, 1990.
139. Mourelle, M. and Meza, M.A. CCl₄-induced lipoperoxidation triggers a lethal defect in the liver plasma membrane. J of Applied Toxicology 10:23, 1990.

140. Muriel, P. and Favari, L. Erythrocyte alterations correlate with CCl₄ and biliary obstruction-induced liver damage in the rat. *Life Sci*, en prensa.
141. Ehrinpreis, M., Grambrone, M. and Rojkind, M. Liver proline oxidase activity and collagen synthesis in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Biochim Biophys Acta* 629:184, 1980.
142. Neville, M.D. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8:415, 1960.
143. Reinols, M., McDonald, S., Salem, N., et al. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. *Anal. Biochem.* 124:19, 1982.
144. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248, 1976.
145. Lotersztajn, S. and Pecker, F. A membrane-bound protein inhibitor of the high affinity Ca²⁺-ATPase in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 257:6638, 1982.
146. Daniel, W.W. *Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* Limusa, México. 1977.
147. Davis, R.A., Kern, F. Alterations of hepatic Na⁺,K⁺-ATPase and bile flow by estrogen: Effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Biochemistry* 9:4130-4134, 1975.

148. Hokin-Neaverson, M., Jefferson, J. W. Erythrocyte sodium pump activity in bipolar affective disorder and other psychiatric disorders. *Neuropsychobiology* 22:1-7, 1989.
149. Nassi, A., Mediani, C. Effect of acylphosphatase on human erythrocyte membrane Ca^{++} -ATPase. *Biochemical and Biophysical Research* 2:651-658, 1990.
150. Moore, L. Inhibition of liver-microsome calcium pump by *in vivo* administration of CCl_4 , $CHCl_3$, and 1,1-dichloroethylene (vinylidene chloride). *Biochem Pharmacol* 29:2505-2511, 1980.
151. Boyle, D., Suarez, C.P. Effect of *in vivo* changes in phospholipid composition on liver microsomal calcium transport. *Cell Calcium* 5:475-485, 1994.
152. Zimmerman, H. J., Experimental hepatotoxicity. In: *Hepatotoxicity*. Appleton-Century-Crofts. New York, 1978.
153. Schuller, A., Moscat, J. The fluidity of liver plasma membranes from patients with different types of liver injury. *Hepatology* 4:714-717, 1986.
154. Lee, A. G. Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. *Biochim Biophys Acta* 472:285, 1977.
155. Blok, M., Van Deenen, L. and De Geir, J. The effect of cholesterol incorporation on the temperature dependence of water permeation through liposomas membranes prepared from phosphatidilcholines. *Biochim Biophys Acta* 464:509, 1977.

156. Andrews, L. J. and Cohen, A. I. Freeze-fracture for the presence of cholesterol in particle-free patches of basal disks and the plasma membrane of retinal rod outer segments of mice and frogs. *J Cell Biol* 81:215, 1979.
157. Demel, R. A., Jansen, J. W. et al. The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 465:1, 1977.
158. Lanzini, A., Northfield, T.C. Hepatic biliary lipid secretion and gallbladder biliary lipid mass in gall stone patients: effect of ursodeoxycholic acid. *Gut* 2:226-230, 1990.
159. Roseau, G. Acide ursodésoxycholique dans la cirrhose biliaire primitive: première étude en double aveugle. *La Presse Médicale* 6:237, 1990.
160. Heller, F. R., Martinet, J. P. The rationale for using ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Acta Gastro Enterologica* 53:402-408, 1990.
161. Schnell, E., Siebert, G. On the interaction of colchicine and colchiceine with sulfhydryl compounds. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 567-571, 1976.
162. Hastie, S. B., Macdonald, T. L. Binding of colchiceine to tubulin. Mechanisms of ligand association with tubulin. *Biochem Pharmacol* 39:1271-1276, 1990.
163. Madsen, K., Moskalewski, S., Thyberg, J. Comparison of the in vitro effects of colchicine and its derivate colchiceine on chondrocyte morphology and function. *Experientia* 35:1572, 1979.

164. Schindler, R. Structure-activity relationships in a series of colchicine analogs. *J. Pharm Exp* 3:409, 1965.
165. Plaa, G. L. and Hewitt, W. R. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. Principles and methods of toxicology. Ed. Hayes W. Raven Press, New York, 1982.
166. Cozzolino, G., Francica, G. et al. Lack of correlation between the laboratory findings and a series of steps in the clinical severity of chronic liver disease. *La Ricerca Clin Lab* 14:641, 1984.