



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO FARMACOLÓGICO DE LA
TALIDOMIDA EN LA COLESTASIS INDUCIDA POR 17- α
ETINILESTRADIOL EN RATAS: PAPEL DE LAS
CITOCINAS”.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

ELVIA PÉREZ SOTO

DIRECTOR:

DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ



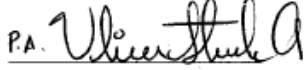
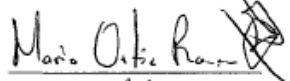


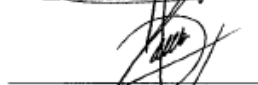


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR, UAEH

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Elvia Pérez Soto** quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado "Evaluación del efecto farmacológico de la talidomida en la colestasis inducida por 17- α etinilestradiol en ratas: papel de las citocinas", después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún	
PRIMER VOCAL:	Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez	
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro	
TERCER VOCAL:	Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez	
SECRETARIO:	M. en C. Mario Segura Almaraz	
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Héctor Ponce Monter	
SEGUNDO SUPLENTE:	Biol. María del Carmen González Rodríguez	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 03 de diciembre de 2010


Biol. Ulises Hurbé Acosta
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Medicinal y Farmacología perteneciente al Centro de Investigación en la Biología de la Reproducción (CIBIOR) del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSA), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), bajo la dirección del Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez, además se contó con apoyo de la Sección Externa de Farmacología y del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Se obtuvo un apoyo económico del proyecto 50733-Q del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como de la beca estudiantil que otorga el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), de acuerdo al acta PIFI 2007 FOMES NO. 15/09, sirviendo como un estímulo para participar en la investigación científica.

DEDICATORIAS

Eres una gran mujer que me tuviste nueve meses. Pasé varias etapas en la vida y siempre estabas al tanto de mí, dándome tu dulzura, ternura, comprensión y amor. Valoro todo de tí, tu gran esfuerzo y apoyo, tu amor incondicional, cualidades y muchas cosas más. El tiempo transcurre y sé que pronto estarás conmigo, mientras tanto te dedico esta tesis y demás logros, te amo...

Mamita “Hermy”

Tu fortaleza, decisión y liderazgo, me ayudo a ser perseverante y poder superar los obstáculos que se presentan en mi camino, saber que las cosas difíciles son las que valen la pena. Ahora culmino un nivel educativo y a tí dedico esta tesis por el apoyo brindado. Expreso hacia tí mi amor de hija y dedico este trabajo...

Papá “Hipólito”

A tí, que me das día a día tu amor, me enseñas a ser bondadosa y ser paciente, te preocupas por todos y entre ellos estoy yo. Por que eres mi luz de cabellos de plata, te respeto y te quiero mucho...

Abuelita “Luz”

El grandioso y querido viejo, fuiste un señor con experiencia y sapiencia, aún recuerdo que con tu voz dulce y serena, me contabas historias heroicas y siempre quería llegar a ser como tú. Gracias te doy por tus consejos sabios y entusiastas que dejaron huellas profundamente marcadas en nuestros corazones y nos hicieron ser diferentes. Ante todo por tu gran corazón lleno de amor, mi querido viejo y amigo que quise mucho, descansa en paz...



Abuelito Emiliano

Agradezco tu confianza, amor de hermano, comprensión y desear lo mejor en mi vida. Sé que hay obstáculos, pero que con la perseverancia llegaremos a la meta, gracias por darme la fuerza para seguir adelante. Te ofrezco mi apoyo, comprensión, mi amor, al igual que la tesis que concluyo orgullosamente...

Hermano Oscar

Hermano menor, que además eres un amigo en el que puedo confiar, me das ánimo para enfrentar cualquier problema y encontrar soluciones. Sé que juntos podremos lograr nuestros objetivos. Te ofrezco mi cariño, comprensión y éxitos venideros, mi amor de hermana, amiga y esta tesis. Te estimo y quiero mucho.....

Hermano Isaías

Siempre estamos rodeados de almas puras. Compartimos cosas preciadas, soñamos y hacen que recuerde que siempre somos niños...

Hermanos Yajseen, Amiel y Yesenia

Mi total e infinita gratitud para mi director de tesis, el Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez quien me enseñó mucho, colaboró en mi formación profesional y personal. Su sencillez, amabilidad, cortesía e inteligencia, me da pie para decir que es una magnífica persona, a la cual ofrezco mi amistad y la tesis.....

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Gracias por las observaciones que hicieron a la tesis, al Dr. Héctor Ponce Monter, M. en C. Mario Segura Almaráz, Dr. Mario Isidoro Ortíz Ramírez, Biol. María del Carmen González Rodríguez, Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún y la Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro.....

Mis sinodales

Agradezco el apoyo brindado en la realización de la tesis, por estar siempre al tanto de mí, ahora me queda ofrecer mi amistad y está tesis...

**Dra. Nury Pérez Hernández y
Dra. Elizabeth Pérez Hernández**

Dedico la tesis a quienes me dieron clases en la licenciatura en biología, gracias por sus conocimientos y sus consejos.

Profesores de la Lic. en Biología.

Compartimos momentos inolvidables durante la carrera profesional, aprendimos, nos divertimos y también lloramos por un compañero fallecido: David...A todos dedico la tesis...

Amigos de la décima primer generación de biología

Agradecida estoy por las personas que han estado a mí alrededor, a mis familiares, amigas y amigos (María José, Selene, Ana Laura, Carmelita, Eva Vela e hijas) y otras personas que no menciono pero han colaborado en mi formación académica y personal.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
ÍNDICE	I.
Índice de figuras.....	II.
Índice de tablas.....	III.
Índice de abreviaturas.....	IV.
Resumen.....	1
1.INTRODUCCIÓN	3
1.1. Anatomía del hígado.....	3
1.2. Unidades secretoras hepáticas.....	3
1.2.1. Lobulillo clásico.....	5
1.2.2. Lobulillo portal.....	5
1.2.3. Acino hepático.....	5
1.3. El sinusoides hepático.....	6
1.4. Análisis histológico del hígado: células de revestimiento sinusoidal y hepatocitos.....	7
1.4.1. Células Endoteliales.....	7
1.4.2. Células de Kupffer.....	8
1.4.3. Células estelares hepáticas o de Ito.....	8
1.4.4. Células de Pit.....	9
1.4.5. Hepatocitos.....	9
1.4.6. Matriz extracelular.....	10
1.5. Aporte vascular al hígado.....	10
1.6. EL sistema biliar.....	10
1.7. Función hepática.....	11
2. DAÑO HEPÁTICO Y AGENTES INDUCTORES: ANTICONCEPTIVOS ORALES (AO)	12
2.1. Daño hepático.....	12
2.1.1. Colestasis.....	12
2.1.2. Fibrosis.....	12
2.1.3. Cirrosis.....	13
2.2. Agentes inductores de daño hepático.....	15
2.3.1. Anticonceptivos orales (AO).....	16
2.3.1.1. Mecanismo de acción y receptores a estrógeno.....	16
3. RESPUESTAS CELULARES AL DAÑO HEPÁTICO: CITOCINAS	18
3.1 Factor de necrosis tumoral (TNF- α).....	21
3.2 Interleucina 10 (IL-10).....	23
3.3 Factor de crecimiento transformante (TGF- β).....	24
4. MODELOS DE DAÑO HEPÁTICO Y MARCADORES	25
4.1. Administración de 17- α etinilestradiol (EE).....	26
4.2. Marcadores del daño hepático.....	27
5. UNA POSIBLE ALTERNATIVA EN LA TERPIA HEPÁTICA: LA TALIDOMIDA	30

6. ANTECEDENTES DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS:	
17-α ETINILESTRADIOL Y LA TALIDOMIDA.....	33
6.1. Antecedentes de los efectos de la terapia estrogénica:	
17- α etinilestradiol (EE).....	33
6.2. Antecedentes de la talidomida en el daño hepático.....	35
7. JUSTIFICACIÓN.....	38
8. HIPÓTESIS.....	41
9. OBJETIVOS.....	42
9.1. General.....	42
9.2. Particulares.....	42
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
10.1. Colestasis experimental inducida con 17 α -	
etinilestradiol (EE).....	44
10.1.1. Grupos experimentales y tratamiento.....	44
10.2. Determinaciones en plasma.....	49
10.2.1. Determinación de la actividad de fosfatasa	
alcalina (FA).....	49
10.2.2. Determinación de la actividad de γ -	
glutamiltranspeptidasa (γ -GTP).....	50
10.2.3. Determinación de la actividad de alanina	
aminotransferasa (ALT).....	51
10.2.4. Determinación de bilirrubinas directas y totales	
(BD y BT).....	53
10.3. Determinaciones en hígado.....	56
10.3.1. Determinación del glucógeno hepático.....	56
10.3.2. Determinación del grado de peroxidación	
lipídica (LP).....	57
10.3.2.1. Determinación de proteínas (Método de	
Bradford).....	58
10.3.3. Determinación de colágena hepática	
(hidroxiprolina o HP).....	59
10.3.4. Determinación de citocinas y ON en plasma e	
hígado.....	64
10.3.5. Análisis histológico.....	64
10.4. Análisis estadístico.....	65
11. RESULTADOS.....	66
11.1. Resultados de los marcadores bioquímicos de daño	
hepático en plasma.....	66
11.1.1. Resultados de fosfatasa alcalina (FA).....	66
11.1.2. Resultados de γ -glutamiltranspeptidasa (γ -GTP)	67
11.2. Resultados de la cuantificación de bilirrubinas directas	
y bilirrubinas totales.....	68
11.2.1. Resultados de alanina-aminotransferasa (ALT)..	70
11.3 Resultados de los marcadores bioquímicos de	
daño hepático en	71
hígado.....	71
11.3.1 Resultados de glucógeno hepático.....	

11.3.2. Resultados de peroxidación lipídica (PL).....	72
11.3.3. Resultados de colágena hepática (HP).....	73
11.4. Resultados de la cuantificación de citocinas y ON hepáticos y plasmáticos.....	73
11.4.1. Resultados del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), en hígado y plasma.....	74
11.4.2. Resultados del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), en hígado y plasma.....	75
11.4.3. Resultados de Interleucina 10 (IL-10), en hígado y plasma.....	77
11.4.4. Resultados de óxido nítrico en hígado y plasma.....	78
11.5. Análisis histológico.....	80
12. DISCUSIÓN.....	83
13. CONCLUSIONES.....	93
14. PERSPECTIVAS.....	94
15. GLOSARIO.....	95
16. BIBLIOGRAFIA.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Anatomía del hígado humano.....	4
Figura 2. Esquema de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado.....	6
Figura 3. Estructura del sinusoide hepático.....	7
Figura 4. Clasificación etiológica de la cirrosis.....	14
Figura 5. Mecanismos de inducción de daño por citocinas y sus propiedades en el hígado.....	19
Figura 6. Estructura tridimensional del TNF- α	22
Figura 7. Estructura tridimensional de la IL-10.....	23
Figura 8. Estructura tridimensional del TGF- β	24
Figura 9. Estructura química de la talidomida (α -N-ftalimidoglutarimida).....	30
Figura 10. Esquema de tratamiento experimental utilizando el modelo de daño hepático inducido por 17- α etinilestradiol.....	45
Figura 11. Determinaciones bioquímicas en plasma.....	47
Figura 12. Determinaciones bioquímicas en hígado.....	48
Figura 13. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FA).....	66
Figura 14. Actividad enzimática de γ -glutamiltanspeptidasa (γ -GTP).....	67
Figura 15. Bilirrubinas directas y bilirrubinas totales (BD y BT).....	69
Figura 16. Actividad enzimática de alanina-aminotransferasa (ALT)..	70
Figura 17. Glucógeno hepático.....	71
Figura 18. Peroxidación lipídica hepática (PL).....	72
Figura 19. Colágena hepática (HP).....	73
Figura 20. Concentración plasmática y hepática del factor de necrosis tumoral α (TNF- α).....	75
Figura 21. Concentración plasmática y hepática del factor de crecimiento transformante β (TGF- β).....	76
Figura 22. Concentración plasmática y hepática de interleucina 10 (IL-10).....	78
Figura 23. Concentración plasmática y hepática de óxido nítrico (ON).....	79
Figura 24. Tinción histológica de hematoxilina/eosina (H/E), en muestras de hígado de rata Wistar.....	81
Figura 25. Tinción histológica de hematoxilina/eosina (H/E), en muestras de hígado de rata Wistar.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Agentes nocivos que causan daño hepático.....	15
Tabla 2. Citocinas involucradas en el daño hepático.....	20
Tabla 3. Principales causas de mortalidad general, 2008. Nacional.....	39
Tabla 4. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años), 2008. Nacional.....	40
Tabla 5. Curva estándar para FA.....	50
Tabla 6. Curva estándar para γ -GTP.....	51
Tabla 7. Curva estándar para ALT.....	53
Tabla 8. Preparación de tubos para cuantificación de bilirrubinas..	54
Tabla 9. Curva estándar de bilirrubinas.....	55
Tabla 10. Curva estándar para hidroxiprolina (HP).....	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina-aminotransferasa
AO	Anticonceptivos orales
BD	Bilirubinas directas
BI	Bilirrubinas indirectas
BT	Bilirrubinas totales
CMC	Carboximetilcelulosa
CK	Células de Kuppfer
EE	17- α etinilestradiol
EE+T	Grupo experimental:17- α etinilestradiol + Talidomida
FA	Fosfatasa alcalina
H/E	Hematoxilina/Eosina
IL-10	Interleucina 10
kg	Kilogramo
LCBC	Ligadura del conducto biliar común
LPS	Lipopolisacárido o endotoxina
MDA	Malondialdehído
MDR3	Gen de Resistencia a multimedamentos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
NO₃⁻	Nitratos
NO₂⁻	Nitritos
NOS	Sintasa del óxido nítrico
ON	Óxido nítrico
PL	Peroxidación lipídica
p.o.	Vía de administración oral
RER	Retículo endoplásmico rugoso
s.c.	Vía de administración subcutánea
T	Talidomida
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNFR1	Receptor tipo I a TNF- α
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UDCA	Ácido ursodesoxicólico
UDCA+EE	Ácido ursodesoxicólico+17- α etinilestradiol
V	Vehículo
V_{EE}	Vehículo de 17- α etinilestradiol propilenglicol
V_{EE+T}	Vehículo de 17- α etinilestradiol+talidomida
V_T	Vehículo de talidomida:carboximetilcelulosa
V_T+V_{EE}	Vehículo de talidomida+vehículo de 17- α etinilestradiol
V_T+EE	Vehículo de talidomida+17- α etinilestradiol
γ-GTP	Gamma glutamiltranspeptidasa

RESUMEN

El hígado se encarga del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, producción biliar, almacena glucógeno y participa en la respuesta inmunitaria. En esta última, las citocinas juegan un papel muy importante durante el daño hepático. En el trabajo se estableció un modelo de colestasis *in vivo* inducido por 17- α etinilestradiol (EE) durante 7 días, para determinar si los cambios bioquímicos plasmáticos, así como morfológicos del hígado ya reportados anteriormente se modifican con la dosis y a tiempo determinados en este experimento; además, de analizar el papel de las citocinas y del óxido nítrico (ON). En este modelo se evaluó a la talidomida (T), como un fármaco inmunomodulador y hepatoprotector que se encuentra en la primera etapa de investigación preclínica en el área de la farmacología hepática. Se utilizaron 4 grupos de ratas Wistar macho (250 g, n=8) a las que se les administró por vía s.c. el EE (10 mg/kg) y/o el vehículo (V, propilenglicol 0.25 mL) durante 7 días, así como la administración p.o. con vehículo (V, carboximetilcelulosa o CMC 0.7%) y/o talidomida (400 mg/kg). En plasma se determinó la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FA), γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP), concentración de bilirrubinas directas y totales (BD y BT), alanina-aminotransferasa (ALT), citocinas como el TNF- α , IL-10, TGF- β , también se cuantificó la concentración de óxido nítrico (ON). En hígado se evaluó glucógeno hepático, grado de peroxidación lipídica (PL), colágena hepática por medio de la cuantificación de hidroxiprolina (HP), las mismas citocinas, ON y se realizó la técnica histológica de hematoxilina/eosina (H/E) en muestras de hígado.

Al establecer el modelo de daño hepático con los marcadores mencionados anteriormente, los resultados sugieren que en el grupo dañado con EE, hay un cambio significativo en algunos de los marcadores como glucógeno hepático, colágena hepática, PL, FA, γ -GTP. En otras determinaciones bioquímicas no se evidenciaron cambios significativos, tal es el caso de citocinas proinflamatorias, antiinflamatorias y ON. La prueba donde se evidenciaron algunos cambios morfológicos en la ultraestructura hepática, es en la técnica de H/E, observando necrosis celular difusa y en parches y dilatación sinusoidal que involucran el proceso patológico de colestasis provocado por estrógenos como el EE.

De manera general, se corroboró que el EE causa daño hepático, ya que hubo cambios significativos en pruebas bioquímicas enzimáticas y alteraciones en la arquitectura hepática de ratas, aunque no de manera contrastante para producir colestasis. En el grupo tratado con T (T+EE), a la dosis y tiempo establecido de 400 mg/kg/7 días, hubo una disminución de los marcadores de PL, FA. Al realizar el análisis histológico de H/E, observamos una tendencia moderada a revertir el daño provocado por EE, como la necrosis hepatocelular difusa, infiltrado linfocitario y escasa regeneración hepatocelular sinusoidal. La modificación de citocinas y ON no fue significativa al tiempo y dosis determinados en este modelo de daño hepático inducido con EE.

Utilizar pruebas bioquímicas clásicas de laboratorio y la cuantificación de citocinas y ON, permite decir que la T a la dosis y tiempo de administración propuesto no provocó hepatoprotección, esto posiblemente por la participación de otras moléculas involucradas en la colestasis experimental, por lo que se propone ajustar la dosis y tiempo de administración de ambos fármacos para futuros estudios de investigación científica.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Anatomía del hígado.

El hígado es el órgano de mayor tamaño y complejidad metabólica del cuerpo humano, se localiza en la parte superior del abdomen, debajo del diafragma, encima del estómago y de la masa intestinal, ocupando el hipocondrio derecho y la mayor parte de la región epigástrica; su coloración es rojo parda, visto de cerca parece estar constituido por una serie de granulillos de diferente color en su centro y en su periferia. En la figura 1, se aprecia el hígado, el cual tiene una masa aproximada de 1.4 kg en el adulto mayor, constituyendo de un 2 a 5 % de la masa corporal del adulto (Netter, 1981; Testut y Latarjet 1998; Aguirre, 2003).

La forma del hígado varía, esto se debe por su capacidad de regeneración, así como la plasticidad del tejido hepático, permitiendo la adopción de una gran variedad de formas, que dependen de la presión ejercida de los órganos vecinos, alteraciones vasculares y procesos patológicos (Netter, 1981). Con base en la distribución macroscópica de las ramas intrahepáticas de la vena porta, la arteria hepática y los conductos biliares el hígado se divide en dos lóbulos de tamaño semejante, el derecho y el izquierdo, cada uno tiene cuatro segmentos designados con números romanos, el izquierdo del I al IV y el derecho del V al VIII (Aguirre, 2003).

1.2. Unidades secretoras hepáticas.

Desde tiempo atrás los científicos han clasificado la unidad anatómica y funcional del hígado, teniendo distintos puntos de vista para concebir las unidades secretoras hepáticas:

- En el siglo XVII en los trabajos de Wepfer y Malpighio, clasificaron la unidad estructural del hígado denominándola “lobulillo clásico” (González *et al.*, 1996; Kuntz y Kuntz, 2006).
- A mediados del siglo XIX surgió el concepto de “lobulillo portal” de Thiele (González *et al.*, 1996; Kuntz y Kuntz, 2006).

- En el siglo XX se considera como “acino hepático” de Rappaport (Ángeles y Larriva, 1993; González *et al.*, 1996).

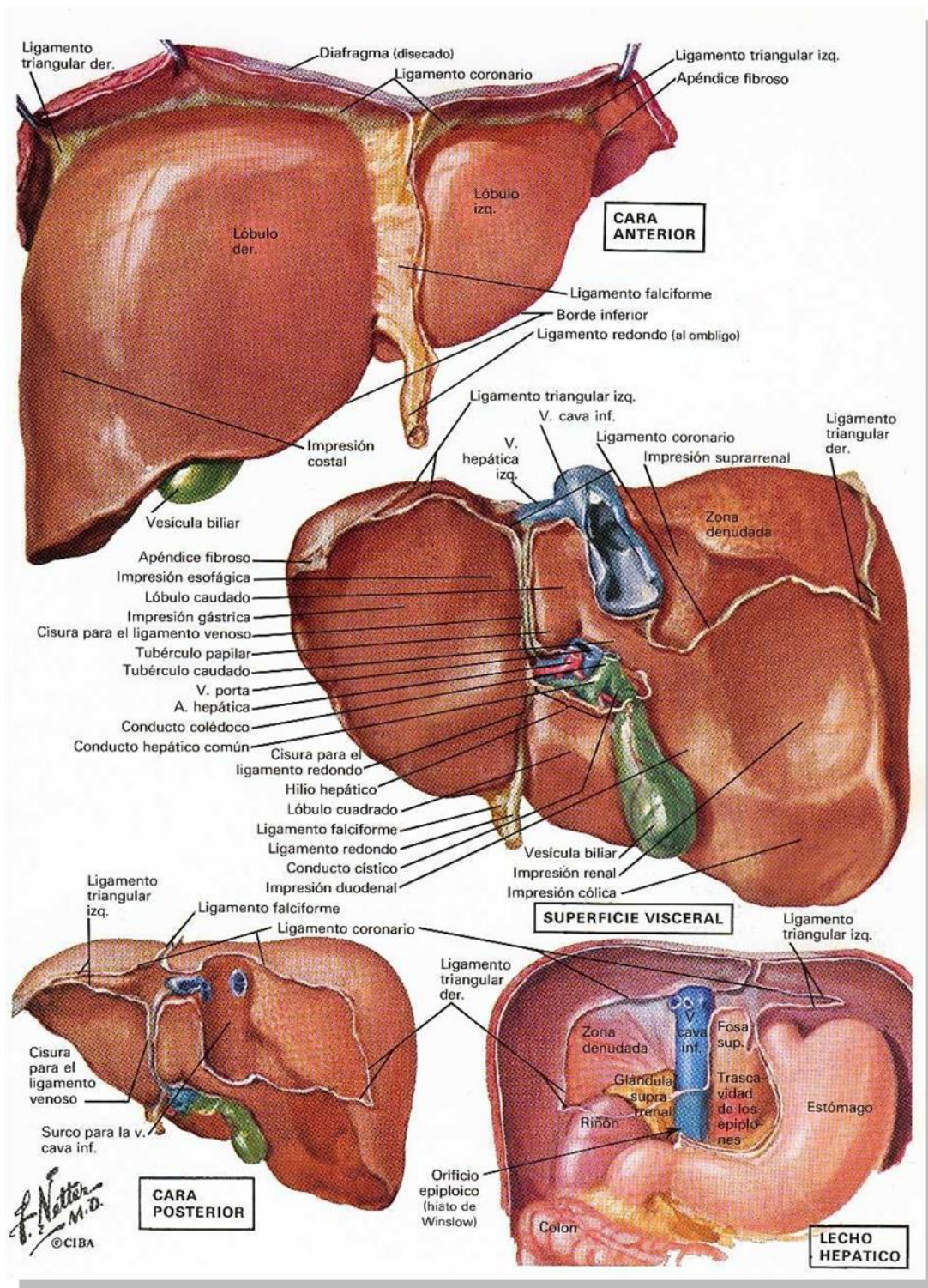


Figura 1. Anatomía del hígado humano. (Tomada de: Netter, 1981).

1.2.1. Lobulillo clásico.

Se considera una estructura en forma de prisma con sección transversal hexagonal, como se muestra en la figura 2, en donde cada ángulo corresponde a un espacio porta y en la porción central se encuentra la vena o vénula centrolobulillar, delimitada por tejido conectivo que se condensa en los ángulos para formar los espacios portas (Ángeles y Larriva, 1993; Barrao, 1996).

1.2.2. Lobulillo portal.

En la figura 2, se observa de forma triangular y se halla centrado por un espacio porta y delimitado en cada vértice por tres o más venas centrales. Los segmentos de células secretoras liberan sus productos en un conducto común, localizado en el centro del lobulillo. Este tipo de unidad estructural del hígado permite explicar la función exocrina (Ángeles y Larriva, 1993; Barrao, 1996).

1.2.3. Acino hepático.

Está constituido por pequeños segmentos de 2 lobulillos clásicos delimitados y 2 venas hepáticas terminales. Su forma es oval o romboidal y se encuentra centrado por un eje terminal portal que contiene ramas de los diferentes componentes del espacio porta. En cada acino las células se colocan concéntricamente alrededor de su eje conectivo, de forma que las más próximas a éste (Zona I) recibirán la sangre con mayor concentración de oxígeno y sustancias nutricias y las más alejadas por el contrario (zona III) recibiendo sangre de menor calidad, en la zona II recibirá sangre de calidad intermedia (González *et al.*, 1996). Desde el punto de vista funcional, es adecuado este concepto, aunque también es utilizado ampliamente el concepto de lobulillo. En los espacios porta se encuentran los siguientes elementos: conductos biliares, una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y canales linfáticos, rodeados de tejido conjuntivo laxo (Ángeles y Larriva, 1993).

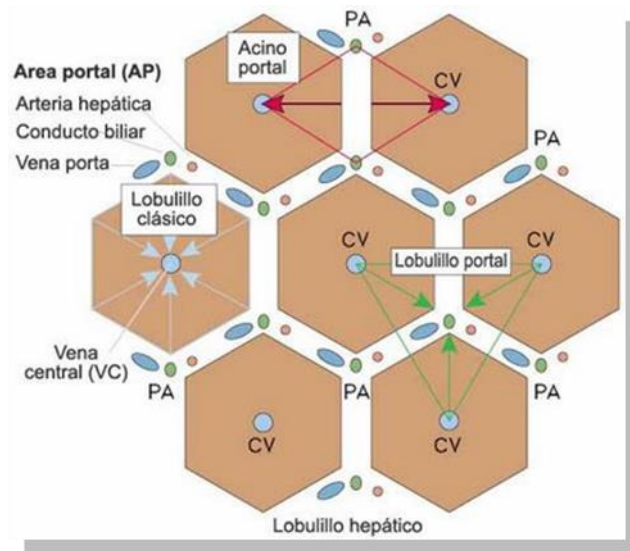


Figura 2. Esquema de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado.

A) Lobulillo clásico de Wepfler y Malpighio. B) Lobulillo portal de Thiele. C) Acino hepático de Rappaport o portal (Tomada de: Gartner y Hiatt, 2002).

1.3. El sinusoides hepático.

Es un canal vascular entre trabéculas hepáticas por donde circula sangre, está revestido por **células endoteliales**, entre ellas se sitúan las **células de Kupffer**. En la figura 3, se observa que entre los sinusoides y los cordones de los hepatocitos se encuentran los espacios de Disse, donde se localizan las **células de Ito** y **células de Pit** con características similares a los linfocitos y finalmente los **hepatocitos** (Ángeles y Larriva, 1993; Barrao, 1996).

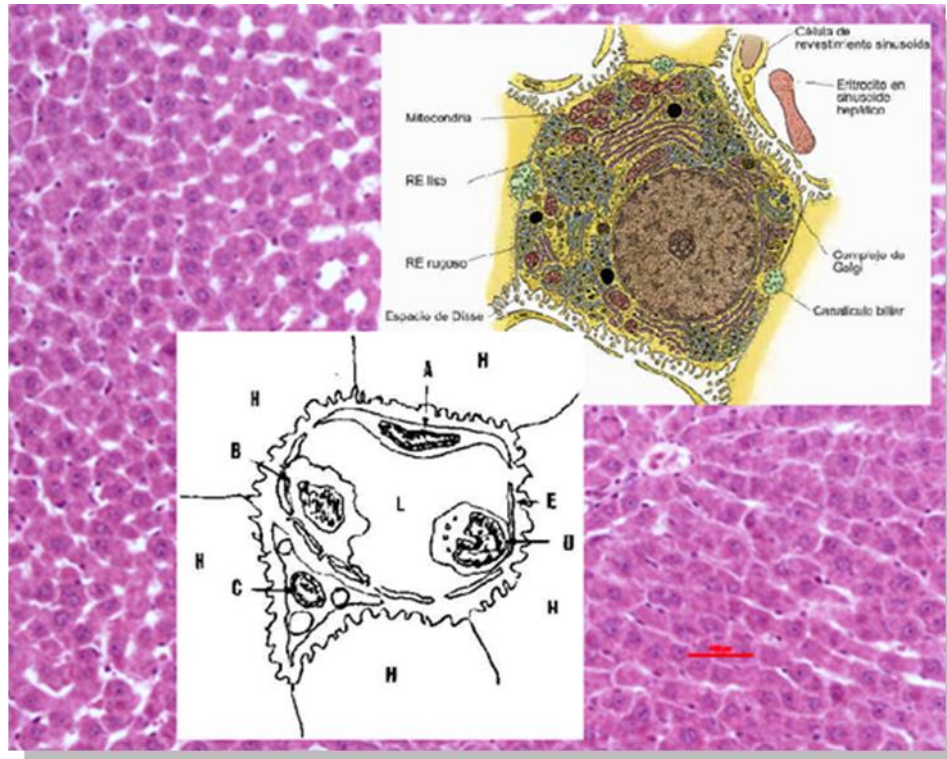


Figura 3. Estructura del sinusoides hepático: A) Célula endotelial. B) Célula de Kupffer. C) Célula de Ito. D) Célula de Pit. H) Hepatocito. E) Espacio de Disse. L) Luz del sinusoides. (Modificada de: Barrao, 2002; Gartner y Hiatt, 2002).

1.4. Análisis histológico del hígado: células de revestimiento sinusoidal y hepatocitos.

1.4.1. Células endoteliales.

Son células alargadas y aplanadas que participan en el transporte activo de sustancias entre los sinusoides y el espacio de Disse, la coagulación, la fibrinólisis, la reacción inflamatoria, la respuesta inmunitaria, la regulación de la presión sanguínea, la angiogénesis y el metabolismo de los lípidos (Aguirre, 2003). Una característica importante es su aspecto de “lámina perforada” por la existencia de múltiples orificios completos, tienen la función de permitir el paso de ciertas moléculas de tamaño variable, en un momento determinado, colaborando de esta forma con las células Kupffer y células de Pit en adecuar una respuesta inmunitaria eficaz (Barrao, 1996).

1.4.2. Células de Kupffer.

Llamadas también macrófagos residentes del hígado, fueron descubiertas por Kupffer, en 1876 (Haubrich, 2004). El citoplasma contiene vesículas, cuerpos densos y vacuolas, constituyendo un aparato lisosomal muy desarrollado para la fagocitosis y pinocitosis, desechando lo nocivo por la sangre sinusoidal como hematíes viejos, detritus celulares, bacterias, parásitos y determinadas líneas celulares (Barrao, 1996). La membrana presenta receptores que son activados por sustancias con poder inmunogénico, siendo capaces de responder a estímulos como endotoxinas o sustancias inmunomoduladoras, con la producción y liberación de productos con potente efecto biológico, mediadores de la inmunidad y de agentes citotóxicos (Barrao, 1996).

1.4.3. Células estelares hepáticas o de Ito.

Fueron descubiertas por Ito en 1951 y se conocen con los nombres de adipocitos, pericitos, células almacenadoras de grasa o células estelares hepáticas; éstas emiten brazos citoplasmáticos que se extienden por el espacio de Disse contactando con la célula endotelial y las microvellosidades de los hepatocitos. Constituyen el 15 % del total de células del hígado (Barrao, 1996; Friedman, 2000; Aguirre, 2003).

El citoplasma tiene fibras reticulares consideradas como precursoras de colágena y de grandes gotas de grasa. Sus funciones son almacenar vitamina A del organismo, sintetizar colágena tipo I, III y IV, fibronectina, laminina, ácido hialurónico y otras sustancias habituales en la matriz extracelular. Se ha observado que la síntesis aumenta de forma evidente en la rata con lesión inducida por tetracloruro de carbono, además de la respuesta inflamatoria, cicatrización y la regeneración (Barrao, 1996; Aguirre, 2003).

1.4.4. Células de Pit.

Fueron descritas por Wisse en 1976 y se caracterizan por poseer pseudópodos citoplasmáticos (González *et al.*, 1996). Estas células participan en la defensa natural frente al desarrollo de tumores o a la colonización intracelular de virus, por lo que parece ser que constituyen un elemento efector de respuesta inmunitaria (Barrao, 1996).

1.4.5. Hepatocitos.

Fueron descubiertos por M. H. Dutrochet, quien reconoció “acumulaciones de células vesiculares” en tejido hepático en 1824. Posteriormente fue confirmada la descripción y extendida por F. Kiernan (1833), J. Henle (1836) y J. E. Purkinje (1837) quienes también descubrieron las células (Kuntz y Kuntz, 2006).

Los hepatocitos constituyen el 80 % del volumen total del hígado y un 60 a 65 % del número total de células presentes en este órgano. Son células poliédricas con un diámetro de 20 a 40 μm y una vida media de 150 a 200 días (Kuntz y Kuntz, 2006). El citoplasma contiene abundantes orgánulos como las mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico rugoso (RER), uno o varios aparatos de Golgi y lisosomas, esto debido a que desempeña funciones de síntesis, detoxificación, excreción y secreción. La mitocondria asume la función de metabolizar glúcidos (glicólisis aeróbica) y lípidos (beta oxidación). La presencia de ribosomas libres y RER reflejan actividad de síntesis de proteínas tanto las utilizadas o incorporadas intracelularmente como las secretadas; el ensamble de polipéptidos para la secreción se lleva a cabo en el aparato de Golgi, presenta glucógeno y pocas vacuolas lipídicas; las células además desempeñan la secreción exocrina de bilis en el canalículo biliar (Ángeles y Larriva, 1993).

1.4.6. Matriz extracelular.

La cantidad de colágena puede ser de tipo I y III, representa del 5 al 10 % del total del hígado (Aguirre, 2003). En el ser humano, la colágena de tipo I se localiza en los espacios porta, los vasos sanguíneos grandes, las venas eferentes y la capsula portal (de Glisson). La colágena III se encuentra en espacios porta, venas centrolobulillares y el parénquima.

1.5. Aporte vascular al hígado.

La irrigación sanguínea hacia el hígado procede de la vena porta que suministra sangre rica en nutrientes, aproximadamente un 75 % del flujo total, la cual proviene del bazo y tubo digestivo que es de 1,500 mL/min y recibe sangre oxigenada de la arteria hepática izquierda y derecha, participando con menor cantidad de flujo (25 %). La sangre sale del hígado en la superficie posterior del órgano a través de las venas hepáticas, que vierten su contenido en la vena cava inferior (Merck, 1999; Aguirre, 2003; Gartner y Hiatt, 2008). La arteria hepática, conducto biliar y vena porta, en conjunto reciben el nombre de tríada portal, que es un área en donde los tres lobulillos típicos están en contacto, habiendo más tejido conjuntivo (Gartner y Hiatt, 2008).

1.6. El sistema biliar.

Elaborar bilis es una función exocrina de los hepatocitos, es segregada a una red de canalículos biliares intrahepáticos y almacenada en la vesícula biliar. Cuando se necesita la bilis, es transportada por los conductos extrahepáticos hasta llegar al duodeno donde llevan a cabo su función, posteriormente los ácidos biliares son reabsorbidos para ser llevados nuevamente al hígado y así ser útiles en la formación de la bilis (Garries y Ponce, 1996; González *et al.*, 1996).

1.7. Función hepática.

El cuerpo humano trabaja incesantemente ayudado de los órganos, siendo uno de los más importantes el hígado donde se realizan cerca de 500 procesos bioquímicos distintos que son efectuados en el hepatocito y células sinusoidales (Aguilar y del Rincón, 2003; Kuntz y Kuntz, 2006). Esas funciones permiten la homeostasis interna, gracias al metabolismo de sustancias como el colesterol, la vitamina A que participa en diversos procesos fisiológicos, como la formación de la rodopsina, un pigmento que participa en la visión, interviene en el desarrollo embrionario y crecimiento de los huesos entre otras funciones (Díaz-Zagoya, 2003; García y Ochoa, 2003). El hígado también metaboliza compuestos exógenos – fármacos o insecticidas- y endógenos –esteroides-; desintoxicación de sustancias como el etanol, toxinas o cualquier otro xenobiótico gracias al complejo proteico denominado “citocromo p-450” (CYP 450); almacenamiento de glucógeno en hígado, pudiendo guardar de 70 a 80 g del polisacárido al día. Además, realiza la síntesis de una gran variedad de productos que se vierten al torrente circulatorio como es la albúmina, una de las proteínas plasmáticas más abundante, produciéndose 14 g/día en el hígado; fibrinógeno, la mayor parte de globulinas, proteínas de la coagulación como es la heparina que actúa como anticoagulante, lipoproteínas plasmáticas que sirven como precursores de hormonas esteroideas y ácidos biliares, entre otras moléculas (Aguirre, 2003; Cárdenas, 2003). La función exocrina del hepatocito es la de producir la bilis (González *et al.*, 1996).

2. DAÑO HEPÁTICO Y AGENTES INDUCTORES: ANTICONCEPTIVOS ORALES (AO).

2.1. Daño hepático.

2.1.1. Colestasis.

Se define como la condición patológica ocasionada por el estancamiento de componentes de la bilis, provocando alteración en el flujo biliar, morfología de los hepatocitos y las células endoteliales del conducto biliar o colangiocitos (Kasahara *et al.*, 2002). Esa acumulación de los constituyentes biliares en los hepatocitos produce estrés oxidativo, trastorno en la membrana plasmática, daño hepatocelular severo y necrosis o apoptosis probablemente por la actividad detergente de sales biliares (Kasahara *et al.*, 2002).

La colestasis puede ser intrahepática como en el caso de la cirrosis biliar primaria, utilización de medicamentos como el paracetamol, glibenclamida, antibióticos como la ciclosporina y oxipenicilina, componentes de los AO, y durante el embarazo; en el caso de la colestasis extrahepática se da como consecuencia de la obstrucción del conducto biliar, presentándose la colelitiasis, cirrosis hepática e hipertensión portal. Durante el evento patológico se generan los procesos de inflamación, necrosis y fibrosis que son mediados por citocinas (Reyes y Simon, 1993; Kasahara *et al.*, 2002).

2.1.2. Fibrosis hepática.

Es una lesión crónica caracterizada por la activación de células estelares hepáticas y un exceso de producción de matriz extracelular, por lo cual se incrementa el contenido de colágena tipo I, III, fibronectina, glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglucanos, aumentando los niveles de 3 a 5 veces el contenido normal.

Esta patología se presenta en respuesta a varios estímulos como la hepatitis especialmente la B y C, abuso del alcohol, algunos medicamentos, hepatotoxinas, enfermedades metabólicas, ataque autoinmune al epitelio del conducto biliar, siendo considerado un proceso reversible (Farrell, 2002; Prosser *et al.*, 2006).

Durante el proceso de fibrogénesis hepática hay un incremento de citocinas de forma autocrina, siendo el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) el estímulo dominante de la producción de células estelares hepáticas y una supresión de la proliferación de hepatocitos, cambios en la actividad de proteasas, disminución de enzimas responsables en la degradación de matriz extracelular como son las metaloproteinasas: MMP-2 y estromelisin-MMP-3, e incremento de los inhibidores tisulares (TIMP) (Farrell, 2002; Shimizu, 2003; Prosser *et al.*, 2006).

2.1.3. Cirrosis.

Es la fase final crónica de diferentes procesos patológicos en donde se presenta la regeneración, necrosis y fibrogénesis, es generalmente irreversible provocando un trastorno en la circulación hepática (Kuntz y Kuntz, 2006).

En esta patología se presenta un desequilibrio metabólico por la reducción de la masa de hepatocitos y pérdida de la funcionalidad de los mismos. Los pacientes presentan ictericia, encefalopatía, ascitis, disturbios en la coagulación, biotransformación, desbalance hormonal, infecciones bacterianas o virales, alteración en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, etc. (Belmont, 1996; Kuntz y Kuntz, 2006).

Existen varias causas de la cirrosis, las cuales se observan en la figura 4. El número de casos clínicos de pacientes de diferentes edades y géneros va en aumento (<http://sinais.salud.gob.mx>).

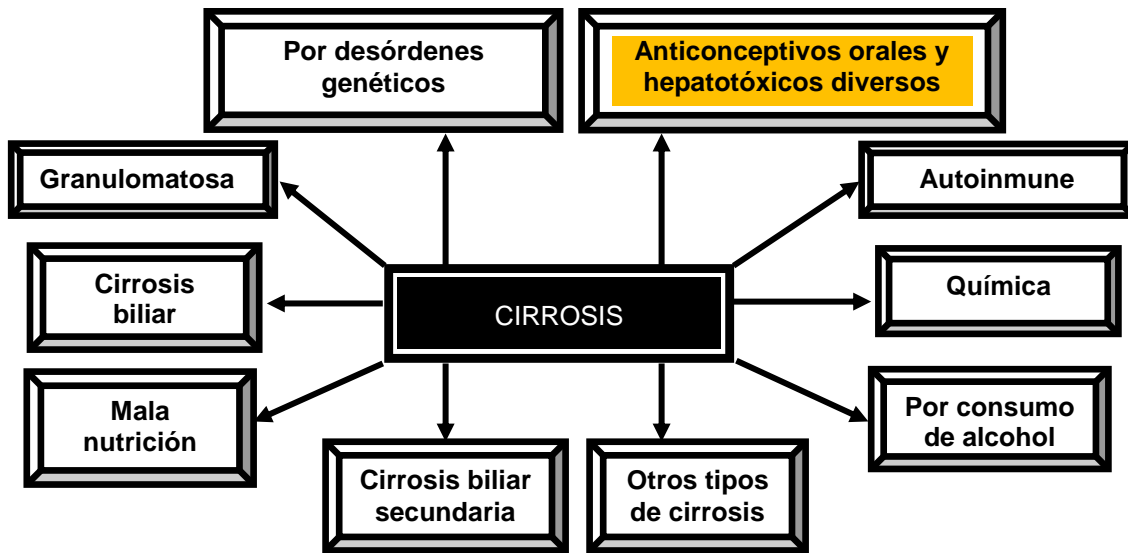


Figura 4. Clasificación etiológica de la cirrosis. (Modificada de: Belmont, 1996).

2.2. Agentes inductores de daño hepático.

El daño hepático puede ser causado por un gran número de sustancias que se aprecian en la tabla 1, de las que se deben considerar la dosis y tiempo de exposición (Farrell, 2000).

Tabla 1. Agentes nocivos que causan daño hepático.

Agente	Tipo de exposición	Daño hepático
Arsénico.	Agua contaminada, exposición industrial, pesticidas herbicidas.	Fibrosis hepática y cirrosis.
Alcohol (EtOH).	Ingestión alcohólica a altas dosis y en tiempo prolongado.	Fibrosis, apoptosis, hígado graso, toxicidad hepática, Peroxidación lipídica, daño a macromoléculas y alteración de citocinas que participan en la inflamación.
Tolueno y xileno.	Solvente y diluyentes de pinturas, gomas adhesivas.	Esteatosis posiblemente lesión hepatocelular leve. Sólo certeza exposición prolongada y masiva.
<i>Amanita phalloides</i>	Ingestión accidental, con sólo una seta.	Insuficiencia hepática fulminante. Toxicidad.
Hipervitaminosis A Vitamina A1 (retinol).	Dosis elevadas de vitamina A. Depende de la vida media del retinol (50 días a un año).	Hay fibrosis, hipertensión portal, retardo del crecimiento y cirrosis. Hay mejoría sí se deja de administrar la vitamina A, excepto cuando hay cirrosis
Metotrexato.	Ingesta elevada de metotrexato en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda, cáncer en seno, cabeza, cuello y pulmones.	Causa hepatotoxicidad, fibrosis y algunos casos de cirrosis, además de otras alteraciones como reacciones mucocutáneas y neumonitis.
Paracetamol. Analgésico.	Sobredosis del fármaco, ya que se obtiene sin receta médica.	Causa necrosis hepática centrolobulillar. En modelos de daño hepático se ha visto que causa citotoxicidad a hepatocitos.
Clorpromazina. Calmante	Dosis elevada y prolongada en el tratamiento de la psicosis. Predomina en mujeres adultas.	Hay colestasis, presentándose prurito, ictericia, alteración de pruebas de funcionalidad hepática e hiperbilirrubinemia.

(Calabresi y Chabner, 1996; Qiu-Ju *et al.*, 1994; Farrell, 2000; Cárdenas, 2003; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2009).

2.3.1. Anticonceptivos orales (AO).

Los anticonceptivos orales (AO), son un grupo de medicamentos más consumidos en el mundo incluyendo México, estos se utilizan para evitar el embarazo y en la terapia de sustitución hormonal (<http://www.forbes.com>; Brunton *et al.*, 2007), que generalmente son una combinación de un análogo hormonal de progestina y otro de estrógeno, a distinta dosis (Kalant y Roschlau, 2002; Mycek *et al.*, 2004). En el mercado farmacéutico se encuentran en las presentaciones que se muestran en el cuadro sinóptico.

ANTICONCEPTIVOS ORALES

Combinados. Contienen un análogo de estrógeno (dosis variable de 20 a 50 µg) y uno de progestina (dosis variable, 1 mg o menos).

Eficacia de 97% a 99%.

Se comercializan en paquetes para 21 días.

Sólo contienen progestinas. Incluyen la minipíldora, los implantes subdérmicos de liberación prolongada y formulaciones inyectables intramusculares.

Eficacia de 96 a 97.5%.

Poscoito. Se emplean dosis altas por píldora (0.05 mg de 17 α-etinilestradiol y 0.25 mg de levonorgestrel), ingiriendo la primer dosis en cualquier momento en término de 72 h del coito y 12 h después ingerir la segunda dosis (Brunton *et al.*, 2007).

Su eficacia es de 90 al 98%, dependiendo del régimen de 72 horas después del coito.

2.3.1.1. Mecanismo de acción y receptores a estrógeno.

Los estrógenos inhiben la secreción de la hormona folículo estimulante y las progestinas inhiben la liberación de la hormona luteinizante, para producir la inhibición del desarrollo del folículo y la ovulación, además de aumentar la viscosidad del moco cervical, impidiendo la penetración de los espermatozoides, así como modifica las condiciones para la implantación alterando el desarrollo del endometrio (Williams y Stancel, 1996).

Los estrógenos ejercen sus efectos por la interacción con receptores nucleares: receptor estrogénico α (RE- α) y receptor estrogénico β (RE- β), los cuales son factores de transcripción activados por ligandos que aumentan o disminuyen la transcripción de algunos genes (Cheskis *et al.*, 1997). Cuando penetran a la célula por difusión a través de la membrana plasmática, la hormona se liga a un receptor estrogénico en el núcleo. En dicha zona de la célula el receptor inactivo unido a una proteína de choque calórico, se liga al estrógeno, provocando un cambio conformacional del receptor, lo que ocasiona que se disocien las proteínas de choque térmico y ocasiona dimerización del receptor, lo cual intensifica la afinidad y la rapidez de unión del receptor a DNA (Cheskis *et al.*, 1997). Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, glándulas mamarias, hipófisis, hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos (Williams y Stancel, 1996).

3. RESPUESTAS CELULARES A DAÑO HEPÁTICO: CITOCINAS.

Las citocinas son proteínas solubles tipo hormona del sistema inmunitario que se encargan de efectuar la comunicación celular, son producidas por diversos tipos celulares en respuesta a varios estímulos. Sus funciones son mediar y regular las respuestas inflamatorias e inmunitarias iniciando su acción al unirse a receptores específicos en la superficie de las células diana. Los receptores a citocinas son proteínas transmembranales y están reguladas por señales específicas (otra citocina), estas citocinas se unen a los dominios extracelulares, y posteriormente se produce una respuesta celular requiriendo la síntesis de “novo” ARNm y proteínas, este es un acontecimiento breve y autolimitado (Abbas *et al.*, 1998).

De manera general, basándose en la estructura y función de las citocinas, estas se clasifican en interleucinas, factores de crecimiento, interferones, factores de necrosis tumoral y quimiocinas (Oppenheim y Ruscetti, 2002). Tienen un papel importante en la regulación de varias respuestas biológicas, así como respuestas inmunitarias, inflamación, hematopoyesis, oncogénesis, neurogénesis y en el desarrollo temprano embrionario (Ishihara y Hirano, 2002). En cuanto al hígado se refiere, éste es un órgano que sintetiza y remueve citocinas, encargándose de eso las células que lo componen. Se habla de un efecto autocrino cuando la misma célula produce la citocina, un efecto parácrino cuando se producen citocinas por estimulación de células cercanas o células de diferentes tipos (pleiotrópicas) que secretan citocinas a la circulación endocrina, pudiendo actuar en distintos tipos de tejidos u órganos, conduciendo a una respuesta inflamatoria (Simpson *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 1998). (Figura 5).

Las citocinas desencadenan respuestas diversas en el hígado, interviniendo en el metabolismo hepático, regeneración, daño hepático, inflamación y fibrosis hepática. Algunas citocinas que participan en algunos de los procesos mencionados anteriormente, se muestran en la tabla 2, como el TNF- α , IL-10 y TGF- β (Ashcroft, 1999; Fernández-Martínez *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004; Prosser *et al.*, 2006).

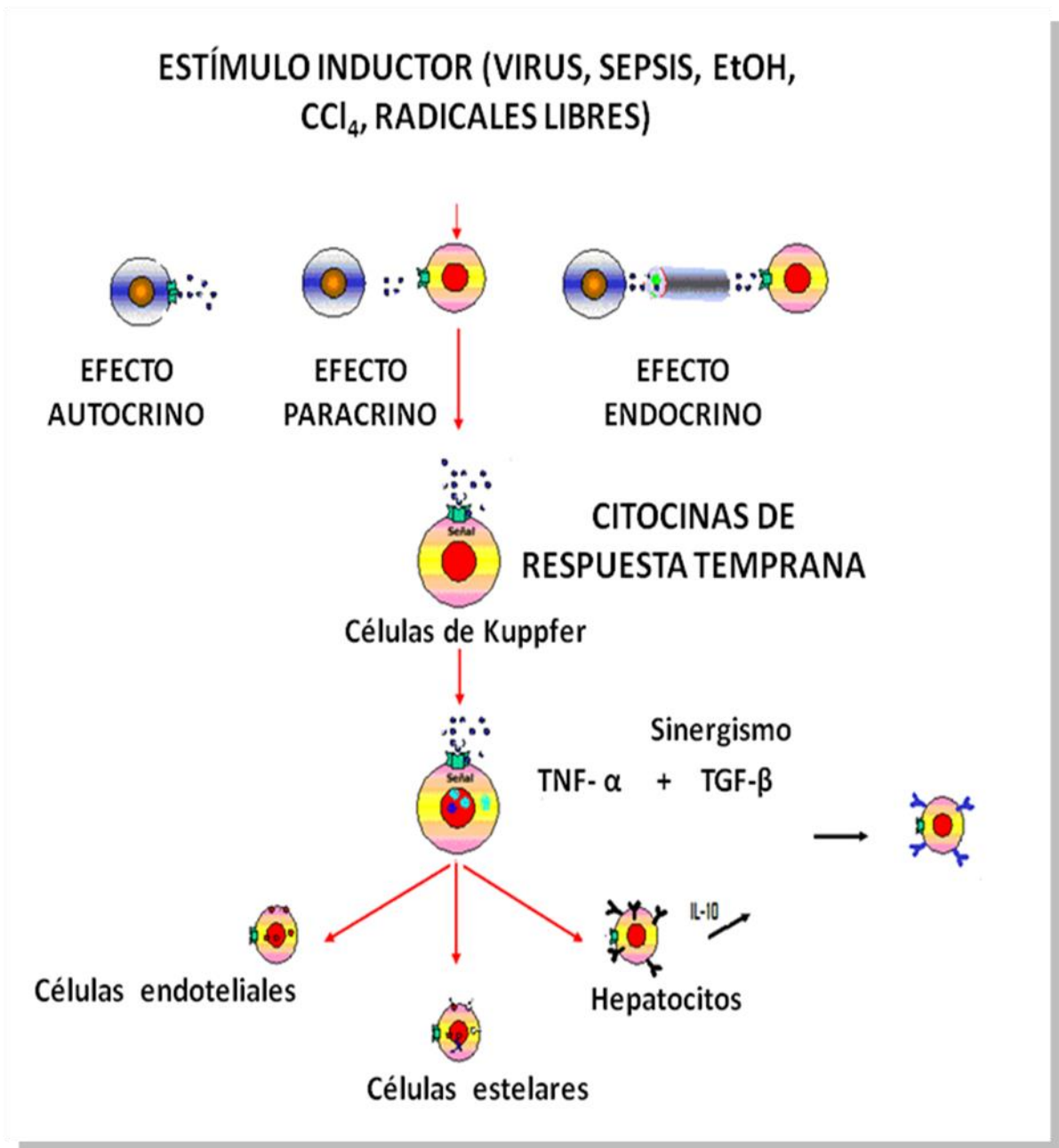


Figura 5. Mecanismos de inducción de daño por citocinas y sus propiedades en el hígado. (Modificada de: Simpson *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 1998; Fernández-Martínez *et al.*, 2004; Muriel, 2008; <http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>)

Tabla 2. Citocinas involucradas en el daño hepático.

Citocina	Tamaño del polipéptido	Fuente celular	Células diana	Efectos
TNF- α	17 kD	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipotálamo ▪ Músculo ▪ Grasa ▪ Hígado ▪ Células de Kupffer ▪ Neutrófilos ▪ Células endoteliales ▪ Hepatocitos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipotálamo ▪ Músculo ▪ Hígado ▪ Células endoteliales ▪ Neutrófilos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activación (inflamación, coagulación). ▪ Fiebre, proteínas de fase aguda. ▪ Catabolismo (caquexia). ▪ Apoptosis. ▪ Choque séptico.
IL-10	20 kD	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Células de Kupffer. ▪ Queratinocitos. ▪ Células T. ▪ Macrófagos. ▪ Linfocitos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hepatocitos ▪ Células de Kupffer 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Factor inhibidor de la síntesis de citocinas (IFN-γ). ▪ Inhibe activación de citocinas (IL-1, IL6 y TNF-α).
TGF- β	14 kD	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Linfocitos T ▪ Macrófagos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Linfocitos T ▪ Macrófagos ▪ Células de Kupffer 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibe activación, proliferación ▪ Regula +/- proliferación. ▪ Fibrosis.

(Clemens, 1991; Abbas *et al.*, 1998; Ashcroft, 1999; Oppenheim y Ruscetti, 2002).

3.1. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

Esta molécula es considerada un blanco terapéutico con énfasis en sus actividades inmunoestimulantes y antineoplásicas para la inmunomodulación de otras citocinas, ya que tiene un papel fundamental en enfermedades crónicas e inmunitarias, incluyendo las hepatopatías. El TNF- α fue identificado inicialmente como mediador de la necrosis tumoral, posteriormente se investigó que puede inducir regresión de algunos tumores, servir como mediador circulante de la caquexia, por lo que recibió la denominación de caquectina. Se sabe que los efectos biológicos dependen en parte de la concentración de la citocina y la interacción con las demás citocinas (Clemens, 1991; Abbas *et al.*, 1998; Oppenheim y Ruscetti, 2002). Hay 2 tipos de TNF, el α y β , en ambos hay una considerable homología en su secuencia de aminoácidos y pertenecen a la familia beta “sándwich”. El TNF- β es una glicoproteína de 171 aminoácidos, y el TNF- α , una proteína que no presenta glicosilaciones constituida de 157 aminoácidos, se localiza en el cromosoma 6 de la especie humana; ambas moléculas comparten un receptor de 70 kD (Clemens, 1991; Abbas *et al.*, 1998). El TNF- α se sintetiza como un propéptido que después se procesa intracelularmente por medio de una enzima convertidora de TNF- α denominada TACE (del inglés, TNF- α converting enzyme) para pasar a su forma madura y activa secretada como un trímero compacto formado por 3 subunidades idénticas de 157 aminoácidos que semeja un cono. En la figura 6, se muestra que el TNF- α se une como un trímero a su receptor, cada trímero se une a 2 o 3 copias del receptor de manera simultánea, esto resulta en un enlazamiento cruzado con los receptores mediados por ligandos, tal enlace transmitirá señales al interior de la célula (Oppenheim y Ruscetti, 2002). Se han identificado dos tipos de receptores que son proteínas transmembranales, el receptor tipo I (TNFR1) y el tipo II (TNFR2). Cada receptor transmembranal posee un dominio citoplasmático grande y puede transmitir señales a través de la vía NF κ B que originará la mayor parte de los efectos inmunológicos del TNF- α . El TNFR1 es el mediador principal de la actividad de TNF- α , en tanto el TNFR2 desempeña una función auxiliar.

La porción citoplasmática del TNFRI incluye una secuencia de 80 aminoácidos conocida como dominio de muerte celular (Abbas *et al.*, 1998).

Los dominios de muerte de ambos receptores permiten desencadenar la apoptosis celular cuando se unen con sus ligandos respectivos; también activan la caspasa-8, que a la vez activa la cascada de caspasas (Abbas *et al.*, 1998; Oppenheim y Ruscetti, 2002).



Figura 6. Estructura tridimensional del TNF- α . (Tomada de: ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/tnf-alpha.html)

El TNF- α juega un papel interesante en varias formas de lesión hepática experimental. En el modelo de colestasis por la ligadura del conducto biliar el TNF- α , TGF- β e IL-6, contribuyen a determinar la condición colestática, además de causar muerte celular por necrosis o apoptosis a hepatocitos (Plebani *et al.*, 1996; Prosser *et al.*, 2006). Recientemente en el modelo de colestasis inducido por la LCBC sinergizado por AO durante 14 días (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de norgestrel y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de EE), se encontró que se incrementa la concentración del TNF- α , por la ingesta de ambos componentes de AO a las dosis y tiempo administrados (González, 2008).

3.2. Interleucina 10 (IL-10).

Es una citocina con efectos potentes antiinflamatorios y antifibróticos (Iimuro y Brenner, 2008). Esta proteína que es vista en la figura 7, es un producto de las células T_H2 activadas y células B; es miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices α y probable actúa como un homodímero (Oppenheim y Ruscetti, 2002). El receptor a la IL-10 se encuentra dentro de la familia de dos cisteínas/WSXWS y señala a través de una vía Jak/STAT (Abbas *et al.*, 1998).

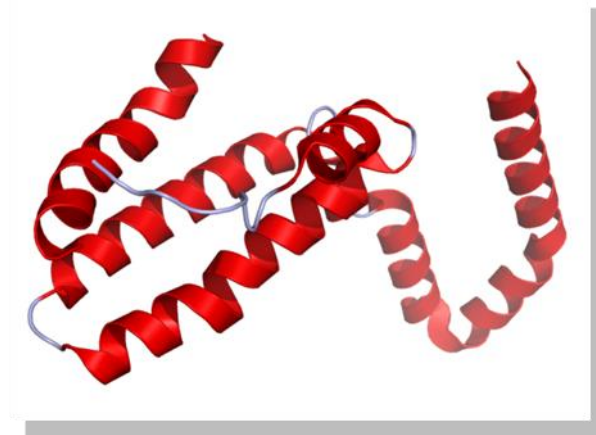


Figura 7. Estructura tridimensional de la IL-10. (Tomada de:<http://upload.wikimedia.org>)

Esta citocina tiene la capacidad de inhibir la transcripción y traducción de una variedad de citocinas proinflamatorias (Muriel, 2008). En el hígado la IL-10 se expresa en hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, células estelares y linfocitos infiltrados hepáticos (Muriel, 2008). Varios estudios han reportado que la IL-10 tiene un papel importante en enfermedades hepáticas, así Santucci y colaboradores (1996), investigaron el papel que tiene esta citocina en la hepatitis experimental inducida por LPS, Le Moine y colaboradores (1995) la investigaron en la hepatitis alcohólica, y Den Boer y colaboradores (2006) observaron el papel de esta importante citocina antiinflamatoria en la enfermedad del hígado graso (Muriel, 2008).

3.3. Factor de crecimiento transformante (TGF- β).

En principio se identificó como un factor de crecimiento para fibroblastos que promovía la cicatrización, posteriormente se determinaron efectos biológicos contrarios (Oppenheim y Ruscetti, 2002). El TGF- β se produce en varios tipos celulares, incluyendo macrófagos activados, queratinocitos y linfocitos T. En el humano se expresan 3 tipos de proteínas TGF- β : 1, 2 y 3 de 112 aminoácidos cada una, siendo productos independientes de genes, aunque todos se unen a 5 tipos de receptores de alta afinidad localizados en las superficies celulares (Clemens, 1991; Oppenheim y Ruscetti, 2002). (Figura 8).

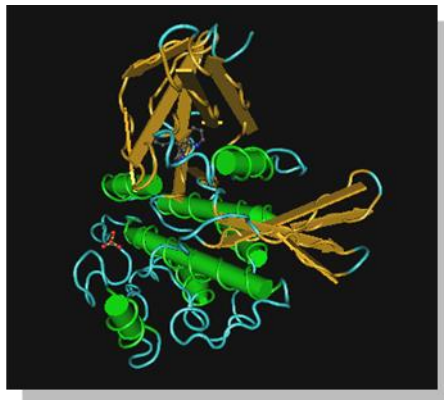


Figura 8. Estructura tridimensional del TGF- β . (Tomada de:<http://commons.wikimedia.org>)

El TGF- β 1, es una citocina profibrogénica que activa las células estelares hepáticas produciendo una gran cantidad de componentes de la matriz extracelular y la formación de fibrosis, disminuyendo los hepatocitos por la necrosis o apoptosis (Oppenheim y Ruscetti, 2002; Chong *et al.*, 2006; Prosser *et. al.*, 2006). Son varios los efectos biológicos del TGF- β , pudiendo antagonizar el efecto positivo del crecimiento en fibroblastos, células epiteliales y músculo, poseer actividades proinflamatorias actuando como un factor quimioatrayente de neutrófilos y monocitos, por otra parte, la administración sistémica del TGF- β ejerce efectos antiinflamatorios (Oppenheim y Ruscetti, 2002).

4. MODELOS DE DAÑO HEPÁTICO Y MARCADORES.

Para comprobar la eficacia de la actividad biológica de compuestos para la terapia hepática éstos necesitan ser evaluados en estudios preclínicos y clínicos que determinan la seguridad y efectividad de los compuestos. Al realizar un estudio preclínico, éste se puede llevar a cabo utilizando uno de los varios modelos de daño hepático que simulan enfermedades hepáticas causadas por diferentes agentes nocivos que provoca daño hepático agudo o crónico. Los animales utilizados frecuentemente en experimentos de laboratorio son los roedores, encontrándose la rata (*Ratus ratus*) y en menor proporción el ratón (*Mus musculus*) (Muriel, 2003). Algunos de los modelos utilizados en la parte experimental hepática son los que se mencionan a continuación:

La administración de CCl₄, es un modelo de daño hepático agudo o crónico, en donde se transforma el CCl₄ en el radical triclorometilo ($\cdot\text{CCl}_3$) por acción del citocromo CYP2E1, causando estrés oxidativo, peroxidación lipídica y daño al DNA. Se administran 4g/kg de CCl₄ vía oral, siendo una forma confiable, simple y económica para ocasionar hepatitis tóxica. Este procedimiento produce un daño máximo a las 24 horas, estimulación máxima de regeneración hepática a las 72 horas y recuperación completa de la masa funcional hepática a los 7 a 10 días (Muriel, 2003).

Otro modelo de daño agudo que provoca **sepsis es mediado por endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS)** componentes de la pared celular de bacterias Gram-negativas. La dosis subletal que se usa de LPS son 5 mg/kg, siendo sacrificadas las ratas a las 24 horas (Ikejima *et al.*, 1998). Los efectos biológicos que causan son choque letal y colestasis, induciendo citocinas proinflamatorias como el TNF- α y algunas interleucinas como la IL-1 β e IL-5 (Rodríguez-Garay, 2003; Fernández Martínez *et al.*, 2004).

Un modelo de daño hepático crónico que simula la cirrosis biliar es la **ligadura del conducto biliar común**. Esta condición provoca la excreción hepatocelular de sales biliares que se acumulan en el hígado, al alcanzar concentraciones elevadas entran en contacto con las membranas ejerciendo su acción detergente sobre ellas, aumentando la permeabilidad celular y desencadenando eventos fisiopatológicos característicos de las enfermedades hepáticas como la necrosis, inflamación y fibrosis (Muriel, 2003; Rodríguez-Garay, 2003).

4.1. Administración de 17- α etinilestradiol (EE).

Algunas ocasiones los estrógenos naturales endógenos y la ingesta de AO pueden causar daño hepático por toxicidad, provocando colestasis durante el embarazo y en mujeres que reciben el tratamiento de anticoncepción, así como algunas que reciben terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia y han presentado alguna alteración hepática (Yamamoto *et al.*, 2006), por tal motivo, se han llevado a cabo estudios en un modelo animal.

Se tienen los siguientes reportes en cuanto a inducción de daño hepático con EE a distintas dosis y tiempo de administración:

Cuando se administra el estrógeno sintético EE y se considera un modelo de daño subcrónico que causa colestasis en ratas y ratones (Yamamoto *et al.*, 2006), la dosis usada es de 5 mg/kg/día de EE durante 5 días, por vía s.c., utilizando propilenglicol como vehículo, el cual no interactúa con el fármaco. La vía de administración puede ser intraperitoneal (Storch y Schachter, 1984; Geier *et al.*, 2003) o vía subcutánea en ratones adultos, dando una dosis de 10 mg/kg de EE con el mismo vehículo durante 5 ó 21 días consecutivos, causando hepatotoxicidad, hepatomegalia, elevación de ácidos biliares en plasma, inflamación y colestasis (Yamamoto *et al.*, 2006). Inan y Cowan (2006), establecen un modelo de colestasis crónica, utilizando una dosis de 2 mg/kg durante 14 días, provocando alteraciones en ácidos biliares y fosfatasa alcalina (FA), además de prurito (Inan y Cowan, 2006).

Garduño y colaboradores (2007), establecieron el modelo a una dosis aumentada de 10 mg/kg durante 5 días de tratamiento habiendo una disminución de los marcadores utilizados, como el colesterol total, lipoproteínas de baja y alta densidad y un aumento en la FA.

El daño colestático causado por EE se debe a la disminución del flujo biliar y deterioro de mecanismos de transporte en la membrana basolateral y canalicular de hepatocitos (Geier *et al.*, 2003). Además, disminuyen los marcadores bioquímicos como bilirrubinas, colesterol, fosfolípidos y excreción de sales biliares, incrementando la actividad de FA, ALT y γ -GTP (Rodríguez-Garay, 2003), durante 5 ó 21 días de exposición al daño hepático (Rahner *et al.*, 1996).

En el trabajo presente se realizaron experimentos en un modelo de colestasis inducido por EE a una dosis de 10 mg/kg/día durante 7 días consecutivos, vía subcutánea, utilizando como vehículo el propilenglicol. Se evaluó el daño hepático con los marcadores de funcionalidad hepática y colestasis que no determinan flujo biliar, pero sí la condición colestática, es decir pruebas clínicas de funcionalidad hepática de laboratorio, así como citocinas y óxido nítrico.

4.2. Marcadores del daño hepático.

Es necesario realizar un panel de pruebas de laboratorio para valorar las funciones bioquímicas, sintéticas y excretoras que desempeña el hígado, ya que nos ayudará a saber la magnitud del daño hepático tanto en animales de laboratorio como en humanos (Woodman, 1988). Algunas de las pruebas de laboratorio utilizadas son las que a continuación se mencionan:

La enzima alanina aminotransferasa (ALT), marcador de necrosis o muerte celular, se utiliza para determinar desórdenes que ocurren en el hígado, por ende se utiliza como un marcador daño hepatocelular, considerándolo un indicador sensible, aunque inespecífico, de lesión aguda o crónica de los hepatocitos independientemente de su etiología (Kaplan, 1993).

La fosfatasa alcalina (FA), es una enzima útil como marcador de colestasis, ésta cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato a un pH alcalino óptimo. La medición se realiza en plasma, pero como es un reflejo de la función sistémica, la FA puede provenir del hueso, intestino delgado, placenta y riñón, por lo que es útil cuantificar la concentración catalítica de otra enzima, la γ -glutamiltanspeptidasa (γ -GTP), un indicador de colestasis, que es muy sensible cuando hay una alteración hepática, pues cuando la γ -GTP se encuentra elevada, sugiere que el hígado es la fuente de ese aumento de la concentración de FA, siendo necesario realizar ambas determinaciones enzimáticas para dar un mejor diagnóstico del daño hepático (Woodman, 1988; Kaplan, 1993).

El producto final de la degradación del grupo hemo de los eritrocitos es la bilirrubina. Cuando hay un bloqueo en el tracto biliar, la bilirrubina no se excreta en la bilis y su concentración en el plasma aumenta, creando alteración en el hígado, de tal forma que se puede utilizar como marcador de funcionalidad hepática y de colestasis. Los derivados obtenidos por la reacción del plasma con el ion diazonio del ácido sulfanílico (llamada reacción de diazo o de Van den Bergh) se detectan mediante detección fotolorimétrica. La reacción separa la bilirrubina conjugada de otra que es soluble en lípidos, reacciona de manera indirecta y representa la forma no conjugada de la bilirrubina (Kaplan, 1993; Bayon *et al.*, 2003; Méndez-Sánchez *et al.*, 2003).

El hígado almacena la glucosa en forma de glucógeno, el cual juega un papel importante en el mantenimiento de la concentración de glucosa en la sangre mediante procesos metabólicos de glucogenólisis y gluconeogénesis. Cuando ocurre un descontrol metabólico, este órgano no funciona adecuadamente, por lo que se usa como un marcador de funcionalidad hepática y de estrés al abolirse la cantidad hepática durante el daño (Fernández-Martínez *et al.*, 2001; García Gutiérrez, 2001).

La peroxidación lipídica (PL), es un reflejo entre la interacción de oxígeno molecular, radicales libres o especies reactivas de oxígeno y los ácidos grasos poliinsaturados que sufren daño oxidativo. El lugar donde se realizan dichas reacciones es la membrana celular, en especial de los hepatocitos, que cumplen funciones variadas (García Gutiérrez, 2001). Muchas proteínas pueden ser indicadores de la capacidad de síntesis del hígado, como es el fibrinógeno, protrombina y albúmina; cuando hay daño en los hepatocitos, hay una capacidad reducida de síntesis proteica. Esta última proteína plasmática, la albúmina, se sintetiza en adultos de 12 a 15 g diarios, teniendo una vida media de alrededor de 20 días. En general es un indicador poco confiable de síntesis proteica en enfermedad hepática (Méndez-Sánchez *et al.*, 2003).

La fibrosis hepática refleja cambios cualitativos y cuantitativos de la matriz extracelular, habiendo gran cantidad de colágena en un hígado fibrótico, por lo que la cuantificación de hidroxiprolina, un aminoácido que compone a la colágena es un buen marcador indirecto de la fibrosis (Kaplan, 1993).

La colestasis causa desequilibrio en la síntesis de biomoléculas incluyendo las citocinas, en donde las concentraciones de las proinflamatorias y pronecróticas como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, profibrogénicas o TGF- β aumentan y las citocinas antiinflamatorias y antifibróticas como la IL-10 disminuyen (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

Las técnicas histológicas (Hematoxilina-Eosina) ayudan a evaluar los cambios morfológicos en el hígado, como la apoptosis de hepatocitos y fibrosis de la matriz extracelular (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

El óxido nítrico (ON) es un radical libre con múltiples actividades biológicas en varios órganos incluyendo el hígado. Se ha visto que el ON está involucrado en enfermedades hepáticas, aunque dependiendo de las condiciones experimentales puede atenuar o incrementar las respuestas fisiopatológicas, como la fibrosis e inflamación reflejando el complejo comportamiento en el organismo.

Esta molécula es muy inestable y rápidamente se convierte en nitratos y nitritos (NO_2^- y NO_3^-) que son cuantificados y usados como un índice de la generación de ON. Fernández-Martínez y colaboradores (2006), encontraron que el ON en plasma e hígado en el modelo de la LCBC fue elevado, demostrando la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Fernández-Martínez *et al.*, 2006; Muriel, 2006).

5. UNA POSIBLE ALTERNATIVA EN LA TERAPIA HEPÁTICA: LA TALIDOMIDA.

El número de fitofármacos y fármacos sintéticos para la terapia hepática va aumentando de manera lenta, a pesar de eso son valiosas herramientas terapéuticas (Muriel, 2003; Garduño-Siciliano *et al.*, 2007). Una de las alternativas farmacológicas para el tratamiento de hepatopatías como la colestasis y cirrosis biliar causadas por AO, podría ser la talidomida un agente inmunoterapéutico que se observa en la figura 9. La talidomida, conocida en el mercado farmacéutico mexicano como Talizer tiene una gran historia farmacológica debido a los efectos causados desde su nacimiento hasta la actualidad. En 1954 se sintetizó por primera vez por los laboratorios Chemie Grünenthal en Alemania, posteriormente se comercializó y usó en distintos países como Reino Unido, Nueva Zelanda, Australia, Japón y Canadá (Marriot *et al.*, 1999). La estructura química de la talidomida (α -N-ftalimidoglutarimida), es un derivado sintético del ácido glutámico, consiste en un anillo ftaloilo y un anillo ftaloilo.

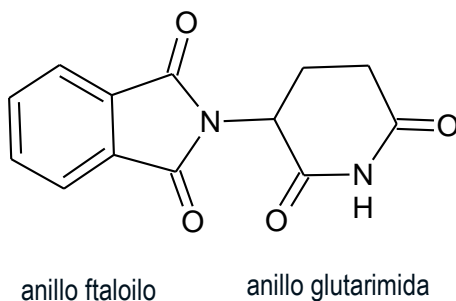


Figura 9. Estructura química de la talidomida (α -N-ftalimidoglutarimida).

(Realizada con el software ACD/ChemSketch)

En los años 50's era el tercer fármaco más vendido sin toxicidad entonces reconocida, se utilizó por sus efectos sedantes, hipnóticos y antieméticos, es decir, para el tratamiento del vómito durante los 3 primeros meses de embarazo. Como consecuencia de esto entre los años de 1956 y 1961 nacieron más de 12,000 niños con malformaciones congénitas, siendo la más evidente la focomelia, seguida de amelia, malformaciones gastrointestinales, entre otros efectos.

Debido a lo anterior, el 26 de noviembre de 1961 fue retirada del mercado, ya que se evidenció experimentalmente que la talidomida causó teratogénesis en conejos (McBride, 1961; Somers, 1962; Williams 1968; Sigala *et al.*, 2001). A pesar de los antecedentes de la talidomida, en 1965 el dermatólogo Sheskin la utilizó por su efecto sedante en pacientes con eritema nodoso leproso (ENL), observando que las lesiones mejoraban sorprendentemente (Sheskin, 1965), debido a sus propiedades antiinflamatorias investigadas posteriormente. Este acontecimiento fue el motivo del resurgimiento de la talidomida, despertando el interés de investigar los posibles mecanismos de acción y la aplicación del agente inmunoterapéutico en enfermedades de distinta etiología relacionadas al sistema inmunitario humano (Marriot *et al.*, 1991). La talidomida se aprobó en 1998 por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de América (FDA) y actualmente se encuentra en la posición 197 de los fármacos más vendidos, por sus efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antiangiogénicos en la terapia contra el ENL, siendo utilizado también en mieloma múltiple, condiciones asociadas por la infección de VIH, caquexia, artritis reumatoide, tuberculosis crónica, algunos tipos de cáncer y angiogénesis, entre otras (Marriot *et al.*, 1991; Sigala *et al.*, 2001; www.celgene.com.mx). La dosis terapéutica de la talidomida, es una mezcla racémica, de 100 a 400 mg al día para pacientes con enfermedades de mieloma múltiple (Eriksson, 1995; Mujagić *et al.*, 2002; Kamikawa *et al.*, 2006), es administrada vía oral y se absorbe lentamente en el tracto gastrointestinal, posteriormente la molécula se rompe por el cambio de pH alcalino (pH 7.4 y 8) y se transforman en productos que se excretan en la orina (Schumacher, 1965), sólo una pequeña parte de la talidomida es biotransformada por un complejo enzimático

hepático denominado CYP2C que cataliza la molécula mediante hidroxilación (Ando *et al.*, 2002).

Se han propuesto mecanismos diversos de acción de la talidomida, siendo el más estudiado el de la inhibición de la síntesis de la citocina pleiotrópica proinflamatoria y pronecrótica, el TNF- α en monocitos humanos primarios estimulados con LPS *in vitro* (Sampaio *et al.*, 1991). Otro mecanismo posible inmunomodulador propuesto de la talidomida, es la inhibición de la activación del factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) en macrófagos primarios infectados con VIH (Moreira *et al.*, 1997). El NF- κ B envuelve un gran número de genes que participan en respuestas inmunitaria, inflamatorias y de crecimiento. Éste es activado por varios estímulos incluyendo citocinas proinflamatorias como el TNF- α (Sun y Karin, 2008).

6. ANTECEDENTES DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS: 17- α ETINILESTRADIOL Y LA TALIDOMIDA.

6.1. Antecedentes de los efectos de la terapia estrogénica: 17- α etinilestradiol (EE).

En principio la dosis del componente estrogénico de los AO eran elevadas hasta 150 μ g, actualmente las dosis son menores oscilando entre los 20 a 50 μ g, proporcionando anticoncepción segura (Loose y Stancel, 2007). A pesar de eso, en algunas mujeres, los AO combinados siguen provocando efectos adversos como vómito, dolor de cabeza, alteración en el metabolismo de lípidos y aumento de colesterol, que conlleva a hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y puede ser la base para el aumento de la formación de cálculos biliares que reciben la terapia estrogénica (Williams y Stancel, 1996; Loose y Stancel, 2007). Otras alteraciones que se relacionan al hígado, en algunas mujeres que los consumen o sintetizan de forma endógena, son los responsables de la colestasis intrahepática del embarazo (Reyes y Simón, 1993), susceptibilidad a desarrollar colelitiasis, incidencia de adenomas hepáticos, hiperplasia nodular focal (neoplasia benigna), hepatocarcinogénesis hasta la etapa final que es la cirrosis, además de sinergismo del daño hepático en pacientes con enfermedades hepáticas (hepatitis aguda y crónica, colelitiasis y carcinoma hepatocelular) que ingieren AO (Yager y Fifield, 1982; Vickers *et al.*, 1989; Connolly y Zuckerman, 1998). Hay que considerar además la dosis y tiempo de exposición a los AO, sexo, edad, antecedentes de colestasis del embarazo, hepatitis, colelitiasis, predisposición genética, geográfica e interacción con fármacos (Farrell, 2002).

Algunos reportes de casos clínicos son los siguientes:

A) Mujeres sanas de Francia que consumieron AO presentaron alteraciones en las pruebas de funcionalidad hepática, como en lipoproteínas de alta densidad, colesterol y triglicéridos, observando que los estrógenos crean una alteración en el metabolismo de lípidos y esto puede ser un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (Schile *et al.*, 1998).

B) Ganne-Carrié y colaboradores (2003), reportaron un caso clínico donde una mujer de 17 años de edad que ingirió AO durante 15 días, con una dosis de 150 µg de levonorgestrel y 30 µg de EE, después de 3 meses presentó ictericia, prurito, dolor agudo biliar y vómito, estos signos y síntomas se relacionan con una enfermedad genética denominada colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3 (PFIC3, por su nombre en inglés Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3), que se da por una alteración del gen humano de resistencia a multimedicamentos 3 (MDR3) que participa en la excreción biliar fosfolipídica. En este estudio se llega a la conclusión que las hormonas sintéticas dañan la función del gen MDR3. Posteriormente Dumont y Jacquemin encontraron que el EE es el responsable de disminuir la secreción biliar fosfolipídica en la rata, provocando colestasis (Ganne-Carrié *et al.*, 2003).

C) Dunn y McNair (2007) estudiaron 2 casos clínicos de mujeres con colelitiasis, una mujer de 25 años que tuvo colestasis durante el embarazo y posteriormente ingirió AO y la otra mujer de 66 años que estuvo bajo terapia estrogénica durante la menopausia por tiempo prolongado; ambas presentaban alteración en la función hepática, observando malestar, prurito, ictericia y pérdida de peso que llevó a la anorexia, además de la alteración de pruebas de funcionalidad hepática.

Se tienen conocimientos escasos de la participación de citocinas en el daño hepático provocado por la ingesta de AO. Konno y colaboradores (2002), estudiaron en un modelo de sepsis por lipopolisacárido (LPS) sinergizado con AO, la exacerbación del daño hepático, (norentindrona y EE), donde la mezcla provocó un aumento en la producción del TNF- α por las células de Kupffer (Konno *et al.*, 2002); además, en un modelo experimental de daño hepático de cirrosis biliar como la ligadura del conducto biliar común (LCBC) sinergizado con la ingesta de AO (norgestrel y EE), hubo una modificación de las concentraciones de citocinas como el TNF- α , TGF- β e IL-10 involucradas en procesos de inflamación, fibrosis y necrosis (González, 2008).

En la colestasis provocada por EE, se ha estudiado el papel del citocromo P-450 (CYP450) y sus isoformas, ya que participan en la degradación del fármaco (Mackinnon *et al.*, 1978; Bolt, 1994), en particular el CYP 450 3A4 que participa en el catabolismo de estrógenos (17- α estradiol y 3-metil éter mestranol). Cuando se encuentra disminuido el CYP450, no lleva a cabo la función de degradación del EE lo que provoca daño hepático por acumulación (Bolt, 1994).

Uno de los metabolitos del EE, el 17 α -etinilestradiol-17 β (β -D-glucorónido) está involucrado en la colestasis, causando reducción del flujo y secreción de ácidos biliares. Este metabolito sufre glucuronidación en el anillo D y ha sido encontrado en la orina de mujeres que ingieren los AO (Vore *et al.*, 1983).

Por lo comentado anteriormente, antes de emplear los AO en mujeres, se debe consultar a un médico especialista (ginecólogo o gastroenterólogo) para que haga un diagnóstico clínico apropiado de la salud hepática de mujeres y si existen indicios o antecedentes de hepatopatías, dar un tratamiento profiláctico para la enfermedad hepática y ofrecer otro método anticonceptivo, tales como el dispositivo intrauterino (DIU) y los métodos de barrera como el condón y diafragma (Connolly y Zuckerman, 1998).

6.2. Antecedentes de la talidomida en el daño hepático.

Durante el daño hepático agudo y crónico causado por algún agente etiológico, hay un desequilibrio de citocinas proinflamatorias, pronecróticas y profibróticas como IL-1 β , IL-6, TNF- α y TGF- β , como las antiinflamatorias (IL-10), que provoca en el hígado procesos como la colestasis, inflamación, necrosis, apoptosis y fibrosis (Fernández-Martínez *et al.*, 2006), esto se ha comprobado en distintos modelos experimentales preventivos. La inmunomodulación que provee la talidomida atiende a restablecer el balance de citocinas en niveles normales de homeostasis, disminuyendo algunas citocinas y aumentando otras, provocando efectos biológicos benéficos en el hígado (Fernández-Martínez *et al.*, 2001; Muriel *et al.*, 2003).

En los trabajos de Fernández Martínez y colaboradores, muestran que los niveles de citocinas pro/antiinflamatorias y ON son modificados a comparación con las normales utilizando el modelo de la ligadura del conducto biliar, por lo cual se define que el desequilibrio interfiere con la enfermedad de la cirrosis biliar experimental en ratas (Fernández-Martínez *et al.*, 2006). Posteriormente, se evaluó la talidomida y dos análogos el 3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanamida (PDP) y ácido 3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoico, los cuales muestran la actividad antioleostática, antinecrótica y antifibrótica. El PDP tiene un efecto inhibitorio del TNF- α mayor que la talidomida y PDA tiene un mejor efecto antinecrótico que la talidomida (Fernández-Martínez *et al.*, 2001 y 2009).

Muriel y colaboradores en el 2003 reportaron que al provocar la cirrosis con CCl₄ se induce un incremento en los marcadores bioquímicos utilizados como ALT (marcador de necrosis), γ -GTP, FA (marcadores de colestasis), disminución de glucógeno hepático (funcionalidad hepática), peroxidación lipídica aumentada y aumento de la colágena; al administrar la talidomida bajan los marcadores bioquímicos, evidenciando los efectos antinecróticos, antioleostáticos y antifibróticos (Muriel *et al.*, 2003).

En otro estudio hepático realizado en un modelo de cirrosis inducida por tioacetamida, se concluyó que la talidomida posee efectos antiinflamatorios y antifibróticos por la supresión en la producción de TNF- α y TGF β 1 en células de Kupffer, mejorando la necroinflamación, protegiendo de la cirrosis en las ratas (Yeh *et al.*, 2004).

En un modelo de cultivo celular (HSC-T6) *in vitro* estimulados con TGF- β , la talidomida inhibe al factor de transcripción NF κ -B, de manera concentración dependiente, disminuyendo así al TNF- α . (Chong *et al.*, 2006).

De manera general, en varios modelos de daño hepático inducido por distintos agentes causales, como el CCl₄, etanol, iodoacetamida, lipopolisacáridos de *E. coli* y la ligadura del conducto biliar común, la talidomida ha mostrado un efecto hepatoprotector por la inmunomodulación de citocinas que participan en la patogénesis, así como otras moléculas involucradas en el desequilibrio homeostático como ácido hialurónico, laminina, procolágena III y colágena IV, así como óxido nítrico (Fernández-Martínez *et al.*, 2001,2008; Enomoto *et al.*, 2002; Muriel *et al.*, 2003; Enomoto *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004; Lv *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007).

7. JUSTIFICACIÓN.

La colestasis es un proceso patológico ocasionado por el estancamiento de la bilis, que conlleva a la cirrosis. Con base a los datos reportados por la Secretaría de Salud y Asistencia, en el año de 2008 en México, la cirrosis y otras enfermedades relacionadas al hígado se consideran la cuarta causa de muerte, representando el 5.3 % del total de la población (Tabla 3). Entre la edad reproductiva de 15 a 64 años, las hepatopatías ocupan el segundo lugar como causa de muerte entre la población, con un 8.9 % (Tabla 4). De las enfermedades hepáticas, las causas son variadas aunque se hace mayor énfasis en aquellas relacionadas al consumo de alcohol representando el 80 % y el resto causadas por infecciones virales, exposición a compuestos químicos hepatotóxicos y diversos fármacos a los que la población tiene más acceso incluyendo los anticonceptivos orales (AO) (<http://sinais.salud.gob.mx>; García Gutiérrez, 2001). Estos son muy importantes en la terapia anticonceptiva y postmenopáusica hormonal, por lo que es importante saber los efectos benéficos y dañinos, a cierta dosis y tiempo de exposición de los AO en mujeres que los consumen.

Por los antecedentes del componente estrogénico, 17- α etinilestradiol y la talidomida, se procedió a evaluar a la talidomida (400 mg/kg/día, durante 7 días, vía oral), en un modelo de daño hepático colestático inducido por EE, con una dosis de 10 mg/kg/día durante 7 días, vía subcutánea, y así poder observar las propiedades hepatoprotectoras e inmunomoduladoras de citocinas y ON, ya que se tiene escaso conocimiento sobre la participación de marcadores de funcionalidad hepática, citocinas y ON.

Además, que existen pocas alternativas de medicamentos, pudiendo ser la T, una opción en el área de la farmacología hepática.

Tabla 3. Principales causas de mortalidad general, 2008. Nacional.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	538 288	504.6	100.0
1	E10-E14	Diabetes mellitus	75 572	70.8	14.0
2	I20-I25	Enfermedades isquémicas del corazón	59 579	55.8	11.1
3	I60-I69	Enfermedad cerebrovascular	30 212	28.3	5.6
4	K70, K72.1, K73, K74, K76	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	28 422	26.6	5.3
5	J40-J44, J67	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20 565	19.3	3.8
6	^{2/}	Accidentes de vehículo de motor	16 882	15.8	3.1
7	I10-I15	Enfermedades hipertensivas	15 694	14.7	2.9
8	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	15 096	14.2	2.8
9	P00-P96	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	14 767	13.8	2.7
10	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	13 900	13.0	2.6
11	N00-N19	Nefritis y nefrosis	12 592	11.8	2.3
12	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	8 310	7.8	1.5
13	C33-C34	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	6 697	6.3	1.2
14	C16	Tumor maligno del estómago	5 509	5.2	1.0
15	B20-B24	VIH/SIDA	5 183	4.9	1.0
16	C61	Tumor maligno de la próstata	5 148	4.8	1.0
17	C22	Tumor maligno del hígado	5 037	4.7	0.9
18	C50	Tumor maligno de la mama	4 840	4.5	0.9
19	X60-X84, Y87.0	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	4 668	4.4	0.9
20	C53	Tumor maligno del cuello del útero	4 031	3.8	0.7
	R00-R99	Causas mal definidas	10 514	9.9	2.0
		Las demás	175 070	164.1	32.5

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

Los totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02-V04 (.1, .9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3-.9), V29-V79 (.4-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86 (.0-.3), V87.0-V87.8, V89.2, V89.9, Y85.0

Las principales causas de mortalidad están basadas en la lista GBD de 165

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Tabla 4. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años), 2008. Nacional.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	202 670	292.1	100.0
1	E10-E14	Diabetes mellitus	29 554	42.6	14.6
2	K70, K72.1, K73, K74, K76	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	18 086	26.1	8.9
3	I20-I25	Enfermedades isquémicas del corazón	14 968	21.6	7.4
4	^{2/}	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	13 314	19.2	6.6
5	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	12 689	18.3	6.3
6	I60-I69	Enfermedad cerebrovascular	7 054	10.2	3.5
7	B20-B24	VIH/SIDA	4 961	7.2	2.4
8	N00-N19	Nefritis y nefrosis	4 749	6.8	2.3
9	X60-X84, Y87.0	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	4 089	5.9	2.0
10	I10-I15	Enfermedades hipertensivas	3 363	4.8	1.7
11	C50	Tumor maligno de la mama	3 275	4.7	1.6
12	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	2 969	4.3	1.5
13	C53	Tumor maligno del cuello del útero	2 446	3.5	1.2
14	C16	Tumor maligno del estómago	2 371	3.4	1.2
15	J40-J44, J67	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	2 146	3.1	1.1
16		Uso de alcohol	2 095	3.0	1.0
17	C91-C95	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	2 007	2.9	1.0
18	F10, G31.2	Leucemia	1 968	2.8	1.0
19	C81-C90	Linfomas y mieloma múltiple	1 822	2.6	0.9
20	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	1 773	2.6	0.9
	R00-R99	Causas mal definidas	1 761	2.5	0.9
		Las demás	65 210	94.0	32.2

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

Los totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02-V04 (.1, .9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3-.9), V29-V79 (.4-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86 (.0-.3), V87.0-V87.8, V89.2, V89.9, Y85.0

Las principales causas de mortalidad están basadas en la lista GBD de 165

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

8. HIPÓTESIS.

Si se administra la talidomida (T) en un modelo de daño hepático experimental de colestasis inducida por 17- α etinilestradiol (EE), se esperan efectos hepatoprotectores e inmunomoduladores sobre marcadores bioquímicos, algunas citocinas y óxido nítrico.

9. OBJETIVOS.

9.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto farmacológico de la talidomida (T) en un modelo de daño hepático experimental de colestasis inducida por 17- α etinilestradiol (EE) en ratas.

9.2 Objetivos particulares.

1. Establecer un modelo de daño hepático de colestasis inducida por EE con base en referencias bibliográficas ya reportadas para su utilización en este proyecto.
2. Cuantificar el daño hepático inducido por EE mediante marcadores bioquímicos comunes de colestasis, necrosis, funcionalidad y estrés oxidativo, con el fin de evidenciar si el modelo establecido es útil.
3. Evaluar el efecto farmacológico de la talidomida en el modelo de colestasis por EE establecido, por medio de los marcadores de daño hepático, para comprobar sus propiedades hepatoprotectoras.
4. Cuantificar los niveles plasmáticos y hepáticos de algunas citocinas y ON implicados en el daño hepático, con técnicas de inmunoensayo, para determinar si el efecto deletéreo del EE y el efecto hepatoprotector de la T están relacionados con sus propiedades inmunomoduladoras sobre citocinas y ON.
5. Realizar un análisis histopatológico con la técnica de hematoxilina/eosina con el fin de corroborar el efecto deletéreo del EE y el efecto hepatoprotector de la T observados con los marcadores bioquímicos de daño.

10. MATERIALES Y MÉTODOS.

La investigación presente se desprendió de un proyecto CONACyT denominado “Evaluación farmacológica de la aminotalidomida y sus análogos N-sustituidos en ratas con cirrosis biliar secundaria y administradas con anticonceptivos orales” (50733-Q).

Se estudió el efecto que tiene uno de los componentes de los AO, el 17- α etinilestradiol (EE), un estrógeno sintético con efecto dosis-dependiente y el tiempo de exposición, teniendo antecedentes de producir colestasis (Rahner *et al.*, 1996; Rodríguez Garay, 2003; Garduño Siciliano *et al.*, 2006; Clerici *et al.*, 2006). Por lo anterior se decidió administrar una dosis de 10 mg/kg/día, siendo una dosis doble a la reportada en la mayoría de los artículos (Rahner *et al.*, 1996; Garduño Siciliano *et al.*, 2006), durante 7 días como lo realizado por Clerici y colaboradores (2006), siendo administrada en un vehículo de propilenglicol, vía subcutánea, donde probablemente producirá daño hepático (Rodríguez Garay, 2003; Garduño Siciliano *et al.*, 2006; Clerici *et al.*, 2006). Las pruebas de funcionalidad hepática convencionales utilizadas para evaluar lo anterior mencionado son determinaciones bioquímicas enzimáticas, marcadores de colestasis, necrosis, estrés oxidativo, funcionalidad hepática y fibrosis que se usan en un laboratorio de análisis clínicos, citocinas y óxido nítrico (ON). En el mismo modelo de colestasis, se evaluó la dosis terapéutica de la mezcla racémica de la talidomida (400 mg/kg/día, disuelta en carboximetilcelulosa, durante 7 días), la cual ha sido utilizada anteriormente en estudios de investigación preclínica y clínica, donde ha mostrado efectos benéficos hepatoprotectores e inmunomoduladores en modelos “*in vivo*” y en pacientes con mieloma múltiple (Eriksson *et al.*, 1995; Fernández-Martínez *et al.*, 2001 y 2004; Mujagić *et al.*, 2002; Muriel *et al.*, 2003; Kamikawa *et al.*, 2006;).

10.1. Colestasis experimental inducida por 17 α -etinilestradiol.

En el trabajo presente se evaluó el efecto colestático del EE, el cual ha sido reportado que en ratas ofrece buenos resultados de forma aguda como crónica, siendo éste un caso intermedio, administrando una dosis diaria de 10 mg/kg, por vía subcutánea, disuelta en propilenglicol durante 7 días, además se determinó la actividad farmacológica de la mezcla racémica de T, por sus posibles efectos hepatoprotectores y la inmunomodulación de citocinas y ON.

i. Grupos experimentales y tratamiento.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con una masa entre 200 y 250 g, teniendo 8 ratas por cada grupo experimental sometido en el modelo de daño hepático colestático por EE. Los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos, teniendo acceso libre al alimento (Purina-chow dieta estándar; Purina, E.U.A.) y agua, así como sujetos a ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Todos los animales recibieron trato humanitario con base en el criterio de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Institutes of Health Publ. 86-23, rev. 1985), también de acuerdo a los lineamientos y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Fernández Martínez *et al.*, 2006).

Se siguió el esquema de tratamiento observado en la figura 10.

Los grupos son los siguientes:

1. **Grupo control de controles.** Vehículo de 17- α etinilestradiol + vehículo de talidomida. ($V_{EE}+V_T$). A cada rata sólo se le administró p. o. el vehículo de T: 1 mL de solución de carboximetilcelulosa (CMC) 0.7%, 2 veces al día (8:00 h y 20:00 h) y 0.2 mL de propilenglicol una vez al día por 7 días por s.c. (12:00 h).
2. **Grupo control de la Talidomida.** Vehículo de 17- α etinilestradiol + talidomida. ($V_{EE}+T$). Se administró a cada rata p. o. talidomida (400 mg/kg): 1 mL de suspensión de T, en CMC 0.7%, 2 veces al día (8:00 h y 20:00 h) y 0.2 mL de propilenglicol una vez al día por 7 días (12:00 h), vía s.c.

3. **Grupo dañado.** Vehículo de talidomida + EE. (V_T+EE). A cada rata se le administró p. o. el vehículo de T: 1 mL de solución de carboximetilcelulosa (CMC) 0.7%, 2 veces al día, cada 12 h (8:00 h y 20:00 h) y el EE (10 mg/kg): s. c. en 0.25 mL de propilenglicol una vez al día por 7 días (12:00 h).

4. **Grupo en tratamiento.** Talidomida + 17- α etinilestradiol. (EE+T). Se les administró p. o. T a cada rata (400 mg/kg) suspendida en 1 mL de CMC 0.7%, 2 veces al día (8:00 h y 20:00 h) y el EE (10mg/kg): s. c. en 0.25 mL de propilenglicol a las 12:00 horas.

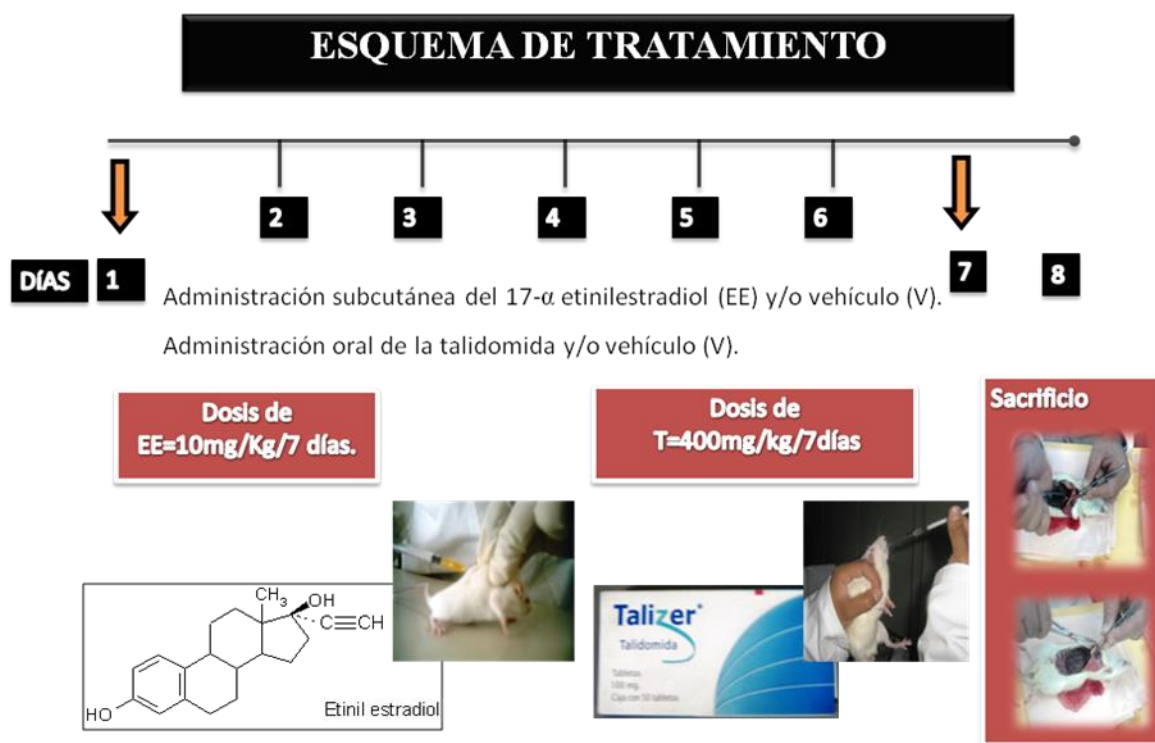


Figura 10. Esquema de tratamiento experimental utilizando el modelo de daño hepático inducido por 17- α etinilestradiol.

Después de transcurrir los 7 días de tratamiento farmacológico, las ratas fueron sometidas bajo anestesia leve de éter para posteriormente sacrificarlas mediante exanguinación por punción cardíaca utilizando una jeringa conteniendo heparina de sodio como anticoagulante. Se removió al hígado rápidamente y se

enjuagó en solución salina isotónica para posteriormente ser pesado en su totalidad y tomar la cantidad necesaria para cada determinación.

Las muestras de plasma e hígado se mantuvieron en hielo para llevar a cabo las determinaciones ese mismo día, o ser congeladas en nitrógeno líquido para la cuantificación posterior, manteniéndolas en ultracongelación a -70° C hasta su uso. Se realizaron las determinaciones bioquímicas en plasma y en hígado de los marcadores de daño y funcionalidad hepáticos, citocinas, ON, así como la toma de muestras de hígado en forma de lengüeta en solución de formaldehído al 10 % en solución amortiguadora de fosfatos. El plasma se obtuvo de la sangre colectada y centrifugada a 3,000 rpm por 10 minutos. Para la determinación de hidroxiprolina se sigue la técnica que se encuentra más adelante.

En el caso de las determinaciones de peroxidación lipídica (PL) y cuantificación de proteínas en hígado, se homogenizó 0.5 g de hígado de rata para obtener el extracto. En el caso de citocinas y óxido nítrico se realizó el extracto de hígado con las muestras almacenadas en ultracongelación, siguiendo la siguiente técnica:

1. Pesar 0.5 g de hígado de cada muestra.
2. Adicionar 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría a pH 7.4, con cocktail de inhibidores de proteasas, posteriormente llevar a cabo la homogenización del hígado en el homogenizador.
3. Los homogenados se centrifugaron a 5500 rpm durante 35 minutos a 4° C en la centrífuga refrigerada.
4. Se realizó la filtración de cada muestra con un filtro de 0.45 mm (Millex-HA, Millipore, Francia).
5. Se centrifugaron las muestras a 12500 rpm durante 45 minutos a 4° C en la centrífuga refrigerada.
6. Se separó el sobrenadante y se llevó a un tubo eppendorf.

7. Las muestras se colocaron en el ultracongelador (Thermo Scientific) a una temperatura de -70°C para posterior análisis de citocinas y óxido nítrico.

En la figura 11, se muestra lo que se determinó en plasma:

- 1.-Actividad de fosfatasa alcalina (FA).
- 2.-Actividad de γ -glutamiltanspeptidasa (γ -GTP).
- 3.-Actividad de alaninoaminotransferasa (ALT).
- 4.-Bilirrubinas directas (BD o conjugadas) y totales (BT).
- 5.-Concentración de citocinas (TNF- α , TGF- β e IL-10).
- 6.-Concentración de óxido nítrico (ON).



Figura 11. Determinaciones bioquímicas en plasma.

En la figura 12 se muestran los marcadores que se cuantificaron en hígado:

- 1.- Grado de peroxidación lipídica (PL).
 - 2.- Cantidad de glucógeno hepático.
 - 3.- Muestras para histología (tinción de eosina /hematoxilina).
 - 4.- Cuantificación de colágena (hidroxiprolina o HP).
 - 5.- Concentración de citocinas (TNF- α , TGF- β e IL-10).
 - 6.- Concentración de óxido nítrico (ON).
- .En la siguiente sección se describe cada técnica realizada.

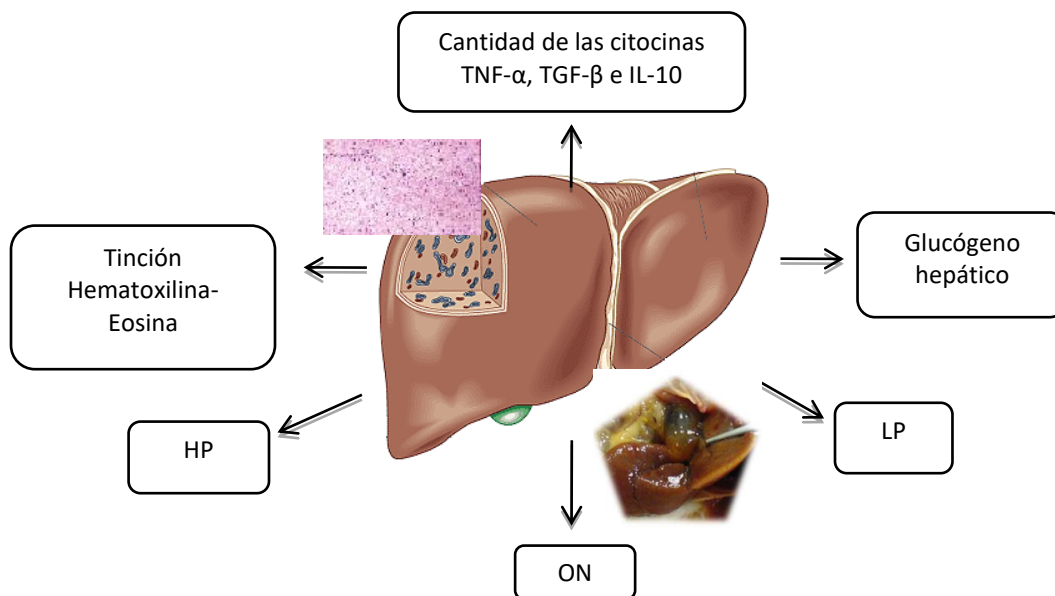


Figura 12. Determinaciones bioquímicas en hígado.

10.2. Determinaciones en plasma.

10.2.1. Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina (FA).

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la FA, para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el que se lee a 410 nm (Bergmeyer *et al.*, 1983; Berger y Rudolph, 1963).

En los tubos de ensaye la mezcla de reacción se compuso de: 0.25 mL de amortiguador de glicina 0.1M, con $MgCl_2$ 1mM pH= 10.5 y 0.25 mL de substrato de p-nitrofenilfosfato (100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 mL de agua). La mezcla se incubó en baño de María a 37 °C durante 5 minutos, la reacción se disparó al añadir 50 μ L de la muestra plasmática, después se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al adicionar 5 mL de NaOH 0.02 N, se agitó por inversión y se leyó a 410 nm en un espectrofotómetro.

El blanco fue idéntico a lo descrito, sólo que en vez de muestra plasmática se adicionaron 50 μ L de agua, se calibró con agua y se leyó el blanco.

La actividad enzimática se determinó al interpolar el valor en una curva estándar de p-nitrofenol y se reportó en μ mol de substrato hidrolizado por litro de plasma por minuto.

-Curva estándar para FA.

Soluciones para la curva estándar:

- 1.- p-nitrofenol, solución estándar de 10 μ mol/mL.
- 2.- 0.5 mL de solución 1 estándar llevados a 10 mL con NaOH 0.02 N.
- 3.- Solución de NaOH 0.02 N.

El blanco se hizo con 5.5 mL de la solución 0.02 N leyendo a 410 nm.

Tabla 5. Curva estándar para FA.

Tubo número	Sol. 2 (mL)	Sol. 3 (mL)	μ mol de sustrato
1	0.5	5.0	0.25
2	1.0	4.5	0.50
3	2.0	3.5	1.00
4	3.0	2.5	1.50
5	4.0	1.5	2.00
6	5.0	1.0	2.50

10.2.2. Determinación de la actividad de γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP).

En este método se utilizó como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima γ -1-glutamyl transpeptidasa y del receptor del grupo γ -1-glutamilo, como lo es la glicil-glicina, produjo la γ -glutamylglicina y p-nitroanilina que pudo cuantificarse con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossman y Neville, 1972). Se realizó una curva estándar para comparar los resultados obtenidos en los grupos experimentales y se leyeron las muestras a la misma absorbencia.

-Técnica: En un tubo de ensaye de vidrio de 13x100 mm se agregaron los siguientes reactivos: 400 μ L de tris-HCl 200 mM a pH= 8.2, 100 μ L de MgCl₂ 200 mM, 100 μ L de glicil-glicina 40 mM pH= 8.2 y 200 μ L de γ -glutamyl-p-nitroanilida 10 mM. La mezcla de reacción se incubó en baño de María a 37 °C durante 10 minutos y se inició la reacción al agregar 200 μ L de plasma. Se agitó e incubó a 37 °C durante 30 minutos, la reacción enzimática se detuvo con 2 mL de ácido acético 1.5 M. Se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro.

La actividad enzimática se determinó interpolando el valor de la muestra en una curva estándar de p-nitroanilina y se reportó en μmol de sustrato hidrolizado por litro de plasma por minuto. Se calibró con agua y no se requirió de blanco.

-Curva estándar para γ -GTP.

Solución 1.- Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se llevaron a 250 mL con ácido acético 1.5 M.

Tabla 6. Curva estándar para γ -GTP.

Tubo Número	Sol. 1 (μL)	Agua (μL)	nmol/mL
1	50	1950	10
2	100	1900	20
3	150	1850	30
4	250	1750	50
5	375	1625	75
6	500	1500	100
7	750	1250	150
8	1000	1000	200

10.2.3. Determinación de la actividad de alanina-aminotransferasa (ALT).

Se siguió la técnica descrita por Reitman y Frankl (1957), para obtener piruvato a partir de la reacción de transaminación entre la alanina y el ácido α -oxoglutarico. Es un marcador de necrosis hepática muy sensible y usado en el laboratorio. Las muestras se leyeron a 515 nm. Se realizó una curva estándar para

ALT con solución estándar de piruvato (1 $\mu\text{mol/m}$) haciendo las lecturas a la misma absorbencia. Se realizó de la siguiente manera:

Se rotularon los tubos blancos y problema para cada muestra.

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

-Curva estándar para ALT.

Reactantes:

- Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4: Se mezclaron 840 mL de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de solución 0.1 M. de fosfato monopotásico.
- Solución de substrato: Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido alfa-oxoglutarico en solución amortiguadora; se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 N y se llevó a 100 mL con solución amortiguadora. Se refrigeró a 4 °C.
- Reactivo cromógeno: Se disolvieron 200 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y se completó hasta un litro con HCl 1 N, así la solución que se preparó fue 1 mM.
- Solución estándar de piruvato (1 $\mu\text{mol/mL}$): Se disolvieron 11 mg de piruvato sódico en 100 mL de solución amortiguadora. Se preparó el mismo día que se utilizó.

Se preparó una serie de tubos como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 7. Curva estándar para ALT

Solución	Tubo número						
	1	2	3	4	5	6	7
Substrato (μL)	250	225	200	175	150	125	100
Estándar de Piruvato (μL)	---	25	50	75	100	125	150
Amortiguadora de Fosfatos (μL)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo de cromógeno (μL)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4 N (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
μmol de piruvato	---	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

10.2.4. Determinación de Bilirrubinas directas y totales (BD y BT).

Se utilizó un kit marca Tecno diagnostics de México para la cuantificación de BD y BT, estas pruebas se consideran marcadores de colestasis y funcionalidad hepática, que son usadas en la clínica. Se realizó la medición de las muestras de bilirrubinas a 560 nm.

-Reactantes:

- 1.- Nitrito de sodio
- 2.- Ácido sulfanílico
- 3.- Acelerador
- 4.- Reactivo diazo (1 gota de nitrito de sodio + 1.5 mL de ac. sulfanílico), se preparó en el momento la cantidad necesaria.

-Técnica:

1) Se marcaron los tubos de ensaye como B (blanco), BD (bilirrubina directa), BT (bilirrubina total) y se procedió de acuerdo al siguiente esquema:

Tabla 8. Preparación de tubos para cuantificación de bilirrubinas.

Solución	B (mL)	BD (mL)	BT (mL)
Agua	1.80	1.80	--
Acelerador	--	--	1.80
Ac. Sulfanílico	0.15	--	--
Reactivo diazo	--	0.15	0.15
Plasma	0.05	0.05	0.05

Los tubos blanco se utilizaron para las dos bilirrubinas.

- 1) Se mezclaron bien y dejaron en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 2) Se determinó la absorbencia a 530 nm. El color es estable por 30 minutos.

Curva estándar de bilirrubinas.

Reactantes:

- 1.- Nitrito de sodio
- 2.- Acido sulfanílico
- 3.- Acelerador
- 4.- Reactivo diazo (1 gota de nitrito de sodio + 1.5 mL de ac. sulfanílico), se preparó en el momento la cantidad necesaria.
- 5.- Patrón: 0.10 mg/mL.

Técnica:

- 1) Se marcaron los tubos de ensaye de acuerdo al esquema y se siguió el orden de adición de los reactivos:

Tabla 9. Curva estándar de bilirrubinas.

TUBO NÚMERO	CONC. ($\mu\text{mol/L}$)	AGUA (μL)	PATRÓN (μL)	REACTANTES (mL)		
				Acelerador	Sulfanílico	Diazo
Blanco	0	120	0	1.68	0.2	0
1	0.855	115	5	1.68	0	0.2
2	1.710	110	10	1.68	0	0.2
3	3.421	100	20	1.68	0	0.2
4	6.841	80	40	1.68	0	0.2
5	10.262	60	60	1.68	0	0.2
6	11.973	50	70	1.68	0	0.2

2) Se mezclaron bien y se dejaron en reposo durante 5 minutos exactamente a temperatura ambiente.

3) Se determinó la absorbencia a 530 nm. El color es estable por 30 minutos.

10.3. Determinaciones en hígado.

10.3.1 Determinación del glucógeno hepático.

Se hizo la cuantificación del glucógeno con la técnica de la antrona en medio ácido. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 620 nm y los resultados se expresaron como gramos de glucógeno por 100 g de hígado. (Seifter *et al.*, 1950).

Se realizó lo siguiente:

- 1) Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se adicionaron 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon e hirvieron en baño de agua durante 30 minutos.
- 2) Después de enfriarse se pasó el contenido cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó con agua agitando muy bien.
- 3) Del matraz anterior se tomaron de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, se llevaron a 1 mL en tubos de 13 x 100 mm esmerilados, por duplicado, se preparó además un tubo blanco que contuvo 1 mL de H₂O y otros 2 estándares con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se llevaron a 1 mL con agua.
- 4) Se preparó una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añadieron (con ayuda de una bureta) 2 mL a cada tubo agitando suavemente y enfriando sobre hielo.
- 5) Se taparon los tubos fríos y pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 min.
- 6) Se enfriaron de inmediato sobre agua con hielo. Se leyeron a 620 nm.

Cálculos:

$$20 \times A_m / 1.11 \times A_e = \mu\text{g de glucógeno en la alícuota}$$

A_m = Absorbencia de la muestra.

A_e = Absorbencia del estándar.

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

10.3.2. Determinación del grado de peroxidación lipídica (PL)

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico, que reacciona con las especies reactivas del malondialdehído (Buege y Austin, 1978). Se hizo una dilución 1:10 del homogenado de hígado y se tomaron 20 μL para determinar proteínas. Se expresó como nmoles de MDA/mg proteína. La lectura se realizó a 532 nm.

Reactantes:

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

Procedimiento:

- Se pesaron 0.5 g de hígado.
- Se homogenizaron en 5 mL de agua.
- Se tomaron 300 μL del homogenado al 10% y se agregó 700 μL de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL.
- Se incubaron a 37 °C por 30 minutos.
- Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%.
- Se pusieron a ebullición por 45 minutos.
- Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se leyó a 532 nm.

Cálculos:

$$C = A / \xi L = A \times 19.2308$$

Donde:

C es la cantidad de nmoles de MDA en la muestra final

A Es la absorbencia de la muestra

L Es la longitud de la celda (1 cm para equipo Shimadzu UV-1203)

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

Considerar que 19.2308 es el factor final para calcular las nmoles de MDA en la muestra de hígado en los volúmenes y diluciones trabajados a la absorbencia determinada. Se hizo una dilución 1:10 del homogenado y se tomaron 20 μL para determinar proteínas.

- Se expresó como nmoles de MDA/mg proteína.

10.3.2.1. Determinación de proteínas (Método de Bradford).

Se utilizó el reactante de Bradford, siguiendo la técnica que lleva el mismo nombre (Bradford, 1976). Se hizo reaccionar el reactante de Bradford con la dilución del homogenado del hígado, posteriormente se leyeron las muestras a 595 nm. Los resultados se compararon con una curva estándar de albúmina sérica bovina.

A continuación, se muestra con detalle la descripción de preparación de reactante y de la técnica.

Reactante de Bradford (Bradford, 1976):

- Ácido fosfórico al 85%.....100 mL
- Alcohol etílico.....50 mL
- Azul de Coomasie G-250....100 mg
- Aforado a un litro con agua.

Técnica:

- 1) Se tomaron 100 μL del homogenado y se llevaron a 1,000 μL en agua bidestilada.
- 2) Se tomaron alícuotas para proteínas y se llevaron a 100 μL con agua (20 μL de la dilución anterior + 80 μL de agua bidestilada).
- 3) El blanco se preparó con 100 μL de agua.
- 4) Se añadieron 2.4 mL de reactivo.
- 5) La absorbencia se leyó a 595 nm.
- 6) Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1mg/mL).
Con: 0, 10, 15, 25, 20, 30, 35, 40, 45, 50 μl .
- 7) Los tubos se aforaron con agua a 100 μL .

10.3.3. Determinación de colágena hepática (hidroxiprolina o HP).

La técnica utilizada se basa en la descrita por Rojkind y González (1974).

1. Se pesó 0.1 g de hígado de rata previamente seco con papel filtro y se colocó en una ampolleta.
2. Se agregaron 2 mL de HCl 6N y se sellaron con el mechero o soplete, posteriormente se colocaron a 100 °C en el horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se destaparon las ampolletas y se colocaron nuevamente en el horno a temperatura de 60 °C aproximadamente 24 h o hasta que se secaron.
4. Las muestras ya secas se resuspendieron con 1 mL de solución amortiguadora (Sol. 1); se agitaron vigorosamente en el vortex y se vaciaron en tubos de ensaye, las ampolletas se lavaron con 1 mL de la misma solución. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min.
5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita (carbón activado) se depositó el sobrenadante, se agitó durante un minuto, se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, si se observaba que el sobrenadante no quedaba claro se repetía este paso.
6. Se tomó 1 mL del sobrenadante más 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T (Sol. 2). Se dejó reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un blanco sólo con 2 mL de H₂O, es decir en vez del mL del sobrenadante.
7. Transcurridos los 20 min, se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl . Se agitaron inmediatamente para detener la reacción.
8. A cada tubo se agregaron 6 mL de tolueno y se agitaron 1 minuto justamente.
9. Se extrajo la capa de tolueno y se desechó. La porción acuosa se cubrió y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfriaron 15 minutos preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adicionaron 6 mL de tolueno se agitaron durante 1 min.

11. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 mL y se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich, se agitaron fuertemente.
12. Se dejaron reposar durante 30 minutos para que se llevara a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, se leyeron a 560 nm.

Reactantes:

Solución 1. Amortiguadora de acetato de sodio – ácido cítrico, pH = 6. (Relación para un litro):

- 50 g de ácido cítrico.
- 120 g de acetato de sodio (3H₂O).
- 34 g de hidróxido de sodio.
- 15 mL de ácido acético glacial.

La solución amortiguadora se mantiene en refrigeración y es estable por meses.

Solución 2. Solución de cloramina T. (Relación para 10 mL): 0.141 g de cloramina-T se mezclaron con 2 mL de agua destilada, 3 mL de etilenglicol y 5 mL de solución amortiguadora. Esta solución se debe preparar en el momento de usarse.

Solución 3. Reactante de Ehrlich: a) Se tomaron 27.4 mL de H₂SO₄ concentrado y se agregaron lentamente a 200 mL de alcohol etílico absoluto en un vaso sobre hielo.
b) Se pesaron 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvieron en 200 mL de alcohol etílico absoluto.

La mezcla de ácido-etanol (a) se agregó lentamente y con agitación a la solución (b) en hielo, el recipiente se cubrió con papel aluminio (solución fotolábil). Se agitó durante 15 minutos y se sacó del hielo, se siguió agitando hasta que se disolvió. La solución se puede almacenar en el refrigerador por varias semanas. Los cristales que precipitaron por el enfriamiento se disolvieron calentando en baño de María la solución y agitándola.

-Curva estándar para hidroxiprolina.

Se pesaron 10 mg (76.26 μmol) de hidroxiprolina (HP) y se llevaron con agua a un volumen de 76.26 mL, lo que dio una solución cuya concentración fue de 1 $\mu\text{mol/mL}$ = 1 $\text{nmol}/\mu\text{L}$.

Tabla 10. Curva estándar para hidroxiprolina (HP).

Tubo número	HP μL	H ₂ O mL	HP nmoles
1	10	1.99	10
2	20	1.98	20
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
Blanco	--	200	--

1. Se colocaron en un tubo con rosca y tapón, se les adicionó 1 mL de cloramina T. Se dejaron reposar 20 min a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 min se detuvo la reacción por la adición de 500 μL de tiosulfato de sodio 2M, con 1 mL de NaOH 1N y con aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitaron inmediatamente (de esto depende que se detenga la reacción).
3. Se agregaron 6 mL de tolueno a cada muestra y se agitó durante 1 minuto.
4. Se extrajo la capa de tolueno, se desechó y el contenido acuoso se cubrió con su respectivo tapón y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 min.
5. Los tubos se enfriaron y nuevamente se les agregaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante justo 1 minuto.

6. Se tomó por duplicado una alícuota de 1 mL de la fase de tolueno y mezcló con 4 mL de reactivo de Ehrlich y se agitó vigorosamente.

7. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollar color. Se leyeron en espectrofotómetro a 560 nm.

Cálculos:

I Curva Estándar.

i) Se usa un frasco de 10 mg de cis-4-OH L-prolina (Sigma H-1637) cuyo P.M. = 131.13 g. Considerando que 131.13 g ----- 1 mol

$$131.13 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ mmol}$$

$$10 \text{ mg} \text{ ----- } X = 0.07626 \text{ mmol}$$

$$X = 76.26 \text{ } \mu\text{mol aforar}$$

ii) 10 mg de HP = 76.26 μmol ----- 76.26 mL

Por tanto 76.26 ----- 76.26 mL

$$X \text{ ----- } 1.0 \text{ mL}$$

$$X = 1 \text{ } \mu\text{mol/mL} = \text{nmol}/\mu\text{L}$$

II) Determinación de Colágena.

i) Considerando que la molécula de colágena está constituida por tres cadenas alfa, cuyo peso individual es de 96,000 d, y que a su vez cada cadena contiene 100 residuos de hidroxiprolina (HP), tenemos:

$$96,000 \times 3 \text{ y } 131.1 \times 100 \times 3$$

$$288,000 \text{ g colágena} \text{-----} 39,330 \text{ g HP}$$

$$1 \text{ g} \text{ -----} X = 0.137 \text{ g HP}$$

por lo que el contenido de HP

$$288,000 \text{ g} \text{ -----} 100\%$$

$$39,330 \text{ g} \text{ -----} X = 13.66\%$$

es de 13.66% (m/m) en una molécula de colágena.

ii) El resto de los cálculos se demuestra con un ejemplo.

$$A^1 = 0.1287$$

$$A^2 = 0.1431$$

Blanco = 0.0578

m = 0.0019 nmoles

\bar{A} = 0.1359

\bar{A} - bco. = 0.0781

A = 0.0781 x 3 = 0.2343 Se multiplica por tres, ya que se toma una alícuota de 1 mL de la muestra disuelta en 3 mL de amortiguador de citrato de sodio.

A/m = 0.2343 / 0.0019 = 123.32 nmoles Interpolación en la curva estándar

123.32 ----- 0.1 g hígado

X ----- 1 g hígado

X = 1233.2

131.13 g --- 1×10^9 nmol

X ----- 1233.2 nmol

X = 0.0001617 g

1 g ----- 1000 mg

0.0001617 g --- X

X = 0.1617 mg

X = 0.1617 mg HP/g hígado

Por último:

0.1617 mg HP ---- 13.66% 13.66% de 100%

X ---- 100%

X ---- 1.1837 mg HP

X = 1.1837 mg colágena/g hígado

Cálculo por factor común:

b = intersección con la ordenada.

$$\bar{A} - \text{bco} = A/m \times 3 \times 10 \times 131.1 \div 1 \times 10^9 \times 1000 \times 7.32 - b$$

$$(10 \times 10^{-9} \times 1000 = 10^{-5})$$

$$A/m \times 3 \times 131.1 \times 10^{-5} \times 7.32 - b$$

$$A/m \times 2878.96 \times 10^{-5} (= 0.0288) - b$$

$$\text{mg Colágena/g hígado} = A/m \times 0.0288 - b$$

10.3.4. Determinación de citocinas y ON en plasma e hígado.

Se utilizaron kits para cuantificación de citocinas por anticuerpos monoclonales recombinantes de rata (r)-TNF- α , IL-10 y TGF- β por el método de ELISA (inmunoensayo), marca Biosource Internacional Inc. E.U.A. La técnica se siguió tal cual está descrita por el proveedor y se llevaron a cabo las diluciones adecuadas cuando fue requerido.

En el caso del ON, se utilizaron filtros (Filter units with microporous durapore PVDF Membrane) para remover partículas y algunos precipitados de cada muestra, se centrifugaron a 12,000 rpm por 60 minutos a 4°C. Posteriormente se utilizó el kit para cuantificar de forma indirecta el óxido nítrico, siguiendo la técnica descrita en el instructivo del ensayo del kit (Cayman Chemical Co., MI, EUA). Las muestras fueron leídas en el lector de ELISA a 450 nm (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

10.3.5. Análisis histológico.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Experimental, perteneciente al CINVESTAV en la ciudad de México, además se contó con la colaboración de la Dra. Elizabeth Pérez Hernández del Hospital de Ortopedia, Dr. Victorio de la Fuente Narváez (IMSS).

Se realizó la técnica de tinción Hematoxilina/Eosina (H/E) para evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de los hepatocitos teñido de color rosa. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Los cortes de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS.

Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de grosor y se cubrieron con silano. Se realizó lo siguiente:

a) Tinción de H/E.

- 1) Las rebanadas se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- 2) Se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 min.
- 3) Se enjuagaron en agua corriente por 2 minutos.
- 4) Se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones. Se verificó la diferenciación con microscopio, los núcleos se distinguen y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.
- 5) Se lavaron en agua corriente brevemente.
- 6) Se sumergieron en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante.
- 7) Se lavaron en agua corriente de 10 a 20 minutos.
- 8) Se tiñeron con eosina de 15 a 20 minutos dependiendo del tiempo de preparación de la eosina y el grado de contraste deseado (contrateñido).
- 9) Se lavaron con alcohol al 95%.
- 10) Se lavaron con alcohol absoluto, al menos dos cambios.
- 11) Se lavaron con xileno 2 cambios.
- 12) Se montaron en el polímero Permound o bálsamo.

10.4. Análisis estadístico.

Las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de cada grupo experimental del modelo de colestasis inducido por EE y administradas con la talidomida, fue el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para la comparación de todos los grupos contra todos, es la llamada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. La prueba se corrió en un paquete de Systat Software versión Sigma Stat 3.1 (U.S.A.).

Se presentan las gráficas de barras en la sección de resultados que contemplan el valor promedio en cada determinación, con una n de 8, +/- el error estándar indicado en la parte superior.

11. RESULTADOS

11.2. Resultados de los marcadores bioquímicos de daño hepático en plasma.

11.2.1. Resultados de fosfatasa alcalina (FA).

Con respecto a la determinación de la actividad de FA, que es un marcador de colestasis, no hay diferencia estadísticamente significativa de los grupos estudiados con respecto al grupo control (V_T+V_{EE}), excepto en el grupo control de EE (V_T+EE). El grado de colestasis se determina por el aumento en la actividad de FA en los grupos con daño hepático por EE. En este caso, con la administración de la talidomida se observa una disminución significativa de la actividad de la FA, observándose en la figura 13.

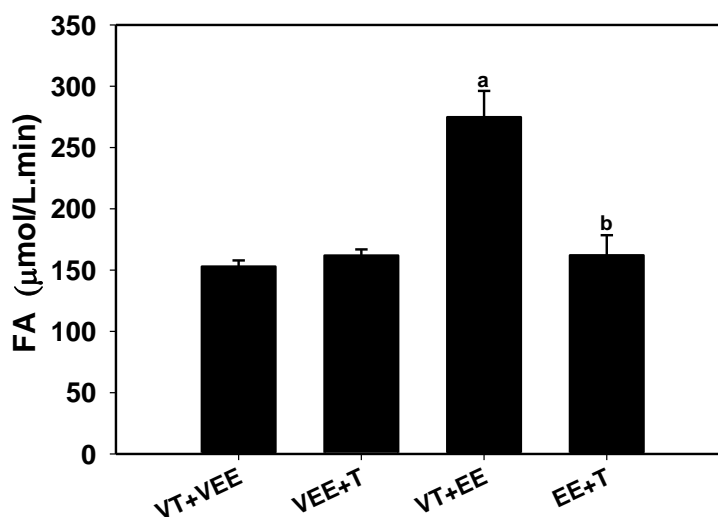


Figura 13. Actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FA).

La actividad enzimática fue determinada en muestras de plasma de ratas con vehículo del EE (V =propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T =400mg/kg) suspendida en vehículo (V =CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a:** Diferente vs. Grupo control (V_T+V_{EE}). **b:** Diferente vs. grupo control dañado (V_T+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.2.2. Resultados de γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GTP).

En la figura 14 se observa una elevación de más del doble en la actividad enzimática de γ -GTP, que es el marcador más sensible a colestasis por la administración de T; por el contrario la dosificación de EE inhibe a tal marcador de manera significativa con respecto del control de vehículos.

La administración conjunta incrementa de forma marcada su actividad, aunque de manera intermedia al ser comparada con ambos fármacos administrados por separado.

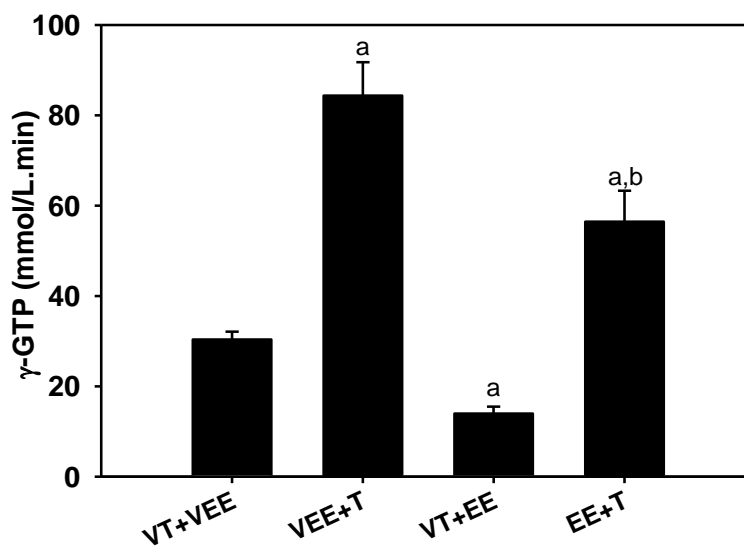


Figura 14. Actividad enzimática de γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GTP).

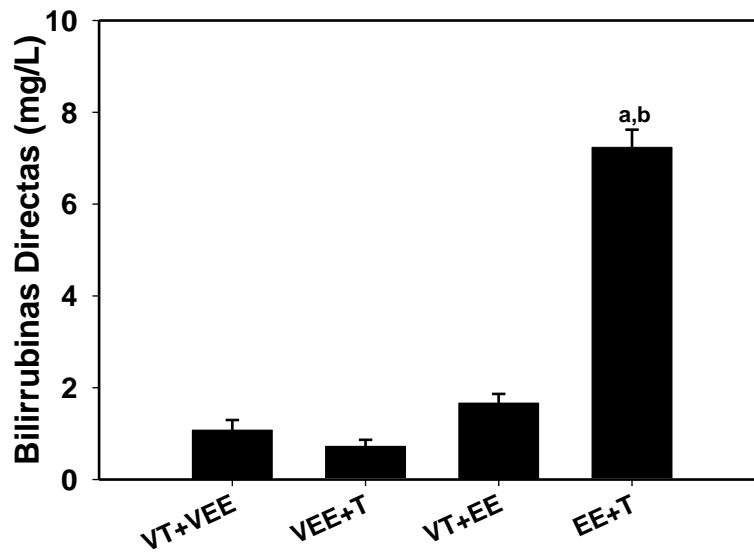
La actividad enzimática fue determinada en muestras de plasma de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a:** Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.3. Resultados de la cuantificación de bilirrubinas directas y bilirrubinas totales (BD y BT).

Las bilirrubinas plasmáticas son indicadores de funcionalidad hepática y de colestasis. Las bilirrubinas directas o conjugadas fueron detectadas en el grupo control (V_T+V_{EE}), observando una tendencia ligera a aumentar la concentración de bilirrubina en el grupo control dañado (V_T+EE), aunque no hay una diferencia significativa; sin embargo, en el grupo de la talidomida hay una disminución de la concentración de las bilirrubinas directas en comparación del grupo control (V_T+V_{EE}), pero no es estadísticamente diferente. En el grupo T+EE hay un incremento de 4 veces con respecto al grupo V_T+V_{EE} ($P < 0.05$), observándose en la figura 15 A.

En la cuantificación de bilirrubinas totales se observa una tendencia creciente a aumentar la concentración de la misma en los grupos experimentales. La administración de T incrementa la concentración de BT sin alcanzar diferencia estadística, pero la administración de EE (V_T+EE) induce un aumento contrastante y significativo de casi 3 veces con respecto al grupo control (figura 15 B); aún más, se sugiere nuevamente un efecto sinérgico por la administración concomitante de ambos fármacos, ya que como se observa la concentración de BT se eleva 400% al compararse con el grupo V_T+V_{EE} . Incluso, una explicación probable es que la mayoría de las bilirrubinas no se conjugaron, por lo que las bilirrubinas indirectas o no conjugadas son las que están en aumento en los grupos experimentales.

A)



B)

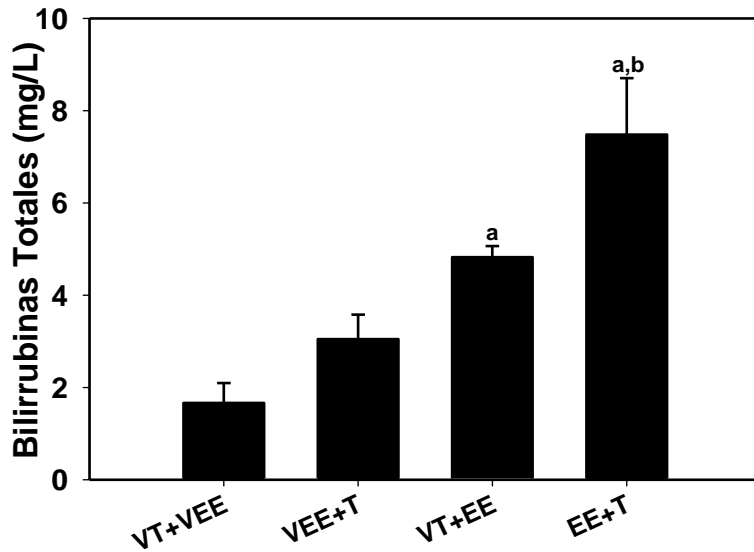


Figura 15. Bilirrubinas directas y bilirrubinas totales (BD y BT).

La concentración plasmática de bilirrubinas A) directas y totales B) fue determinada en muestras de plasma de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar.

a: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.3.1. Resultados de alanina-aminotransferasa (ALT).

La actividad enzimática de la ALT, que es un indicador de necrosis, no tiene diferencia estadística significativa en ningún grupo con respecto al grupo VT+VEE, y se nota una leve tendencia a la baja en todos ellos (Figura 16).

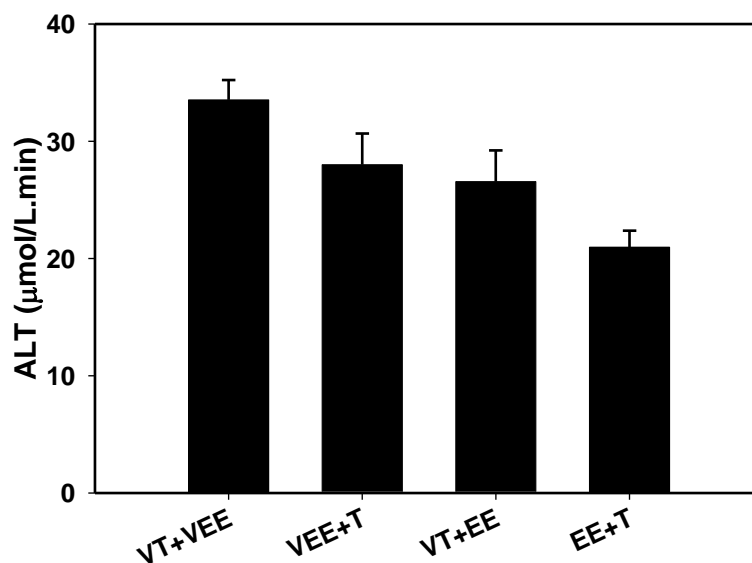


Figura 16. Actividad enzimática de alanina-aminotransferasa (ALT).

La actividad enzimática fue determinada en muestras de plasma de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a:** Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.4. Resultados de los marcadores bioquímicos de daño hepático en hígado.

11.3.1 Resultados de glucógeno hepático.

El contenido de glucógeno en el hígado indica metabolismo y funcionalidad. El grupo control (V_T+V_{EE}) posee una cantidad normal de glucógeno, en el caso del grupo $V_{EE}+T$, el marcador disminuye someramente pero no es estadísticamente diferente, pues la talidomida no modifica esta reserva de energía en el hígado. El grupo al que se administró el EE (V_T+EE) perdió de forma contrastante ($P < 0.05$) el contenido de glucógeno. El grupo de $EE+T$ muestra un incremento escaso en la cantidad de glucógeno, pero no es de forma significativa, por lo que la talidomida no previno la caída del glucógeno hepático durante el tratamiento, lo cual se muestra en la figura 17.

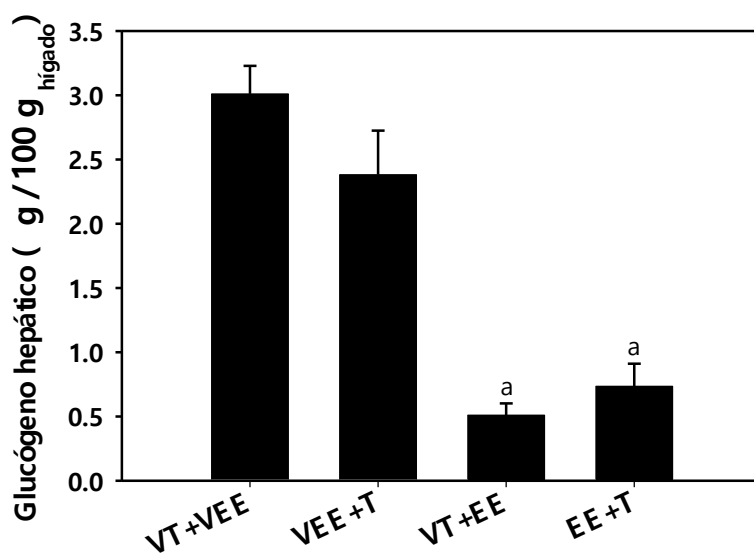


Figura 17. Glucógeno hepático.

El contenido de glucógeno hepático fue determinado en muestras de hígado de ratas con vehículo de EE (V =propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T =400mg/kg) suspendida en vehículo (V =CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a:** Diferente vs. Grupo control (V_T+V_{EE}). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (V_T+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.3.2. Resultados de peroxidación lipídica (PL).

La cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico es un indicador del grado de peroxidación lipídica (PL) de la membrana celular hepática. En la figura 18 se observa que existe aproximadamente el mismo nivel de PL entre el grupo control (V_T+V_{EE}) y el grupo $V_{EE}+T$. De manera evidente y significativa estadísticamente, el grado de peroxidación aumentó casi al doble en el grupo control dañado (V_T+EE) y al ser comparado con el grupo administrado con talidomida ($V_{EE}+T$), ésta previene su aumento, ya que disminuye la peroxidación ($P < 0.05$); sugiriendo que probablemente esta molécula sea buen atrapador de radicales libres.

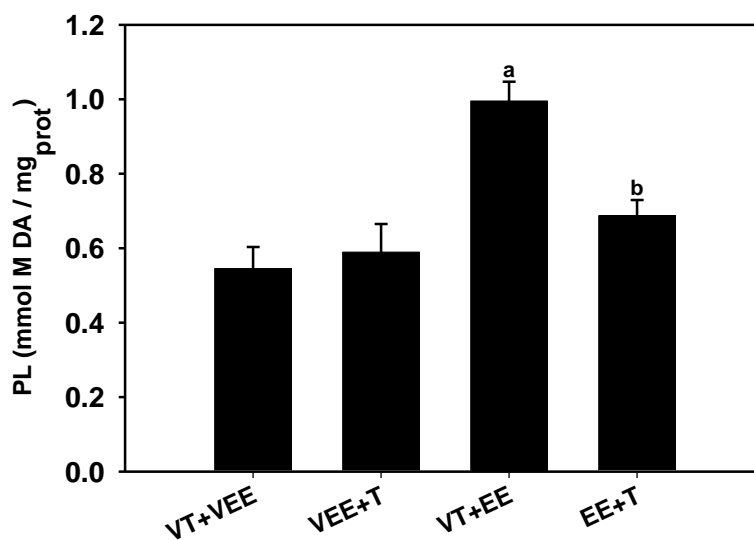


Figura 18. Peroxidación lipídica hepática (PL).

El grado de peroxidación lipídica fue determinado en muestras de hígado de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a:** Diferente vs. Grupo control (V_T+V_{EE}). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (V_T+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.3.3. Resultados de colágena hepática (HP).

La cantidad de colágena hepática es un indicador de fibrosis. En el grupo control (VT+VEE), es evidente que el contenido de colágena es menor a comparación de los demás grupos, habiendo diferencia estadísticamente significativa en los 2 grupos tratados con EE (VT+EE y EE+T), con respecto al grupo control (VT+VEE). La administración de T no previno el incremento de la colágena, como se aprecia en la figura 19.

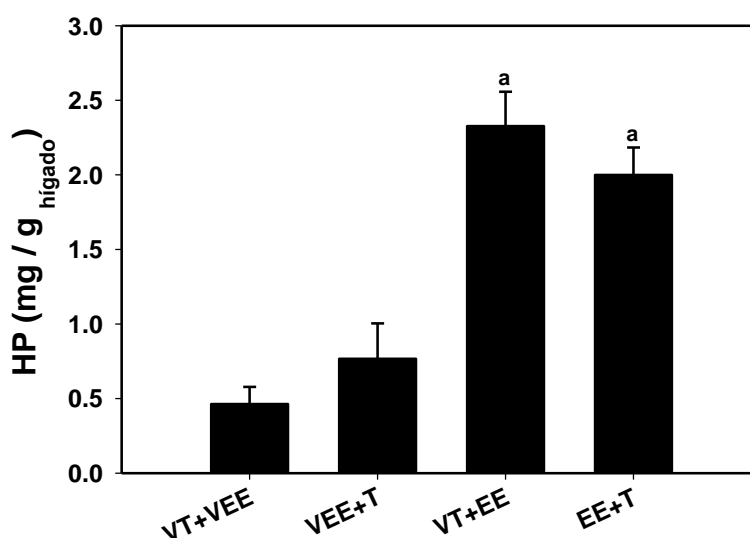


Figura 19. Colágena hepática (HP).

La cantidad de colágena hepática fue determinada en muestras de hígado de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar.

a: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

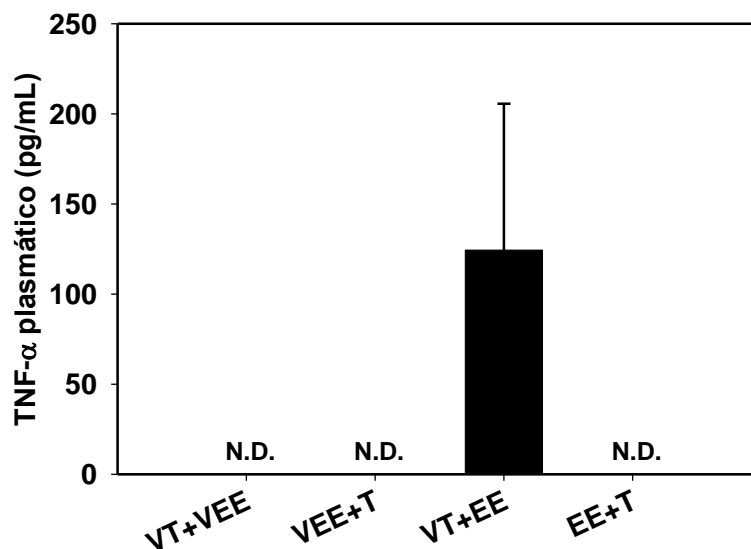
11.4. Resultados de la cuantificación de citocinas y óxido nítrico hepáticos y plasmáticos.

Se cuantificaron tres citocinas que están involucradas en el daño hepatocelular, así como la cuantificación indirecta del óxido nítrico. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

11.4.1. Resultados del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), en hígado y plasma.

La concentración plasmática del TNF- α indica la presencia de uno de los promotores endógenos de inflamación, necrosis, apoptosis y fibrosis más importantes en el daño hepatocelular. La presencia del TNF- α no fue detectable en 3 de los 4 grupos: VT+VEE, VEE+T y EE+T, excepto en el grupo dañado con EE, en donde hay un incremento en la concentración plasmática de esta citocina pero sin diferencia significativa, como se muestra en la figura 20 A. En la figura 20 B, se observa que la cantidad hepática de TNF- α es cuantificable e idéntica en los grupos control (VT+VEE y VEE+T), pero para el caso de los grupos donde se administró EE, incluso el grupo en tratamiento con T, presentan cantidades similares de la citocina hepática, habiendo una disminución significativa en ambos casos con respecto al grupo control VT+VEE.

A)



B)

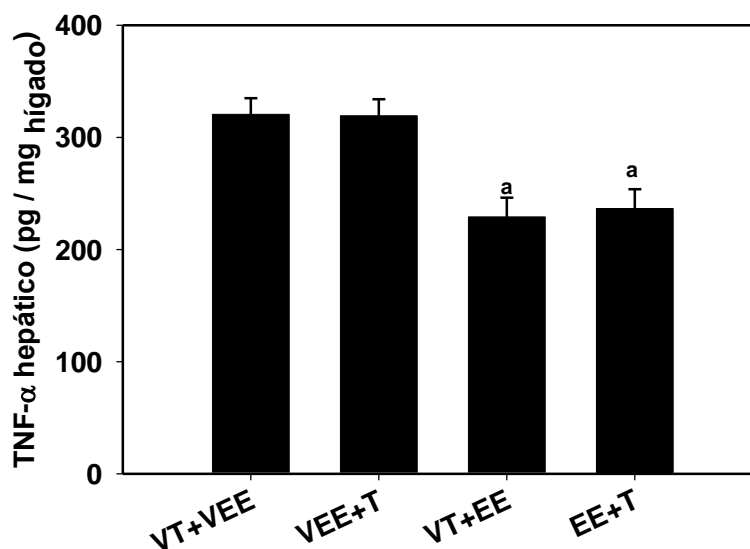


Figura 20. Concentración plasmática y hepática del factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

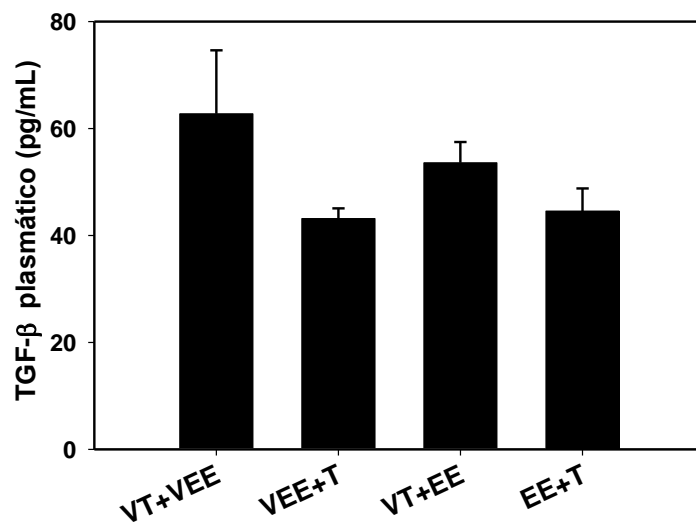
La concentración A) plasmática y B) hepática de la citocina fue determinada por ELISA de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar.

a: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.4.2. Resultados del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), en hígado y plasma.

El TGF- β es un marcador de fibrosis. La presencia del TGF- β en plasma fue detectable en todos los grupos experimentales, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos, como se determina en la figura 21 A. La concentración del TGF- β en hígado aumentó en los grupos donde se administró la T (V_{EE+T}), siendo más notorio en el grupo tratado (EE+T), aunque no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, tal como se aprecia en la figura 21 B, esto debido probablemente a la variabilidad biológica.

A)



B)

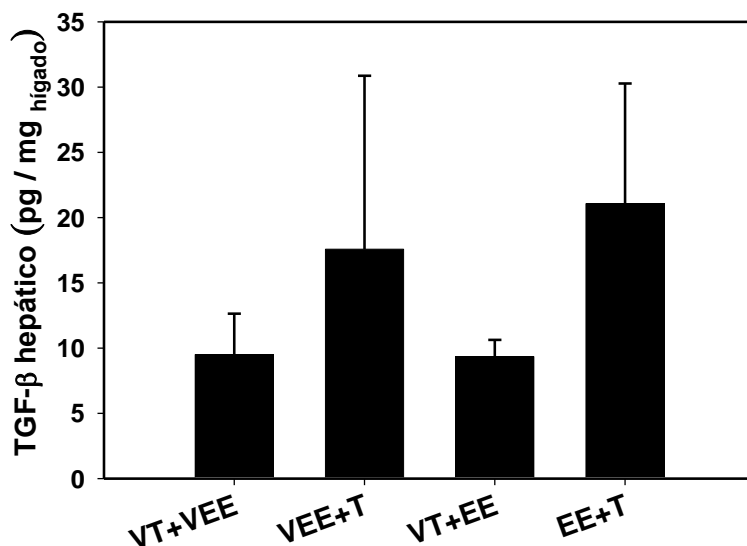


Figura 21. Concentración plasmática y hepática del factor de crecimiento transformante β (TGF- β).

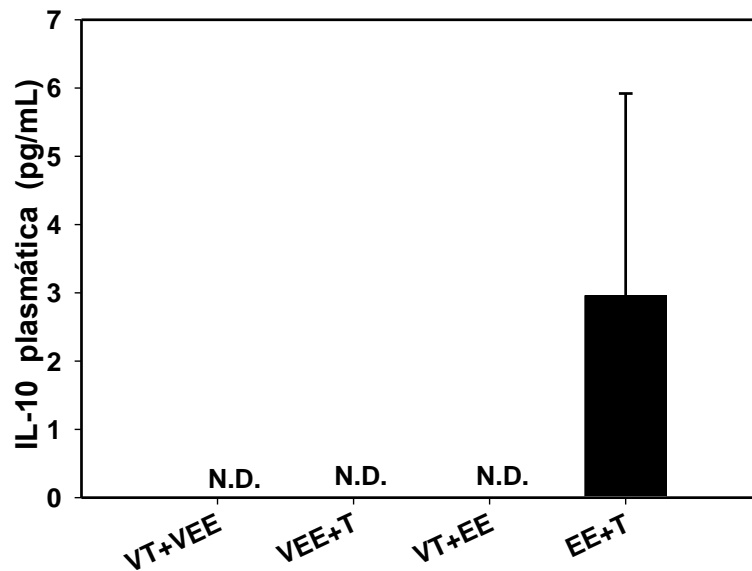
La concentración A) plasmática y B) hepática de la citocina fue determinada por ELISA de ratas con vehículo del 17- α etinilestradiol (V=propilenglicol 0.2 mL), 17- α etinilestradiol (EE=10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar.

a: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.4.3. Resultados de Interleucina 10 (IL-10), en hígado y plasma.

La figura 22 A, muestra los niveles plasmáticos de la citocina antiinflamatoria más potente, la IL-10. Los niveles basales de esta proteína no son cuantificables en los grupos control, ni en el grupo dañado con EE, pero sí en el grupo dañado que recibió tratamiento (EE+T), donde hay una elevación en la concentración de la IL-10 aunque no hay significancia estadística. En la figura 22 B, la cantidad de IL-10 en hígado aumentó en el grupo V_{EE}+T, habiendo significancia estadística con respecto al grupo control (V_T+V_{EE}). En el grupo dañado (V_T+EE), el nivel de IL-10 disminuye comparado con el grupo (V_{EE}+T); cuando son administrados ambos fármacos, el inductor del daño EE y la T, esta última disminuye aún más el nivel de la citocina, pero no hay significancia estadística.

A)



B)

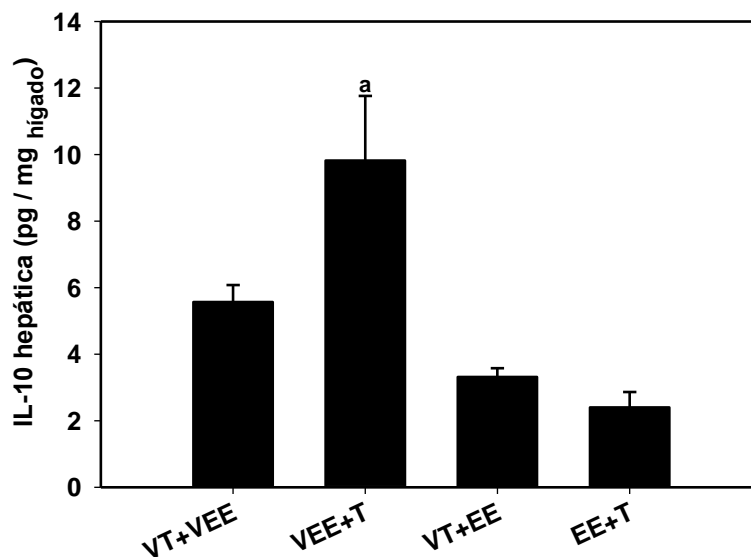


Figura 22. Concentración plasmática y hepática de interleucina 10 (IL-10).

La concentración A) plasmática y B) hepática de la citocina fue determinada por ELISA de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar.

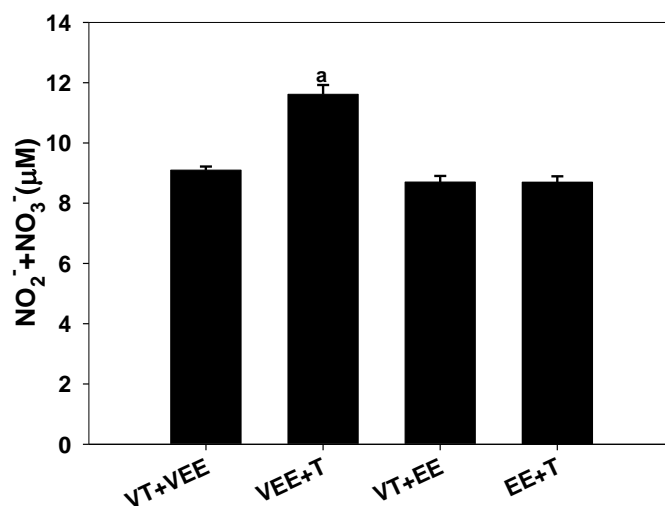
a: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b:** Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.4.4. Resultados de óxido nítrico (ON) en hígado y plasma.

Se cuantificó indirectamente el óxido nítrico a través de sus productos de oxidación, nitratos y nitritos (NO_3^- y NO_2^-). En la figura 23 A, donde se muestran los resultados de ON plasmático, sólo el grupo V_{EE+T} exhibe diferencia significativa con respecto al grupo control V_{T+VEE} . Los niveles de ON en el grupo dañado como en el grupo con la T se mantiene la concentración de ON.

La cantidad de óxido nítrico hepático en el grupo V_{EE+T} es contrastante en comparación de los demás grupos, habiendo diferencia significativa con respecto al grupo V_{T+VEE} . En el grupo $EE+T$, se obtienen valores similares al grupo dañado V_{T+EE} , por lo que no hay diferencia estadística significativa en ambos grupos con respecto al grupo control de controles teniendo el mismo perfil que el plasmático, lo cual se muestra en la figura 23 B.

A)



B)

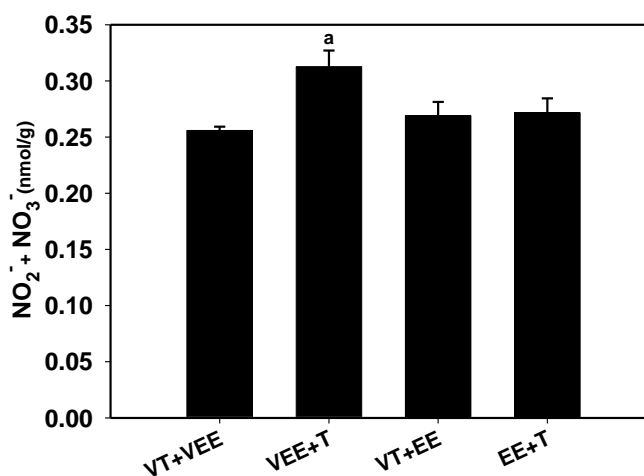


Figura 23. Concentración plasmática y hepática de óxido nítrico (ON).

La concentración A) plasmática y B) hepática de óxido nítrico fue determinada por ELISA de ratas con vehículo de EE (V=propilenglicol 0.2 mL), EE (10mg/Kg) y/o administradas dos veces al día durante 7 días con talidomida (T=400mg/kg) suspendida en vehículo (V=CMC 0.7%). Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 8 animales \pm error estándar. **a**: Diferente vs. Grupo control (VT+VEE). **b**: Diferente vs. Grupo control dañado (VT+EE). $p < 0.05$, ANOVA, prueba de Student-Newman-Keuls.

11.5. Análisis histológico.

Al realizar el examen microscópico de las muestras de hígado de ratas de los grupos experimentales, preparadas con la tinción de hematoxilina/eosina (H/E), en los grupos control: V_T+V_{EE} y $V_{EE}+T$ se observa de manera general, la morfología hepática normal (Figura 24A, 25A; 24B, 25B). Al comparar los resultados con los grupos experimentales sometidos al agente inductor de daño (V_T+EE) y el grupo profiláctico ($EE+T$), se observan diferencias en la arquitectura hepática. En el grupo V_T+EE , el EE causa cambios estructurales importantes, como la dilatación sinusoidal, vacuolación citoplasmática de algunas células e infiltrado linfocítico, además se observa necrosis hepatocelular difusa y en parches (Figura 24C, 25C). Con estas características descriptivas del hígado nos permite decir que el EE causa daño hepatocelular, apoyando al padecimiento colestático. En el grupo profiláctico, la talidomida tiende a mejorar la arquitectura hepática, observando menor necrosis hepatocelular en parches (Figura 24D). A pesar de eso sigue habiendo infiltrado linfocitario y dilatación sinusoidal en algunas zonas hepáticas, presentándose escasa regeneración hepatocelular sinusoidal (Figura 25D).

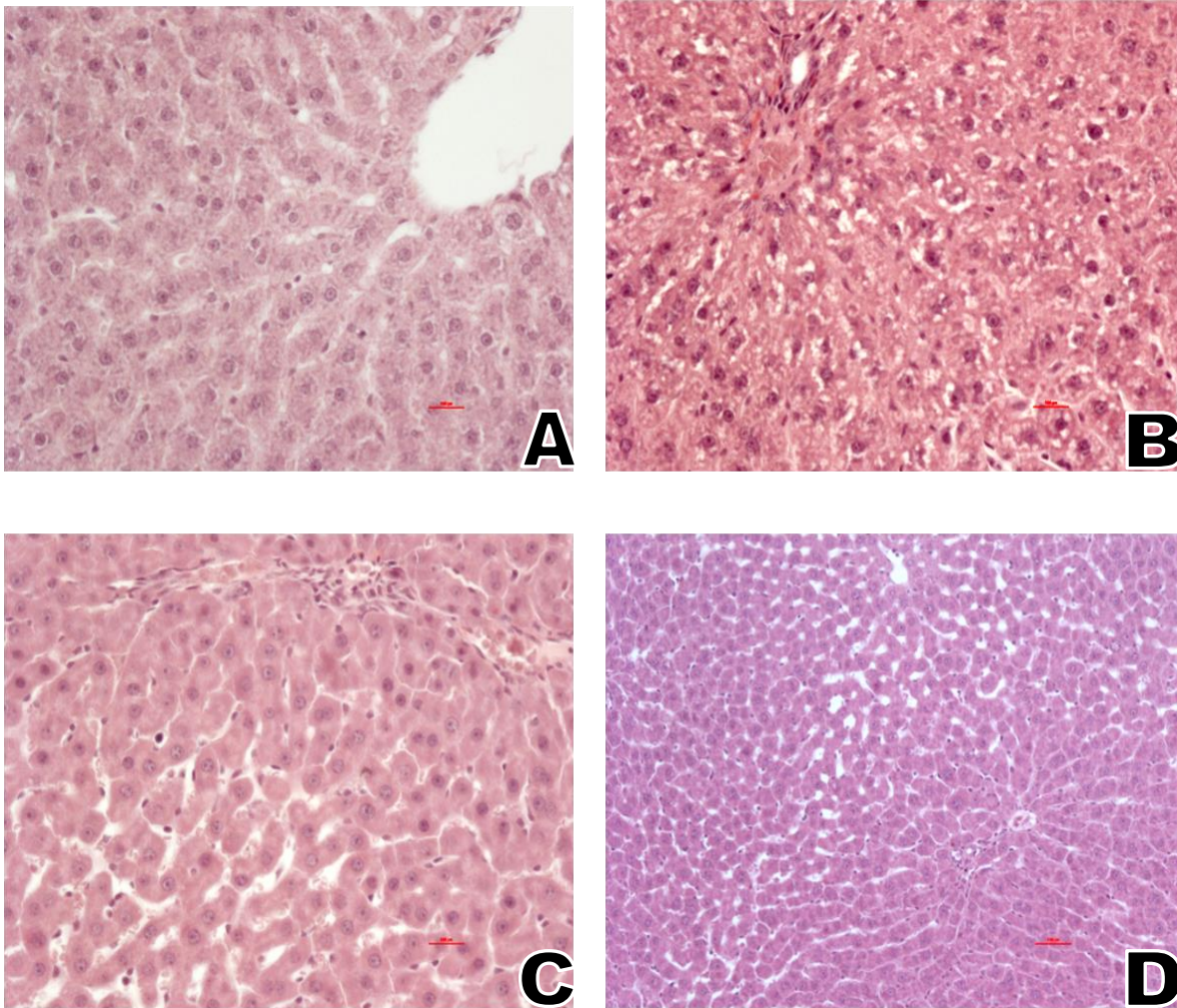


Figura 24. Tinción histológica de hematoxilina/eosina (H/E), en muestras de hígado de rata Wistar.

A: Fotografía representativa de la morfología hepatocelular normal, del grupo control de controles, V_T+V_{EE} , donde se aprecia el parénquima hepático y en la parte superior derecha, la vena central. 538x.

B: Fotografía representativa de la morfología hepatocelular normal, al administrar sólo la talidomida, observándose la vena porta y arteria hepática del grupo $V_{EE}+T$. 551x.

C: Fotografía representativa del efecto del $17-\alpha$ etinilestradiol, donde se muestra el daño hepatocelular, como es la dilatación sinusoidal e infiltrado linfocítico perteneciente al grupo V_T+EE . 550x.

D: Fotografía representativa del efecto de la administración de ambos fármacos, 17- α etinilestradiol y talidomida, apreciándose menor tendencia a la necrosis y ligero cambio en la dilatación sinusoidal. Se observa la triada portal. EE+T. 139x.

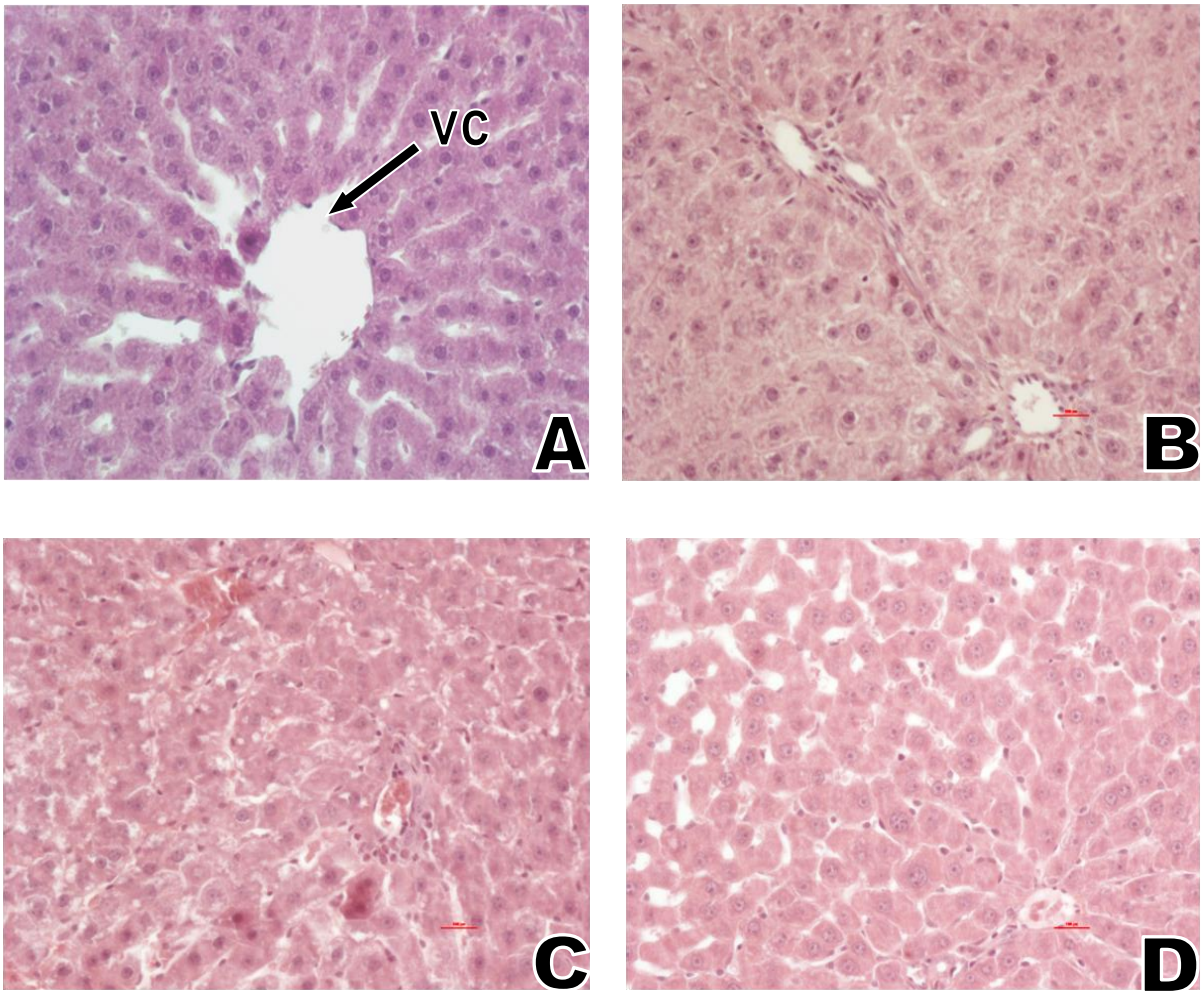


Figura 25. Tinción histológica de hematoxilina/eosina (H/E), en muestras de hígado de rata Wistar.

VC: Vena central.

A: Fotografía representativa de la morfología hepatocelular normal del grupo V_T+V_{EE} , donde se aprecia el parénquima hepático y la vena central. 570x.

B: Fotografía representativa de la morfología hepatocelular normal, al administrar sólo la talidomida, observándose ligera necrosis hepatocelular en parches, además se observan 2 triadas portales. $V_{EE}+T$. 562x.

C: Fotografía representativa del efecto del 17- α etinilestradiol, donde se muestra el daño hepatocelular, donde hay dilatación sinusoidal, infiltrado linfocítico, necrosis hepatocelular en parches y vacuolación citoplásmica. V_T+EE . 539x.

D: Fotografía representativa del efecto de la administración de ambos fármacos, 17- α etinilestradiol y talidomida, apreciándose menor tendencia a la necrosis, aún se observa la necrosis hepatocelular y dilatación sinusoidal. Se observa diada portal. EE+T. 527x.

12. DISCUSIÓN.

La colestasis se define como la condición en la que el flujo biliar es alterado, trayendo consecuentemente la acumulación de los constituyentes biliares en los hepatocitos produciendo estrés oxidativo, disrupción de la membrana plasmática y daño severo a los hepatocitos, habiendo apoptosis y/o necrosis, probablemente debido a la propiedad detergente de las sales biliares; además, hay un reemplazo del área necrótica por tejido conectivo fibrótico así como reclutamiento de mediadores centrales de procesos patológicos mencionados anteriormente que producen una respuesta de inflamación como son las citocinas (Fernández-Martínez *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2002; Kuntz y Kuntz., 2006). En la condición patológica mencionada al principio, la talidomida ha mostrado ser un medicamento con propiedades antiinflamatorias, antinecróticas, antifibróticas y anticolestáticas, al actuar en la inmunomodulación de citocinas involucradas en la patología (Fernández-Martínez *et al.*, 2001), como son las citocinas proinflamatorias tal es el caso del TNF- α y las citocinas antiinflamatorias como la IL-10; así, el fármaco actúa sobre estas moléculas regulándolas al inhibir de forma selectiva la producción e incrementando la degradación del RNAm del TNF- α , y al promover la producción de la IL-10 (Fernández- Martínez *et al.*, 2001 y 2004).

Para confirmar el efecto hepatoprotector e inmunomodulador de la T en la colestasis, se estableció un modelo de daño hepático experimental por colestasis inducida con EE, un estrógeno sintético que es utilizado en la hormonoterapia anticonceptiva y la menopausia, por lo que es importante estudiar este modelo de daño hepático. Se tienen reportes de que la administración aguda o crónica del fármaco, con una dosis de 5 mg/kg de EE durante 5 días (Rodríguez Garay, 2003), o la dosis de 2 mg/kg de EE durante 14 días, muestran deterioro del hígado (Rodríguez Garay, 2003; Inan y Cowan, 2006); a 21 días de exposición con 5 mg/Kg, se observa un aumento en la permeabilidad a moléculas pequeñas por las uniones estrechas e

incrementan en grado variable los marcadores enzimáticos y sales biliares en suero (Rahner *et al.*, 1996). En otro estudio científico se determinó la colestasis inducida con una dosis de 5 mg/kg/día durante 7 días (Clerici *et al.*, 2006). Por lo anterior, en el presente trabajo se hizo una modificación en la dosis y tiempo de exposición al EE de 10 mg/kg durante 7 días y en este mismo modelo se evaluó el posible efecto hepatoprotector de la T utilizando una batería de marcadores bioquímicos en plasma e hígado como la actividad enzimática de γ -GTP, FA, ALT, concentración de BD y BT, peroxidación lipídica, glucógeno hepático, colágena hepática, TNF- α , IL-10, TGF- β y ON, además se realizó la técnica histológica de H/E, para mostrar la colestasis.

Un marcador bioquímico enzimático útil para evaluar el daño hepático por colestasis es la FA, enzima que está presente en la membrana canalicular de los hepatocitos, ésta se detecta en el suero y dependiendo de la cantidad de FA presente se infiere que hay daño en células hepáticas (Fernández-Martínez *et al.*, 2006; Garduño Siciliano *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos, sugieren que en el grupo dañado V_T+EE , la FA se encuentra aumentada al doble con respecto al control V_T+V_{EE} . En investigaciones anteriores se observa que la concentración catalítica de la enzima FA a diferente tiempo de exposición del EE se incrementa de manera variable (Simon y Arias, 1973; Accantino *et al.*, 1998; Garduño Siciliano *et al.*, 2006; Henríquez-Hernández *et al.*, 2006). Los resultados no aclaran el mecanismo involucrado en el incremento de la actividad de FA en ratas tratadas con EE, pero se infiere que el incremento en la síntesis de la enzima puede ocurrir por el incremento de contenido intracelular de ácidos biliares (Arrese *et al.*, 1995). Además, la administración de EE está asociada a cambios significativos en la ultraestructura hepática, como lo observado anteriormente (Accatino *et al.*, 1998). En las muestras se observa dilatación sinusoidal, una lesión que se caracteriza por una dilatación de sinusoides en ausencia de cualquier restricción estructural o hemodinámica del flujo de salida de sangre desde el hígado, en donde los estrógenos, son la causa principal de dilatación sinusoidal inducida por fármacos (Rodés *et al.*, 2001).

En el grupo experimental al que se le administró la T, muestra efectos benéficos anti-colestáticos al disminuir la FA de manera significativa, inclusive los resultados son semejantes a los valores que muestra el grupo control V_T+V_{EE} . La talidomida probablemente tiene la actividad inhibitoria en la regulación de la síntesis “*de novo*” a nivel transcripcional/traduccional de la enzima (Fernández-Martínez *et al.*, 2006).

La γ -GTP es una enzima embebida en la membrana plasmática y es útil como marcador de colestasis y daño hepático (Glossman y Neville, 1972; Fernández-Martínez *et al.*, 2001). En este trabajo se observó que en el grupo dañado con EE (V_T+EE), la concentración catalítica disminuye casi a la mitad con respecto al grupo control (V_T+V_{EE}), habiendo diferencia significativa; el grupo dañado (V_T+EE), es diferente estadísticamente con respecto al grupo en tratamiento (EE+T), sugiriendo cambios en la actividad enzimática. En estudios realizados anteriormente en el modelo de colestasis inducido con el mismo estrógeno, EE, hay una variación en los valores de actividad enzimática de γ -GTP (Arrese *et al.*, 1995; Rahner *et al.*, 1996; Henríquez-Hernández *et al.*, 2006). Rahner y colaboradores (1996), demostraron que la actividad de la enzima γ -GTP incrementa dependiendo al tiempo de exposición al EE; Henríquez-Hernández y colaboradores (2006), no detectaron la actividad enzimática de γ -GTP, aunque otros marcadores moleculares como los genes que participan en la síntesis de ácidos biliares y metabolismo del fármaco, reflejan cambios en la expresión de proteínas involucradas en la colestasis (Henríquez-Hernández *et al.*, 2006). En un estudio realizado en mujeres que consumen AO, a distintas dosis de estrógenos (EE) y diferentes tipos de progestinas (norgestrel, levonorgestrel), se observa que hay un incremento significativo de los niveles de γ -GTP, confirmando el efecto de ambas moléculas en conjunto (Schile *et al.*, 1998). De acuerdo a los resultados observados en este trabajo con el marcador enzimático de γ -GTP, probablemente la molécula de EE, no tiene significancia en la patogenia

de la colestasis (en este trabajo), tal como ha sido demostrado con la actividad de otras enzimas como $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPasa, al estar en niveles normales ó disminuida y a pesar de eso presentar colestasis (Arrese *et al.*, 1995; Accatino *et al.*, 1998). Otra posibilidad es que a esa dosis y tiempo de administración el EE posee un efecto inhibitorio en la síntesis o actividad intrínseca de la γ -GTP y contraria por completo a la T. En los grupos V_{EE+T} y $EE+T$, la talidomida puede estar actuando de forma similar que el ácido ursodesoxicólico (UDCA), ya que previene cambios en la excreción biliar de FA, a pesar que la actividad enzimática de γ -GTP se encuentra incrementada en fracciones de la membrana canalicular y sinusoidal del hígado en grupos administrados con UDCA y UDCA+EE (Arrese *et al.*, 1995). La talidomida probablemente incrementa la síntesis y activación de la enzima γ -GTP pero inhibe a la FA.

En el diagnóstico de enfermedades del hígado en el hombre y animales, es útil la ALT, enzima citosólica de los hepatocitos que es un buen marcador de daño hepático y necrosis (Reitman y Frankl., 1957; Fernández-Martínez *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en la determinación de ALT, muestran que no hay diferencia significativa entre los grupos en tratamiento, lo cual ha sido observado anteriormente cuando se administra EE en un modelo similar (Crocenzi *et al.*, 2006). El análisis histológico sugiere hepatotoxicidad por EE, presentándose en algunas áreas necrosis individual focal, en parches y difusa. En el grupo administrado con la talidomida no modificó la actividad enzimática de la ALT, observando lo mismo con la tinción de H/E.

La bilirrubina es el resultado de la degradación del grupo hemo de las proteínas sanguíneas, es utilizada como marcador de funcionalidad hepática y colestasis. Los hepatocitos captan la bilirrubina, la conjugan en su interior y luego la secretan a la bilis, cualquier alteración en el metabolismo de la bilirrubina propicia la acumulación de ésta en el plasma, siendo cuantificables en forma de BD o conjugadas que sufren esterificación con radicales de carbohidratos, como el ácido

glucurónico. Las BT son la suma de BD y las bilirrubinas no conjugadas o indirectas (BI) (Woodman, 1988; Bayón *et al.*, 2000).

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio experimental, en el grupo al que se administró EE, las BD y BT fueron incrementadas, aunque sólo de manera significativa las BT, indicando que las BI se encuentran en aumento, probablemente por un defecto en la conjugación de las BD generado por la administración de EE (Bayón *et al.*, 2000). En cuanto a las BD aumentadas aunque no significativamente, puede que haya una alteración en la secreción de bilis por la afectación de mecanismos de transporte en la membrana canalicular (Bossard *et al.*, 1993; Bayón *et al.*, 2000) como la proteína Mrp-2, que se encuentra en la membrana canalicular, que transporta sustancias conjugadas como las BD. En un estudio ajeno a éste, la expresión y función de Mrp 2 en el modelo de colestasis por EE, fue reducida, indicando la participación en el deterioro de secreción biliar (Ruiz *et al.*, 2007). En general el EE aumentó la capacidad de excretar bilirrubinas, como lo observado anteriormente (Henríquez- Hernández *et al.*, 2006), además de haber cambios en la morfología hepática (Accatino *et al.*, 1998). La administración de la T aumenta las BT, sugiriendo cambios importantes en la funcionalidad hepática, a pesar de eso, las muestras histológicas teñidas con H/E, no presentan daño en toda la muestra, son sólo en algunas partes, habiendo aún necrosis focal individual y en parches así como dilatación sinusoidal causada por el EE. Haciendo una búsqueda en relación a los resultados, se encontró que las bilirrubinas tienen nuevas e interesantes propiedades bioquímicas, siendo ésta probablemente una de ellas, donde junto con la talidomida muestra protección en contra del estrés oxidativo como se observa en la gráfica de peroxidación lipídica; además la bilirrubina tiene propiedades antiapoptóticas así como un papel en la inmunomodulación (Aller *et al.*, 2008).

Los marcadores de daño hepático actúan de distinta manera y no hay un patrón, lo cual ha sido observado anteriormente en un modelo de daño hepático parecido a éste (Crocenzi *et al.*, 2006).

El glucógeno hepático es un polisacárido que se considera la fuente de almacenamiento principal de energía en el organismo. La síntesis y/o degradación de esta molécula mediante procesos de síntesis de glucógeno y glucogenólisis respectivamente, es de vital importancia para el mantenimiento de la concentración de niveles de glucosa en la sangre (Fernández-Martínez *et al.*, 2008). Esta molécula se encuentra principalmente en el hígado y en menor proporción en músculo, por lo que la cuantificación de este carbohidrato sirve para detectar la funcionalidad del órgano. En este modelo de colestasis inducido por la inyección del EE muestra niveles reducidos del glucógeno hepático en el grupo dañado (V_T+EE) con respecto al grupo control (V_T+V_{EE}), bajando de 3.01 ± 0.21 a 0.51 ± 0.09 g de glucógeno/100 g de hígado, esto es evidente cuando existe un daño hepático (Muriel *et al.*, 1999). En relación al glucógeno hepático, se sabe que el TNF- α está relacionado en el metabolismo y producción de ON y que a la vez el ON juega un papel importante en el metabolismo del glucógeno hepático en el modelo de sepsis bacteriana (Fernández-Martínez *et al.*, 2008). En este modelo de colestasis inducido por EE, el TNF- α en plasma en el grupo dañado aumenta, pero su concentración no es significativa y tampoco la producción de ON es modificada, pudiendo decir que la disminución de glucógeno hepático parece no estar relacionada al TNF- α y ON. Posiblemente el glucógeno hepático disminuye debido a la respuesta del daño que sufren los hepatocitos creando un desequilibrio metabólico, pues disminuye la glucógeno sintasa y eleva la actividad de la glucógeno fosforilasa al mismo tiempo (Fernández-Martínez *et al.*, 2004 y 2008). Es más factible que el efecto del EE estrese al hígado e induzca disminución del glucógeno. La T tiende a aumentar los niveles de glucógeno hepático, sin diferencia significativa con respecto al grupo dañado con EE. No se tiene información con respecto a este marcador utilizado en el modelo experimental de colestasis por EE, pero al comparar con resultados del modelo de daño hepático inducido con LPS se observan resultados similares a este estudio. Fernández-Martínez y colaboradores (2008), evidencian que la T no muestra un efecto benéfico, pero sí sus análogos que participan en la regulación del glucógeno hepático. La talidomida no revertió el efecto del EE, pero tampoco provocó más daño al hígado, ya que hubo ligeros cambios en el tejido hepático (Figura 25D).

En relación con la peroxidación lipídica o PL, es una prueba que nos ayuda a dilucidar el efecto dañino a las células por la perturbación del equilibrio entre la producción y la eliminación de radicales libres, así como el nivel antioxidante reducido, condición que puede perjudicar irreversiblemente a moléculas orgánicas, provocando estrés oxidativo lo que consecuentemente puede acabar en apoptosis (Pincemail *et al.*, 2007; Gutiérrez Salinas *et al.*, 2009). El estrés oxidativo es un mecanismo importante de daño en el hígado (Prosser *et al.*, 2006; Pincemail *et al.*, 2007), y se observó en este modelo de colestasis. Las especies reactivas a oxígeno están involucradas en la necrosis y apoptosis de hepatocitos y contribuyen a la activación de las células estelares hepáticas (Prosser *et al.*, 2006). El efecto de los radicales libres en la membrana celular se mide por medio de sus productos de la reacción de las moléculas con los lípidos (Muriel, 1997). En relación a los resultados de la determinación de PL, el EE posiblemente daña la membrana celular de los hepatocitos, generando radicales libres y por ende estrés oxidativo, tal como se ha observado en trabajos anteriores que hablan sobre especies reactivas a oxígeno causadas por el consumo de AO (progestina-estrógeno:EE) (Pincemail *et al.*, 2007). Pincemail y colaboradores (2007), demostraron en un análisis realizado en mujeres que oscilan entre los 40 y 48 años, que al consumir diferentes dosis de AO, éstas presentaron niveles elevados de peróxidos de lípidos. Se sabe que en mujeres y en ratas de laboratorio, el aumento de peróxidos de lípidos en plasma es debido al uso de estrógenos, estos últimos son capaces de inducir estrés oxidativo, sin embargo, aún no es claro el papel del estrés oxidativo mediado por estrógenos. Es importante mencionar que existen datos contradictorios a lo anteriormente mencionado, donde los estrógenos (17 β -estradiol, estriol), poseen efectos antioxidantes en la terapia de sustitución hormonal (Clemente *et al.*, 1999; Telci *et al.*, 2002). En el grupo donde se administra la T, se observa una disminución significativa de PL, permitiendo comentar que probablemente esté asociada con propiedades antioxidantes, actuando como un atrapador de radicales libres (Muriel, 1997).

La colágena hepática, es una proteína que forma fibras. Las fibras de colágena son secretadas por células de tejido conjuntivo como fibroblastos. Esta molécula se origina de tropocolágeno, el cual está formado por 3 cadenas polipeptídicas, cada cadena denominada también cadena alfa, está constituida por un polipéptido, formado por una repetición de 3 aminoácidos siendo ricas en prolina, hidroxiprolina y glicina, las cuales son fundamentales en la formación de la superhélice (Brunton *et al.*, 2007).

En este experimento se determinó la cantidad de hidroxiprolina, para así cuantificar indirectamente la cantidad de colágena hepática, siendo éste un indicador de fibrosis. Los resultados comentados anteriormente nos evidencian una síntesis incrementada de colágena hepática en el grupo administrado con EE, sugiriendo daño hepatocelular y probablemente fibrosis, aunque no de forma marcada como en modelos evaluados a tiempo prolongado como el de CCl₄ (Muriel *et al.*; 2003) y el modelo de la LCBC (Fernández-Martínez *et al.*; 2001). Posiblemente hay una alteración en la proliferación de células estelares hepáticas (Fernández-Martínez *et al.*, 2001) que participan en la producción de componentes de la matriz extracelular en el daño hepático, siendo apoyado con los resultados encontrados en PL, sugiriendo además estrés oxidativo por las especies reactivas a oxígeno, que contribuyen a la activación de las células, como en lo reportado anteriormente (Prosser *et al.*, 2006; Pincemail *et al.*, 2007).

La fibrosis es el exceso de producción y acumulación de colágena, además de otros componentes de la matriz extracelular, como las metaloproteinasas, inhibidores de las metaloproteinasas, factores de transcripción y TGF- β , que activan o inducen el proceso patológico (Fernández-Martínez *et al.*, 2008 y Türkay *et al.*, 2008). La talidomida no muestra efectos anti-fibrogénicos significativos al utilizar los marcadores de la colágena hepática y TGF- β ; a pesar de los resultados encontrados anteriormente en otros modelos experimentales de daño hepático (Fernández-Martínez *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2004; Lv *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2006; Xiao *et al.*,

2007). En el caso de la colágena hepática, sólo hay una tendencia a disminuirla, posiblemente actúa inhibiendo ligeramente la enzima prolil 4-hidroxilasa la cual cataliza la formación de 4-hidroxiprolina en la colágena.

A pesar del conocimiento del papel que juega la citocina TGF- β con funciones bimodales, comportándose como profibrogénica, proinflamatoria o antiinflamatoria en procesos patológicos, aún es escasa, controversial y difícil de describir la interacción con sistemas específicos (Ashcroft, 1999), siendo de igual forma en este modelo de colestasis por EE en ratas. Los resultados nos indican que al administrar los fármacos EE y T, el TGF- β se encuentra presente con valores parecidos a los controles. Esto parece indicar que probablemente otras moléculas y no TGF- β , participan en la fibrogénesis en el modelo de colestasis por EE. No hubo una descompensación excesiva de algunas moléculas cuantificadas en el modelo experimental, hay niveles normales de TGF- β , concentraciones estables de ON, aún así no es significativa la mejoría, debido a los resultados obtenidos en los demás marcadores de daño hepático.

Otra de las moléculas interesantes que se han estudiado en el daño hepático, es la citocina antiinflamatoria y antifibrogénica IL-10, producida en los macrófagos y linfocitos (Clemens, 1991). Esta proteína inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y TNF- α por las células TH₁ de monocitos y macrófagos (Fernández-Martínez *et al.*, 2004; Muriel, 2008); incrementa la actividad de la colagenasa, durante la activación de las células estelares hepáticas, esto para evitar la acumulación de las células (Friedman, 2000). En las gráficas de cuantificación de la concentración de IL-10 plasmática y hepática, no hay diferencia significativa respecto a los grupos tratados con los fármacos, aunque hay una ligera disminución de la IL-10 hepática en el grupo administrado con EE. Esto lleva a asumir que probablemente hay participación de la citocina, pero no es significativa tal disminución al tiempo expuesto al agente inductor de daño hepático.

La talidomida no induce la regulación de TNF- α ni TGF- β , ya que posiblemente no participan en el mecanismo de acción del modelo experimental a la

dosis y tiempo expuesto, aunque se observó que causa deterioro hepatocelular. En el grupo control de la T, la concentración de IL-10 aumenta, respecto al grupo control, lo que sugiere la evaluación de la T a diferentes dosis y tiempo de exposición.

En condiciones patológicas la iNOS puede ser expresada en hepatocitos y colangiocitos, así como células estelares hepáticas y células de Kupffer (Inan y Cowan, 2006). El ON puede estar involucrado en la colestasis, asociándolo al prurito (Inan y Cowan, 2006). En nuestro modelo de daño hepático, el ON plasmático y hepático no muestra algún cambio en el grupo tratado con EE, aunque sí en el grupo control de la T, pero al administrar ambos fármacos no muestra diferencia significativa. Algunos datos sugieren que no necesariamente tiene que haber un aumento de ON, cuando hay una patología, tal como lo reportan Ma y Wang (1998), donde los niveles de ON en pacientes con colestasis intrahepática prurítica son bajos, eso depende de la susceptibilidad, variabilidad biológica, genética y funcional.

La concentración de ON plasmático y hepático se ve modificada de igual forma y manera significativa en el grupo V_{EE+T} , mostrando un perfil similar en los grupos. Estos resultados al principio causan controversia aunque en la bibliografía se sabe que esta molécula tiene funciones bimodales, comportándose de manera benéfica o dañina dependiendo de su concentración, en este caso no hay efecto dañino. En este modelo a dosis y tiempo establecidos, el EE no causa efecto sobre el ON, probablemente cuando se cuantificó la molécula, no se encontraba en su pico más alto de concentración, esto porque en el marcador de PL sí hay diferencia significativa, por ejemplo, a 14 días de administración de EE a dosis de 2 mg/kg, hay cambios en el marcador de ON, estando asociado con el prurito (Inan y Cowan, 2006). Al administrar ambos fármacos vemos que no se modifican las concentraciones de ON, por lo que al parecer no actúa sobre éste, con la dosis y tiempo establecido.

13. CONCLUSIONES.

1. La administración del EE a la dosis de 10 mg/kg/7 días, mostró un efecto deletéreo sólo sobre algunos marcadores bioquímicos de daño, ya que elevó la actividad enzimática de FA y la concentración de BT, ambos marcadores de colestasis y funcionalidad hepática; además, incrementó el grado de PL y la cantidad de colágena hepática, marcador de estrés oxidativo, y de fibrosis, respectivamente. Sin embargo, el resto de los indicadores de daño hepático no fueron alterados y, en comparación con estudios previos donde utilizan otros marcadores, se puede decir que no se logró establecer un modelo de colestasis adecuado.
2. Al evaluar la T, a la dosis de 400 mg/kg/7 días, sólo se observó la disminución del grado de PL y de la actividad enzimática de la FA, por lo que no provocó hepatoprotección en el daño hepático escaso inducido por EE, esto al menos con los marcadores comunes utilizados en este experimento.
3. Los niveles plasmáticos y hepáticos de citocinas y ON, en general, no fueron modificados significativamente, por lo que se sugiere que estas moléculas no están implicadas en el daño hepático modesto por EE con la dosis y el tiempo determinados. Así mismo, la administración de la T no mostró el efecto hepatoprotector por inmunomodulación, ya que no disminuyó las citocinas proinflamatoria TNF- α , ni la citocina profibrogénica TGF- β , así como no elevó la citocina anti-inflamatoria IL-10 y tampoco mostró un efecto significativo sobre el ON.
4. El EE causa un daño morfológico hepatocelular ligero, con lesiones de dilatación sinusoidal, vacuolación citoplasmática de algunas células e infiltrado linfocítico, además de necrosis hepatocelular difusa y en parches; sin embargo la T no vuelve a la ultraestructura hepatocelular normal.

14. PERSPECTIVAS.

Debido a los resultados encontrados en el trabajo presente, al utilizar ciertas dosis de EE y T, éstas alteran algunos marcadores que indican funcionalidad hepática, colestasis y algunas citocinas, por lo que se sugiere que en trabajos de investigación futuros se determine el papel del EE a la misma dosis pero mayor tiempo de exposición (14 días), esperando un daño hepático generalizado al utilizar las mismas determinaciones clínicas de laboratorio, así como algunas citocinas y ON, además de probar en el mismo modelo de colestasis el papel de la T, con una dosis menor (100 mg/kg/día) a la utilizada en este estudio, para ver si tiene el efecto hepatoprotector por inmunomodulación de algunas citocinas, ON, marcadores de daño hepático, análisis histopatológico y posteriormente analizar la expresión proteica de las citocinas involucradas en la colestasis. Todo esto, utilizando pruebas clásicas de laboratorio, ELISA y técnicas de biología molecular.

15. GLOSARIO.

- **Angiogénesis:** Desarrollo de un suplemento sanguíneo para nutrir a un tejido, puede ser promovido por citocinas.
- **Apoptosis:** Programa de muerte celular controlada genéticamente, que se activa como parte del desarrollo normal o como consecuencia de un daño celular.
- **Caquexia:** Estado caracterizado por la pérdida de masa corporal, balance negativo de nitrógeno y pérdida de muchos tejidos conocido como síndrome de desgaste.
- **Carcinoma:** Neoplasia epitelial maligna que tiende a invadir los tejidos circundantes y a metastatizar en regiones distantes del organismo.
- **Células B:** Linfocitos que se desarrollan en la médula ósea de los adultos y que en su etapa madura produce anticuerpos.
- **Células T:** Linfocitos que se diferencian primariamente en el timo y son fundamentales para el control y desarrollo de las respuestas inmunitarias.
- **Cirrosis:** Enfermedad crónica del hígado, consistente en la muerte progresiva del tejido hepático normal y su sustitución por tejido fibroso, lo que conlleva a un desequilibrio funcional y hemodinámico.
- **Colágena:** Se caracteriza por formar fibras insolubles con gran resistencia a la tracción. Es la proteína más abundante en los mamíferos, constituyendo la cuarta parte de su peso total. Principal elemento fibroso de la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos y dientes. Sirve para mantener las células juntas formando unidades discretas.
- **Colangiocitos:** Células endoteliales del conducto biliar.
- **Colestasis:** Es resultado del fallo de la secreción biliar en los hepatocitos o células ductulares, que bloquean el flujo biliar. Clínicamente y bioquímicamente se caracteriza por presentar diferentes grados de ictericia,

prurito y niveles elevados de enzimas como fosfatasa alcalina, ácidos biliares y colesterol.

- **ELISA:** Inmunoensayo acoplado a enzima. Medio sensible de cuantificación de antígeno por la cubierta específica de anticuerpo acoplado a la enzima y puede sintetizarse fácilmente en un producto medible.
- **Eritema Nodoso Leproso:** Una afección en pacientes con lepra, en la cual se enrojecen algunas áreas de la piel cuando se congestionan los vasos sanguíneos pequeños.
- **Estrógeno:** Esteroide que tiene función hormonal en el cuerpo humano. La molécula sintética se utiliza como un componente de los anticonceptivos orales en mujeres. Cuando es consumido en dosis elevadas y tiempo prologado puede producir varios efectos dañinos.
- **Estudio clínico:** Estudio en el cual se prueba la eficacia de un fármaco en un grupo de pacientes, usando un protocolo de tratamiento específico.
- **Fibronectina:** Componente de tejido conjuntivo. Es una proteína adhesiva de la superficie celular que facilita a las células la interacción con la matriz extracelular, desempeña papel clave en la migración y en la cicatrización.
- **Fibrosis:** Deposición excesiva de proteínas de la matriz extracelular cicatrizante, principalmente la colágena tipo I y III, pudiendo llegar al deterioro del órgano hasta la cirrosis.
- **Glicoproteína:** Proteína covalentemente modificada por la adición de uno o más cadenas de carbohidratos.
- **Glucosaminoglucanos:** Componente de la matriz extracelular, cuando se encuentran en exceso indica una alteración que probablemente conlleve a fibrosis.
- **Hepatomegalia:** Aumento de tamaño del hígado y con ello un descontrol funcional.
- **Isoforma:** Es una versión de una proteína con pequeñas diferencias de otra isoforma de la misma proteína. Se pueden producir diferentes formas de una proteína a partir de genes diferentes pero relacionados entre sí, o pueden

derivarse del mismo gen por splicing alternativo.

- **Inflamación:** Respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante o infeccioso. Puede ser aguda o crónica, caracterizada por edema e infiltración celular.
- **Laminina:** Glicoproteína adhesiva de la matriz extracelular. Facilita que las células epiteliales puedan fijarse al tejido conjuntivo que tienen debajo, tiene una elevada afinidad por la colágena IV, un componente de las membranas basales.
- **Linfocito:** Célula móvil perteneciente a la serie blanca con gran núcleo y escaso citoplasma. Realiza múltiples funciones en los mecanismos de defensa inmunitaria. Se distinguen dos tipos: los T o timodependientes y los B dependientes de la “Bursa” o de la médula ósea.
- **Linfocito T colaborador:** Célula T CD4+ efectora, referida también como T_{H2}, que en respuesta al reconocimiento del antígeno asociado a las moléculas de MHC de una célula B produce en ésta una serie de estímulos que resultan en una producción de anticuerpos más eficiente. En este proceso las principales citocinas secretadas son la IL4 e IL5.
- **Linfocito T inflamatorio:** Célula T CD4+ efectora, referida también como T_{H1}, que tienen como función principal la activación de macrófagos. El reconocimiento del antígeno induce la producción de interferon gamma y el factor de necrosis tumoral (TNF).
- **Macrófago:** Leucocito mononuclear que interviene en la captación, transformación y presentación del antígeno a los linfocitos inmunocompetentes y que posee capacidad fagocítica.
- **Metaloproteinasas:** Enzimas que degradan la matriz extracelular. Éstas son reguladas por diferentes mecanismos como las TIMP's o enzimas inhibitoras de las metaloproteinasas. que permiten el control de su actividad degradativa extracelular.
- **Mol:** Masa molecular en gramos de un compuesto.

- **Necrosis:** Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar. Una vez que se ha producido y desarrollado, la necrosis es irreversible.
- **NF-κB:** Factor nuclear κ-B que está involucrado en la transcripción de genes envueltos en la respuesta inmune, inflamatoria y crecimiento, este puede ser activado por citocinas proinflamatorias.
- **Progestina:** Molécula sintética que tiene efectos parecidos a las hormonas sexuales naturales como la progesterona, tiene efectos dañinos sobre el hígado cuando se consume en dosis elevada y tiempo prolongado.
- **Proteína:** Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos.
- **Proteoglicano:** Químicamente es una proteína unida a un carbohidrato. Es un componente de la matriz extracelular, y juega un papel importante en el proceso de fibrosis.

16. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 1998. Inmunología celular y molecular. 3era. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México. 276-309.
- Accatino L., Pizarro M., Solís N., Koenig 1998. Effects of diosgenin, a plant-derived steroid on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology*; 28:129-40.
- Aguilar-Salinas C., del Rincón J. P. 2003. Sección I: Anatomía, fisiología y bioquímica del hígado. Cap 3: Metabolismo de lipoproteínas. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 19-26.
- Aguirre G. J. 2003. Sección I: Anatomía, fisiología y bioquímica del hígado. Cap 1. Anatomía e histología normales de hígado. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 3-8.
- Aller M. A., Arias J. L., García-Domínguez J., Arias J. I., Durán M. y Arias J. 2008. Fibrogenesis & Tissue repair. Experimental obstructive colestasis: the wound-like inflammatory liver response. *BioMed Central*; 1:1-16.
- Ando Y., Fuse E., Figg W. D. 2002. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res*; 8:1964-73.
- Ángeles A. A. y Larriva S. J. 1993. Capítulo 103. Sección Novena. Histología del hígado en Gastroenterología de Villalobos J. J. editor. Vol II. 4ta. Ed. Méndez editores S. A. de C. V. México D. F. 1294-1313.
- Arrese M., Pizarro M., Solís N., Koenig C., Accatino L. 1995. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in ethynylestradiol-induced cholestasis. Effects of ursodeoxycholic acid administration. *Biochem Pharmacol*; 12:1223-32
- Ashcroft G. S. 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes and infection*. 1:1275-1282.

- Barrao C. F. 1996. Cap. 16. Funciones biológicas del sinusoide hepático. En Tratado de Hepatología de Herrerías González, Díaz Belmont y Jiménez Sáenz editores. Tomo I. Universidad de Sevilla, España. II,187-II,196.
- Bataller R., Ginès P., Nicolás J. M., Görbig M. N., Garcia-Ramallo E., Gasull X., Bosch J., Arroyo V., Rodés J. 2000. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*; 118:1149-56.
- Bayon J. E., Pascola L. y Tiribelli C., 2003. Sección I, Cap 9. Metabolismo y alteraciones de la bilirrubina. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 71-99.
- Belmont A. D. 1996. Capítulo 59: Cirrosis hepática: etiopatogenia y diagnóstico. En: Tratado de Hepatología de Herrerías González, Díaz Belmont y Jiménez Sáenz editores. Tomo I. Universidad de Sevilla, Sevilla España. X705-X713.
- Bergmeyer H., Grabl M., Walter H. 1983. Enzymes, en: Methods of enzymatic analysis de Bergmeyer H. y Grabl M., Ed. Verlag-chemie Weinheim, Alemania.
- Bolt H. M. 1994. Interactions between clinically used drugs and oral contraceptives. *Environ Health Perspect*; 9:35-38.
- Bossard R., Stieger B., O'Neill B., Fricker G., Meier P. J. 1993. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest*; 91:2714-20.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram cuantities of protein utilizing the principal of proteine dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54.
- Brunton, Laurence L., Lazo J. S., Parker K. L. 2007. En: Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc-Graw Hill Interamericana. México, D. F. 2017.
- Buege J. A. y Austin S. D. 1978. *Methods in Enzymology*. 30:302.

- Calabresi P. y Chabner B. A. 1996. Sección X. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. En: "Goodman y Gilman, las bases farmacológicas de la Terapéutica", editores Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W. y Goodman G. A. Vol. II. Novena edición. Mc. Graw-Hill Interamericana. México. 1302-1303.
- Cárdenas-Vázquez R. 2003. Sección I: Anatomía, fisiología y bioquímica del hígado. Cap 5: Metabolismo de la Vitamina A. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 41-48.
- Cheskis B. J., Karathanansis S., Lyttle C. R. 1997. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J. Biol. Chem*; 272:11384-11391.
- Clemente C., Caruso M. G., Berloco P., Notarnicola M., D'Attoma B., Osella AR., Guerra V., Buonsante A., Giannandrea B., Di Leo A. 1999. Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women. *Maturitas*; 31:137-142.
- Clerici C., Castellani D., Ascitti S., Pellicciari R., Stechell K., O'Connell N., Sadeghpour B., Camaioni E., Fiorucci S., Renga B., Nardi E., Sabatino G., Clementi M., Giuliano V., Baldoni M., Orlandi S., Mazzocchi A., Moreli A., Moreli O. 2006. 3 α -6 α -dihidroxy-7 α -fluoro-5 β -cistolanoate (UPF-680), physicochemical and physiological properties of a new fluorinated bile acid that prevents 17 α -ethynyl-estradiol-induced cholestasis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*; 214:199-208.
- Chong L. W., Hsu Y. C., Chiu Y. T., Yang K. C. y Huang Y.T. 2006. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci*; 13:403-18.
- Clemens M. J. 1991. Introduction to cytokines, en:Cytokines. Medical Perspectives series. Read A. P. y Brown T. ed. Bioscientific publishers ed., Oxford U. K. 1-20.
- Connolly T. J. y Zuckerman A. L. 1998. Contraception in the Patient with liver disease. *Semin Perinatol*; 22:178-182.
- Crocenzi F. A., Pellegrino J. M., Catania V. A., Luquita M. G., Roma M. G., Mottino A. D., Pozzi E. J. 2006. Galactosamine prevents ethinylestradiol-

induced cholestasis. *Drug Metab Dispos*; 34:993-7.

- Díaz Zagoya J. C. 2003. Sección I: Anatomía, fisiología y bioquímica del hígado. Cap 4: El hígado y el metabolismo de las proteínas plasmáticas. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 27-40.
- Dunn J. M. y McNair A. 2007. Prolonged cholestasis following successful removal of common bile duct stones: Beware patients on estrogen therapy. *World J Gastroenterol*; 13:6277-6280.
- Eriksson T., Björkman S., Roth B., Fyge Å., Höglund P. 1995. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*; 7:44-52.
- Farrell G. G. 2002. Capítulo 73. Hepatopatía causada por fármacos, anestésicos y toxinas. En: Enfermedades gastrointestinales y hepáticas, Feldman M., Scharshmidt B. y Sleisenger M. H. 6ta. Ed. Tomo II. Editorial Panamericana. México. 1305-1340.
- Fernández-Martínez E., Morales-Ríos M. S., Pérez-Álvarez V., Muriel P. 2001. Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *Drug Dev Res*; 54:209-18.
- Fernández-Martínez E., Morales-Ríos M. S., Pérez-Álvarez V., Muriel, P. 2004. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol*; 68:1321-9.
- Fernández-Martínez E., Pérez-Álvarez V., Tsutsumi V., Shibayama M. y Muriel P. 2006. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*; 58:49-58.
- Fernández-Martínez E., Pérez-Hernández N., Muriel P., Pérez-Álvarez V., Shibayama M., Tsutsumi V. 2009. The thalidomide analog 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoic acid improves the biliary cirrhosis in the rat. *Exp Toxicol Pathol*; 61:471-9.

- Fernández-Martínez E., Wens-Flores I., Moreno M. G., Ortiz M. I., Muriel P., Pérez-Alvarez V. 2008. Short-term effects of thalidomide analogs on hepatic glycogen and nitric oxide in endotoxin-challenged rats. *Gen Physiol Biophys*; 27:203-10.
- Friedman S. L. 2000. Molecular Regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. Compendium by the American Society for Biochemistry and molecular biology; 275:2247-22.
- Ganne-Carrié N., Baussan C., Grando V., Gaudelus J., Cresteil D., Jacquemin E. 2003. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 revealed by oral contraceptive pills. *J Hepatol*; 38:693-4.
- García J. E. y Ochoa S. A. 2003. Sección I: Anatomía, fisiología y bioquímica del hígado. Cap 2: Metabolismo hepático de glucosa y lípidos. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 9-18.
- García-Gutiérrez C. J. 2001. Síntesis y evaluación farmacológica de un análogo de la talidomida el ácido-3-ftalimido-3-(3,4 dimetoxifenil)-Propanoico, en la cirrosis biliar secundaria en la rata [tesis][Puebla,México] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). 7-32.
- Garduño-Siciliano L., Labarrios F., Tamariz J., Moreno M. G., Chamorro G., Muriel P. 2007. Effect of α -asarone and a derivative on lipids, bile flow and Na^+K^+ /ATPase in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Fundam Clin Pharmacol*; 21:81-8.
- Garries G. V. y Ponce G. J. 1996. Fisiología de la Vía biliar. En: Tratado de Histología, Tomo I. Herrera G., Delmont A. y Jiménez A. M. (Eds.) Sevilla, España. Universidad de Sevilla. 59-65.
- Gartner P. Leslie y Hiatt L. J. 2008. Texto Atlas de Histología. 3era. edición. McGraw-Hill Interamericana editores. México D. F. 403.
- Geier A., Dietrich C. G., Gerloff T., Haendly J., Kullak-Ublick G. A., Stieger B., Meier P. J., Matern S. y Gartung C. 2003. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Bioch et Biophys Acta*; 10:87-94.

- Glossman M., Neville D. 1972. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett*; 19:340-4.
- González H. C. 2008. Estudio hepático del efecto que ejerce la administración de anticonceptivos orales sobre el daño subcrónico en hígado por colestasis en rata [tesis][Hidalgo, México] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). 1-49.
- González-Campora R., Hevia-Vázquez A. y Galera H. D. 1996. Cap 2. Anatomía microscópica del hígado. En: Tratado de Hepatología de Herrerías González, Días Belmont y Jiménez Sáenz editores. Tomo I. Ed. Universidad de Sevilla, Sevilla España. I,20.
- Gutiérrez Salinas J., Esquivel Soto J., García Luna M., Madrigal Santillán E., Fernández Sánchez A., Flores Ledesma E., Morales González J. A. 2009. Los radicales libres en las enfermedades: Cirrosis hepática. En: Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas, tomo I. Morales González J. A., Fernández Sánchez A. M., Bautista Ávila M., Vargas Mendoza N y Madrigal Santillán E. O. UAEH. 325:351.
- <http://sinais.salud.gob.mx>
- <http://commons.wikimedia.org>
- <http://upload.wikimedia.org>
 - Haubrich W. 2004. Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology*;1:127-16.
- Henríquez-Hernández L. A., Flores-Morales A., Santana-Farré R., Axelson M., Nilsson P., Norstedt G., Fernández-Pérez L. 2007. Role of pituitary hormones on 17 alpha-ethinylestradiol-induced cholestasis in rat. *J. Pharmacol. Exp Ther*; 320:695-705.
- Iimuro Y. y Brenner A. D. 2008. Matrix Metalloproteinase Gene Delivery for Liver Fibrosis. *Pharm Res*; 25:249-58.
- Ikejima K., Enomoto N., Iimuro Y., Ikejima A., Fang D., Xu J., Forman D. T., Brenner D. A., Thurman R. G. 1998. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol*; 74:669-76.
- Inan S. y Cowan A. 2006. Nalfurafine, a kappa opioid receptor agonist, inhibits scratching behavior secondary to cholestasis induced by chronic

ethinylestradiol injections in rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 85:39-43.

- Ishihara K. y Hirano T. 2002. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *Biochim Biophys Acta*; 11:281-96.
- Kalant H. y Roschlau W. H. 2002. Principios de Farmacología médica. 6ta. ed. Oxford University Press. 956.
- Kamikawa R., Ikawa K., Morikawa N., Asaoku H., Iwato K., Sasaki A. 2006. The pharmacokinetics of low-dose thalidomide in Japanese patients with refractory multiple myeloma. *Biol Pharm Bull*; 29:2331-4.
- Kaplan M. 1993. Capítulo 4: Laboratory tests. En: Diseases of the liver, de Schiff, R. E. y Schiff J. B., 7 ed., Ed. Lippincott Company, Philadelphia. 108-144.
- Kasahara E., Sato E. F., Miyoshi M., Konaka R., Hiramoto K., Sasaki J., Tokuda M., Nakano Y., Inoue M. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J*; 1:849-56.
- Konno A., Enomoto N., Takei Y., Hirose M., Ikejima K., Sato N. 2002. Oral contraceptives worsen endotoxin-induced liver injury in rats. *Alcohol Clin Exp Res*; 26:70S-74S.
- Kuntz E. y Kuntz H. D. 2006. Hepatology. Principles and practice. History, morphology, biochemistry, diagnostics clinic and Therapy. Springer Medizin Verlag Heidelberg. Germany. 19-50.
- Loose D. S. y Stancel G. M. 2007. Estrógenos y Progestágenos, en: Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica de Brunton, Laurence L., Lazo J. S., Parker K. L. Mc-Graw Hill Interamericana. México, D. F. 1549.
- Lv. P., Luo H. S., Zhou X. P., Paul., S. C., Xiao Y. J., Si. X. M., Liu S. Q. 2006. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract*; 202:777-788.
- Ma Z., Wang X. 1998. The changes of serum nitric oxide level in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*; 33:148-

9.

- Mackinnon M. A., Sutherland E. y Simon F. R. 1978. Qualitative alteration in hepatic microsomal cytochrome P-450 apoproteins associated with bile duct ligation, and the administration of ethinyl estradiol, Phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem Pharmacol*; 27: 29-35.
- Marriott J. B., Muller G. y Dalglish A. G. 1999. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunol Today*; 20:538-540.
- McBride, W. B. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*; 2:1358.
- Méndez-Sánchez N., Guevara González L., y Uribe M. E., 2003. Sección III Evaluación de la función hepática, Cap 22. Pruebas de funcionamiento hepático. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 201-210.
- Merck 1999. Manual de Merck. 10ª. Ed., Sección 4. Enfermedades hepáticas y biliares. Capítulo 36. Anatomía y fisiología. 84.
- Moreira A. L., Corral L. G., Ye W., Johnson B., Stirling D., Muller G. W., Freedman V. H., Kaplan G. 1997. Thalidomide and thalidomide analogs reduce HIV type 1 replication in human macrophages in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 13:857-63.
- Mujagić H., Chabner B. A., Mujagić Z. 2002. Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. *Croat Med J*; 43:274-85.
- Muriel P. 1997. Peroxidation of lipids and liver damage. In: Oxidants and free radicals. p.p. 237-257. S. I. Baskin and H. Salem, (eds). Taylor & Francis, Washington, USA. 237-255.

- Muriel P., Fernández-Martínez E., Pérez-Alvarez V., Lara-Ochoa F., Ponce S., García J., Shibayama M., Tsutsumi V. 2003. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 15:951-7.
- Muriel P. 2006. Rol of Nitric Oxide in liver disorders. In Liver diseases Biochemical mechanisms and new therapeutic insights. Pathophysiology,

- diagnostic and therapeutic insights. Editors A. S, Friedman S. L. and Mann D. A. Science Publisher. Jersey; 1:115-131.
- Muriel P. 2008. NFκB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol*; 29:91-100.
 - Muriel, P. 2003. Sección I, Cap 8. Farmacología hepática experimental. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 63-69.
 - Mycek M. J., Harvey R. A. y Champe P. C. 2004. Farmacología. Mc Graw Hill Interamericana. México. 315-332.
 - Netter F. H. 1981. Colección Ciba de Ilustraciones Médicas, Sistema Digestivo: Hígado, Vías Biliares y Páncreas, tomo 3.3, sección XV; Ed. Científicas y Técnicas (Masson-Salvat de Medicina), Barcelona. 2-12.
 - Nieman K. L., Loriaux L. D. 1998. Estrógenos y Progestágenos. En: Farmacología. 1era. Edición. México, D. F. Editorial Médica Panamericana. 660-679
 - Oppenheim J. J. y Ruscetti FW. 2002. Citocinas. En: Inmunología básica y clínica, Parslow G. T., Stites P. D., Terr I. A. e Imboden B. J. editores. 10th ed. El Manual Moderno. México. 167-197.
 - Paul, SC; Lv, P; Xiao, YJ; An, P; Liu, SQ; Luo, HS. 2006. Thalidomide in rat liver cirrhosis: blockade of tumor necrosis factor- α via inhibition of an inhibitor of nuclear factor- κ B. *Pathobiology*; 73:82-92.
 - Pérez-Álvarez VM. 2003. Sección I, Cap 7. Papel del hígado en el metabolismo de los fármacos. En: Conceptos actuales en Hepatología. Ed. Masson Doyma, México. 53-62.
 - Pincemail J., Vanbelle, Gaspard U., Collette G., Haleng J., Cheramy-Bien J. P. Charlier C., Chapelle J.P., Giet D., Albert A., Limet R. and Defraigne J.O. 2007. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Lie`ge, Belgium. *Hum Reprod*; 22: 2335–2343.
 - Plebani M, Panozzo MP, Basso D, DePaoli M, Biasin R, Infantolino D. 1999. Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation, *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 26:358-63.

- Porter Le, Elm MS, Van Thiel Dh y Eagon PK. 1987, Hepatic estrogen in human liver disease. *Am Gastroenterol Assoc*; 92:735-45.
- Prosser CC, Yen RD, Wu J. 2006. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: Where are we?. *World J Gastroenterol*; 28:509-15.
- Qiu J., Bessems J. G., Commandeur J. N., Adams B., Vermeulen N. P. 1994. Mechanism of protection of ebselen against paracetamol-induced toxicity in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*; 18:1631-40.
- Rahner C, Stieger B, Landmann L. 1996. Struture-Function correlation of tight junctional impairment alter intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology*; 110:1564-78.
- Reitman S. y Frankl S. A. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*; 28:56-63.
- Reyes H y Simon F. R. 1993. Intrahepatic cholestatic of pregnancy:an estrógeno-related disease. *Semin liver Dis*; 13:289-301.
- Rodés J., Benhamou J. P., Bircher J., McIntyre N. y Rizzetto M. 2001. Tratado de hepatología clínica.2da. Ed. Elsevier, España. 1324.
- Rodríguez-Garay E. A. 2003. Cholestasis:human disease and experimental models. *Ann Hepatol*; 2:150-8.
- Rojkind M., González E. 1974. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Anal Biochem*; 57:1-7.
- Ruiz M. I., Villanueva S. M. S., Luquita G. M., Ikushiro S., Mottino D. A. y Catania A. V. 2007. Beneficial effect of spironolactone administration on Ethynilestradiol-induced colestasis in the rat:Involvement of up-Regulation of multidrug resistance-Associated protein 2. *Drug Metab Dispos*; 35: 2060-66.
- Sampaio E. O., Sarno E. N., Galilly R., Cohn Z. A., y Kaplan G. 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*; 173:699-703.
- Sánchez Pozzi E. J., Crocenzi F. A., Pellegrino J. M., Catania V. A., Luquita M. G., Roma M. G., Rodríguez Garay E. A., Mottino A. D. 2003. Ursodeoxycholate reduces ethynylestradiol glucuronidation in the rat: role in

- prevention of estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther*;1: 279-86.
- Schile F., Vicent-Viry M., Fournier B., Starck M. y Siest G. 1998. Biological effects of eleven combined or contraceptives on serum triglycerides, γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, bilirubin and other biochemical variables. *Clin Chem Lab Med*; 36:871-878.
 - Schumacher H., Smith R. L., Williams R.T. 1965. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *Brit J Pharmacol*; 25:324-337.
 - Seifter S., Seymour B., Novic B., Montwyler E. 1950. The estimation of glucogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*; 25:191.
 - Sheskin, J. 1965. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther*; 6:303-6.
 - Shimizu I. 2003. Impact of oestrogens on the progresión of liver disease. *Liver Int*; 23:63-9.
 - Sigala C., Nelle N., Halabe J. 2001. El resurgimiento de la talidomida. *Revista Facultad de Medicina. UNAM.* 44:212-15
 - Simon F. R., Arias I. M. 1973. Alteration of bile canalicular enzymes in cholestasis. A possible cause of bile secretory failure. *J Clin Invest*; 52:765-75.
 - Simpson K. J., Lukacs N. W., Colletti L., Strieter R. M., Kunkel S. L. 1997. Cytokines and the liver. *J Hepatol*; 27:1120-32.
 - Somers, G. F. Thalidomide and congenital abnormalities. 1962. *Lancet*;1:912-3.
 - Storch J., Schachter D. 1984. A dietary regimen alters hepatocyte plasmamembrane lipid fluidity and ameliorates ethinilestradiol cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta*; 22:137-40.
 - Sun B., Karin M. 2008. NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*; 27:6228-44.
 - ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/tnf-alpha.html
 - Telci A., Cakatay U., Akhan S. E., Bilgin M. E., Turfanda A., Sivas A. 2002.

Postmenopausal hormone replacement hormone therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecol Obstet Invest*; 54:88–93.

- Testut L. y Latarjet A. (1998). Compendio de Anatomía Descriptiva. Vigésimo segunda edición española. Salvat editores, S. A. México. 640-641.
- Türkay C., Yöner O., Arici S., Koyuncu A., Kanbay M. 2008. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. *Dig. Dis. Sci*; 53:789-93.
- Vázquez H., González-Campora R., y Galera H. D. 1996. Cap 4. Ultraestructura del hígado. En: Tratado de Hepatología de Herrerías González, Días Belmont y Jiménez Sáenz editores. Tomo I. Ed. Universidad de Sevilla, Sevilla España. II,45.
- Vickers A. E., Nelson K., McCoy Z., Lucier G. W. 1989. Changes in estrogen receptor, DNA ploidy, and estrogen metabolism in rat hepatocytes during a two-stage model for hepatocarcinogenesis using 17 alpha-ethinylestradiol as the promoting agent. *Cancer Res*; 1:6512-20.
- Vore M., Hadd H. y Slikker W. Jr. 1983. Ethinylestradiol-17β D-ring Glucuronide conjugates are potent cholestatic agents in the rat. *Life Sci*; 32:2989-93.
- Williams C. L., Stancel G. M. 1996. Capítulo 57: Estrógenos y progestágenos, en: “Goodman y Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica”, Molinoff, B. P. y Ruddon, W. R. editores. McGraw-Hill Interamericana, México. 1497-1529.
- Williams R. T. 1968. Thalidomide: a study of biochemical teratology. *Arch Environ Health*; 16:493-502.
- Williams y Maddrey. 1987. Gastroenterología 4. Hígado. El manual moderno. México, D. F. 134-135.
- Woodman D. D. 1988. Assessment of hepatic function and damage in animal species. Animal Clinical Chemistry Association. *J Appl Toxicol*; 8:249-54.
- www.celgene.com.mx
- www.cmbi.bjmu.edu.cn/cmb

- www.forbes.com/2003/07/11/cx_ad_0710shr.html
- www.wikipedia.org
- Xiao Y. J., Luo, H. S., Lv, P. 2007. Effects of thalidomide on adhesion molecules in rat liver fibrosis. *World Chinese J Digestol*; 15:3372-6.
- Yager J. D. y Fifield D. S. 1982. Lack of Hepatogenotoxicity of oral contraceptive esterooids. *Carcinogenesis*; 3:625-628.
- Yamamoto Y. Moore R., Hess H. A, Guo G. L, González F. J, Korach K. S., Maronpot R. R. y Negishi M. 2006. Estrogen receptor α mediates 17- α ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem*; 281:16625-16631.
- Yeh Ta-Sen, Ho Yu-Pin, Huang Shiu-Feng, Yeh Jun-Nan, Jan Yi-Yin, Chen Miin-Fu. 2004. Thalidomide salvages lethal hepatic necroinflammation and accelerates recovery from cirrhosis in rats. *J hepatol*; 41:606-612.