



**PROTOCOLO:
COLCHICINA Y FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL EN HEPATITIS CRONICA ACTIVA.**

**NOMBRE:
DR. MARCIAL PEREZ DOSAL.**

**TUTOR:
DR. DAVID KERSHENOBICH STANLIKOWITZ.**

**INSTITUCION SEDE:
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
“SALVADOR ZUBIRAN”**

**UNIVERSIDAD:
UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE
PUEBLA.**



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COLCHICINA Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL EN HEPATITIS CRONICA ACTIVA

INTRODUCCION

La hepatitis crónica activa se caracteriza clínicamente por necrosis hepática mantenida, inflamación portal, periportal y, en menor grado, lobulillar, y fibrosis. La hepatitis crónica, cuya gravedad oscila entre límites amplios, se considera como una enfermedad progresiva que puede llevar a la cirrosis, la insuficiencia hepática y la muerte.

Las características morfológicas de la hepatitis crónica activa son: 1) infiltrado mononuclear denso de los espacios porta, que se extiende de manera evidente a los lobulillos hepáticos (en el tipo autoinmune hay células plasmáticas formando parte del infiltrado), 2) destrucción de los hepatocitos en la periferia del lobulillo, con erosión de la placa limitante de hepatocitos que rodea las triadas portales (rasgo conocido como necrosis en sacabocados); 3) Tabiques de tejido conectivo que rodean los espacios porta y se extienden desde ellos al interior del lobulillo, aislando nidos de células hepáticas y rodeando conductos biliares y 4) signos de regeneración hepatocelular (formación de "rosetas", engrosamiento de las láminas de hepatocitos y "pseudolobulillos de regeneración").

Aunque es difícil demostrar que se produzca progresión a cirrosis en los pacientes con hepatitis crónica activa en la que sólo hay necrosis en sacabocados, esta evolución es habitual en formas muy graves de la enfermedad. De un 20 a un 50% de los enfermos con hepatitis crónica activa en la biopsia tienen también cirrosis, incluso en fases iniciales de la enfermedad. En general, la hepatitis crónica activa es clínicamente más grave que las hepatitis crónicas persistente y lobulillar.

Las dos variedades de hepatitis viral de transmisión entérica, A y E, se resuelven espontáneamente y no producen hepatitis crónica (existen casos contados donde se reporta hepatitis crónica autoinmune en pacientes con susceptibilidad genética). Por el contrario, los enfermos con hepatitis crónica B y C, así como aquellos con hepatitis crónica D superpuesta a hepatitis B muestran toda la gamma del espectro clinicopatológico de las hepatitis crónicas.

La hepatitis C pasa a la cronicidad en el 50% de los casos y de estos el 20% de las personas progresan a cirrosis hepática.

Así mismo la hepatitis crónica activa puede ser provocada por autoinmunidad, mediado por células y dirigido contra hepatocitos, con toda probabilidad, la predisposición a la autoinmunidad es hereditaria, mientras que la alteración hepática específica de este proceso es desencadenada por factores ambientales tales como productos químicos o virus. Cuando satisface criterios de gravedad este tipo de hepatitis crónica activa puede tener una tasa de mortalidad de hasta el 40% en 6 meses. Es frecuente encontrar en este tipo de hepatitis crónica activa haplotipos del sistema de histocompatibilidad, tales como HLA-B 1, -BS-DRw3 y Drw4. Este tipo de hepatitis crónica activa responde al tratamiento con glucocorticoides e inmunosupresores, que es eficaz en diversos trastornos autoinmunes.

CITOCINAS Y DAÑO HEPATICO

Las citocinas integran una gran red de. Mediadores. Moleculares constituyentes de un sistema de comunicación coordinado entre diferentes células y tejidos y que se encargan fundamentalmente de restablecer o mantener la homeostasis fisiológica.

Independientemente del factor causante del daño, el hígado desarrolla una respuesta uniforme al daño crónico. La necrosis hepatocelular es seguida de fibrosis y cirrosis que es el resultado de un aumento de la síntesis y depósito de colágena y de proteínas de matriz extracelular, sintetiza principalmente a nivel de células de Ito, células estelares, hepatocitos y células endoteliales. Aunque el mecanismo fibrogénico no es totalmente conocido, existen evidencias de que diversas citocinas son capaces de actuar en las distintas células hepáticas induciendo modificaciones intracelulares que culminan con el depósito de colágena, y hasta el desarrollo de cirrosis.

Las citocinas son polipéptidos de peso molecular bajo sintetizadas y liberadas por numerosas células tales como monocitos macrófagos y de particular relevancia para las enfermedades hepáticas, las células de Kupffer. Por sus características efectoras, las citocinas se han considerado en dos grandes grupos aquellas que fundamentalmente actúan como factores de crecimiento, tales como Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) e Interleucina-6 (IL-6) y aquellas que poseen principalmente propiedades inflamatorias, tales como la Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-8 (IL-8) y Factor de Necrosis Tumoral (FNT). En ocasiones, es factible que los factores de crecimiento posean actividad inflamatorio y viceversa. Cada citocina tiene distinta secuencia de aminoácidos, estructura y receptores de superficie. Las citocinas tienen diversas actividades biológicas que a menudo se sobreponen y que se cree influyen de manera, importante en los procesos de daño y regeneración hepática.

Factor de Necrosis Tumoral

El FNT es una citocina sintetizada principalmente por monocitos/macrófagos (2), en respuesta a estímulos infecciosos, traumáticos, neoplásicos o en enfermedades inflamatorias crónicas. Se le conocen actividades biológicas importantes como pirogénesis, inducción de neutrofilia (3,4), inducción de la liberación de otras citocinas (IL-1, EGF, PDGF y TGF- β , entre otras). Se le conoce como un potente promotor de la síntesis de reactantes de fase aguda (5), así como su capacidad para disminuir la síntesis de albúmina. Se ha demostrado su participación en respuesta a estímulos químicos y bacterianos en el daño hepatocelular mediado por macrófagos en forma aguda (6,7,8,9,10,11), confiriéndoles capacidades citotóxicas, con la consiguiente producción de radicales libres de oxígeno (24).

Posee al igual que la IL-1 la capacidad de regular la expresión de moléculas adherentes en las superficies de las membranas de células endoteliales y neutrófilos, favoreciendo además síntesis de radicales libres y su degranulación (2,12,13,14). Se conoce también su poder amplificador en la actividad proliferativa y citotóxica de respuesta de células T (15,16,17), además de su capacidad moduladora sobre células NK. Estudios "in vivo" han demostrado un incremento significativo en los niveles séricos y número de receptores tisulares de FNT en pacientes con daño hepático agudo y crónico (6,18,9,10,19,20,21). En la actualidad se estudian sus efectos sobre la síntesis y la degradación de la colágena y aunque existe aún controversia, parece importante su participación en el proceso de fibrogénesis (22,23).

COLAGENA.

Antes de 1960 se consideraba que la colágena era una proteína insoluble con una vida media muy prolongada, quizá incluso inerte y que una vez depositada en la matriz extracelular permanecía hasta la muerte. Así mismo, se consideraba que el aumento en el contenido de colágena en el hígado cirrótico era secundario a colapso del estroma. A partir de 1960 se demostró que la fibrogénesis era un proceso activo y que el exceso de colágena en la cirrosis hepática resultaba de un aumento en la biosíntesis de colágena y una disminución en la actividad colagenolítica que se lleva a cabo por collagenasas específicas.

Se han descrito distintos tipos de colágena de las cuales las que predominan tanto en el hígado normal como en el del cirrótico y en hepatitis crónica activa son la colagena I y III, variando únicamente sus proporciones que son lo normal 1: 1, hepatitis crónica activa 1 - 2:1 y en el cirrótico 2-3: 1. Estudios cuantitativos de colágena total demuestran que aumenta de

aproximadamente 5 mgr por g de tejido de hígado normal hasta 10-15mg en hepatitis crónica activa, hasta 30 mg por gramo de hígado cirrótico.

La colágena de tipo 1 es el producto de dos genes alfa 1 y alfa 2 que se localizan en diferentes cromosomas y que son reguladas en forma coordinada. Durante la Fibrosis hepática la expresión de los genes de la colágena tipo 1 aumenta. Se han descrito como factores importantes en su regulación, modificaciones en la estructura de la cromatina, la metilación y desmetilación del DNA, entre otros (1). En particular, existe una serie de agonistas que inhiben la expresión del RNA de colágena tipo 1 en células en cultivo, como son los retinoides, glucocorticoides, interferón gamma, vasopresina, factor de necrosis tumoral alfa y ésteres de forbol. La función fisiológica de cualquiera de estos factores inhibitorios no es aún clara. Varios factores cis y trans han sido identificados y parcialmente caracterizados como reguladores transcripcionales de la expresión del gen de colágena al igual que para las citocinas, sin embargo los mecanismos moleculares a través de los cuales citocinas como TGF-B y TNF-A e IL-1 regulan, la expresión de colágena y fibrogénesis, no se conocen aún en detalle.

TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DE HEPATITIS CRONICA ACTIVA

Los conceptos anteriormente señalados en cuanto a la importancia de las citocinas y la regulación de los genes de colágena, como importante predictor del daño hepático crónico, representan la base experimental para el desarrollo de nuevas formas de intervención terapéutica en pacientes con hepatitis crónica activa. Existen actualmente una serie de compuestos que han demostrado tanto en animales de experimentación como en humanos tener potencial de modificar esta relación:

La Pentoxifilina que es un derivado de las metilxantinas inicialmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica y que además posee acción amplificadora sobre sistemas fibrinolíticos endógenos (24,25), bloqueo de lisis mediada por células NK y disminuye proliferación de linfocitos citotóxicos (26,27), disminución de citocinas inflamatorias (28), promueve bienestar físico (29,30), disminución de toxicidad relacionada al trasplante (31), entre otras.

Los interferones son una familia de proteínas que se agrupan en base a sus efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores (32,33). Su efecto antiviral fué descrito desde 1957 y se han clasificado en 3 tipos, alfa, beta y gama, distinguidos desde el punto de vista estructural, bioquímico y antigénico. Es conocida su capacidad de regulación sobre la producción de citocinas como Interleucina 1 y 2 y Factor de Necrosis Tumoral, así como en la activación de macrófagos y Células Asesinas Naturales.. En la actualidad el Interferón recombinante que se utiliza en el tratamiento de las hepatitis virales de evolución crónica

causadas por virus B y C, es el interferón alfa, fundamentalmente por su potente acción antiviral, y cada vez se conocen más fundamentos para su utilización.

COLCHICINA:

La Colchicina es una droga con actividad antifibrogénica y antiinflamatoria (34), que previene el transporte y secreción de la colágena, estimula colagenasa, inhibe IL-1 e IL-2, afecta la producción de FNT (35) y en base a esta y otras propiedades ha sido usada en animales de experimentación y en humanos para el tratamiento de la cirrosis hepática con resultados favorables. Se ha reportado una mayor sobrevida y mejor calidad de vida en pacientes cirróticos, mediante un estudio doble ciego de 100 pacientes (36) en el INNSZ, confirmados parcialmente estos resultados por otros autores en Cirrosis Biliar Primaria (37,38), y causada por hepatitis B (39) y en hepatitis crónica activa con transformación a cirrosis hepática (40). Los efectos secundarios que se han descrito son mínimos. Se ha demostrado en animales de experimentación que la depuración de colchicina es de 77.33 ml $\pm$ 8.27 ml por minuto por kilogramo; su vida media es de 16.68 $\pm$ 0.97 minutos y su volumen de distribución de 1.84 $\pm$ 0.15 l/kg. En tres modelos de disyunción hepática y uno de inhibición de Citocromo P450, se ha observado que el daño hepático en estos animales altera en forma significativa la farmacocinética de la colchicina de tal forma que por ejemplo, la ligadura del conducto biliar hace que la depuración disminuya en 1.84%, la vida media aumente a 513.7 $\pm$ 100.6 minutos y que el volumen de distribución aumente 175%. Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que el hígado es la vía de mayor eliminación de colchicina (41). Los estudios se han repetido con resultados similares en humanos. Otro hecho importante lo constituye el que la concentración pico de colchicina en los leucocitos alcanza valores de 16 veces por encima de su concentración en plasma. Esta concentración preferencial en linfocitos puede estar relacionada con los efectos terapéuticos descritos.

JUSTIFICACION

El tratamiento de la hepatitis crónica activa en la actualidad es fundamentalmente sintomático y no ha impactado sobre la prevalencia e historia natural de la enfermedad. En estudios recientes aislados de investigación demuestran que como en la cirrosis hepática, existe relación estrecha entre la inflamación y fibrogénesis en la hepatitis crónica activa., por lo que se requiere de un estudio integral en pacientes que explore este aspecto así como de los fármacos que actúan a este nivel.

OBJETIVOS

- 1.- Valorar el efecto de la Colchicina en los mecanismos fisiopatológicos de hepatitis C y su efecto en el tratamiento de la hepatitis crónica activa por virus de hepatitis C.
- 2.-Realizar un análisis "in vivo" e "in vitro" de los efectos de la Colchicina sobre la expresión de los genes y síntesis de Factor de Necrosis Tumoral (FNT) y colágena de tipo 1 (como predictor de evolución) a nivel sérico y tisular.
- 3.-Estudiar la relación entre inflamación y fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica activa por virus de hepatitis C.

HIPOTESIS

***Hipótesis nula:** La Colchicina no modifica la relación inflamación-fibrogénesis en hepatitis crónica activa.

***Hipótesis alterna:** La Colchicina modifica la relación inflamación-fibrogénesis en hepatitis crónica activa.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Ensayo clínico, previa estratificación por virus de la hepatitis C.

MUESTRA

Se estudiarán pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 30 y 65 años, con antecedente de infección por virus de Hepatitis C que serán distribuidos de la siguiente manera:

Grupo : Se incluirán 5 pacientes con antecedente de transfusión previa y anticuerpos positivos contra virus de hepatitis C , que presenten alteraciones de las Pruebas de Función Hepática (PFH) y evidencia en la biopsia de cualquier lesión histológica, exceptuando cirrosis.

Criterios de exclusión:

- *Seropositividad para HAVAb y HBsAg,, HBCAg o HBcAb
- *Evidencia de seropositividad para marcadores inmunológicos predisponentes de enfermedad hepática.
- *Cirrosis hepática.

Criterios de exclusión generales:

- *Antecedente de transfusión en las 8 semanas previas.
- *Tratamiento antifibrogénico, antiviral o inmunomodulador previo.
- *Tratamiento en los 4 meses previos con agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos.
- *Contraindicación para la realización de biopsia hepática:
 - Tiempo de Protrombina más de 3s alargado.
 - Cuenta plaquetaria menor de 100,000
 - Ascitis.
- *Creatinina > 2 mg/dl.
- *Presencia de enfermedad tumoral maligna a cualquier nivel.
- *Proceso infeccioso o inflamatorio a otro nivel.
- *Falta de consentimiento escrito.

METODOLOGIA

La valoración inicial de los pacientes se realizará en base a la Historia Clínica detallada, Exámen físico completo y determinaciones séricas: Hemograma completo, Pruebas de Función Hepática (AST, ALT, ALP, BT, BD, GGT, ALB, Tiempo de Protrombina), marcadores virales para virus B (HBsAg, HBeAb) y C (HCVAb, Elisa de 2a. generación), anticuerpos antimitocondriales, anti músculo liso, antinucleares, anticitoplásmicos y antitiroideos. Se realizará Ultrasonido hepático y medición de alfa feto- proteína cada 6 meses.

Una vez seleccionados los pacientes de cada grupo, se tomarán 35 ml. de sangre que será asignada de la siguiente forma: 7 ml para determinación sérica de péptidos de procolágena; 5 ml para determinación sérica de FNT; 7 ml para determinación de PFH completas; 10 ml para pruebas hematológicas y 10 ml para seroteca. Estas determinaciones se realizarán a los 0,2,4,6,12 meses. En la primera toma, se obtendrán 20 ml de sangre adicionales para la extracción del DNA de leucocitos periféricos para el estudio del polimorfismo del gen de colágena tipo I.

Se hará biopsia hepática percutánea con aguja de Tru-Cut o bien, biopsia en cuña durante un procedimiento quirúrgico sin evidencia de sepsis o proceso inflamatorio a cualquier nivel, a los 0, 2 y 12 meses, con el fin de determinar la expresión tisular (RNAm) del FNT y de colágena, así como valoración histológica. En ausencia de contraindicación, las biopsias iniciales y a los 9

meses serán realizadas con visión directa por laparoscopia, evaluándose al mismo tiempo el aspecto del hígado, la presencia de datos de esplenomegalia y ascitis.

El tratamiento será administrado por 12 meses, mismo tiempo que representará el tiempo de seguimiento de los pacientes.

Para obtener resultados evaluables, los pacientes deberán haber completado cuando menos 2 meses de tratamiento.

Análisis de sangre:

Suero:

Se toman 5-7 ml de sangre sin anticoagulante y se deja reposar a temperatura de 4 grados C durante una hora. Una vez formado el coágulo, este es retirado con un aplicador y el resto se somete a centrifugación durante 15 minutos a 5000 g. Se coloca 1 ml de suero por criotubo y se congela a -70 grados C hasta su utilización para la medición de péptidos de procolágena y FNT.

Determinación sérica de Factor de Necrosis Tumoral (FNT):

Se realizará determinación sérica a los 0,2,4,6 y 12 meses de tratamiento de FNT, mediante estuche inmunoenzimático específico para FNT.

Determinación sérica de péptidos de procolágena:

Se cuantificará a partir de suero almacenado por un periodo no mayor a un mes, la concentración sérica de péptidos de procolágena mediante Kit comercial de radioinmunoensayo (RIA-gnost P-III-NP; Behring, Rueil-Malmaison, Francia), basado en anticuerpos policlonales que reconocen principalmente propéptido de colágena-3 de alto peso molecular (intacto). Se aceptará un rango de normalidad de 2-12 g/lt. . Así mismo se realizará la medición del péptido de procolágena de tipo I.

Biopsias hepáticas:

Obtención de muestras: Se estima por experiencia previa que se obtendrá un promedio de 25 mg de tejido hepático mediante biopsia percutánea con aguja de Tru-Cut y guiada por ultrasonido, o bien durante cirugía abdominal abierta o laparoscópica. La mitad del tejido será congelado de inmediato en nitrógeno líquido bajo condiciones estériles a -80 grados C hasta su utilización para los estudios de Biología Molecular. El resto será asignado al estudio histopatológico.

Estudio Histopatológico:

***Análisis cualitativo de fibrosis:** Un estudio a ciegas será realizado por patólogos del INNSZ mediante tinciones convencionales: Hematoxilina y Eosina y tinción de Masson.

***Análisis cuantitativo de la concentración total de colágena:**

La muestra obtenida por biopsia hepática será fijada en formalina a 10% en buffer de fosfato a 0.1 M pH 7.2 conteniendo NaCl 0.15 M, embebida en parafina y se realizarán cortes de 15 μ m de espesor. Se desparafinizará en grupos de 10 a 20 cortes después de incubación con xylol, xylol:etanol (1:1), etanol. etanol-agua (1:1) y agua. Las muestras serán mantenidas en agua destilada a 4 grados C y procesadas durante un lapso de 1 semana.

Procedimiento de tinción: Cortes individuales, con área aproximada de 10-50 mm², serán cubiertos con 0.2 ml de una solución saturada de ácido piérico en agua destilada conteniendo Fast-green FCF (colorante para proteínas no-colágena) y 0.1% de Rojo Sirio F3BA (colorante para colágena). La solución saturada de ácido piérico es necesaria para la interacción del Rojo Sirio con colágena. Una pre-incubación con una solución a 0.1 de Fast-green y ácido piérico será realizada para prevenir cualquier tinción inespecífico con Rojo Sirio, como núcleo de hepatocitos y de células linfoides, que se explorará por microscopía. Los tubos serán cubiertos con papel aluminio e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos en un mezclador giratorio. Se retirarán los fluidos cuidadosamente con una pipeta desechable y se lavarán los cortes varias veces con agua destilada hasta que el fluido se decolore.

Se añadirá 1 ml. de NaOH a 0.1 N en metanol absoluto (1:1; v:v) y se mezclará cada tubo hasta que todo el color se eluya del corte (generalmente por pocos segundos). Si la concentración de colágena es muy alta, como en el hígado cirrótico, el color será eluido en 2 o 3 ml de NaOH-metanol en lugar de 1 ml. Inmediatamente, se leerá el color eluido en espectrofotómetro a 540 y 605 nm, cuando las longitudes de onda corresponden a absorbancias máximas de Rojo Sirio y Fast-green, respectivamente. Se almacenará el eluido en recipiente oscuro a 4 grados C.

Determinación de Proteína e hidroxiprolina. Cortes duplicados o triplicados serán colocados en recipientes de vidrio que contengan 0.5 ml de HCl a 6 N, serán sellados al vacío e hidrolizados durante 18 horas a 104 grados C. El exceso de HCL será removido al vacío y las muestras secas serán resuspendidas en 0.5 ml de HCl a 2N, incubados con Dowex-Norit para remover "humin", neutralizado a pH de 5-6 con NaOH y aforado con agua destilada para la obtención de un volumen final de 2 ml. Alicuotas conteniendo 0.2 y 0.5 ml serán utilizadas para la determinación de hidroxiprolina de acuerdo con el procedimiento de Rojkind y González. Se utilizará 1 ml de la solución para determinación de nitrógeno por análisis de micro-Kjeldahl. Para cuantificación de colágena, se asumirá que una cadena alfa 1 de aproximadamente 96,000 daltons contiene en promedio 1000 residuos de 4 hidroxiprolina. Para la estimación de proteínas se asumirá que las proteínas en el tejido se compone de 16% de nitrógeno.

Extracción de RNA:

Homogeneización: Se mezcla la muestra obtenida (de tejido hepático en el caso de la determinación en biopsia) con RNazol B MR. (2 ml por 100 mg de tejido). El RNazol es un método de aislamiento de RNA que promueve la formación de complejos de RNA con guanidina y moléculas de agua e impide interacciones hidrofílicas entre las proteínas y el DNA). Para aislar el RNA de las células crecidas en suspensión, es necesario sedimentarlas y lisarlas mediante la

adición de 0.2 ml de RNazol B por millón de células. Las células crecidas en monocapa son lisadas directamente en la caja de cultivo al añadir 1 ml de RNazol por cada 3.5 cm de la caja de Petri.

Extracción del RNA: Se agrega a 2 ml del homogeneizado 0.2 ml de cloroformo y se agita la mezcla de manera vigorosa durante 15 segundos y se deja reposar a 4 grados C por 15 minutos. El homogeneizado formará dos fases: la inferior de color azul (fase fenol-cloroformo) y una fase incolora acuosa en la porción superior. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas quedan en la interfase y fase orgánica.

Precipitación del RNA: Se transfiere la fase acuosa a un tubo, se agrega una cantidad similar de isopropanol y se deja 15 minutos a 4 grados C. En seguida se centrifuga la mezcla por 15 minutos a 12,000 g (4 grados 'C). El precipitado del RNA forma una pastilla de color amarillo.

Lavado del RNA: Se realiza un sólo lavado del botón agitándolo en una solución de etanol al 75% (mínimo 0.8 ml de etanol por cada 50-100 um de RNA) y enseguida se centrifuga por 8 minutos a 7500 g (4 grados C o 20grados C). Al finalizar el procedimiento es necesario secar el botón y al vacío por 10-15 minutos. Es importante evitar que el pellet de RNA se seque completamente, ya que esto disminuiría de manera importante su solubilidad.

La transcripción de los genes de las diferentes citocinas se cuantificará en presencia de un control interno poliespecífico (plásmido pQA-1) mediante la reacción de la transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Transcriptasa reversa: La reacción de transcriptasa reversa se llevará a cabo con mezclas del RNA obtenido y el RNA estándar del plásmido pQA107. Se mezclará 1 ng de RNA del botón con 0,0005 pg del RNA estándar X n (donde n es el número de RNAm que se estudiarán i.e., RNAm para FNT). Como parámetro de comparación inter e intraensayo, se mezclará 1 ng del RNAm obtenido con 0.025 pg del RNA estándar para la cuantificación del transcrito de la proteína estructural Beta 2 microglobulina. Las mezclas de RNA serán desnaturalizadas durante 5 minutos a 70 grados C y enfriadas rápidamente en hielo. Se agregará posteriormente 100 ng de oligonucleótido iniciador, Oligo Id(T)16 50U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (Gibco-Elmer Corporation, Noiwalk, CT, EUA).

Reacción de la polimerasa en cadena: El producto de la reacción de transcriptasa reversa será dividido entre n. El cDNA se mezclará con 30 pM de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido para el FNT, 0.5 M de deoxinucleótidos trifosfato y 2 U de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer). Las condiciones de amplificación serán de 1 ciclo a 94 grados C por 5 minutos, 57 grados C por un minuto y 72 grados C por un minuto, seguido de 33 ciclos a 94 grados C por un minuto, 57 grados C por un minuto y 72 grados C por un minuto y finalmente un ciclo a 94 grados C, 75 grados C por un minuto y 72 grados C por 5 minutos, todo esto en el ciclador térmico programado. Los productos amplificados se correrán en electroforesis en geles de

agarosa al 1% con 0.05ug/ml de bromuro de etidio y serán fotografiados sobre un transluminador de luz ultravioleta con película Polaroid.

Cuantificación de los productos amplicados: Cada negativo de la película Polaroid será analizado por densitometría. Se medirá la altura alcanzada en el histograma resultante de cada una de las bandas, obteniéndose posteriormente la relación del producto amplificado estándar sobre el producto amplificado de la muestra. Con el fin de descartar variaciones dadas por el área bajo la curva en los histogramas, estos serán recortados y pesados en una balanza analítica y, de igual forma, se obtendrá el cociente del producto amplificado estándar sobre el producto amplificado de la muestra obtenida.

Control interno de RNA: El RNA que se empleará como control interno se sintetizó a partir del plásmido pQA107 (amablemente proporcionado por el Dr. David Shire, Sanofi Elf Bio Recherches, Labège, Francia) (51). Primeramente el plásmido pQA107 (ug) fué linearizado con 10 U de la endonucleasa de restricción EcoR1 durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se verificó la ruptura del plásmido por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en solución 0.5 X de tris-boratos - EDTA y 0.05 ug/ml de bromuro de etidio. Una vez linearizado, se contruyó una ribosanda con 400 ng del plásmido mediante la acción de 50 U de la enzima T7 RNA polimerasa, en presencia de 2.5 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfato y 40 U de inhibidor de Rnasa. Después de incubar por 1 hora a 37°C se agregaron 32U de Dnasa y el RNA se purificó secuencialmente con fenol y cloroformo: alcohol isoamílico. Por último, el RNA obtenido se precipitó con etanol. La pureza se verificó en un gel agarosa al 1% con formaldehído y 0.05 ug/ml de bromuro de etidio. La ribosinda o RNA estándar se cuantificó también por el método antes descrito. Una vez purificado el RNA, se procederá a determinar la expresión de las citocinas con el método antes descrito en relación a la determinación sérica.

Expresión de RNAm de procolágena I en tejido hepático.

Muestras de RNA total extraído, cuantificadas por espectrofotometría, serán fraccionadas por electroforesis en geles en condiciones desnaturalizantes (agarosa 1%, formaldehído 17.63%, fosfatos 10 mM). Se transferirán a filtros de nitrocelulosa en SSC 20X y se realizará una prehibridación con SSC 10X, Denhardt's 10X, NaP pH 6.5 100mM, en mezcla con formamida, y DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La hibridación será realizada con una sonda marcada con P32 de DNA complementario Hf 32 (fornecido por ATCC, EU), que contiene 1,443 nucleótidos que codifican el dominio de la colágena 2(I) y 597 nucleótidos codificantes para el C-péptido, e incluye aproximadamente la mitad de las secuencias codificantes para el gen de procolágena 2(Y); en formamida y SSC 5X, Denhardt's 1X, NaP pH 6.5 20 Mn y destrán sulfato 0.1 g/ml. Los filtros serán lavados 6 veces con SSC y SDS y sometidos a autoradiografía. Las autoradiografías se cuantificarán con densitometría.

Extracción de DNA:

Se tomará muestra de 20 ml de sangre con anticoagulante (ACD) y se mantendrá congelada a -76 grados C hasta la realización de la extracción por la técnica de Denver.

Polimorfismo del gen de Colagena Tipo 1: Se realizará digestiones con enzimas de restricción para analizar polimorfismos del gen de la cadena alpha 2, transferencia por la técnica de Southern e hibridación con bandas NJ 3.2, NJ 3.5 y Hf 32. Los polimorfismos de la cadena alpha 1 serán analizados por Nested-PCR con primers específicos.

CULTIVOS CELULARES.

De la muestra de sangre a los 0,6 y 12 meses se aislará específicamente TGF-B que posteriormente será incubado en una línea celular obtenida de un hepatoma humano, denominada HepG2 (53), o en células fetales hepáticas (WRL-68).

Las líneas celulares se cultivan de la siguiente manera:

Las células de hepatoma humano HepG2 serán cultivadas en medio de Williams suplementado con suero fetal bovino al 10% (v:v) y 100 UI/ml de penicilina. Las células WRL-68 serán cultivadas en medio mínimo esencial de Dulbecco, suplementado con 8% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no-esenciales, 100 UI/ml de penicilina y 1001 de estreptomicina. En ambos cultivos el medio será reemplazado cada 2 días y las células sembradas en una dilución 1:5 cada 7 días. Las células serán cultivadas a 37 grados C en botellas de plástico desechable en una atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂. Ambas líneas se adquieren comercialmente en la American Type Culture Collection.

Las condiciones así descritas serán para la proliferación celular. Los experimentos en los cuales se incuben las células con suero de los pacientes, se llevarán a cabo en ausencia de suero fetal bovino. Posteriormente se procederá a determinar la expresión del gen de colágena de tipo 1 a diferentes periodos de incubación, mediante la extracción del RNA con la técnica de Northern previamente descrita.

Una vez inducido el aumento de la expresión de colágena tipo 1 por el TGF-B, se evaluará el efecto de la Colchicina sobre esta inducción.

MONITOREO DE TOXICIDAD:

Se citará al paciente al Departamento de Gastroenterología de manera mensual para vigilar mediante interrogatorio espontáneo y dirigido la presencia de efectos indeseables atribuibles al medicamento. Se realizarán exámenes de rutina (BH, PFH, Tiempos de Coagulación), a los 0, 2, 4, 6 y 12 meses de tratamiento, con el fin de vigilar toxicidad. En caso necesario se procederá a consideración del investigador a realizar los exámenes de laboratorio y/o suspender el medicamento.

La Colchicina ha sido ampliamente utilizada y generalmente bien tolerada cuando se utiliza a dosis moderadas. Los principales síntomas relacionados a efectos adversos son:

***Sistema Gastrointestinal:**

-Nausea, vómito, diarrea y dolor abdominal.

***Sistema Hematológico:**

-Leucopenia transitoria.

En intoxicaciones severas suele observarse:

-Gastroenteritis hemorrágica.

-Daño vascular extenso.

-Nefrotoxicidad.

-Depresión muscular.

-Parálisis ascendente del SNC.

Con el uso prolongado rara vez ocurre:

-Agranulocitosis.

-Anemia aplásica.

-Miopatía.

-Alopecia.

-Azospennia.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se incluirá un total de 5 pacientes. El tamaño de la muestra de 5 pacientes está fundamentada estadística y factiblemente. Desde el punto de vista estadístico, y considerando una distribución binomial con una probabilidad de cambio a priori , un resultado del todo o nada alcanza significancia estadística con un mínimo de 5 observaciones.

Por otra parte y dados el número y las características de los procedimientos a realizarse en cada paciente, la factibilidad de estudiar un número mayor de pacientes es limitada. La posibilidad de incrementar el tamaño de la muestra se considerará una vez finalizado el estudio del número de pacientes aquí estipulado.

ANALISIS ESTADISTICO

Las características generales, clínicas, bioquímicas e histológicas de ingreso del grupo de estudio se resumirá en términos de frecuencias (porcentajes) y medianas (intervalos).

Las variables de interés primario se resumirán de la misma manera y se harán comparaciones entre las observaciones basal y final (pareadas) de los pacientes mediante la prueba del signo de Wilcoxon. Así mismo, se determinará el efecto de la Colchicina considerando como variables independientes adicionales a la etiología.

ASPECTOS ETICOS

El estudio plantea como único problema ético la realización de 3 biopsias hepáticas en un año, que se justifican en cuanto a que los pacientes se les proporcionará una medida terapéutica con probabilidad de modificar favorablemente su historia natural y que de otra manera no podrían recibir. Los riesgos de complicaciones son mínimos (< 10%) y además, se extremarán los cuidados, realizándose siempre bajo control ultrasonográfico o durante cirugía. En ningún caso que exista contraindicación se hará biopsia hepática.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Brenner DA, Westwick J, Breindi M. Type 1 collagen gene regulation and the molecular pathogenesis of cirrhosis. *Am J Physiol.* 1993;264:G589-G595.
- 2.-Tracey KJ, Viassara H, Cerami A. Cachectin/Tumor Necrosis Factor. *Lancet* 1989; ii: 1 122-1125.
- 3.-Remick DG, Kunkei RG, Larñick JW et al. Acute in vivo effects of human recombinant Tumor Necrosis Factor. *Lab. Invest* 1987; 56 (6): 586-590.
- 4.-Beutier B, Cerami A. Cachectin: more than a Tumor Necrosis Factor. *N Eng J Med* 1987; 316 (7): 379-385.
- 5.-Thiele DL. (Editorial) Tumor Necrosis Factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology* 1989; 9 (3): 497-499.
- 6.- McClain CJ, Coben D. Increased Tumor Necrosis Factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989; 349-351.
- 7.- Bird GLA, Sheron N, Goka AKJ et al. Increased plasma Tumor Necrosis Factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Int Med* 1990; 917-920.
- 8.- Nagakawa J, Hishinuma Y, Hir~ K et al. Involvement of Tumor Necrosis Factor in the pathogenesis of activated macrophages-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterol* 1990; 99; 758-765.

- 9.- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ et al. Circulating Tumor Necrosis Factor, Interleukin 1 and interleukin 6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991; 13: 267- 276.
- 10.-Deviere J, Content J, Denys C et al. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide- induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11: 628-634.
- 11.- Lee E, Marsano L, McClain CJ et al. Liver cytokines in alcoholic hepatitis as assessed by immunohistochemistry. (abstract) *hepatology* 1991; 14 (4): Pt2: 141 A.
- 12.- Shiratori Y, Kawase T, Shiina S et al. Modulation of hepatotoxicity by macrophages in the liver. *Hepatology* 1988; 8 (4): 815-821.
- 13.- Rarnadori G, Meyer zum Buschenthalde. Liver cells and cytokines. *Cur Op Gastroenterol* 1993; 9: 359-366.
- 14.- Colletti LM, Remick DG, Burwh GD et al. Role of Tumor Necrosis Factor in the pathophysiologic alterations after ischemia 1 reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85: 1936-1943.
- 15.- Shalaby MR, Espevik T, Rice GC et al. The involvement of human Tumor Necrosis Factor and in the mixed Lymphocyte reaction. *J Immunol* 1988; 141: 499-503.
- 16.- Scherich P, Thoma B, Ucer U et al. Immunoregulatory activity of recombinant Tumor Necrosis Factor (TNF): Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987; 138: 1786-1790.
- 17.- Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76 (12): 2421-2438.
- 18.- Yoshioka K, Kakumu S, Arao M et al. Tumor Necrosis Factor production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1989; 10 (5): 769-773.
- 19.- Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Postichwaite AE et al. Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat liver produce chemotactic factors for fibroblast and monocytes: The role of Tumor Necrosis Factor. *Hepatology* 1991; 14: 894-900.
- 20.- Miller LC, Kaplan NM. Serum Interleukin-2 and Tumor Necrosis Factor- in Primary Biliary Cirrhosis: decreased by colchicine and relationship to HLA-DR4. *Am J Gastroenterol* 1992; 87 (4): 465-470.
- 21.- Lehmann V, Freudenberg NIA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and Tumor Necrosis Factor in normal and D-galactosamine treated mice. *J Exp Med* 1987; 165- 657-663.
- 22.- Weiner FR, Giachrone NU, Czaja MJ et al. Ito-cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990; 11: 111-117.
- 23.- Andus T, Baue J, Gerok W. Effects of cytokines in the liver. *Hepatology* 1991; 13 (2): 364-375.
- 24.- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. Review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50-97.
- 25.- Bessier H, Gilgal R, Djaldetti M et al. Effect of Pentoxifylline on the phagocytic activity, CANT levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. *J Leuk Biol* 1986; 40: 747-745.
- 26.- Tilg H, Eibl B, Pichi M et al. Immune response modulation by Pentoxifylline *in vitro*. *Transplantation* 1993; 56:196-201.

- 27.- Reed WR, DeGowin. Suppressive effects of Pentoxifylline on natural Mier ecil activity. J Lab Clin Med 1992; 119 (6): 763-771.
- 28.- Neuner P, Klosner G, Schaucr E et al. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of ll-IB, 11-6, 118 and Tumor Necrosis Factor Aipha by human peripheral blood mononuelear celis. Immunology 1994; 83:262-267.
- 29.- Dezube BJ, Fridovich-Keil JL, Bouvard T et al. Pentoxifylline and weilbeing in patients with cancer. Lancet 1990; ù: 662.
- 30.- Fauci AS. Multifactorial nature of Human Immunodeficiency Virus disease: Implications for therapy. Science 1993; 262. 1011-1018.
- 31.- Bianco JA, Appcibaum FR, Neunianaitis J et al. Phase 1-11 trial of Pentoxifylline for the prevention of transpiarit-related toxicities following bone marrow transpiantation. Blood 199 1; 78 (5): 1205 -121 1.
- 32.- Sen GC, Lengyel P. The Interferon System. A bird's eye view of ts biochemistry. J. Biol. Chem. 1992; 267 (8): 5017-5020.
- 33.- Pestka S, Langer JA. Interferons and their actions. ANN. Rev. Biochem. 1987; 56: 727-77.
- 34.- Entzian P; Schiaak M; et al. Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis. Lung. 1997, 175 -.1,41-5 1.
- 35.- Li Z, Davis GS; mohr C, et al. Inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production by colchicine and other microtubule disrupting drugs. Immunobiology. 1996; 195:4-5, 624-639.
- 36.- Kershenobich D, Vargas F, Garcia-Tsao G, Pérez-Tarnayo R, Rojkind M. Colchicine in the treatrnt of cirrosis of the liver. N Engl. J. Med 1988, 318: 1709-1713.
- 37.- Ikeda T, Tozuka S; Noguchi O, et al. Effects of additional administration of colchicine in ursodeoxycolic acid-treated patients with pfimary biliary cirrhosis: a prospective randomized study. J Hepatol. 1996; 24 (1): 88-94.
- 38.- Frysak Z, Hrcckova Y. Colchicine in the tratment of liver cirrohosis. 12 years'experience. Vnitr-Lek. 1996; 42 (1): 17-19.
- 39.- Lin DY, Sheen IS, Chu CM, Liaw YF. A prospective randomized trial of colchicine in prevention of liver cirrhosis in chronic hepatitis B patients. Aliment Pharinacol Ther. 1996; 10:6, 961-966.
- 40.- Simon K; Glays A; Zalewska M, Machaj A. Evaluation of elinical effectiveness of colchicine in the treatment of chronic active hepatitis with transformation to liver cirrhosis.Przegl Epidemiol. 1991; 45 (4): 331-4.
- 41.- Rudi J, Raedsch R, Gerteis C, et al. Plasma kinetics and biliary excretion of colchicine in patients with chronic liver disease after oral administration of single dose and after long- term treatment. Scand J Gastroenterol. 1994; 29(4): 346-35 1.