

IV. Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis

Victoria Chagoya-de Sánchez,* Juan Antonio Suárez-Cuenca y Rolando Hernández-Muñoz

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

RESUMEN

La cirrosis es una de las causas más comunes de muerte a nivel mundial ya que la disfunción hepática resultante es una condición letal a mediano o largo plazo. Su etiología es diversa y no existe un tratamiento efectivo para la reversión de esta patología salvo, con sus limitaciones, el trasplante hepático. Estudios de laboratorio en hepatotoxicidad experimental aguda y crónica, usando inicialmente la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP) y posteriormente un derivado con mayor potencia (IFC-305), demostraron que a través de disminuir los inhibidores de las metaloproteinasas con actividad colagenolítica se recupera el metabolismo de la colágena y normaliza la función hepática, particularmente su capacidad regenerativa. La aplicación de este fármaco a pacientes está en el proceso de desarrollo farmacéutico y pruebas clínicas requeridas.

Palabras clave:

Cirrosis, colágena, hepatotoxicidad, inhibidores de metaloproteinasas

SUMMARY

Cirrhosis is one of the most common causes of mortality worldwide because the resulting hepatic dysfunction in the medium to long term constitutes a potentially lethal condition. Its etiology is variable and there is no treatment available to reverse this pathology except liver hepatic transplant that entails some limitations. Our experience regarding studies of acute and chronic experimental hepatotoxicity using 6-aminoribofuranosil purine (6ARP) and later on a potent derivative (IFC-305) shows an increase in collagenolytic activity through a decrease of tissue inhibitor metalloproteinases, favoring hepatic function thru the liver's regenerative capacity. We are currently applying these findings to cirrhotic patients exploring the possibility of a pharmaceutical breakthrough and its ensuing clinical trial.

Keywords:

Cirrosis, collagen, hepatotoxicity, tissue inhibitors metalloproteinases

Introducción

Se considera que la fibrosis hepática es irreversible. Se le denomina cirrosis desde que Laennec, al describir esta patología en 1826, la llamó por primera vez *cirrosis* por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se le denomina *kirrhos*.¹ Las alteraciones estructurales causadas por esta enfermedad fueron detectadas desde 1761 por el patólogo Gianbattista Morgagni quien, en un reporte de 500 autopsias, describió alteraciones morfológicas del hígado parecidas a las que se reportan en la cirrosis.

Los primeros intentos para entender esta patología datan de 1930 cuando Roessle sugiere que se parece a un proceso degenerativo en el que se observa cicatrización de una lesión y proliferación del tejido. Actualmente, la cirrosis se le sigue dando definiciones en términos morfológicos, siendo la más aceptada la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1977 como "un proceso difuso caracterizado por fibrosis y transformación de la arquitectura normal del hígado a nódulos estructuralmente anormales."^{2,3}

La cirrosis surge de un daño crónico e irreversible del parénquima hepático, presenta una fibrosis difusa con nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura lobulillar y vascular del tejido hepático, originando una pérdida de la masa funcional. La fibrosis es el resultado de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente de la colágena que es la proteína más abundante en esta estructura. La colágena se acumula debido a una disminución importante en su degradación, proceso que se considera autoperpetuable e irreversible.

La cirrosis, por su alta tasa de mortalidad, es una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial y ocupa en México el séptimo lugar como causa de muerte. Sólo en 1997, causó, en nuestro país, 20,420 muertes, siendo una de las tres primeras causas de muerte entre la población económicamente activa de 40 a 60 años de edad.⁴ En Estados Unidos, las tendencias estadísticas auguran un incremento de 223% de muertes por cirrosis para el año 2008 y de 360% para el 2028.⁵

Este problema no es solamente social sino también económico. Por lo general, en las últimas etapas de la enfermedad se presentan varices esofágicas, hipertensión portal, ascitis, encefalopatía, etc., por lo que se requiere

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Victoria Chagoya-de Sánchez. Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México. Tel.: (52 55) 5622 5614, Fax: (52 55) 5622 5611. Correo electrónico: vchagoya@ifc.unam.mx

hospitalización de los pacientes, con el consecuente impacto en el costo de los institutos de salud.

La etiología de la cirrosis es muy diversa. Las causas más frecuentes son el alcoholismo y el daño hepático crónico secundario debido a infección por virus de hepatitis B o C. Son menos frecuentes la cirrosis biliar y la cirrosis autoinmune, complicación de insuficiencia cardiaca congestiva, encontrándose no pocos casos de cirrosis criptogénica de etiología a determinar y que se ven en las autopsias.⁶

El hígado es un tejido anatómicamente heterogéneo, organizado en zonas de tamaño y forma irregular denominadas acinos. Posee diferentes tipos de células como los hepatocitos, las células endoteliales, ovales, biliares, de Kupffer, de Pit y las estelares⁷ (HSC sus siglas en inglés Hepatic Stellate Cell). Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas de 30 a 40 μm de diámetro, altamente polarizadas que constituyen el 70% del parénquima hepático cuya función es principalmente metabólica. Están dispuestos en cordones o hileras que conectan las diferentes zonas. El espacio entre hilera e hilera se denomina sinusoides hepáticos mientras que el espacio entre hilera y endotelio se conoce como espacio de Disse (Figura 1). El complejo formado por los hepatocitos, capilar de la arteria hepática, capilar porta, conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios, forma la llamada triada o espacio porta. La conjunción del espacio porta con la vénula hepática constituye el acino.⁷

El tejido libre de células constituye el 20% del volumen hepático y está constituido por la MEC, formada principalmente por colágena. El hígado normal presenta diversos tipos de colágenos fibrilares (I, III, V) y las no fibrilares (IV, VI y XIV).^{8,9} En menor proporción, existen otros componentes como la fibronectina, la laminina, la elastina, los proteoglicanos y los glucosaminoglicanos.^{10,11}

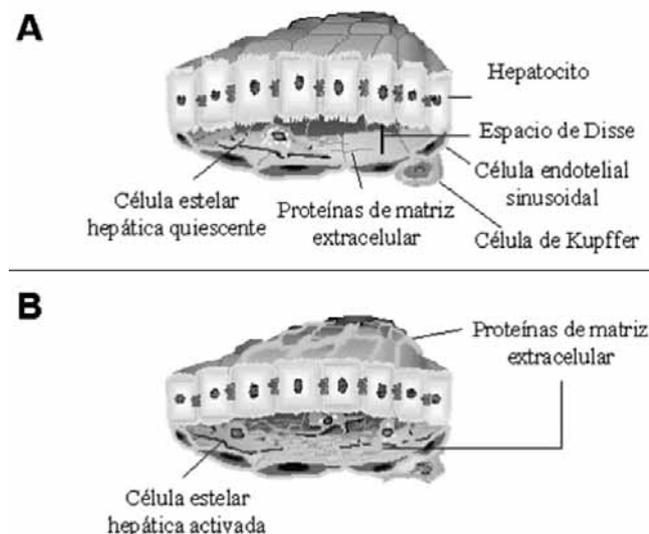


Figura 1. Representación de las poblaciones celulares hepáticas: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida por CCl₄.

Además de su estructura compleja, el hígado tiene una intensa y diversa actividad bioquímica. Así, dentro del metabolismo de carbohidratos, el hígado regula los niveles de glucosa en la sangre, almacenando, sintetizando y degradando el glucógeno; en el metabolismo de lípidos, sintetiza el colesterol, las lipoproteínas, los fosfolípidos y la oxida grasas y genera los cuerpos cetónicos.

El papel del hígado es importante en el metabolismo proteico ya que sintetiza las proteínas de la sangre entre las cuales figuran la albúmina y los elementos necesarios para la coagulación sanguínea. También es el único tejido que sintetiza la urea como mecanismo de eliminación del residuo nitrogenado de los aminoácidos. Este órgano sintetiza las bases nitrogenadas como purinas y pirimidinas y las distribuye al resto de los tejidos.¹²

Tiene funciones específicas como el almacenamiento de materiales de reserva, vitaminas, hierro, sangre, como la secreción de la bilis y la eliminación de la circulación los eritrocitos dañados; su papel es fundamental en el proceso de detoxificación de los compuestos endógenos tóxicos como el amonio y exógenos como las sustancias tóxicas y los medicamentos, transformándolos en compuestos fácilmente eliminables.

Dentro de este complejo sistema de confluencia estructural y bioquímica, cada población celular o componente de la MEC cumple con su papel para alcanzar la homeostasis que mantenga la estructura y la función del tejido hepático. A este equilibrio, contribuyen diversos metabolitos, citocinas y factores de crecimiento producidos en el hígado o fuera de él que preservan la comunicación célula-célula, célula-MEC y regulan la expresión de los genes responsables de la conservación de la estructura y la función del tejido hepático.¹⁰

Las alteraciones del equilibrio mantenido por la homeostasis pueden favorecer una respuesta regenerativa y por ende la restauración del órgano. Por ejemplo, después de una lesión aguda intensa en la que hay destrucción de células y se detecta disminución de su capacidad funcional, se induce la regeneración hepática. Esto implica proliferación inicial de hepatocitos, seguida por un incremento de las células no parenquimatosas, y por la producción de los componentes normales de la MEC en proporción y distribución adecuadas. Al final del proceso regenerativo, se restablecen las interacciones y funciones generales de los componentes celulares que vuelven a sus condiciones basales.^{10,13,14}

Si por el contrario el daño es pequeño, repetitivo y crónico, los intentos de recuperación de la homeostasis serán insuficientes produciendo la enfermedad del órgano,¹³ y activando procesos como la fibrogénesis y la remodelación tisular que no son proporcionales al origen específico de la lesión hepática.

Durante esta respuesta fibrogénica, los componentes colagénicos de la MEC se incrementan en una proporción de tres a cinco, llegando el hígado a contener hasta seis veces más colágena y proteoglicanos lo que modifica su composición en comparación con un órgano sano.^{15,16} Los componentes no colagénicos como los proteoglicanos y las glucoproteínas (fibronectina, laminina, y tenascina) aumentan en menor proporción,¹⁷⁻¹⁹ lo que provoca alteración en la estruc-

tura y la función del hígado y su transformación en un tejido fibrótico con nódulos de regeneración del parénquima, dando lugar a la cirrosis.

Fundamentalmente, la respuesta fibrótica del hígado es la misma independientemente del tipo de estímulo que la origine, pudiendo ser genético, metabólico, infeccioso, tóxico, inmunológico y colestásico. El daño tisular debe permanecer meses o años antes de la formación de una fibrosis significativa.

Los mecanismos que originan la cirrosis no se conocen bien a bien; sin embargo, existen características comunes:

- a) un daño tisular que frecuentemente se debe a estrés oxidativo.²⁰
- b) una movilización de células inflamatorias que liberan citocinas reguladoras de la respuesta, contribuyendo a la activación y proliferación de las células efectoras (HSC).^{21,22}
- c) una vez activadas, las células HSC adquieren un fenotipo colagénico en el que se incrementa la biosíntesis de la colágena y de los inhibidores específicos de las colagenasas (TIMP-1 y TIMP-2).^{20,23}

La respuesta inflamatoria asociada al daño tisular juega un papel importante en el desarrollo de la cirrosis favoreciendo el proceso fibrogénico. Este proceso puede también desencadenarse en ausencia de inflamación evidente como ocurre durante la acumulación de metales, hierro o cobre, lo que llega a alterar la homeostasis del tejido, originando la cirrosis en ausencia de daño hepatocelular evidente como sucede en la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson.²⁴

A pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, no existe un tratamiento curativo para estos padecimientos. Las estrategias terapéuticas están encaminadas al manejo paliativo que retrasa la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis y consiste principalmente en dietas con bajo contenido de grasas y en suplementos vitamínicos. Se han usado algunos medicamentos antifibróticos que tienen efectos colaterales como gastritis. El único tratamiento efectivo por el momento es el trasplante ortotópico del hígado con el cual se ha logrado sobrevivir de hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, sus desventajas son obvias; en efecto, todos los pacientes no son candidatos a trasplante, el procedimiento tiene un costo alto, la obtención de donadores es difícil y el tratamiento con inmunosupresores necesarios después del de la cirugía también son caros. Aunado a esto, existe alta posibilidad de reincidencia de la infección y de la fibrosis en el hígado trasplantado por cirrosis secundaria a infección por virus de hepatitis.

Los pacientes infectados con virus de la hepatitis C (HCV) desarrollan una hepatitis crónica recurrente; el 30% de ellos presenta fibrosis y el 10% cirrosis.²⁵ En casos específicos de infecciones virales de tipo C, se trata de evitar que el cuadro de hepatitis crónica evolucione a cirrosis intentando eliminar el virus con compuestos antivirales e interferones α y γ .

Una alternativa terapéutica muy promisoriosa para el tratamiento de esta enfermedad es el uso de un nuevo fármaco,

derivado del ácido aspártico y de la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP), llamado IFC305. Este compuesto tiene una vida media muy corta debido a su rápido metabolismo en el hígado; hasta el momento no se han observado efectos secundarios a las dosis y condiciones administradas.

La sustancia base de este compuesto, la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP), es un nucleósido con actividad fisiológica en los sistemas nervioso central y cardiovascular, es un modulador metabólico y de la respuesta inmune. La mayor parte de las células poseen receptores de cuatro tipos A1, A2a, A2b y A3; puede penetrar a la célula por transporte facilitado.

A continuación se señalan algunos efectos farmacológicos del 6-ARP en la hepatotoxicidad aguda inducida por diversos tóxicos:

1. Prevención parcial del hígado graso.²⁶
2. Recuperación del estado energético normal, disminuido por los tóxicos.²⁷
3. Mantenimiento del equilibrio redox entre citosol y mitocondria.²⁸
4. Prevención de la necrosis inducida por CCl₄ (Tetracloruro de Carbono).²⁹
5. Evitación de la propagación de los radicales libres generados durante el metabolismo del CCl₄ (Tetracloruro de Carbono).³⁰
6. Control del flujo sanguíneo de la arteria hepática.³¹

Con base en estos antecedentes, se evaluó el efecto de este compuesto en un modelo de cirrosis experimental inducido por administración crónica de CCl₄.³² Se encontró que previene parcialmente la fibrosis inducida por el tóxico, inhibe en un 50% el depósito de colágena, preserva el contenido de glucosaminoglicanos, aumenta la actividad de la colagenasa, normaliza el estado funcional del hígado, protege la estructura y la función de las mitocondrias e induce un aumento de la proliferación hepática disminuida en el hígado cirrótico.

Reversión de la cirrosis experimental

A medida que avanza el conocimiento de los mecanismos que desencadenan esta patología, se mantiene latente el interés de muy diversos grupos de investigación por revertir la cirrosis. Con base en los resultados antes mencionados, nos planteamos la posibilidad de probar, en un modelo experimental, el efecto de la 6-ARP y de una serie de sus derivados en el tratamiento, de la cirrosis provocada por la administración crónica de CCl₄. Se seleccionó el derivado más activo, el aspartato de adenosina que se denominó IFC-305. Se obtuvieron resultados fueron muy semejantes a los que se lograron con 6-ARP.

Métodos

La inducción de la cirrosis y el tratamiento se describieron en detalle con anterioridad.³² En resumen, se inyectaron por vía Lp unas ratas Wistar macho de 100 g tres veces a la semana con una pequeña dosis de CCl₄ (Tetracloruro de carbono)

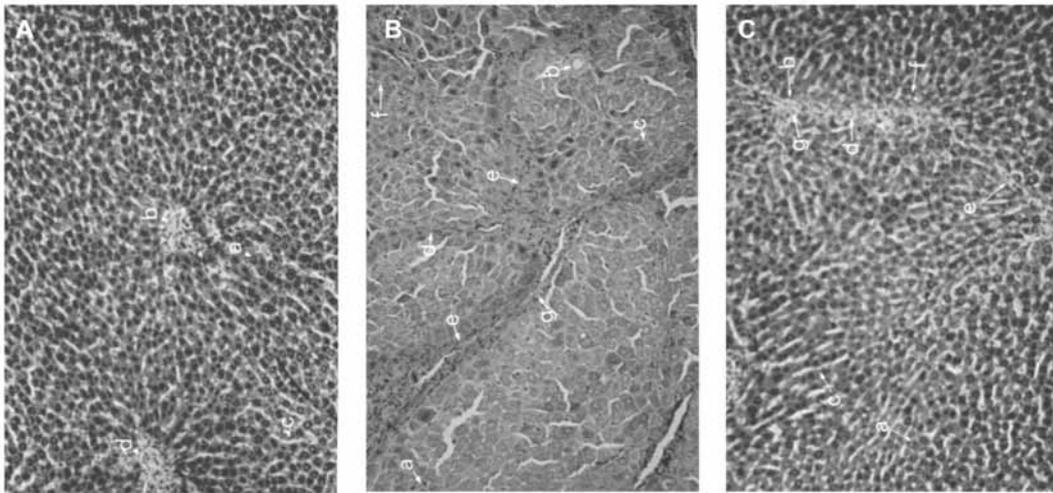


Figura 2. Evaluación histológica por microscopia de luz y tinción de Masson de: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida por CCl₄ y tratamiento posterior con salina por 5 semanas, C) hígado con cirrosis inducida con CCl₄ y tratamiento con 6-ARP por 5 semanas.

durante 10 semanas, provocando una cirrosis micronodular, muy similar a la cirrosis humana.³³ Se trabajó con 6 grupos experimentales:

1. un grupo control, sin ningún tratamiento;
2. un grupo control de cirrosis (TO) con animales tratados con el tóxico durante 10 semanas;
3. después de suspender la administración del tóxico y de separar los animales cirróticos del grupo TO, se dividen el resto de los animales en 4 grupos. Dos de ellos reciben tratamiento con administración por vía intraperitoneal de 6-ARP o IFC-305 (50 mg/kg) 3 veces por semana durante 5 o 10 semanas. Los otros 2 grupos fueron inyectados con salina.

Se sacrificaron los animales a tiempos predeterminados y se procedió al análisis histológico, fijando una muestra de tejido en formaldehído para la obtención de cortes con tricrómica de Mason y/o tejido bioquímico en suero, midiendo transaminasa glutámica pirúvica (ALT), albumina y bilirrubina como se describió previamente.³² Se evaluó en el tejido los niveles de colágena³² que se cuantificó de acuerdo con Roj-kind and González.³⁴ La actividad colagenolítica se determinó con la técnica descrita por Pérez-Tamayo et al.³⁵ La actividad proliferativa se calculó midiendo el índice mitótico que corresponde al promedio de células en mitosis en 10 campos por muestra observadas con el objetivo 40X. La actividad de la timidina cinasa se midió con la técnica de Sayer y Willmanns.³⁶ Las metaloproteinasas y sus inhibidores (TIMP's) se determinaron por técnicas de Western blot, utilizando anticuerpos policlonales de cabra de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

En la figura 2, se presentan una micrografía de hígado normal, una de hígado dañado después de 10 semanas de

tratamiento con el tóxico y otra de una preparación de un hígado que recibió tratamiento.

En nuestro modelo experimental, el hígado cirrótico se caracteriza por un incremento de 5 veces de su contenido de colágena, nivel que se mantiene después de 6 meses de discontinuar la administración del tóxico (no se muestra). En estos animales cirróticos, el tratamiento con adenosina promueve una disminución del 70% de la colágena acumulada (Figura 3).

Estudiando el metabolismo de la colágena en el hígado de ratas cirróticas, se evaluó el proceso de síntesis y degra-

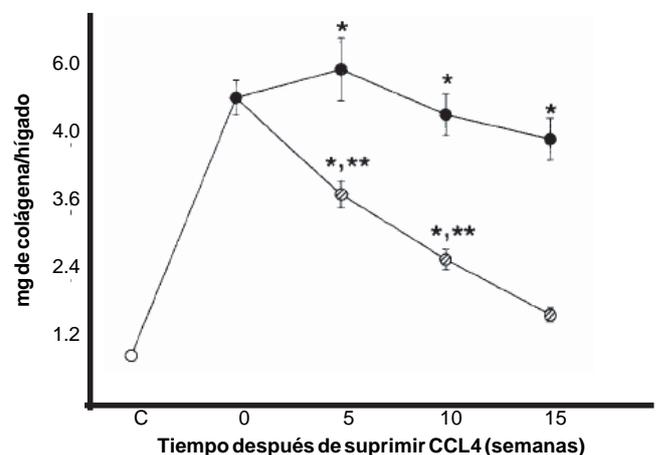


Figura 3. Efecto del tratamiento con 6-ARP en el contenido de colágena hepática en el grupo control de animales cirróticos más salina y el grupo de animales cirróticos tratados con 6-ARP. Los valores representan el promedio \pm EE de 7 animales de cada grupo. Significancia estadística * $p < 0.01$ vs. grupo control; ** $p < 0.01$ animales cirróticos vs animales cirróticos tratados con 6-ARP.

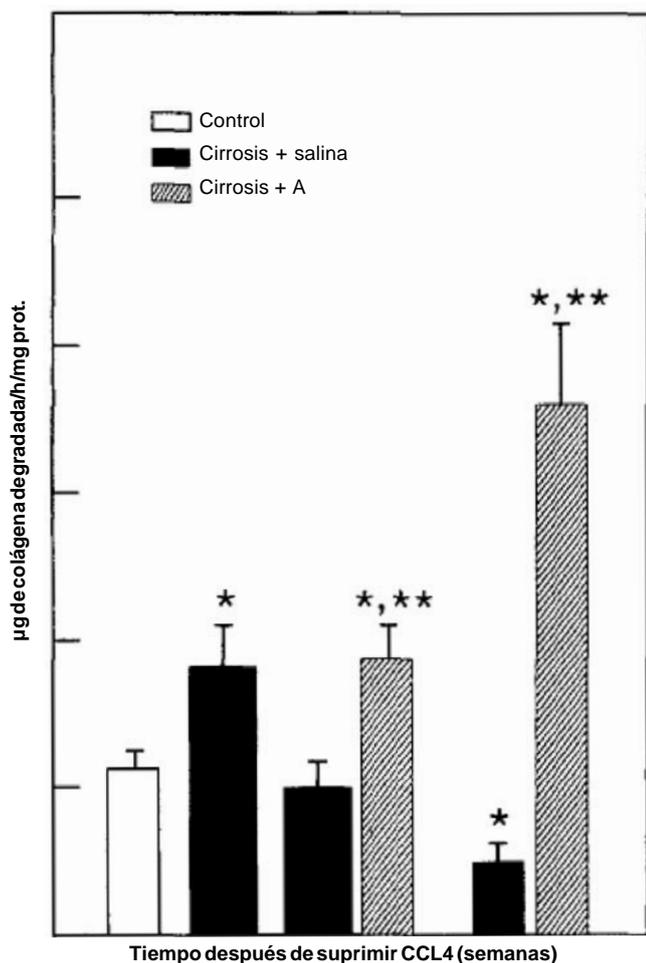


Figura 4. Efecto del tratamiento con 6-ARP en la actividad colagenolítica en el hígado de ratas cirróticas. Los resultados representan el promedio \pm EE de 7 animales por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

dación de esta proteína. Durante 10 semanas de tratamiento con CCl4 y el desarrollo del proceso crigénico, la síntesis de la colágena aumentó en cuatro veces (no se muestra). Al evolucionar el proceso cirrótico en ausencia del inductor y compararlo con los animales cirróticos que fueron tratados con 6-ARP, no se detectaron diferencias significativas (no se muestra) que sugieran que la disminución de la colágena se explica por un aumento en su degradación. La actividad colagenolítica se muestra en la figura 4. Sin tratamiento de la cirrosis, se observa una importante disminución de la actividad colagenolítica mientras se nota un incremento de dos a cuatro veces después de 5 y 10 semanas de tratamiento con adenosina respectivamente.

Las proteinasas que degradan la MEC pertenecen a la familia de las metaloproteinasas, que se caracterizan por tener un átomo de zinc en el centro activo de la enzima. Las metaloproteinasas más importantes que participan en la degradación de la MEC del hígado cirrótico son la MMP-13, MMP-2, MMP-1 y sus actividades están moduladas por la

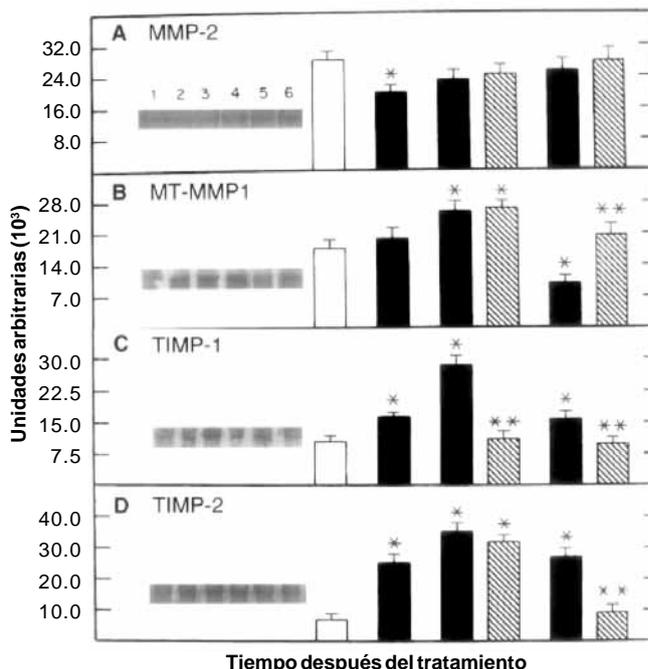


Figura 5. Efecto del tratamiento con 6-ARP en los niveles titulares de metaloproteinasas y de sus inhibidores tisulares (MMP-2, MMP-1, TIMP-1, TIMP-2) en el hígado de ratas cirróticas, estimados por la técnica de Western Blot. Las ratas cirróticas fueron tratadas con salina y tratadas con 6-ARP. Los valores representan el promedio \pm EE de 5 animales por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

presencia de inhibidores tisulares específicos llamados TIMP-1 y TIMP-2, del inglés tissue inhibitor of metalloproteinases. En la figura 5, se muestra la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores. Con el tratamiento con el nucleósido no se notan cambios significativos en la expresión de MMP-2 pero sí en la expresión de MMP-1 a las 10 semanas de tratamiento y en las expresiones de TIMP-1 y TIMP-2, lo cual nos indica que el incremento en la actividad colagenolítica se explica por la disminución de los inhibidores específicos. Los resultados sugieren que, a través de estos efectos, es la manera de recuperar la actividad colagenolítica disminuida en el hígado cirrótico.

En forma simultánea con esta recuperación estructural, con la cuantificación de los niveles de albúmina, bilirrubina y transaminasas, es manifiesta una clara recuperación de la función hepática (Cuadro I) y, a partir de las 5 semanas del tratamiento, se observa una evidente normalización de los valores. Estos resultados sugieren que hay recuperación integral de la estructura y de la función del tejido hepático después de un tratamiento con 6-ARP. Sin embargo, una de las características muy importante del hígado es su propia capacidad de regeneración.

Esta capacidad se evaluó midiendo el índice mitótico y la actividad de la timidina cinasa (Tk) que es una enzima limitante de la biosíntesis de ADN; los resultados se presentan en la figura 6. El hígado de las ratas controles es un tejido

Cuadro I. Efecto del tratamiento con adenosina en parámetros séricos indicativos de la función hepática

Tratamiento	ALT (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Bilirrubina (mg/dL)
Control (5 a 10)	53 ± 3	4.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Cirrosis + salina			
Tiempo 0	238 ± 35*	1.6 ± 0.1*	1.6 ± 0.2*
Después de 5 semanas	277 ± 45*	3.4 ± 0.3*	1.3 ± 0.2*
Después de 10 semanas	65 ± 8	3.5 ± 0.3*	0.76 ± 0.1
Cirrosis + adenosina			
Después de 5 semanas	86 ± 9**	4.5 ± 0.2**	0.7 ± 0.1**
Después de 10 semanas	42.5 ± 5**	4.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1

ALT = transaminasa de alanina; los resultados expresan el promedio ± ES de 7 determinaciones individuales.

* grupo control ($p < 0.01$) ** contra grupo cirrótico + salina ($p < 0.01$).

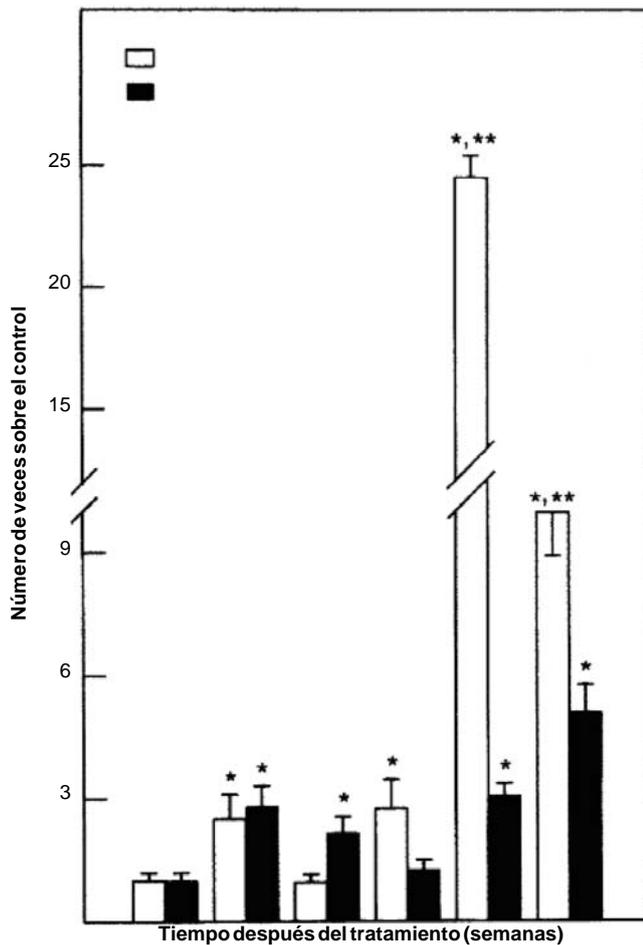


Figura 6. Efecto de 6-ARP en la actividad proliferativa de ratas cirróticas, evaluada por el índice mitótico (promedio de la actividad de timidina quinasa en citosol hepático). Los valores representan el promedio ± EE de veces sobre el control (Valor control $0.22 \pm \text{nmols de } [^3\text{H}]\text{-TMP/h/mg proteína}$) de 6 experimentos por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

quiescente que induce su capacidad regenerativa al verse dañado; el daño inducido durante el proceso cirrótico promueve una capacidad regenerativa pobre que disminuyó aun más a lo largo de las 5 o 10 semanas de evolución. En forma sorprendente, el tratamiento con el nucleósido aumentó de manera importante el índice mitótico y la actividad de la Tk.

En conclusión, constatamos, en nuestro modelo de cirrosis experimental, que la administración del nucleósido 6-ARP o su derivado IFC-305 revierte la cirrosis y la disfunción hepática consecuente, reestableciendo el potencial proliferativo del hígado. Estos hallazgos nos ofrecen un potencial terapéutico importante en pacientes con cirrosis.

Los resultados de estos estudios señalan que el compuesto se metaboliza activamente en el hígado y no muestra toxicidad ni efectos colaterales a la dosis y vía de administración usadas. Su administración favorece la recuperación de la función hepática y la disminución de las reacciones adversas de la enfermedad, evita su progresión e induce una reestructuración lenta pero progresiva de la arquitectura del tejido hepático.

Perspectivas

Los caminos por seguir son los siguientes:

1. Continuar con la investigación básica para ahondar en el conocimiento los mecanismos que se desencadenan durante el proceso cirrótico y para saber cuales se ven modificados por la administración del compuesto ya que por la heterogeneidad del tejido hepático y la complejidad de esta patología, estos mecanismos son difíciles de conocer. Los resultados pueden ser muy interesantes al aportar información sobre los procesos genéticos y moleculares que desencadenan esta patología y la forma de revertirlos, abriendo la oportunidad de mejorar el presente y de diseñar nuevos fármacos más eficaces.
2. Buscar la posibilidad de aplicación de este hallazgo en

el tratamiento de la cirrosis. Esta posibilidad implica una serie de estudios farmacológicos de toxicidad en diversas especies animales y en humanos en relación con vías de administración, dosis, acción del compuesto en el órgano blanco (en este caso en el hígado), efectos colaterales, etc.

3. Tener un proyecto clínico piloto autorizado por la Secretaría de Salud y el Comité de Ética en pacientes cirróticos.
4. Realizar un desarrollo farmacéutico con algún laboratorio interesado en el fármaco. En este caso la empresa Probiomed está interesada en participar en este desarrollo, terminando los estudios y pruebas clínicas y realizando las pruebas de estabilidad médica necesarias para realizar los trámites en la Secretaría de Salud.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo en la investigación del Instituto de Fisiología Celular UNAM con la participación de la Biol. Susana Vidrio, la QFB Lucía Yáñez, M en C Lidia Martínez; el Sr. Juan Manuel Barbosa (Unidad de Computo), y el M en C Rodolfo Paredes (Unidad de Microscopia) así como del Instituto de Cardiología Ignacio Chávez con el Dr. Alberto Aranda y la Dra. María Lilia Loreda. Agradecemos también el apoyo secretarial de la señorita Rosario Villaseñor Ávila; el apoyo clínico del Dr. Norberto García García; y el apoyo financiero de DGAPA (IN206195, IN2123997, IN226199) y de CONACyT 41433-0. También agradecemos a Corporativa de Fundaciones, A.C., a Laboratorios Sophia, al Ing. Jaime Uribe, Director General de Probiomed y al Dr. Carlos Robles, Director de Planeación de Probiomed.

Referencias

1. **Laennec R.** Traité de l'auscultation médicale. Chaude, Paris, France, 1826, pp 196.
2. **Conn HO, Atterbury CE.** Cirrhosis. En: Diseases of the liver. Schiff L, Schiff ER (Eds.). 7a. Edición, Philadelphia, EUA, 1993, pp 815-934.
3. **Anthony PP, Ishak KG, Nayac NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.** The morphology of cirrhosis: Definition, nomenclature and classification. Bull World Health Organ 1977;55:521.
4. **Pineda-Corona BE.** Epidemiología de la hepatopatía alcohólica. En: Enfermedad hepática por Alcohol. Encuesta Nacional de Adicciones 1993, pp 1-5.
5. **Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seff LB.** Diagnosis and monitoring of hepatic injury. 1. Performance characteristics of laboratory tests. Clin Chem 2000 46:2027-2049.
6. **Crawford JM.** Liver cirrhosis. En: Pathology of the liver. Burt AD, Portmann BC, et al. (Eds.) Mac Sween R.N.M. Churchill Livingstone, Edinburgh 2002, pp 576-577.
7. **Rappaport AM, Wanless IR.** Physioanatomic Considerations. En: Diseases of the liver. Schiff L, Schiff ER (Eds.). Lippincott Company, 7a. Edición, Philadelphia, EUA, 1993.
8. **Rescan PY, Loreal O, Hassell JR, Yamada Y, Guillouzo A, Clement B.** Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocytes culture. Am J Pathol 1993;142:199-208.
9. **Roskams T, Rosenbaum J, De Vos R, David G, Desmet V.** Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver disease. Hepatology 1992; 24:524-532.
10. **Rojkind M, Rojkind MH, Cordero-Hernández J.** In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regeneration rat livers. Collagen Rel Res 1983;3:335-347.
11. **Rojkind M, Mourelle M.** The liver is a Bioecological System: Modifications during Regeneration and Repair. En: Collagen Vol. II. Nimni ME (Eds) CRC Press Inc. Florida, EUA, 1988.
12. **Chagoya V.** Interrelaciones metabólicas entre tejidos. En: Bioquímica. Herrera E (Eds.) Emalsa S.A. 1986, pp 1183-1194.
13. **Rockey DC.** Pathophysiology of Liver Disease. Clinics in Liver Disease 2000;4:1-36.
14. **Martínez-Hernández A, Amenta PS.** The extracellular matrix in hepatic regeneration. FASEB J 1995;9:1401-1410.
15. **Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L.** Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 1979;76:710-719.
16. **Gressner AM, Bachem MG.** Molecular mechanism of fibrogenesis – a homage to the role of activated fat-storing cells. Digestion 1995;56:335-346.
17. **Jezequel AM, Ballardini G, Mancini R, Paolucci F, Bianchi FB, Orlandi F.** Modulation of extracellular matrix components during dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. J Hepatol 1990;11:206-214.
18. **Maher JJ, McGuire RF.** Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. J Clin Invest 1990;86:1641-1648.
19. **Van Eyken P, Geerts A, De Bleser P, Lazou JM, Vrijsen R, Sciort R, et al.** Localization and cellular sources of the extracellular matrix proteins tenascin in normal and fibrotic rat liver. Hepatology 1992;15:909-916.
20. **Wyler DJ, Stadecker MJ, Dinarello ChA, O'Dea JF.** Fibroblast stimulation in Schistosomiasis. Egg Franuloma macrophages spontaneously secrete a fibroblast stimulating factor. J Immunol 1984;132:3142-3148.
21. **Wyler DJ, Wahl SM, Wahl LM.** Hepatic fibrosis and schistosomiasis egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. Science 1978;202:438-440.
22. **Arthur MJP.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physio Gastrointest Liver Physiol 2000;279:G245-G249.
23. **Rojkind M, Greenwel P.** Pathophysiology of liver fibrosis. En: Oxford Textbook of Clinical Hepatology. McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzeto M, Rode J (Eds.) Oxford Medical Publication. New York, EUA, 1991, pp 375-380.
24. **Chojkier M, Brenner DA.** Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. Hepatology 1988;8:176-182.
25. **Chagoya-de Sánchez V, Brunner A, Piña E.** In vivo modification of the energy charge in the liver cells. Biochem Biophys Res Commun 1972;46: 1441-1445.
26. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Santamaría A, Chagoya-de Sánchez V.** Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. Biochem Pharmacol 1979;28:1409-1413.
27. **Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sainz JA, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. Arch Biochem Pharmacol 1978;190:155-162.
28. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** Effects of adenosine in ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox-state, purine and fatty acid metabolism. Biochem Pharmacol 1980;29:1709-1714.
29. **Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, García-Sainz JA, Chagoya-de Sánchez V.** Effect of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 1984;33:2599-2604.
30. **Chagoya-de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Yañez L, Vidrio S, Díaz-Muñoz M.** Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. J Biochem Toxicol 1995;10:41-50.
31. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** Effects of adenosine in ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox-state, purine and fatty acid metabolism. Biochem Pharmacol 1980;29:1709-1714.
32. **Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, García-Sainz JA, Chagoya-de Sánchez V.** Effect of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 1984;33:2599-2604.
33. **Pérez-Tamayo R.** Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄. Hepatology 1983;3:112-120.
34. **Rojkind M, González E.** An improved method for determining specific radioactivities of praline-14C in collagen and noncollagenous proteins. Anal Biochem 1974;57:1-7.
35. **Pérez-Tamayo R, Montfort I, González E.** Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. Exp Mol Pathol 1987;47:300-308.
36. **Sauer H, Willmanns W.** Thymidine kinase. En: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU, Bergmeyer J (Eds.) Verlag Chemie. Deefield Beach, Florida, EUA, 1983. pp 468-473.