

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE UN FÁRMACO PARA EL TRATAMIENTO DE LA CIRROSIS

VICTORIA CHAGOYA-DE-SÁNCHEZ, JUAN ANTONIO SUÁREZ-CUENCA
Y ROLANDO HERNÁNDEZ-MUÑOZ

*Depto. de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM. C.P. 04510, México D.F. E-mail: vchagoya@ifc.unam.mx*

RESUMEN

La cirrosis es una de las causas más comunes de muerte en el mundo ya que la disfunción hepática conduce a una condición letal. Su etiología es diversa y no existe un tratamiento efectivo para prevenir o revertir esta patología, sin embargo, el riesgo de complicaciones como sepsis, peritonitis, sangrados e hipertensión y desarrollo de carcinoma hepático aumenta. En esta nota describimos brevemente las características estructurales y funcionales del tejido hepático normal comparándolas con los cambios que ocurren a lo largo del desarrollo de esta patología. Comentamos el trabajo que hemos realizado en el laboratorio en un modelo experimental de hepatotoxicidad aguda y crónica usando al nucleósido adenosina como hepatoprotector. A través de sus efectos antifibrogénicos en el metabolismo de colágena estimula su degradación al disminuir los inhibidores y favorece la recuperación de la función hepática, principalmente su capacidad de regeneración. También comentamos aspectos importantes y necesarios que permitan la aplicación de estos hallazgos de investigación básica a un modelo experimental de pacientes con este padecimiento y enumeramos una serie de estudios de tipo farmacológico que permitirán la aplicación de este compuesto a pacientes.

Palabras Clave: Aplicación farmacéutica, cirrosis, colágena, hepatotoxicidad, inhibidores de metaloproteinasas.

ABSTRACT

Cirrhosis is one of the most common causes of mortality worldwide because hepatic dysfunction constitutes a potentially lethal condition. Its etiology is variable and there's no treatment for prevention or regression of the pathology. But there is an increased risk of sepsis, bacterial peritonitis, variceal bleeding, portal hypertension and development of hepatocellular carcinoma. This document briefly describes the structure and functions of the normal liver in comparison to the cirrhotic liver. Our experience regarding the studies of acute and chronic experimental hepatotoxicity using the nucleoside adenosine as an hepatoprotector is commented. The antifibrogenic effect of this compound increases collagen degradation through decreasing liver TIMPs levels, favoring normalization of liver function mainly by the promotion of hepatocyte proliferation. Comments on important aspects needed to promote the application of these findings in the experimental model to cirrhotic patients are presented as well. Some pharmacological and toxicological studies which lead us to the human use of this compound are also discussed.

Key Words: Pharmaceutical applications, cirrhosis, collagen, hepatotoxicity, tissue inhibitors metalloproteinases.

INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano más grande del organismo, pesa en promedio 1.5 kg y se le considera como el laboratorio del mismo, desarrollando más funciones que ningún otro órgano, siendo una de ellas muy importante, la capacidad de regenerarse.

El hígado es un tejido heterogéneo anatómicamente, organizado en zonas de tamaño y forma irregular denominadas acinos. Posee diferentes tipos de células: hepatocitos, células endoteliales, células ovales, células biliares, células de Kupffer, células de Pit y células estelares (HSC, por 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, su función es

principalmente metabólica. Están dispuestos en cordones o hileras que conectan las diferentes zonas. El espacio entre hilera e hilera se le denomina sinusoides hepáticos mientras que el espacio entre hilera y endotelio se le conoce como espacio de Disse. El complejo formado por hepatocitos, capilar de la arteria hepática, capilar porta, conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios, forman la llamada triada o espacio porta. La conjunción del espacio porta con la vénula hepática constituye el acino¹.

Las células endoteliales revisten el endotelio vascular y son muy activas en endocitosis y en la formación de especies reactivas de oxígeno.

Las células de Kupffer y de Pit están relacionadas con el sistema inmune, siendo las primeras muy activas en fagocitosis en la región portal, la liberación de citocinas y en citotoxicidad en la región centrolobulillar². Las HSC, también llamadas lipocitos o células de Ito, se caracterizan por almacenar vitamina A y se les considera factores importantes en la regulación del metabolismo de la matriz extracelular (MEC).

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 colágenas fibrilares (I, III y V) y las no fibrilares (IV, VI y XIV)^{3,4}. Existen otros componentes en menor proporción como la fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos^{5,6}.

Independientemente de la estructura compleja que acabamos de bosquejar, está su intensa y diversa actividad bioquímica⁷. Así, dentro del metabolismo de carbohidratos, el hígado regula los niveles de glucosa en sangre almacenando, sintetizando y degradando el glucógeno; en el metabolismo de lípidos sintetiza colesterol, lipoproteínas y fosfolípidos; oxida grasas y genera cuerpos cetónicos. Respecto al metabolismo proteico el hígado tiene un papel importante ya que sintetiza proteínas de la sangre entre las que figuran la albúmina y factores necesarios para la coagulación sanguínea; además, es el único tejido que sintetiza urea como mecanismo de eliminación del residuo nitrogenado de los aminoácidos. Este órgano sintetiza bases nitrogenadas como purinas y pirimidinas, distribuyéndolas al resto de los tejidos de la economía⁸. Tiene funciones específicas como las de almacenar material de reserva, vitaminas, hierro, sangre, forma y secreta la bilis, elimina de la circulación los eritrocitos dañados y es fundamental para el proceso de detoxificación de compuestos endógenos tóxicos como el amoníaco y compuestos exógenos como sustancias tóxicas y medicamentos transformándolos en compuestos fácilmente eliminables.

Dentro de este complejo sistema de confluencia estructural y bioquímica, cada población celular o componente de la MEC tienen un papel que cumplir para alcanzar la homeostasis que mantenga la estructura y la función del tejido hepático. Contribuyen a este equilibrio diversos metabolitos, citocinas y

factores de crecimiento producidos en el hígado o fuera de él, que mantienen la comunicación célula-célula, célula-MEC y regulan la expresión de genes responsables de mantener la estructura y función del tejido hepático⁵.

LA CIRROSIS

Históricamente, las alteraciones estructurales causadas por esta enfermedad fueron detectadas desde 1761 por el patólogo Gianbattista Morgagni, que en un reporte de 500 autopsias describió las alteraciones morfológicas del hígado similares a las reportadas en la cirrosis. En 1826 Laennec al describir esta patología la llama por primera vez “cirrosis”, por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se le llama *kirrhos* y en su monografía clásica comenta⁹:

“El hígado reduce una tercera parte su tamaño ordinario....., parece estar compuesto por multitud de pequeños gránulos redondos u ovoides.... estos granos son fácil de separar uno de otro, mostrando entre ellos ningún lugar en el que se pueda distinguir algún remanente de tejido hepático propiamente dicho.... el resto da al tacto una sensación de una pieza de cuero suave”⁹.

Los primeros intentos para entender esta patología datan de 1930 en que Roessle la sugiere como un proceso degenerativo, hay cicatrización de una lesión y proliferación del tejido. La cirrosis, actualmente continúa definiéndose en términos morfológicos; la definición más aceptada se estableció en 1977 por la Organización Mundial de la Salud, como “un proceso difuso caracterizado por fibrosis y transformación de la arquitectura normal del hígado a nódulos estructuralmente anormales”^{10,11}.

Actualmente, podemos definir a la cirrosis como una entidad patológica caracterizada por daño crónico e irreversible del parénquima hepático, presentando una fibrosis difusa con nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura lobular y vascular del tejido hepático originando una pérdida de la masa hepática funcional. La fibrosis resulta de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y degradación de las proteínas de la MEC, principalmente la colágena que es la proteína más abundante de esta estructura. La colágena se acumula por una disminución importante en su degradación, considerándose un proceso autopépetuable e irreversible.

La tasa de mortalidad por este padecimiento es elevada, considerándose como una de las diez principales causas de mortalidad a nivel mundial, originando 6,000 defunciones al año en el Reino Unido y 27,000 en Estados Unidos, augurando las estadísticas un incremento de 223% de muertes por cirrosis en el 2008 y de 360% en el 2028¹². En nuestro país en 1997 se reportaron 20,420 personas con este padecimiento, por lo que se puede considerar como una de las tres primeras causas de muerte entre la población económicamente activa, entre 40 y 60

años de edad, ocupando el séptimo lugar como causa de muerte en México¹³.

Este problema no sólo es social sino económico, ya que por lo general las últimas etapas de la enfermedad requieren la hospitalización de los pacientes aumentando el costo institucional.

La etiología de la cirrosis es muy diversa, las causas más frecuentes son el alcoholismo y el daño hepático crónico secundario a infección por virus de hepatitis B o C; menos frecuentes son la cirrosis biliar, cirrosis autoinmune, como complicación de insuficiencia cardiaca congestiva, encontrándose no pocos casos de cirrosis criptogénica de etiología a determinar y que se encuentran en autopsias¹⁴.

Las alteraciones del equilibrio que mantiene la homeostasis del hígado, pueden favorecer una respuesta regenerativa y, por ende, la restauración del órgano. Por ejemplo, después de una lesión aguda e intensa en que hay destrucción de células y se detecta la disminución de su capacidad funcional, se induce la regeneración hepática. Esto implica proliferación inicial de los hepatocitos, seguidos por un incremento de las células no parenquimatosas, aunado a la producción de los componentes normales de la MEC en proporción y distribución adecuadas. Al final del proceso regenerativo, los componentes celulares vuelven a condiciones basales con interacciones y funciones generales restablecidas^{5,15,16}.

Si por el contrario el daño es pequeño, repetitivo y crónico, los intentos por recuperar la homeostasis serán insuficientes conduciendo al órgano hacia la enfermedad¹⁵, activándose procesos tales como la fibrogénesis y la remodelación tisular, que no son proporcionales al origen específico de la lesión hepática.

Durante esta respuesta fibrogénica en el tejido hepático se observa un aumento de tres a cinco veces en los componentes colagénicos de la MEC, llegando a contener hasta seis veces más colágena y proteoglicanos, adquiriendo una composición y distribución distinta a la del órgano sano^{17,18}. En menor proporción aumentan los componentes no colagénicos como proteoglicanos y glucoproteínas como fibronectina, laminina, tenascina^{19,20,21}; lo que resulta en alteración de la estructura y función del hígado, transformándose en un tejido fibrótico con nódulos de regeneración del parénquima dando lugar a la cirrosis.

Básicamente, 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 mantenerse por meses o años antes de que se forme una fibrosis significativa.

Los mecanismos que originan la cirrosis no se conocen

completamente, sin embargo, se han encontrado características comunes en esta patología:

- a) Daño tisular que frecuentemente se debe a estrés oxidativo²².
- b) Movilización de células inflamatorias que liberan citocinas reguladoras de la respuesta contribuyendo a la activación y proliferación de las células efectoras (HSC)^{23,24}.
- c) Una vez activadas las células HSC, adquieren un fenotipo colagénico en el que se incrementan la biosíntesis de colágena y de los inhibidores específicos de las colagenasas (TIMP-1 y TIMP-2)^{22,25}.

La respuesta inflamatoria asociada al daño tisular tiene un papel importante en el desarrollo de la cirrosis favoreciendo el proceso fibrogénico. Aunque este proceso también puede desencadenarse en ausencia de inflamación evidente como durante la acumulación de metales como el hierro o el cobre que pueden alterar la homeostasis del tejido, originando la cirrosis en ausencia de daño hepatocelular evidente, como sucede en la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson²⁵.

ANTECEDENTES DIRECTOS

A pesar del avance del conocimiento de las enfermedades crónicas degenerativas del hígado, no existe un tratamiento que pueda considerarse curativo para estos padecimientos. Las estrategias terapéuticas están encaminadas al manejo paliativo que retrasa la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis y consisten predominantemente en dietas con bajo contenido de grasas y suplementos vitamínicos. Se han usado algunos medicamentos anti-fibróticos que tienen efectos colaterales como gastritis. El único tratamiento efectivo por el momento es el trasplante ortotópico del hígado que ha demostrado una supervivencia hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, sus desventajas son obvias; entre ellas, no todos los pacientes son candidatos a trasplante, el procedimiento es de alto costo, igualmente la obtención de donadores es difícil y el tratamiento con inmunosupresores necesarios después del trasplante también son de alto costo, existiendo por otra parte la posibilidad de re-infección y re-fibrosis del hígado trasplantado en aquellos pacientes con cirrosis secundaria a infección por virus de hepatitis.

Los pacientes infectados con virus de hepatitis C (HCV) desarrollan una hepatitis crónica recurrente, 30% presentan fibrosis y 10% cirrosis²⁶. En casos específicos de infecciones virales 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 de la adenosina y llamado (IFC305). Este compuesto tiene una vida media muy corta debido a su metabolismo rápido en el hígado y hasta el momento no se han observado efectos secundarios

a las dosis y condiciones administradas.

Desde 1967, nos hemos interesado en los efectos farmacológicos de la adenosina en el metabolismo hepático, encontrando que el nucleósido es capaz de aumentar la carga energética de los hepatocitos²⁷, efecto que puede participar y modificar los flujos metabólicos hepáticos. Aumenta la síntesis de glucógeno²⁸, e inhibe la oxidación de los ácidos grasos²⁹, mantiene el estado de óxido reducción de la célula. Como parte de estos mecanismos puede estar involucrada la modulación de la vasodilatación y vasoconstricción de los vasos hepáticos, lo que ha llevado a proponer este compuesto como regulador del flujo sanguíneo hepático³⁰.

Con base en estos antecedentes, se probó el efecto de este compuesto en modelos agudos de hepatotoxicidad, inducida por la administración de etanol o de tetracloruro de carbono (CCl_4) observándose una disminución en los efectos tóxicos evidenciados por una prevención de la necrosis celular y la infiltración grasa del hígado^{31,32,33}. Estos resultados sugirieron el probar su efecto en un modelo de hepatotoxicidad crónica como la cirrosis, la cual se indujo experimentalmente por el tratamiento crónico con CCl_4 en ratas. Los resultados obtenidos en este modelo de prevención de cirrosis con administración simultánea al tóxico de la adenosina, mostraron una disminución de la fibrosis inducida por el tóxico al inhibir en un 50% la acumulación de colágena en el tejido hepático, como resultado de un aumento en la actividad colagenolítica del hígado. Estos efectos se acompañaron de una mejoría impresionante de la función hepática recuperándose hacia valores semejantes a los de los animales controles³⁴⁻³⁹, observándose una normalización del metabolismo de colágena e induciendo un aumento en la proliferación hepática del hígado cirrótico. Estos hallazgos nos permitieron proponer un posible tratamiento para revertir esta patología en este modelo experimental de cirrosis.

REVERSIÓN DE LA CIRROSIS EXPERIMENTAL

El modelo de cirrosis inducida mediante la administración crónica del CCl_4 es quizá el mejor estudiado y por las características que presenta se le ha considerado como un modelo adecuado para el estudio de la cirrosis humana. Cuando se administra el tóxico por vía intraperitoneal tres veces por semana durante 4 semanas se produce una fibrosis reversible al discontinuar la administración del tóxico. Si se continúa la administración del tóxico por 8-10 semanas se induce un proceso prácticamente irreversible o muy lentamente reversible semejante a la cirrosis. El modelo experimental que utilizamos comprende 6 grupos: animales control sin tratamiento, animales con cirrosis experimental inducida por tratamiento con CCl_4 por vía i.p., 3 veces por semana, durante 10 semanas, luego se suspende el tratamiento con el tóxico y un pequeño grupo constituye el control de cirrosis llamado (T0). El resto de los animales se dividen en 4 grupos: dos reciben tratamiento y dos se dejan evolucionar libremente, sacrificándose a las 5 y 10 semanas

posteriores a la suspensión de la administración del tóxico⁴⁰.

En la Figura 1 (A, B) representamos un dibujo y una micrografía de un hígado normal y un hígado dañado en el que se aprecian lesiones histológicas que semejan los cambios en el hígado cirrótico humano. Estos hígados se caracterizan por un incremento de 5 a 7 veces el contenido de colágena, nivel que se mantiene aun después de 6 meses de discontinuar la administración del tóxico (Figura 2). En este hígado cirrótico, el tratamiento con adenosina promueve una disminución de la fibrosis casi del 70% (Figura 1-C y 2) induciendo así la reversión de una cirrosis establecida.

Una característica importante de la colágena acumulada a lo largo de la evolución de la cirrosis es el incremento de la colágena tipo I no así de la colágena tipo III, originando un aumento de la relación I/III, de 0.74 hasta 2.26, induciendo un cambio significativo en la composición de la MEC. El tratamiento con adenosina promueve la recuperación de la relación I/III alrededor de 1.0, normalizando la distribución de los tipos de colágena (Tabla I).

Estudiando el metabolismo de la colágena en el hígado de ratas cirróticas se evaluó el proceso de síntesis y degradación de esta proteína. La síntesis de colágena se evaluó midiendo la incorporación de prolina (U-C^{14}) a hidroxiprolina, en rebanadas de hígado, el detalle del proceso se describió previamente⁴⁰. Durante el desarrollo del proceso cirrogénico por 10 semanas de tratamiento con el CCl_4 se observó un incremento de cuatro veces en la síntesis de colágena. Al evolucionar el proceso cirrogénico en ausencia del inductor y compararlo con los animales cirróticos que fueron tratados con adenosina se detectan diferencias significativas (no se muestra) en cantidad y tipo de colágena, sugiriendo fuertemente que la disminución de la colágena tipo I ocurre por un aumento en su degradación. La actividad colagenolítica se determinó como se describió previamente⁴⁰ (Figura 3). Al evolucionar la cirrosis libremente se observa una importante disminución de la actividad colagenolítica, mientras que después del tratamiento con adenosina se observa un aumento de dos a cuatro veces a las 5 y 10 semanas de tratamiento, respectivamente.

Las proteinasas que degradan a la MEC pertenecen a la familia de las metaloproteininas, que se caracterizan por tener un átomo de zinc en el centro activo de la enzima. Las metaloproteininas más importantes que participan en la degradación de la MEC del hígado cirrótico, son la MMP-2 y MMP-1, su actividad está modulada por la presencia de inhibidores tisulares específicos llamados TIMP-1 y TIMP-2 del inglés tissue inhibitor of metalloproteinases. En la Figura 4 se muestran, la expresión de las metaloproteininas y sus inhibidores por la técnica de Western blot⁴⁰. El tratamiento con el nucleósido no modifica significativamente la expresión de MMP-2 y aumenta la expresión de MMP-1 a las 10 semanas de tratamiento, pero sí modifica

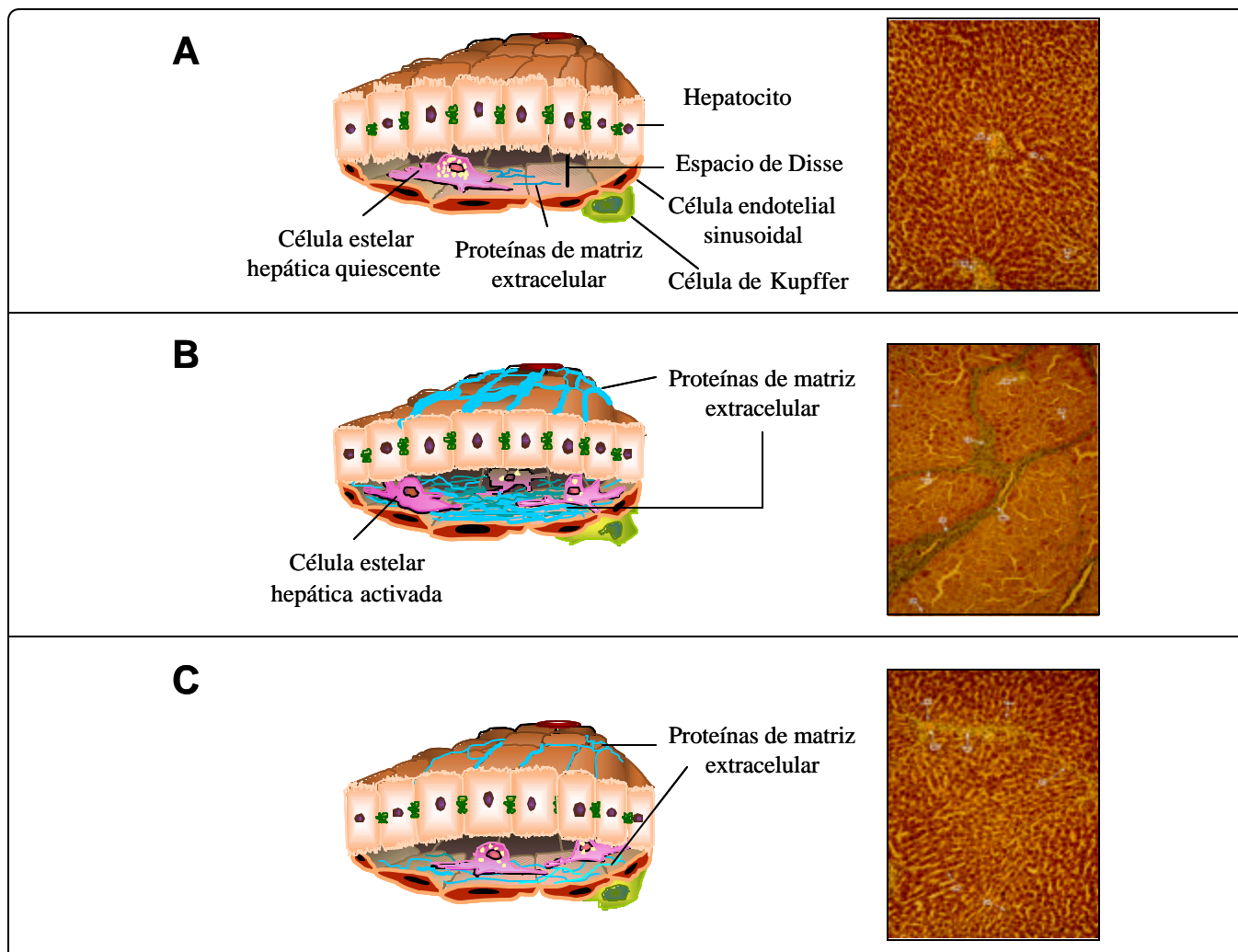


Figura 1. Izquierda representación de las poblaciones celulares hepáticas: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida con CCl_4 , C) hígado cirrótico tratado con adenosina. A la derecha: evaluación histológica por microscopía de luz y tinción de Masson de: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida por CCl_4 y tratamiento posterior con salina por 5 semanas, C) hígado con cirrosis inducida con CCl_4 y tratamiento con adenosina por 5 semanas.

Tratamiento (sem.)	Colágena Tipo I		Relación I/III
	Densitometría arbitraria (Unidades [$\times 10^{-3}$])		
Control (5 a 10)	17.6 ± 1.4	23.8 ± 2.8	0.74 ± 0.08
Cirrosis + salina Tiempo 0	$44.5 \pm 4.8^*$	$52.4 \pm 3.1^*$	0.85 ± 0.07
Después de 5 sem.	$68.4 \pm 10.2^*$	$47.8 \pm 4.5^*$	$1.43 \pm 0.14^*$
Después de 10 sem.	$70.9 \pm 12.7^*$	31.8 ± 4.4	$2.26 \pm 0.37^*$
Cirrosis + adenosina Después de 5 sem.	$28.7 \pm 3.4^{* \dagger}$	$28.2 \pm 4.2^\dagger$	1.02 ± 0.12
Después de 10 sem.	$22.9 \pm 4.2^\dagger$	20.4 ± 4.0	$1.12 \pm 0.20^\dagger$

Los resultados expresan promedio \pm ES de 7 determinaciones individuales. * $p < .01$ el grupo control. $\dagger p < \text{contra el grupo cirrótico} + \text{salina}$

Tabla I. Distribución de tipos de colágena en animales cirróticos y tratados con adenosina

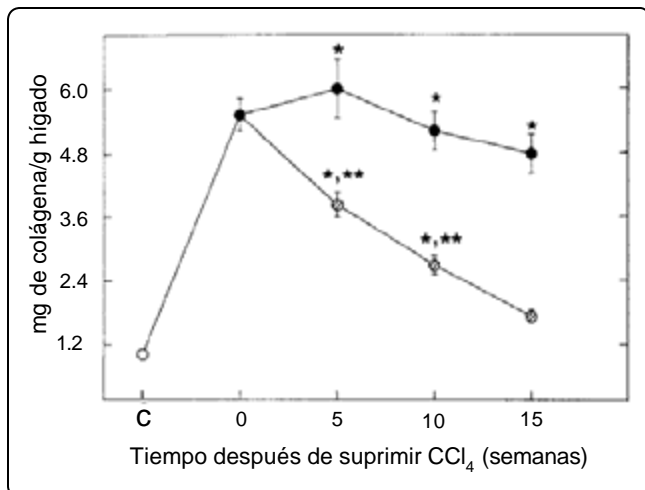


Figura 2. Efecto del tratamiento con adenosina en el contenido de colágena hepática en: o, grupo control, ●, animales cirrótico más salina y ◊, animal cirrótico tratado con adenosina. Los valores representan el promedio ± ES, de 7 animales de cada grupo. Significancia estadística *p< 0.01 vs. grupo control; **p< 0.01 animales cirróticos vs. animales cirróticos tratados con adenosina.

significativamente la expresión de los TIMPs 1 y 2, indicándonos que el aumento en la actividad colagenolítica se explica por la disminución de los inhibidores específicos sugiriendo que a través de estos efectos se recupera la actividad colagenolítica disminuida en el hígado cirrótico.

Simultáneo a esta recuperación estructural, observamos claramente una recuperación de la función hepática al cuantificar en el suero de estos animales los niveles de albúmina, bilirrubina y transaminasas (Tabla II). Observamos una clara normalización de los valores desde las 5 semanas del

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

ALT, transaminasa de alanina; los resultados expresan promedio ± ES de 7 determinaciones individuales. *p<.01 el grupo control. †p<.01 contra el grupo cirrótico + salina

Tabla II. Efecto del tratamiento con adenosina en parámetros séricos indicativos de la función hepática.

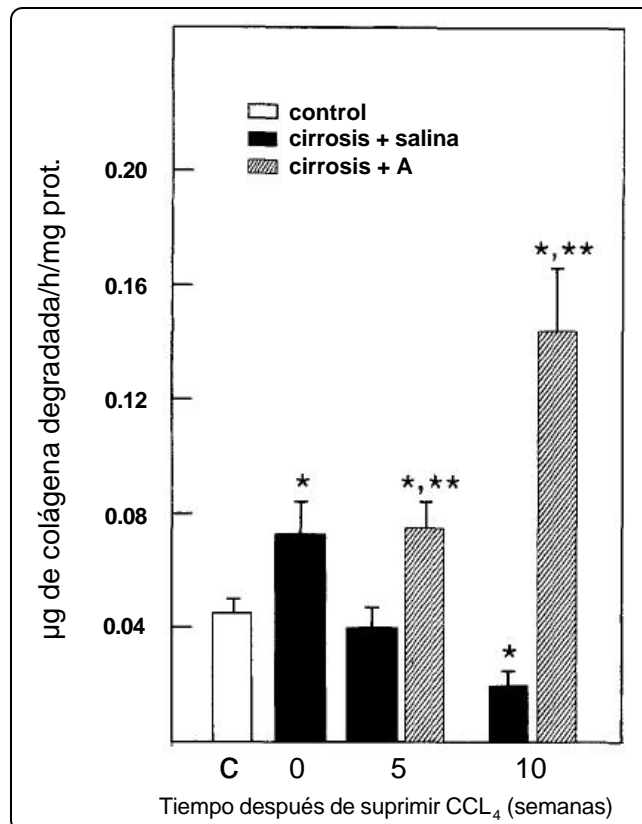


Figura 3. Efecto del tratamiento con adenosina en la actividad colagenolítica en el hígado de ratas cirróticas. Los resultados son el promedio ± ES de 7 animales por grupo. Significado estadístico como en la Figura 2.

tratamiento. Estos resultados nos sugieren fuertemente la recuperación integral de la estructura y la función del tejido hepático después del tratamiento con adenosina. Sin embargo, la función característica y muy importante del hígado es su capacidad de regenerarse.

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 5. El hígado de ratas controles es un tejido quiescente que induce su capacidad regenerativa al verse dañado, el daño inducido durante el proceso cirrogénico induce una capacidad regenerativa pobre que disminuye aún más a lo largo de las 5 ó 10 semanas de evolución, sorpresivamente el tratamiento con el nucleósido aumenta de manera importante el índice mitótico y la actividad de la Tk.

En resumen, vimos en nuestro modelo experimental de cirrosis que la administración del nucleósido adenosina revertía la cirrosis y la disfunción hepática consecuente, reestableciendo el potencial proliferativo del hígado por lo que estos hallazgos nos ofrecían un potencial terapéutico importante en pacientes con cirrosis.

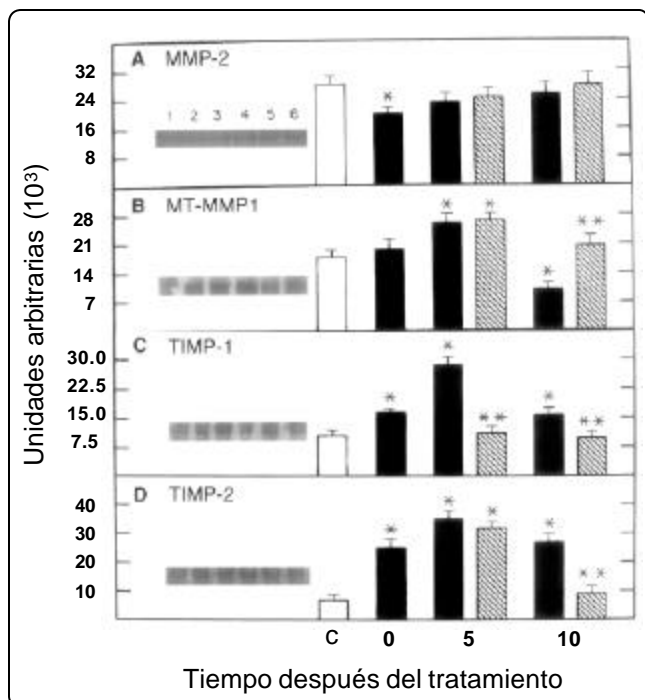


Figura 4. Efecto del tratamiento con adenosina en los niveles titulares de metaloproteinasa y de sus inhibidores tisulares (MMP-2, MMP-1, TIMP-1, TIMP-2) en el hígado de ratas cirróticas, estimadas por la técnica de Western blot. Ratas cirróticas tratadas con salina ●; tratadas con adenosina ○. Los valores son el promedio \pm ES de 5 animales por grupo. Significado estadístico como se indicó en la Figura 2.

APLICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La transferencia de un hallazgo obtenido en un modelo experimental en el laboratorio a un posible tratamiento en humanos es un gran paso, en el que hay que considerar aspectos éticos muy importantes y es un proceso largo que requiere reconsiderar dosis, vías de administración, tolerancia al compuesto, toxicidad inmediata y a largo plazo, genotoxicidad, aspectos farmacológicos como la farmacodinamia y farmacocinética del compuesto, diseño de un protocolo de estudio clínico experimental y la interacción con una empresa farmacéutica interesada en el producto, así como mecanismos de transferencia. Un aspecto importantísimo que debe respaldar todo esfuerzo de transformar un hallazgo de investigación básica en un producto útil a la sociedad, es patentar el producto en el Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual, para obtener la protección nacional y si es posible la internacional.

El incursionar en esa etapa de utilidad y transferencia de un compuesto está fuera de nuestra principal preparación y es de enorme utilidad el contar con el asesoramiento de expertos en las distintas áreas, así como los recursos financieros que permitan adquirir insumos, infraestructura necesaria, honorarios, becas, etc.

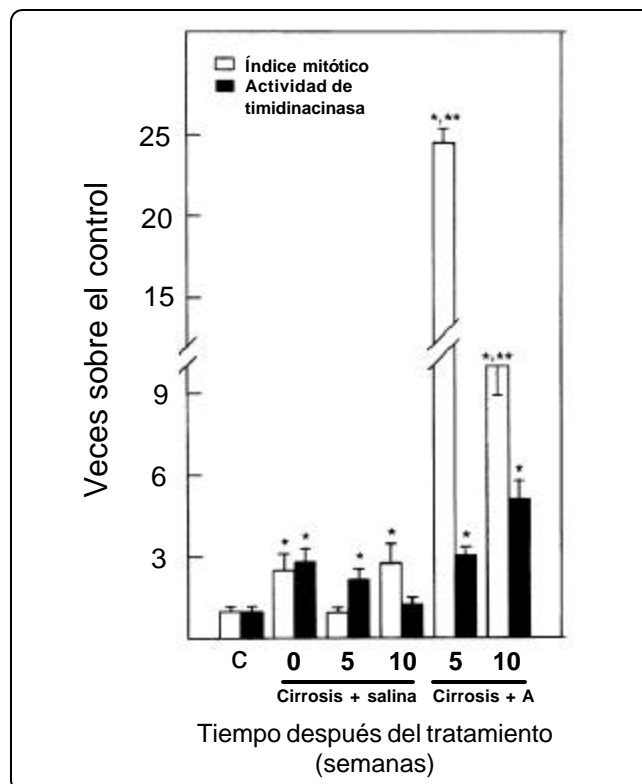


Figura 5. Efecto de la adenosina en la actividad proliferativa de ratas cirróticas, evaluadas por el índice mitótico (promedio y la actividad de adenosina quinasa en citosol hepático, los valores son promedio \pm ES de veces sobre el control (valor control $0.22 \pm$ nmols de $[^3\text{H}]$ -TMP/h/mg proteína) de 6 experimentos por grupo. Significado estadístico como en la Figura 2.

Aproximadamente, hemos invertido 7 años hasta encontrarnos en la situación actual, que es la de contar con la mayor parte de los estudios que requiere la Secretaría de Salud para registrar el producto y con un Laboratorio Farmacéutico, "Probiomed", que participa en el desarrollo farmacéutico con potencial interés en la comercialización del fármaco.

Resumiré brevemente los principales eventos necesarios para la mencionada transferencia:

- Como un primer paso, obtener una familia de derivados que al probar su actividad nos permitan aumentar la eficacia del compuesto y mantener o disminuir la dosis efectiva.
- Investigar la vía de administración en humanos, ya que en el modelo experimental se usaba la vía intraperitoneal que no sería recomendable en humanos. Probar si la vía propuesta asegura la presencia del compuesto en el órgano blanco, en este caso el hígado.
- Conocer su vida media y su efectividad.
- Buscar un asesoramiento para solicitar la patente nacional y/o internacional.
- Estudiar su toxicidad en controles sanos.

- f) Estudiar su efectividad en pacientes.
- g) Planeación y desarrollo de un protocolo clínico experimental en una Institución Hospitalaria que lo autorice su Comité de Ética Local y la Secretaría de Salud.
- h) Conseguir el apoyo de algún laboratorio farmacéutico, en este caso, laboratorios "Probiomed" para que a través del Proyecto Avance de CONACyT se cuente con los recursos para completar los estudios de genotoxicidad, farmacodinamia y farmacocinética, así como continuar con la investigación y el desarrollo farmacéutico del compuesto para obtener el registro ante la Secretaría de Salud y, finalmente, la transferencia para comercialización.

Todos estos pasos se pudieron realizar gracias al apoyo de diversas instancias como, Instituto de Fisiología Celular, Coordinación de la Investigación Científica, Departamento Jurídico de la UNAM, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Laboratorios Probiomed y Centro Médico 20 de Noviembre (ISSSTE).

AGRADECIMIENTOS

En la etapa de investigación: Biól. Susana Vidrio, QFB Lucía Yáñez Maldonado, Juan Manuel Barbosa (Unidad de Cómputo), MC Rodolfo Paredes (Unidad de Microscopía), Dr. Alberto Aranda y Dra. María Lilia Loredo (Instituto Nacional de Cardiología).

En la etapa de desarrollo y aplicación: Dr. Adolfo García Sáinz (Director del Instituto de Fisiología Celular, UNAM), Lic. Gilberto Escamilla (Secretario Administrativo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM), Dr. Francisco Hernández (Depto. de Farmacia, Facultad de Química), Ing. Antonio Galán, Ing. Georgina Valdespino (Coordinación de Vinculación UNAM), Dr. René Drucker Colín, Dra. Carmen Álvarez Buya, Quím. Marta Carrasco, Dr. Raúl Herrera, Dr. Edmundo de Alba, M. en C. Mario Gaytán, Lic. Patricia Morales (Coordinación de la Investigación Científica, UNAM), Lic. Carlos Bazdreich (CIDE), Ing. Jaime Uribe (Director General, Probiomed), Dr. Carlos Robles (Director de Planeación, Probiomed) e Ing. Jaime Parada (Director del CONACyT).

Apoyo Clínico: Dr. Norberto García García y Dra. Laura Ladrón de Guevara.

Apoyo financiero: DGAPA (IN206195, IN2123997, IN226199), CONACyT41433-Q, Corporativa de Fundaciones, A.C. Laboratorios Sophia.

REFERENCIAS

- Rappaport, A.M. & Wanless, I.R. in Diseases of the liver (ed. Schiff, L. & Schiff, E.R.) (Lippincott Company, Philadelphia, 1993).
- Laskin, D.L. in Functional heterogeneity of liver tissue (ed. Vidal-Vanaclocha, F.) 161-176 (R.G. Landes Company, Austin, 1997).
- Rescan, P.Y. *et al.* Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocytes culture. *Am. J. Pathol.* **142**, 199-208 (1993).
- Roskams, T. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver disease. *Hepatology* **24**, 524-532 (1992).
- Rojkind, M., Rojkind, M.H. & Cordero Hernández, J. *In vivo* collagen synthesis and deposition in fibrotic and regeneration rat livers. *Collagen Rel. Res.* **3**, 335-347 (1983).
- Rojkind, M. & Mourelle, M. in Collagen (ed. Nimni, M.E. Vol II) (CRC Press Inc., Florida, 1988)
- Pasternak, C.A. en Bioquímica humana (ed. Barbany Cairó, J.R. & Palés Argulló, S.) 219-224 (EXPAXS, Barcelona, 1980).
- Chagoya, V. en Bioquímica (ed. Herrera, E.) 1183-1194 (Emalsa, 1986).
- Laënnec, R. in Traité de l'auscultation médicale (ed. Chaude) 193 (Paris, 1826).
- Conn, H.O. & Atterbury, C.E. in Diseases of the liver (eds. Schiff, L. & Schiff, E.R., 7th ed.) 815-934 (Lippincott, Philadelphia, 1993).
- Anthony, P.P. *et al.* The morphology of cirrhosis: Definition, nomenclature and classification. *Bull. WHO* **55**, 521 (1977).
- Dufour, D.R. *et al.* Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.* **46**, 2027-2049 (2000).
- Pineda-Corona, B.E. Epidemiología de la hepatopatía alcohólica. en enfermedad hepática por alcohol (Encuesta Nacional de Adicciones) 1-5 (1993).
- Crawford, J.M. in Pathology of the liver (eds. Mac Sween, R.N.M. *et al.*) 576-577 (Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002).
- Rockey, D.C. Pathophysiology of liver disease. *Clinics in Liver Disease* **4**, 1-36 (2000).
- Martínez-Hernández, A. & Amenta, P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* **9**, 1401-1410 (1995).
- Rojkind, M., Giambone, M.A. & Biempica, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* **76**, 710-719 (1979).
- Gressner, A.M. & Bachem, M.G. Molecular mechanism of fibrogenesis a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* **56**, 335-346 (1995).
- Jezequel, A.M. *et al.* Modulation of extracellular matrix components during dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *J. Hepatol.* **11**, 206-214 (1990).
- Maher, J.J. & McGuire, R.F. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in fat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **86**, 1641-1648 (1990).
- Van Eyken, P. *et al.* Localization and cellular sources of the extracellular matrix proteins tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* **15**, 909-916 (1992).
- Wyler, D.J. *et al.* Fibroblast stimulation in schistosomiasis. Egg granuloma macrophages spontaneously secrete a fibroblast stimulating factor. *J. Immunol.* **132**, 3142-3148 (1984).
- Wyler, D.J., Wahl, S.M. & Wahl, L.M. Hepatic fibrosis and schistosomiasis egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor *in vitro*. *Science* **202**, 438-440 (1978).
- Arthur, M.J.P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G245-G249 (2000).
- Rojkind, M. & Greenwel, P. in Oxford textbook of clinical hepatology (eds. McIntyre, N., Benhamou, J.P., Bircher, J., Rizzeto, M. & Rode, J.) 375-380 (Oxford Medical Publication, New York, 1991).
- Chojkier, M. & Brenner, D.A. Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. *Hepatology* **8**, 176-182 (1988).
- Chagoya de Sánchez, V., Brunner, A. & Piña, E. *In vivo* modification

- of the energy charge in the liver cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1441-1445 (1972).
28. Chagoya de Sánchez, V., Brunner, A., Sánchez, M.E., López, C. & Piña, E. Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 145-150 (1974).
29. García-Sáinz, J.A., Hernández-Muñoz, R., Santamaría, A. & Chagoya de Sánchez, V. Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 1409-1413 (1979).
30. Lauth, W.W., Legare, D.J. & D'Almeida, M.S. Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am. J. Physiol.* **248**, H331-H338 (1985).
31. Hernández-Muñoz, R., Santamaría, A., García-Sainz, J.A., Piña, E. & Chagoya de Sánchez, V. On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch. Biochem. Pharmacol.* **190**, 155-162 (1978).
32. García-Sainz, J.A., 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.* **29**, 1709-1714 (1980).
33. Hernández-Muñoz, R., Glender, W., Díaz-Muñoz, M., García-Sainz, J.A. & Chagoya de Sánchez, V. Effect of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2599-2604 (1984).
34. Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Suárez, J. & Chagoya de Sánchez, V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* **12**, 242-248 (1990).
35. Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M. & Chagoya de Sánchez, V. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 160-167 (1992).
36. Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M. & Chagoya de Sánchez, V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochi. Biophys. Acta* **1200**, 93-99 (1994).
37. Hernández-Muñoz, R. & Chagoya de Sánchez, V. *In vivo* correlation between liver and blood energy status as evidenced by chronic treatment of carbon tetrachloride and adenosine to rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 1252-1256 (1994).
38. Hernández-Muñoz, R. *et al.* Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental model of CCl₄ - induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology* **26**, 1100-1110 (1997).
39. Chagoya de Sánchez, V., Díaz-Muñoz, M. & Hernández-Muñoz, R. Reversion of an experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride by adenosine administration. *Hepatology* **28**, 641A (1998).
40. Hernández-Muñoz, R. *et al.* Adenosine reverses a preestablished CCl₄ -induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* **34**, 677-687 (2001).