

Hepatitis fulminante

Estudio morfológico y bioquímico evolutivo y parámetros pronósticos en un nuevo modelo experimental (Acetaminofén)

*Dr. L. Ortega Medina**
*Dr. J. I. Landa García***
*Dr. A. Torres García****
*Dr. J. Arenas*****
*Dr. J. E. Sanz Esponera**
*Dr. G. Silechia***
*Cap. Méd. Dr. E. Romero******
*Dr. J. A. López García-Asenjo**
*Dr. E. Moreno González***
*Dr. J. L. Balibrea Cantero****

RESUMEN

La insuficiencia hepática fulminante en independencia de su etiología conduce a la muerte en la mayoría de los casos. No existe un modelo experimental que cumpla los requisitos apropiados para conseguir un cuadro de IHF. Por este motivo se propone un nuevo modelo de IHF. La administración de 500 mg/kg. de peso de acetaminofén por vía endovenosa, asociado a 20-30 mg/kg. de peso de pentotal sódico en el perro permite conseguir un fallo hepático fulminante que queda demostrado por la intensa necrosis hepatocitaria evidenciada cualitativa y cuantitativamente acompañándose de una marcada alteración bioquímica, siendo la bilirrubinemia el parámetro que se relaciona más estrechamente con el porcentaje de necrosis hepática. Se demuestra también la afectación del mecanismo detoxificador a la vista de los cambios en el metabolismo de la droga en los animales con necrosis masiva. Este modelo muestra gran especificidad, siendo reproducible y reversible. No supone grave riesgo para el investigador y al aplicarse en un animal de fácil manejo puede ser de gran utilidad en la aplicación de nuevos protocolos médicos y/o quirúrgicos en la IHF de cualquier etiología o específicamente en la intoxicación por acetaminofén.

SUMMARY

Fulminant Hepatic Failure from any etiology leads to death in most cases. There is no experimental model fulfilling the requirements of this condition in the laboratory. The authors propose a new model by the administration of an association of acetaminophen 500 mg/kg. b.w. and Sodium Thiopentone 20-30mg/kg. B.W. to the dog with the goal of achieving F.H.F. with intense liver cell necrosis both from qualitative and quantitative points of view. Biochemical changes are marked being the bilirubine levels the ones more closely related to the degree of hepatic necrosis. Drug metabolism changes in the animals thus treated show an affectation of detoxifying mechanisms. This model is a highly specific one, being both reproducible and reversible. Its management includes no serious risks to the investigator and the authors view it as a good help for the study of medical and surgical approaches to FHF of any etiology or else specifically for Acetaminophen toxicity.

Este trabajo fue galardonado con el Premio de la III Reunión de Investigación del Hospital Militar Central «Gómez Ulla» 1985.

* Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Clínico de San Carlos. Universidad Complutense de Madrid.
** Departamento de Cirugía II, Hospital 1.º de Octubre.
*** Departamento de Patología Quirúrgica II. Hospital Clínico de San Carlos. Universidad Complutense de Madrid.
**** Departamento de Bioquímica. Hospital 1.º de Octubre.
***** Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Militar Central «Gómez Ulla».

INTRODUCCION

La insuficiencia hepática fulminante (IHF), cualquiera que sea su etiología, conlleva una elevada mortalidad que puede llegar a alcanzar hasta un 90% (24). El pronóstico de los enfermos con coma hepático grado III-IV es lamentablemente infausto, sin que ninguna pauta terapéutica utilizada hasta la fecha pueda afirmarse que sea realmente eficaz (27).

Al grado de gravedad de estos enfermos que padecen este síndrome poli-etiológico hay que añadir dos hechos negativos:

- No existen parámetros clínicos realmente efectivos para estudiar y valorar estos enfermos, que alcanzan un estadio terminal en pocas horas.

- Actualmente no existe un modelo experimental válido de fallo hepático fulminante que permita el estudio de nuevos protocolos terapéuticos y la búsqueda de un parámetro fiel del grado evolutivo de la lesión hepática fulminante (6).

Los requisitos necesarios para que un modelo de IHF sea válido han sido especificados por diferentes autores (2, 29):

1. Que el animal elegido sea grande.
2. Que la muerte del animal se produzca por daño hepático.
3. Que sea una lesión potencialmente reversible.
4. Que sea reproducible.
5. Que suponga el mínimo riesgo para el investigador.

Han sido publicados bajo estos conceptos numerosos modelos experimentales, pudiéndose asegurar que hasta la fecha no existe ninguno o que cumpla fielmente estos requisitos (6, 8) y, lo que es más lamentable, ninguno o que pueda ser aplicado a la clínica humana. Requisito, este último, que sin ser enumerado en la literatura, consideramos que debería ser primordial.

El análisis de los insatisfactorios modelos publicados, junto al aumento de intoxicaciones mortales por Acetaminofén nos ha llevado a la utilización

de este fármaco para la realización de un modelo experimental, que reuniendo los requisitos mencionados, tenga una evidente aplicación clínica.

El Acetaminofén es un analgésico leve de amplia distribución mundial, que a dosis terapéuticas no muestra efectos secundarios importantes (1).

Fue introducido en la farmacopea en la década de los años cincuenta en Inglaterra (28), publicándose en 1966 los dos primeros casos de necrosis hepática fulminante secundaria a sobredosis por intento de suicidio (7). Desde entonces la frecuencia de esta patología ha ido aumentando rápidamente en Inglaterra (4, 14, 18, 21, 22) extendiéndose a otros países como Estados Unidos (11, 15, 16), Francia (12) y España (25). La mortalidad predecible para los más de 10.000 enfermos intoxicados anuales es de 100 a 150 (30).

Esta elevada frecuencia de necrosis hepática fulminante por este medicamento ha inducido a una gran cantidad de investigadores a estudiar su mecanismo fisiopatológico y a intentar establecer en diferentes animales un modelo experimental válido (3, 5, 9, 10, 13, 19, 26, 31, 33). Los resultados obtenidos no han sido uniformes al utilizar como vía de administración del tóxico la oral y/o la intraperitoneal.

Nosotros, para obviar la problemática de las variaciones en la absorción del fármaco que conducen a resultados no uniformes, hemos utilizado una original preparación intravenosa, obteniendo un modelo experimental reproducible-standard de IHF.

Los objetivos de nuestro trabajo han sido:

- Obtener un modelo válido original de IHF en el perro, que cumpla los requisitos ya establecidos, utilizando el Acetaminofén por vía intravenosa.
- Estudiar la correlación entre dosis del fármaco y daño hepático.
- Analizar los hallazgos morfológicos y bioquímicos y su posible correlación para la búsqueda de parámetros pronósticos encaminados a una posible terapéutica.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon un total de 30 perros de raza indefinida, indistintamente machos o hembras, divididos en los siguientes grupos:

- GRUPO I: Constituido por 5 animales, a los que se administró 250 mg. por Kg. de peso de Acetaminofén por vía intravenosa y 20-30 mg. de Pentotal Sódico. Todos ellos fueron sacrificados a las 72 horas.

- GRUPO II: Formado por 10 animales a los que se les perfundió una dosis de 500 mg. por Kg. de peso de Aceminofén i.v. y misma dosis de Pentotal Sódico. Se hicieron dos subgrupos:

- GRUPO II A: Cinco animales que fueron sacrificados a las 48 horas.

- GRUPO II B: Cinco animales que fueron sacrificados a las 72 horas.

- GRUPO III: A 10 animales se les perfundió una dosis de 500 mg. por Kg. de peso de Acetaminofén, siendo todos ellos sacrificados a las 72 horas. Cinco de ellos recibieron conjuntamente 20-30 mg. de Pentotal Sódico (GRUPO III A), mientras que a los cinco restantes sólo se les perfundió el Paracetamol (GRUPO III B).

- GRUPO IV (Control): Cinco animales a los que se les administró únicamente el Pentotal Sódico, a dosis de 20-30 mg. por Kg. de peso.

La solución de Acetaminofén se preparó disolviendo 10 grs. del fármaco en 1.000 ml. de suero salino isotónico, utilizándose como conservador metabisulfito sódico (0,5 mcgr/ml.). Posteriormente se filtró la solución por placa de vidrio y se esterilizó durante una hora a 100°C en un recipiente herméticamente cerrado. A todos los animales de los grupos I, II y III se les administró dicha solución en la dosis correspondiente, canalizando una gruesa vena de la cara dorsal de una de las extremidades superiores. Algunos de ellos, como ya hemos especificado, recibieron además una dosis de Pentotal Sódico. La perfusión se realizó durante 45-60 minutos.

En los grupos I y II se extrajo sangre para control analítico a las 48 horas, mientras que en los grupos III y IV se realizó a las 4, 24 y 48 horas.

Los parámetros determinados fueron GOT, GPT, LDH, Fosfatasa Alcalina y bilirrubina en los grupos I y II, analizándose además en los grupos III y IV la GGT y GLDH. En el grupo III se determinaron además los picos plasmáticos de Acetaminofén a las 4, 24 y 48 horas.

La sangre, una vez extraída, fue centrifugada a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos y el suero congelado a -20°C.

Los niveles séricos de Acetaminofén fueron evaluados mediante ensayo enzimológico homogéneo según técnica EMIT manufacturada por SYVA (Syva, Palo Alto, California) en un espectrofotómetro Gilford Stasart-3, con dispensación automática de muestra y computarización. Los coeficientes de variabilidad intra e interensayo

necrosis en los animales de los distintos grupos, siendo:

$$V_v = \frac{n}{N}$$

El error estándar se calculó según la siguiente fórmula:

$$ES = \frac{\sqrt{1-V_v}}{n}$$

oscilando, al contar 2.000 puntos por caso entre 6% y 0,1%.

RESULTADOS

Macroscópicamente, en el Grupo I, los hígados no mostraron alteraciones significativas, salvo un color rojizo, más oscuro de lo habitual. Los perros de los Grupos II y III A mostraron unos hallazgos similares, ofreciendo una superficie externa de color rojo vinoso. Al corte eran de consistencia blanda con tendencia a la herniación, mostrando una superficie de aspecto congestivo y morfología de nuez moscada. Los grupos III B y IV no presentaron alteraciones macroscópicas.

El estudio microscópico mostró distintos cuadros en los diferentes grupos como consecuencia de las dosis variables recibidas y del tiempo de evolución de la lesión desde la administración de las mismas.

En los animales del Grupo I se encontraron focos de necrosis dispersa (Fig. 1), constituidos por cuerpos de Councilman, con muy escasa reacción inflamatoria y una marcada hipertrofia de las células sinusoidales. Estos focos necróticos mostraban una localización acinar periférica, estando por tanto en las zonas próximas a la vénula hepática terminal. En algunos animales, o en distintos acinés del mismo animal existía necrosis confluyente (Fig. 2), pero sin llegar a formar puentes. En este grupo se encuadraron, por tanto, todos los animales en el Grado I de Portmann.

En el Grupo II las lesiones fueron distintas según el subgrupo. Así, aquellos animales pertenecientes al Grupo II A tenían extensas áreas de necrosis confluyente de la zona 3 acinar, con puentes que unían las vénulas hepáticas. Los hepatocitos de las zonas 1 y 2 conservaban su disposición trabecular habitual sin presentar signos degenerativos (Fig. 3). Estas amplias zonas producían distorsión del patrón reticulíni-

co, con tendencia a la formación de colapso (Fig. 4) y en ocasiones septos pasivos. Todos los animales de este subgrupo (II A) correspondieron a un Grado II de lesión de Portmann.

Los hallazgos morfológicos en los Grupos II B y III A fueron idénticos, observándose únicamente un ribete de hepatocitos preservados de la zona 1 acinar, es decir, de localización periportal (Figs. 5 y 6). Todos ellos correspondieron a un Grado III de lesión, excepto uno (Grupo III A), con alteraciones Grado II.

En todos los casos las características de las necrosis fueron similares cualitativamente (Figs. 7 y 8), siendo por tanto las diferencias únicamente cuantitativas. Existía una distorsión microarquitectural, con numerosos cuerpos acidófilos y hepatocitos retraídos eosinófilos con núcleo picnótico. Esto producía disrupción de la trabécula y secundariamente alteraciones de la luz sinusoidal. Estas y la prominencia de las células sinusoidales, ocasionaban congestión de intensidad variable (Fig. 9). El estudio de las zonas límite necrosis-hígado sano mostró, en este último, signos degenerativos hepatocitarios precoces, consistentes fundamentalmente en la microvacuolización citoplasmática (Fig. 10) y ocasional degeneración balonzante.

En los hepatocitos necrosados se evidenció una depleción de glucógeno citoplasmático, que se conservaba, sin embargo, a nivel del hígado sano (Fig. 11). En ninguno de los casos existía reacción inflamatoria llamativa, ni a nivel de los espacios porta, ni en las zonas de necrosis, recordando así las lesiones isquémicas hepáticas.

El Grupo III B no presentó focos de necrosis, aunque sí diferentes grados de vacuolización y «coagulación» proteica citoplasmática de los hepatocitos (Figs. 12 y 13) de las zonas 3 acinares y ocasionalmente de las zonas 2 acinares. Correspondieron, por tanto, los animales de este grupo a un Grado 0 de lesión de Portmann.

En el Grupo IV (control) no se observó ningún tipo de lesión, sin existir necrosis ni vacuolización (Grado 0).

En dos animales del Grupo I y dos del Grupo III A se encontraron, ocasionalmente, pequeñas formaciones granulomatosas kupfferianas. La localización de estas formaciones fue preferentemente acinar, aunque se pudieron observar también en espacios porta. Estaban constituidas por escasas células inflamatorias, algunas células sinusoidales y macrófagos de aspecto epitelioides (Fig. 14), sin encontrarse en

de la técnica fueron de 3,2 y 5%, respectivamente.

Las concentraciones catalíticas de ASAT y ALAT (GOT y GPT) se determinaron mediante el método estandarizado de la IFCC, la de GGT por la técnica de Szasz, la ALP (Fosfatasa Alcalina) por metódica recomendada por la Sociedad Francesa de Biología y la GLDH (glutámico deshidrogenasa) se valoró según el modelo de referencia de la Sociedad Alemana de Química Clínica. La cantidad de bilirrubina sérica se tipificó por el método de Malloy-Evelyn. Los reactivos fueron suministrados por Cromatest (Knickerbocker) y Boehringer Mannheim, realizándose las técnicas en un autoanalizador multicanal selectivo Hitachi-705.

Una vez sacrificados los animales, las muestras de hígado fueron fijadas en formol al 10%, siendo incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 6 μ que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, PAS, PAS-diestasa, tricrómico de Masson e impregnación argéntica de Wilder.

Durante el estudio de las biopsias hepáticas se clasificaron los distintos casos siguiendo la gradación de Portmann (18), con discretas modificaciones personales, introducidos fundamentalmente para recalcar la importancia de los puentes de necrosis en el pronóstico y evolución de este tipo de lesiones hepáticas. Quedan así delimitados dos grados de escasa relevancia clínica y buen pronóstico (Grados 0 y I) y dos de fallo hepático con mal pronóstico (Grados II y III):

• GRADO 0: Vacuolización hepatocitaria. No necrosis.

• GRADO I: Focos de necrosis dispersa con confluencia o no de la lesión.

• GRADO II: Necrosis confluyente en puente.

• GRADO III: Necrosis submasiva o masiva (quedando preservada únicamente la zona 1 acinar).

Además, se realizaron estudios esteológicos mediante la técnica de Weibel (32), con contaje de puntos para evaluar el porcentaje volumétrico de

Hepatitis fulminante. Estudio morfológico y bioquímico evolutivo y parámetros pronósticos en un nuevo modelo experimental

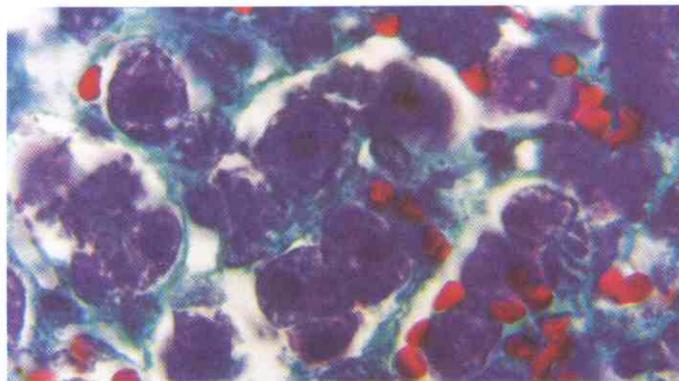


Fig. 2.—Animal Gr I 4. Focos de necrosis (N), con numerosos cuerpos de Councilman (←). Puede observarse necrosis confluyente (↔). Grado I de Portmann (200 X HE).

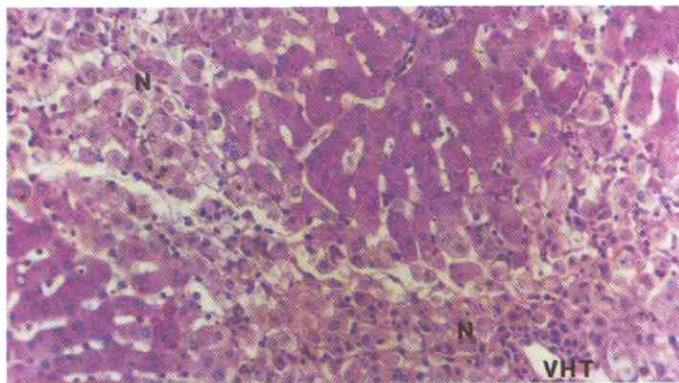


Fig. 4.—Animal Gr II A 3. Colapso reticulínico (←). Grado I de Portmann. (200 X Impregnación argéntica de Wilder).

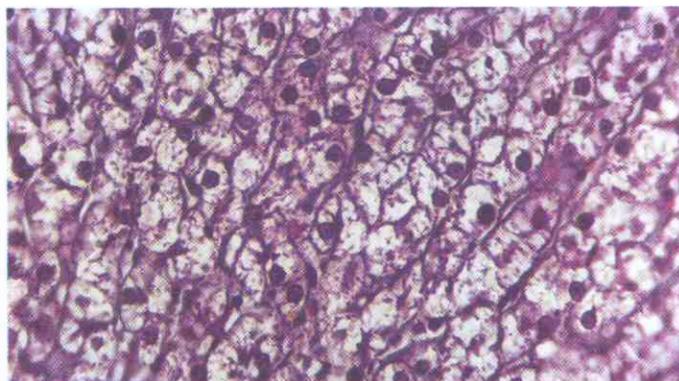


Fig. 6.—Animal Gr III A 5. Necrosis confluyente en puente de las zonas 2 y 3 acinares. Hepatocitos preservados en torno a espacios porta (EP). Nótese una vénula hepática terminal con discreta fibrosis de la pared (VHT). Grado III de Portmann. (100 X Tricrómico de Masson).

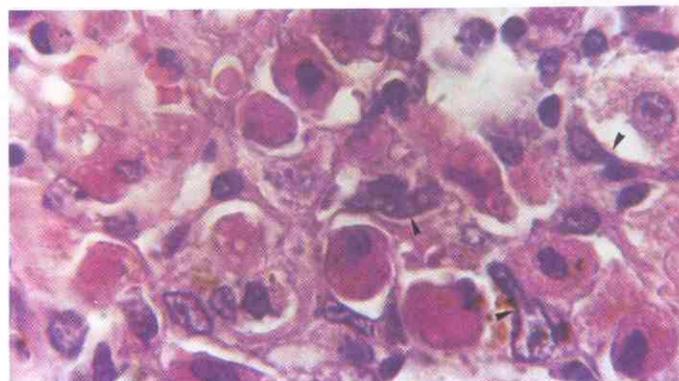


Fig. 1.—Animal Gr I 2. Focos de necrosis (N) dispersos. Es llamativa la hipertrofia de células sinusoidales (←). Grado I de Portmann (200 X HE).

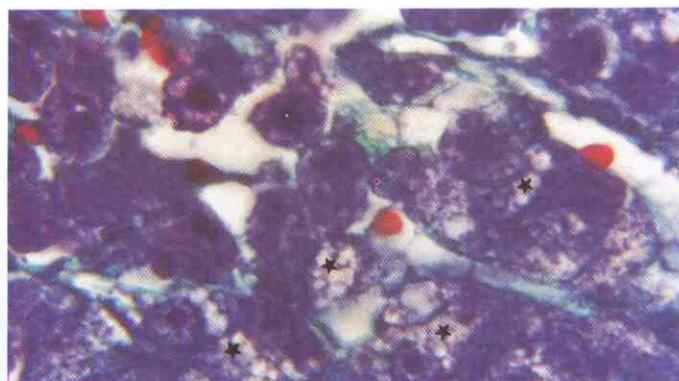


Fig. 3.—Animal Gr II A 3. Necrosis confluyente en puente (N) de la zona acinar 3, constituida por cuerpos de Councilman con escasa reacción inflamatoria. En el centro se observa un espacio porta (EP). Zona 1 acinar preservada. Grado II de Portmann (100 X HE).

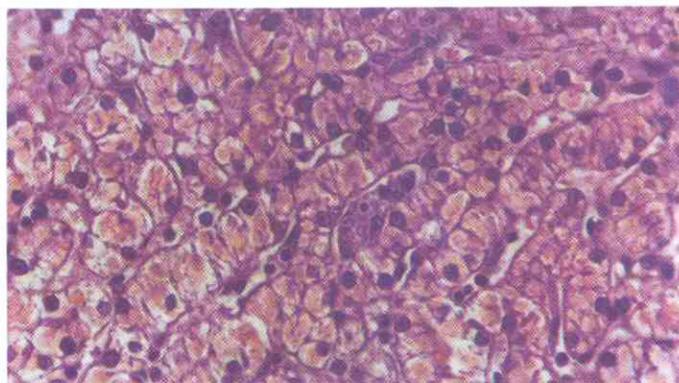


Fig. 5.—Animal Gr II B 2. Necrosis confluyente en puente de las zonas 2 y 3 acinares. Únicamente quedan algunos islotes de hepatocitos preservados (☆). Grado III de Portmann. (50 X HE).

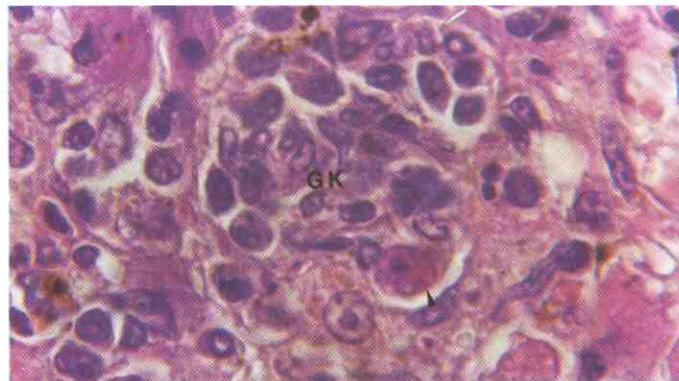


Fig. 7.—Animal Gr II A 5. Zona de necrosis. Numerosos cuerpos de Councilman con llamativa hipertrofia de células sinusoidales (←). Grado II de Portmann (500 X HE).

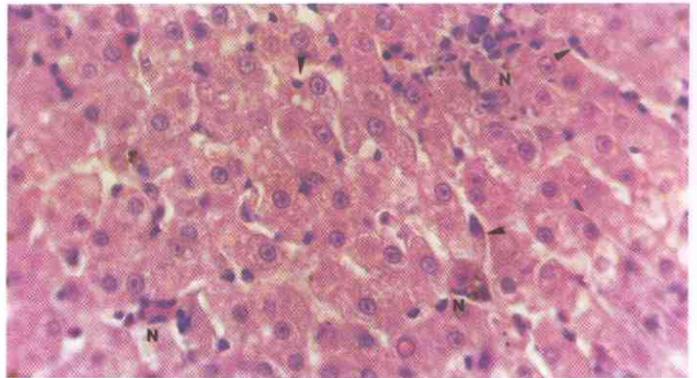


Fig. 8.—Animal Gr III A 4. Zona de necrosis. Mismos hallazgos que en la figura anterior. En este caso se trataba de un Grado III de Portmann (500 X HE).

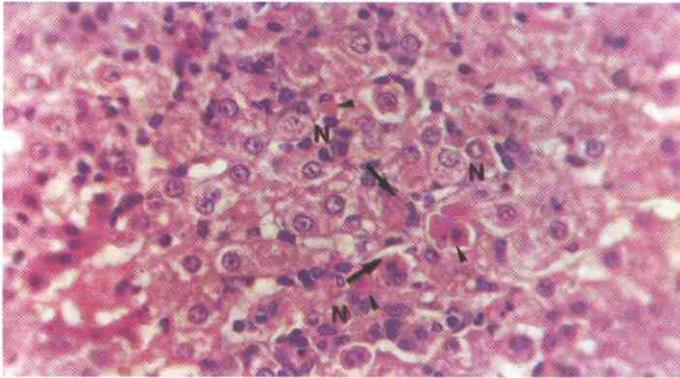


Fig. 9.—Animal Gr III A 2. Zona de necrosis. Distorsión microarquitectural con cuerpos de Councilman y discreta congestión sinusoidal. Grado III de Portmann (500 X Tricrómico de Masson).

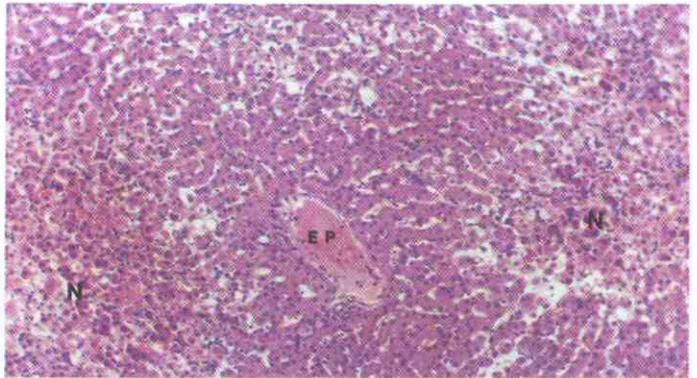


Fig. 10.—Animal Gr III A 2. Limite entre zona de necrosis y hepatocitos en necrobiosis. Obsérvese la fina microvacuolización (★) citoplásmica en estos últimos. Grado III de Portman. (500 X Tricrómico de Masson).

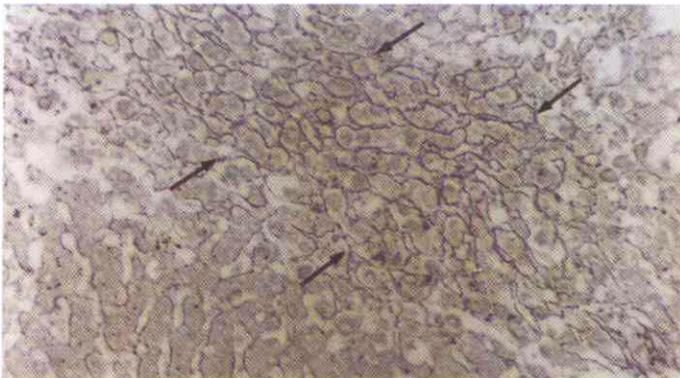


Fig. 11.—Animal Gr III A 4. Pérdida de glucógeno a nivel de la necrosis en puente (N). Se mantiene en torno al espacio porta (EP). Vénula hepática terminal (VHT). Grado III de Portmann (100 X PAS).

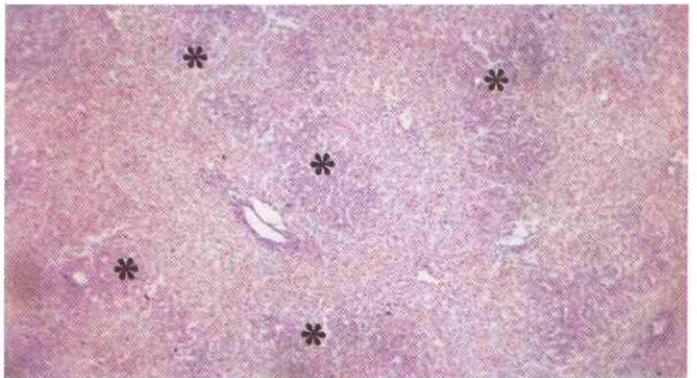


Fig. 12.—Animal Gr III B 1. Vacuolización con «coagulación» citoplásmica 3 acinar. Grado 0 de Portmann (200 X HE).

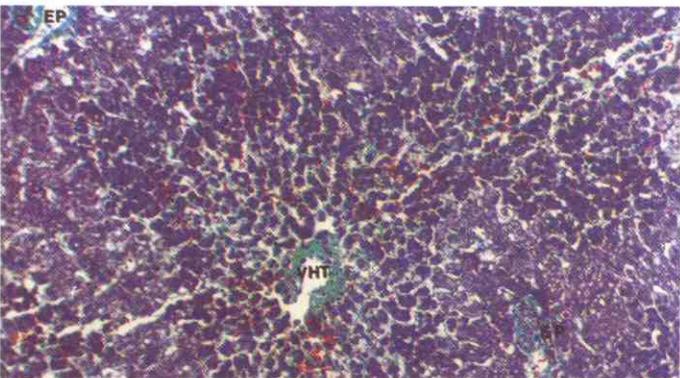


Fig. 13.—Animal Gr III B 4. Extensas zonas de vacuolización citoplásmica. Grado 0 de Portmann. (200 X Tricrómico de Masson).

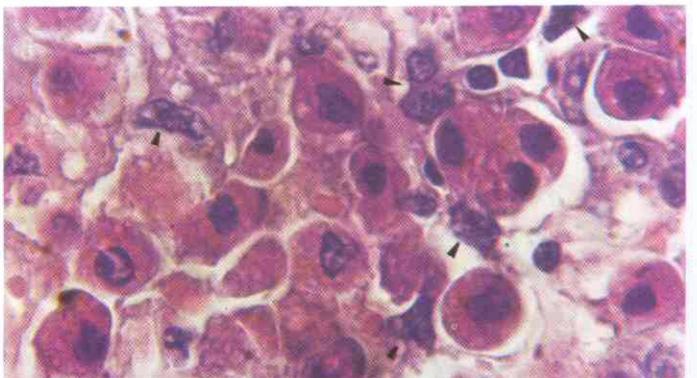


Fig. 14.—Animal Gr III A 5. Junto a un cuerpo de Councilman (←) se observa un «granuloma kupfferiano» (GK) constituido por escasas células inflamatorias y células de aspecto epitelioides. (500 X HE).

ninguno de ellos células gigantes, ni áreas de necrosis.

Los estudios analíticos de los animales de los Grupos I y IV no mostraron alteraciones llamativas, correlacionándose por tanto con los hallazgos cualitativos morfológicos.

En los Grupos II y III A se observaron elevaciones enzimáticas similares que quedan representadas para este último grupo en sus diferentes determinaciones (4, 24 y 48 horas) en la figura 15.

Las cifras analíticas del Grupo III B se representa en la figura 16.

Los resultados de las cifras obtenidas por enzimoimmunoensayo para el Grupo III (A y B) se representan para sus tres determinaciones en la figura 17 A. En la figura 17 B se comparan la vida media del fármaco con la bilirrubina y el porcentaje de necrosis en ambos subgrupos.

Para terminar este apartado se exponen los resultados cualitativos y cuantitativos morfológicos junto con la bi-

lirrubina, para todos los grupos estudiados (Tabla I).

DISCUSION

En la consecución de un modelo experimental de insuficiencia hepática fulminante (IHF) es imprescindible el cumplimiento de una serie de puntos que ya han sido citados en la introducción (2, 29). Hace escasos meses ha sido publicado por Cuervas-Mons y

cols. (6) un nuevo modelo que asocia una hepatectomía del 70% a una anastomosis porto-cava término-lateral, aduciendo estos autores la eficacia del método, encontrando como único inconveniente la dificultad técnica quirúrgica. No obstante, es evidente la invalidez de dicho método que aunque reproducible y productor de IHF no es en ningún caso reversible y por tanto ineficaz en el estudio de protocolos terapéuticos médicos o quirúrgicos.

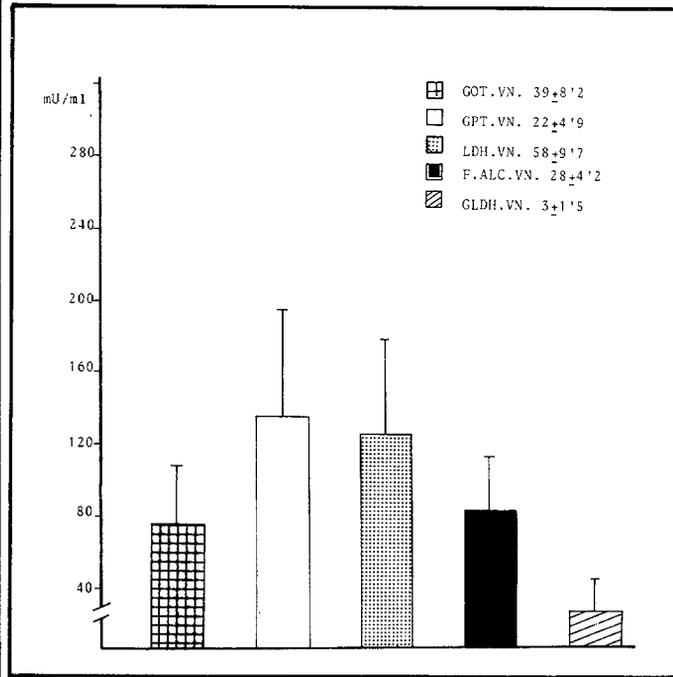


Fig. 15 A.—Determinaciones analíticas en el Grupo III A. 4 horas postintoxicación.

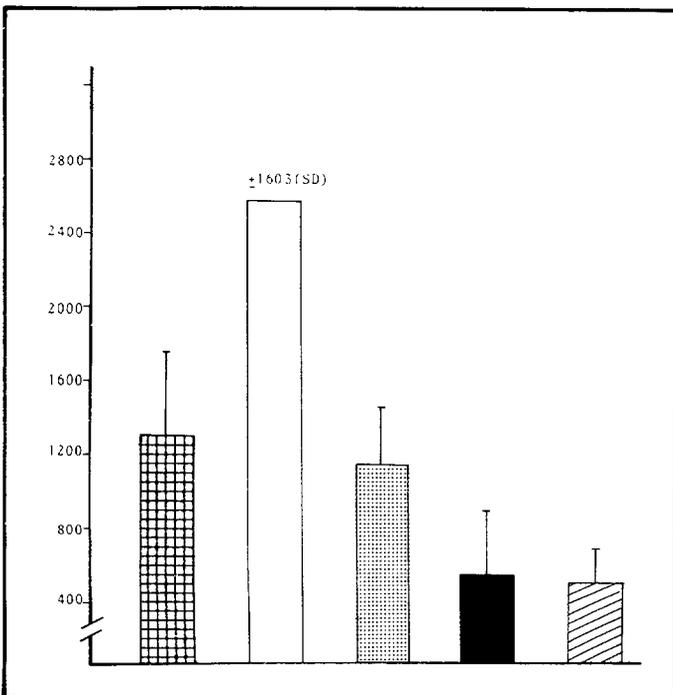


Fig. 15 B.—Determinaciones analíticas en el Grupo III A. 24 horas postintoxicación.

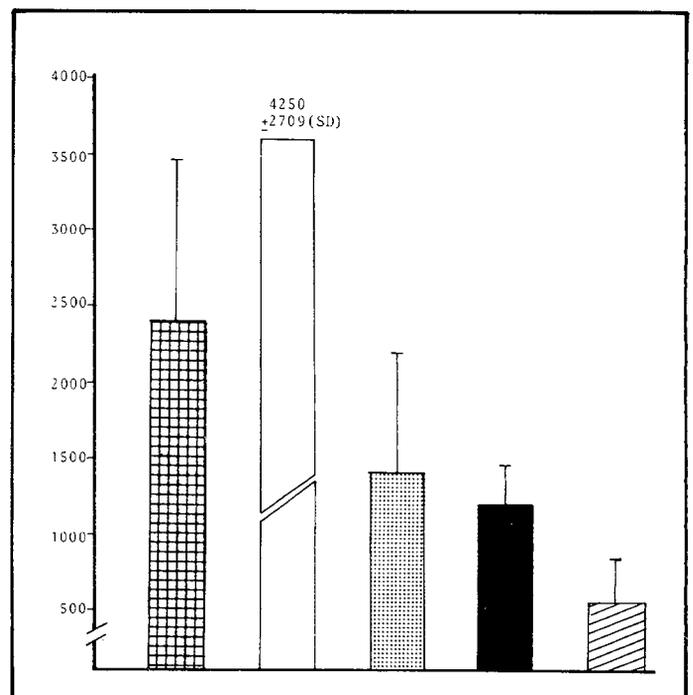


Fig. 15 C.—Determinaciones analíticas en el Grupo III A. 48 horas postintoxicación.

Nuestro modelo, por el contrario, satisface plenamente todos los requisitos. El perro es un animal de tamaño adecuado, fácilmente manejable, tanto en el laboratorio como en el quirófano. En estos animales el Acetaminofén junto al Pentotal Sódico produce una necrosis masiva demostrada morfológicamente, que se reproduce en los diferentes animales y que es reversible según se ha indicado en la literatura (10) sin causar ningún efecto nocivo para el investigador.

Se eligió la vía de administración intravenosa no utilizada en el ser humano ni en los animales de experimentación (3, 5, 9, 10, 13, 19, 26, 31, 33), para obviar las variaciones individuales en la absorción del fármaco y así controlar la dosis recibida realmente por el animal. La dosis máxima elegida no fue muy elevada, puesto que en el animal con altas dosis se puede producir la muerte antes de que se produzcan lesiones reconocibles microscópicamente (13).

El estudio morfológico de la necro-

sis hepática por Acetaminofén es interesante por dos motivos: en primer lugar permite analizar la evolución histopatológica con las consiguientes implicaciones patogénicas del daño tisular y, en segundo lugar, porque la distribución necrótica permite comprobar el concepto microcirculatorio acinar de Rappaport (23).

Los hallazgos anatomopatológicos son similares a los descritos en la literatura, tanto en el ser humano (4, 7,

14, 16, 18, 33) como en los distintos animales de experimentación (3, 5, 9, 10, 13, 26, 31), habiendo obtenido con los diferentes grupos todos los posibles grados de lesión, lo cual queda recogido en la figura 18.

Es llamativa la tendencia a la localización fundamentalmente 3 acinar en todos los grupos, que es la consecuencia de las diferentes actividades enzimáticas de los hepatocitos organizados respecto al eje microvascular que par-

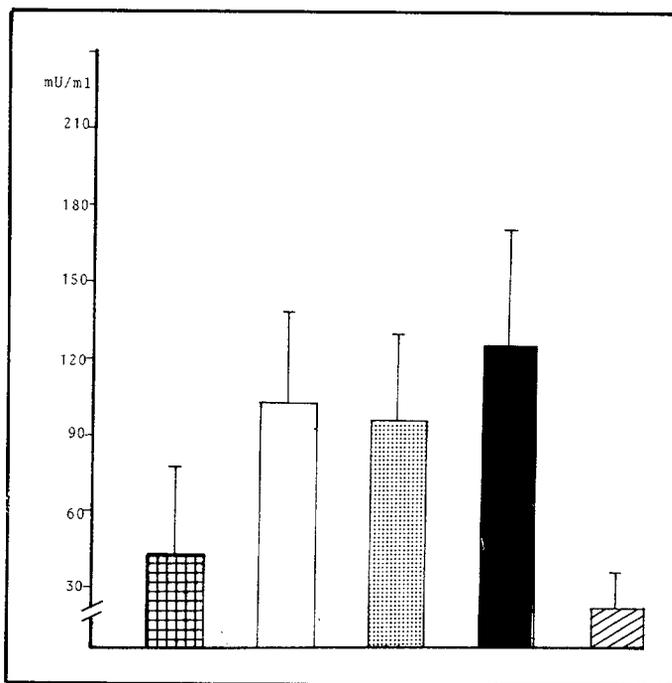


Fig. 16 A.—Determinaciones analíticas en el Grupo III B. 4 horas post-intoxicación.

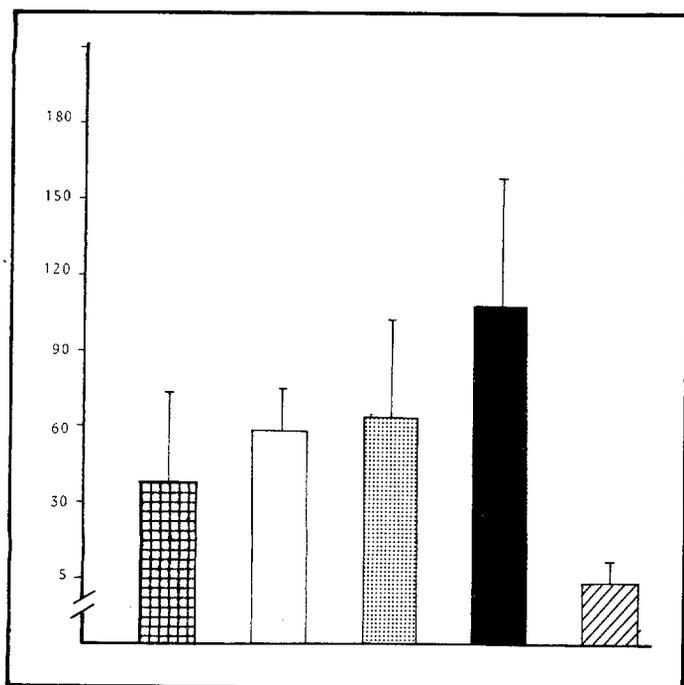


Fig. 16 B.—Determinaciones analíticas en el Grupo III B. 24 horas postintoxicación.

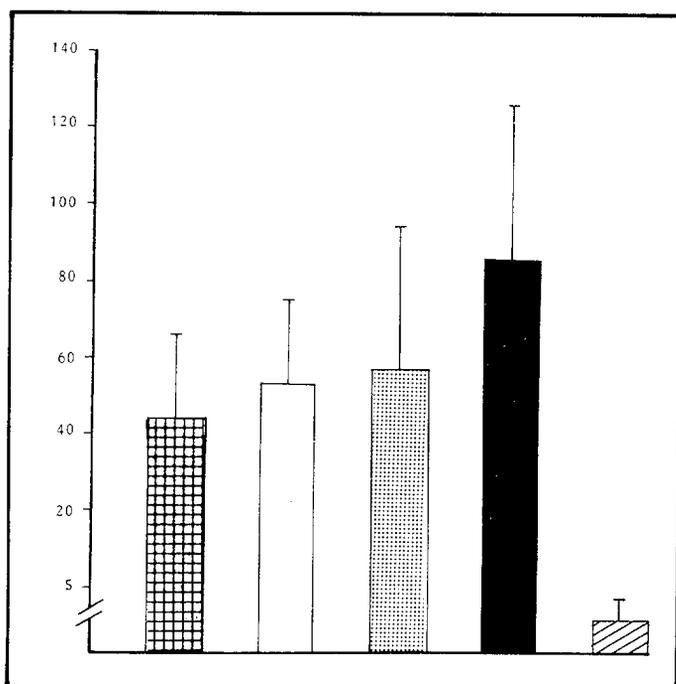


Fig. 16 C.—Determinaciones analíticas en el Grupo III B. 48 horas postintoxicación.

Hepatitis fulminante. Estudio morfológico y bioquímico evolutivo y parámetros pronósticos en un nuevo modelo experimental

te de la arteriola hepática terminal del espacio porta; así, en la zona 3 es máxima la riqueza en microsomas que intervienen en el metabolismo de las drogas (23). Cuando la lesión es importante se produce necrosis confluyente en la zona periférica del acini simple, aunque evidentemente no quedan limitadas a éste, sino que afectan al acini complejo produciéndose necrosis en puente veno-venular.

El hallazgo de formaciones granulomatosas no ha sido comunicado previamente en la literatura. Es conocido, sin embargo, que un número muy elevado de drogas puede producir, al menos por un mecanismo inmunógeno de hepatotoxicidad no predecible, formaciones granulomatosas (17). Las características morfológicas de estos granulomas es, por otra parte, bastante característico en el hígado, como consecuencia de una respuesta inmune.

Es muy llamativo un hallazgo desconocido hasta la fecha en lo que respecta a la hepatotoxicidad por el Acetaminofén; esto es, la ausencia de dicho

efecto tóxico en aquellos animales que no fueron pretratados con Pentotal Sódico. Esto queda demostrado tanto a nivel morfológico (Grado I de Portmann) como a nivel bioquímico (Figs. 16 y 17 B).

En el mecanismo de la injuria es preceptivo la catabolización del Acetaminofén a metabolitos tóxicos altamente reactivos que en un primer paso son neutralizados por el glutatión. Secundariamente, cuando éste se satura, dichos catabolitos se unen mediante un enlace covalente irreversible a las macromoléculas celulares originando la muerte del hepatocito (33). Es evidente que aquellas situaciones que conduzcan a una depleción del glutatión hepático como es el ayuno o la ingesta alcohólica (21) o un aumento en la inducción enzimática (33) o en la actividad de oxidasas microsomas (26) conducirá a una tasa más elevada de metabolismo tóxicos y por tanto a una necrosis más intensa. El Pentotal Sódico puede actuar, muy probablemente, en su efecto potenciador a través de su estimulación enzimática microsomal.

Una vez que la necrosis ha tenido lugar se va a potenciar por las alteraciones microcirculatorias que por una parte producen a su vez desequilibrios en la actividad enzimática (23) y por otra favorecen la isquemia que va a incidir en unos hepatocitos ya deficitarios, con presión de oxígeno disminuida, como son los de la zona 3 acinar.

Desde el punto de vista bioquímico

es evidente la consecución de IHF en aquellos animales tratados con Acetaminofén y Pentotal Sódico (Fig. 15). Existe elevación de toda la batería enzimática (GOT, GPT, LDH, Fosfatasa alcalina y GLDH) que es progresiva desde las 4 horas tras la intoxicación hasta las 48 horas; siendo destacables dos puntos:

- La elevación de la GLDH, que se localiza fundamentalmente en la zona 3 acinar, que es el área de afectación preferencial en este cuadro tóxico, manteniéndose las cifras relativamente uniformes a las 24 y 48 horas.

- La tasa muy elevada de las enzimas representativas de necrosis hepatocitaria, que es muy evidente a las 24 horas, alcanzando sus cotas máximas a las 48 horas.

Estos dos hechos indican una necrosis precoz a nivel de la zona 3 acinar que se mantiene evolutivamente, sumándose la afectación de la zona 2 y región periférica de la 1. Se demuestra así una progresión de la lesión y un peor pronóstico, alcanzándose la hepatitis fulminante (Grado III de Portmann).

En el Grupo III B las alteraciones enzimáticas (Fig. 16) fueron muy escasas. La GLDH se mantuvo dentro de los límites de la normalidad, indicando la ausencia de necrosis perivenular, comprobada morfológicamente. Se observó, como único dato destacable, discreta elevación de la fosfatasa alcalina, probablemente secundaria a los fenómenos de vacuolización hepatociti-

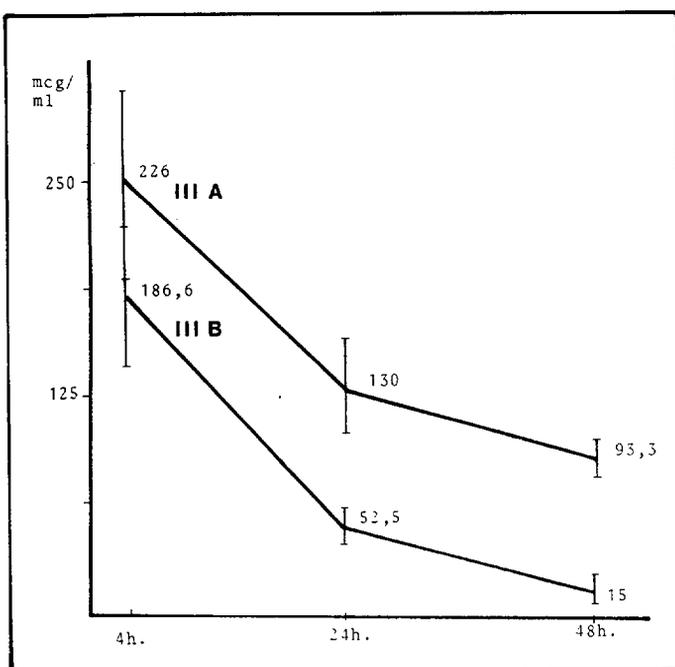


Fig. 17 A.—Picos plasmáticos de paracetamol a las 4, 24, y 48 horas (Grupos III A y III B).

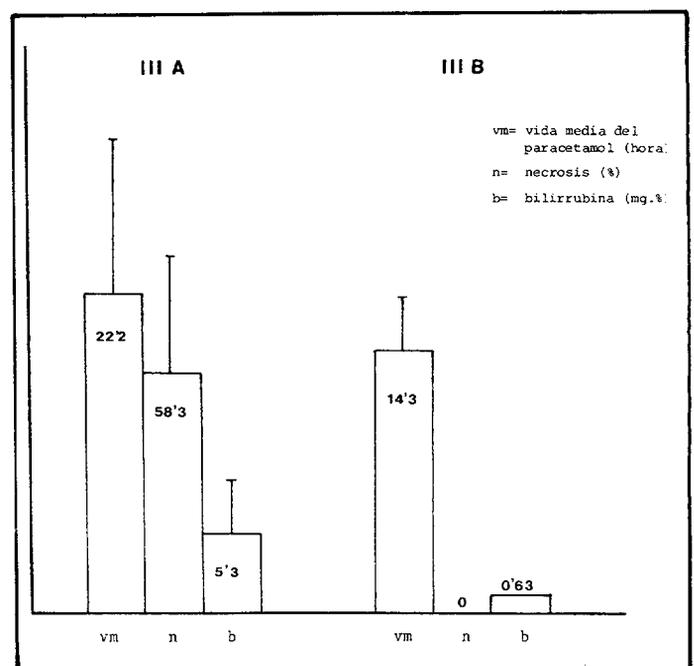


Fig. 17 B.—Relación de la vida media del paracetamol, necrosis y bilirrubinemia en los Grupos III A y III B.

taria en relación a cuadros de degeneración hidrópica mitocondrial.

Dado que la interacción entre el Acetaminofén y el Pentotal Sódico fue un hallazgo clínico accidental en el curso de nuestra experiencia, al comprobar mayor afectación en aquellos animales en los que era empleado el Pentotal como anestésico para mantener al perro sedado durante la perfusión del tóxico, fue introducido un grupo control que recibió únicamente Pentotal (Grupo IV) para descartar el posible efecto tóxico directo de este fármaco; resultando las investigaciones bioquímicas y morfológicas absolutamente normales.

La determinación de los picos plasmáticos de Acetaminofén en el hombre se han considerado de gran importancia en el pronóstico de los cuadros de intoxicación por varias razones. En primer lugar, para cuantificar la dosis ingerida, hecho no siempre sencillo en la clínica (ingesta desconocida, diferencias en la absorción, vómitos, etc.) y en segundo lugar, para determinar la vida media del fármaco. Así, Prescott y cols. (20) han demostrado que la vida media superior a 4 horas conlleva necrosis hepática importante, que puede conducir a fallo.

La cuantificación de la tasa de Acetaminofén en nuestro modelo (aun

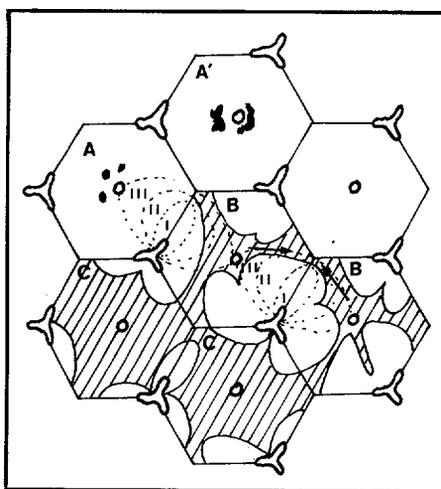


Fig. 18.—Representación esquemática de los grados de necrosis en los distintos grupos. A: Grado I (Grupo I), focos de necrosis dispersos en torno a la vénula hepática terminal. A': en ocasiones se observa necrosis confluyente. B: Grado II (Grupo II A), necrosis en puente de la zona 3 acinar. C: Grado III (Grupos II B y III A), necrosis masiva que respeta únicamente algunos hepatocitos de la zona 1 acinar. (Las flechas indican la dirección de la necrosis.)

siendo conocida la dosis administrada) demuestra una serie de hechos de interés según se observa en la figura 17 A.

- Picos similares en los Grupos III A y III B a las 4 horas, sin significación estadística entre ambos ($\bar{x} = 226$, $ds = 56,3$, $\bar{x} = 186,6$, $ds = 41,6$. $p < 0,05$).

- Marcada disminución del nivel sérico en las tomas de 24 y 48 horas en los animales del Grupo III B ($\bar{x} = 52,5$, $ds = 9,57$, $\bar{x} = 15,0$, $ds = 8,66$. $p < 0,01$). Mantenimiento relativo en las pertenecientes al Grupo III A con alta significación estadística para ambas muestras ($p < 0,01$).

- Disminución intragrupo e intertoma en el Grupo III A ($\bar{x} = 130$, $ds = 26$; $\bar{x} = 93,3$, $ds = 15$. $p < 0,05$) y en el Grupo III B ($p < 0,01$).

De estos puntos se deduce que en independencia del uso del Pentotal ambos grupos de animales muestran una distribución inicial de la droga similar, al no existir diferencias significativas en las concentraciones realizadas a las 4 horas de la intoxicación. En este momento ya se inician en el Grupo III A los signos bioquímicos de necrosis hepática que se desarrolla hasta las 24 horas. Las disminución de la droga es secundaria al catabolismo hepático, aunque se diferencia significativamente del otro grupo por la destrucción hepatocitaria, que impide que continúe el metabolismo del Acetaminofén manteniéndose, además, esta situación en la muestra de las 48 horas. Se puede deducir, por tanto, que la disminución parcial de la cifra de paracetamol sérico es otro marcador fiable de la existencia de necrosis hepática severa. Los resultados son, de esta forma, congruentes con las alteraciones histológicas y bioquímicas.

Se demostró, también, la significación estadística entre ambos grupos en relación a la cifra de vida media. (III A: $\bar{x} = 22,2$, $ds = 12,2$; III B: $\bar{x} = 14,3$, $ds = 2,3$. $p < 0,01$). Este retraso de depuración en los animales con IHF vuelve a indicar la disregulación metabólica hepatocitaria secundaria a la necrosis, constituyendo otro parámetro fiable en el pronóstico de la lesión.

Zimmerman (33) ha considerado de gran importancia pronóstica la bilirrubinemia en los pacientes intoxicados, indicando que valores superiores a los 4 mgrs. % conducen a IHF y muerte en prácticamente el 100% de los casos. En nuestros animales se comprobó esta relación entre las cifras de bilirrubina y la necrosis. Así, para el Grado I las cifras fueron bajas ($\bar{x} = 0,23$, $ds = 0,15$); para el Grado II moderadamente elevadas ($\bar{x} = 0,45$, $ds = 0,26$) y para el

HISTOPATOLOGIA (DATOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS) EN RELACION A LA BILIRRUBINA

GRUPO	I	II A	II B	III A	III B	IV
GRADO DE PORTMANN	I	II	III	III	0	0
PORCENTAJE DE NECROSIS (%)	—*	22,9 ± 6,8	62,02 ± 2,22	58,3 ± 28,5	—**	—**
BILIRRUBINA 72 h. (mg. %)	0,23 ± 0,15	0,45 ± 0,26 ⁺	3,22 ± 1,97	5,3 ± 3,6	0,63 ± 0,1	N

* Focos de necrosis dispersos.

** No necrosis (únicamente vacuolización en el Grupo III B).

+ Cifras de bilirrubina a las 48 horas.

N Normal.

Grado III (Grupo III A) muy elevadas ($x = 5,3$, $ds = 3,6$).

Todos estos hallazgos bioquímicos demuestran la fiabilidad del modelo experimental en cuanto a la producción de IHF con Acetaminofén y Pentotal asociados a las dosis indicadas. No existen falsos positivos ni negativos. Aún más, la estrecha correlación

entre los parámetros bioquímicos realizados permite utilizar marcadores de bajo coste para el control evolutivo de los animales intoxicados. Entre estos indicadores se pueden manejar las cifras de transaminasas, o con mayor fiabilidad, las de bilirrubina, sin necesidad de realizar la determinación de paracetamol sérico, que es más costosa y requiere una técnica más compleja.

CONCLUSIONES

1. La administración por vía intravenosa de 500 mgrs/Kg. de peso de Acetaminofen y 20-30 mgrs/Kg. de peso de Pentotal Sódico al perro produce necrosis hepática fulminante.

2. La necrosis así conseguida constituye un modelo experimental ideal de IHF por su especificidad, reproducibilidad, reversibilidad, por el escaso riesgo del investigador y por tratarse el perro de un animal suficientemente grande para evaluar nuevos protocolos terapéuticos médicos y/o quirúrgicos en la IHF de cualquier etiología o específicamente en la intoxicación por Acetaminofén.

3. La vida media y niveles séricos de Acetaminofén están profundamente alterados en los animales con necrosis masiva, siendo reflejo de ésta.

4. La bilirrubina constituye un marcador bioquímico efectivo y de bajo coste del grado de necrosis y por tanto un factor de control de la consecución y evolución de la necrosis.

BIBLIOGRAFIA

1. ANONYMOUS: «Paracetamol hepatotoxicity». *Lancet*, 2: 1189-1191, 1975.
2. BLITZER, B. L.; WAGGONER, J. G.; JONES, E. A.; GRANLICK, H. R.; TOWNE, D.; BUTLER, J.; WEISE, V.; KOPIN, I. J.; WALTERS, I.; TEYCHENNE, P. F.; GOODMAN, D. G., y BERK, P. D.: «A model of fulminant hepatic failure in the rabbit». *Gastroenterology*, 74: 664-671, 1978.
3. CALDER, I. C.; HART, S. J.; SAMIL, M. C., y TANGE, J. D.: «Hepatotoxicity of phenacetin and paracetamol in the Gunn rat». *Pathology*, 13: 757-762, 1981.
4. CLARK, R.; THOMSON, R. P. H.; BORIRAKCHANYAVAT, V.; WIDDOP, B.; DAVIDSON, A. R.; GOULDING, R., y WILLIAMS, R.: «Hepatic damage and death from overdose of paracetamol». *Lancet*, 1: 66-70, 1973.
5. CHIU, S., y BHATKAN, N. M. G.: «Experimental acetaminophen induced hepatic necrosis. Biochemical and electronmicroscopic study of cysteamine protection». *Lab. Invest.*, 39: 193-203, 1978.
6. CUERVAS-MONS, V.; GOLITSIN, J. A.; CIENFUEGOS, J. A.; MAGANTO, P.; EROLES, G., y CASTILLO, J. L.: «Hepatectomía del 70% y anastomosis portocava terminolateral como modelo experimental de insuficiencia hepática fulminante». *Rev. Esp. Enferm. Ap. Digest.*, 64: 389-394, 1983.
7. DAVIDSON, D. G. D., y EASTHAM, W. N.: «Acute liver necrosis following overdose of paracetamol». *Brit. Med. J.*, 2: 497-499, 1966.
8. DIAZ, A.; RICCO, J. B.; FRANCO, D.; GIGOU, M.; SZEKELY, A. M., y BISTMUTH, H.: «Temporary liver transplantation in acute liver failure». *Arch. Surg.*, 112: 74-79, 1977.
9. DIXON, M. F.; DIZON, B.; APARICIO, S. R., y LONEY, D. P.: «Experimental paracetamol-induced hepatic necrosis: A light and electron-microscopic and histochemical study». *J. Path.*, 116: 17-29, 1975.
10. DIXON, M. E.; NIMMO, J., y PRESCOTT, L. F.: «Experimental paracetamol-induced hepatic necrosis. A histopathological study». *J. Path.*, 103: 225-229, 1971.
11. FERNANDEZ, E., y FERNANDEZ-BRITO, A. C.: «Acetaminophen toxicity». *New Engl. J. Med.*, 296: 577, 1977.
12. GARNIER, R.; RIBOULET-DELMAS, G., y EFTHYMIU, M. L.: «Intoxications aiguës par le paracetamol soluble. Etude rétrospective des données du Centre Anti-Poison de Paris. 1974-1981». *Sem. Hop. Paris*, 58: 435-439, 1982.
13. GAZZARD, B. G.; HUGHES, R. D.; MELLON, P. J.; PORTMANN, B., y WILLIAMS, R.: «A dog model of fulminant hepatic failure produced by paracetamol administration». *Br. J. Exp. Path.*, 56: 408-411, 1975.
14. JAMES, O.; LESNA, M.; ROBERTS, S. H.; PULMAN, L.; DOUGLAS, A. P.; SMITH, P. A., y WATSON, A. J.: «Liver damage after paracetamol overdose (comparison of liver-function test, fasting serum bile acids and liver histology)». *Lancet*, 2: 579-581, 1975.
15. KOCH-WESER, J.: «Acetaminophen». *New Engl. J. Med.*, 295: 1297-1300, 1976.
16. MC JUNKIN, B.; BARWICK, K. M.; LITTLE, W. C., y WINFIELD, J. B.: «Fatal massive hepatic necrosis following acetaminophen overdose». *Jama*, 236: 1874-1875, 1976.
17. MC MASTER, K. R. III, y HENNIGAR, G. R.: «Drug-induced granulomatous hepatitis». *Lab. Invest.*, 44: 61-73, 1981.
18. PORTMANN, B.; TALBOT, I. C.; DAY, D. W.; DAVIDSON, A. R.; MURRAY-LYON, I. M., y WILLIAMS, R.: «Histopathological changes in the liver following a paracetamol overdose: Correlation with clinical and biochemical parameters». *J. Path.*, 117: 169-181, 1975.
19. POULSEN, H. E.; PETERSEN, P., y VILSTRUP, H.: «Quantitative liver function and morphology after paracetamol administration to rats». *Eur. J. Clin. Invest.*, 11: 161-164, 1981.
20. PRESCOTT, L. F.; NEWTON, R. W.; SWAINSON, C. P.; WRIGHT, N.; FORREST, A. R. W., y MATTHEW, H.: «Successful treatment of severe paracetamol overdose with cysteamine». *Lancet*, 1: 588-592, 1974.
21. PRESCOTT, L. F.; WRIGHT, N.; ROSCOE, P., y BROWN, S. S.: «Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage». *Lancet*, 1: 519-522, 1971.
22. PROUDFOOT, A. T., y WRIGHT, N.: «Acute paracetamol poisoning». *Brit. Med. J.*, 3: 557-558, 1970.
23. RAPPAPORT, A. M.: «The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure». *Beitr. Path. Bd.*, 157: 215-243, 1976.
24. RUEEFF, B., y BENHAMOU, J. P.: «Acute hepatic necrosis and fulminant hepatic failure». *Gut*, 14: 805-815, 1973.
25. SAENZ DE SANTAMARIA, J.; PEREZ MIRANDA, M.; SORIA, A.; LOZANO, F.; MARTINENA, E., y GOMEZ DE TEJADA, R.: «Lesión hepática por acetaminofén. A propósito de un caso con infrecuente participación portal». *Rev. Clin. Esp.*, 168: 355-356, 1983.
26. SATO, T.; MATSUDA, Y., y LIEBER, C. S.: «Increased hepatotoxicity of acetaminophen after chronic ethanol consumption in the rat». *Gastroenterology*, 80: 140-148, 1981.
27. SHERLOCK, S.: «Diseases of the liver and biliary systems». Blackwell Scientific Publications, 1981.
28. SPOONER, J. B., y HARVEY, J. G.: «The history and usage of paracetamol». *J. Int. Med. Res.*, 4 (suppl. 4): 1-6, 1976.
29. TERBLANCHE, J.; HIZKMAN, R., y MILLER, P.: «Animal experience with support systems: Are there appropriate animal models of fulminant hepatic necrosis?». Artificial liver supports. R. Williams. J. Murray-Lyon, 163, 1975.
30. VOLAND, G. N.: «Self-poisoning and suicide due to paracetamol». *J. Int. Med. Res.*, 4 (suppl. 4): 7-13, 1976.
31. WALKER, R. M.; RACZ, W. J., y MAC ELLIGOTT, T. F.: «Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice». *Lab. Invest.*, 42: 181-189, 1980.
32. WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S., y SCHERLE, W. H.: «Practical stereological methods for morphometric cytology». *J. Cell Bio.*, 30: 23-28, 1966.
33. ZIMMERMAN, H. J.: «Effects of aspirin and acetaminophen on the liver». *Arch. Intern. Med.*, 141: 333-342, 1981.