

Actividad proil-hidroxilasa hepática y concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en la hepatopatía alcohólica

Miguel Torres Salinas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TITULO:

ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA Y
CONCENTRACION SERICA DEL PEPTIDO AMINO-
TERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III EN LA
HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

TESIS PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR
POR LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSI-
DAD DE BARCELONA.

PRESENTADA POR:
MIGUEL TORRES SALINAS.

BARCELONA 1984.

PARTE PRÁCTICA

A). M A T E R I A L Y M E T O D O S

A.1) MATERIAL

El análisis de la actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático y de la concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III, se efectuaron en 60 pacientes alcohólicos crónicos ingresados en la Unidad de Hepatología del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. Todos estos pacientes ingerían más de 120 gramos de alcohol puro al día (la ingesta osciló entre 121 y 250 g/día) por un periodo superior a 5 años. Cuarenta eran varones con una edad media de $42,7 \pm 8,1$ y 20 mujeres con una edad media de $49,9 \pm 11$ años. Todos los pacientes tenían una función renal normal y no recibían ningún tratamiento en el momento de ser incluidos en el estudio.

1. OBTENCION DE LA MUESTRA DE TEJIDO HEPATICO.

A todos los pacientes se les practicó una punción biopsia hepática percutánea con una aguja de Tru-cut, obteniéndose un fragmento de 20 mm y de 20-23 mg de peso húmedo. El espécimen fue dividido mediante un corte transversal en

dos fragmentos de dos tercios y un tercio respectivamente. El primero de estos fragmentos fue introducido en formol al 4% y procesado para el análisis histológico. El fragmento menor fue introducido en un tubo de Nunc y éste en un medio de transporte conteniendo nieve carbónica para evitar una disminución de la actividad de la prolil-hidroxilasa (PH-asa) en el tejido obtenido. El tubo de Nunc fue trasladado en el medio citado a un contenedor de nitrógeno líquido donde permaneció hasta el momento de realizar el ensayo que se practicó antes de transcurridos 12 meses.

2. OBTENCION DE LA MUESTRA DE SUERO.

El mismo día que se practicó la biopsia hepática se extrajeron 10 ml de sangre a 53 de estos pacientes. Tras centrifugación de esta muestra sanguínea se obtuvo el suero que fue congelado a -20° C hasta el momento de la determinación del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (P-III-P) que se efectuó antes de transcurridos seis meses.

A.2) METODOS

1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA EN EL TEJIDO HEPATICO.

1.1. FUNDAMENTO.

La prolil-hidroxilasa cataliza la hidroxilación de ciertos residuos de prolina en hidroxiprolina. La prolina como aminoácido libre no constituye un sustrato y para que la reacción de hidroxilación tenga lugar la prolina debe estar incorporada en cadenas polipeptídicas relativamente grandes. Existen dos tipos de prolil-hidroxilasa, la 3 prolil-hidroxilasa que hidroxila el carbono 3 del anillo de prolina y la 4 prolil-hidroxilasa (la más abundante en el hígado) que hidroxila el carbono 4.

La determinación de la actividad prolil-hidroxilasa hepática en nuestro estudio se efectuó mediante la técnica de Hutton (95) modificada por McGee (242), que utiliza como sustrato prolina tritiada en posición 3 y 4 unida a una cadena larga de aminoácidos. La hidroxilación de un mol de prolina en hidroxiprolina comporta el desplazamiento de un átomo de hidrógeno del car-

bono hidroxilado, que se equilibra con el agua del medio, dando lugar a la formación de agua tritiada (fig.6). El oxígeno atmosférico es la fuente del átomo de oxígeno que se une al carbono que se hidroxila de la prolina. El otro átomo de oxígeno aparece en el succinato, que se forma a partir del α acetoglutarato, un sustrato obligado de esta reacción. Así pues la prolil-hidroxilasa es una dioxigenasa. Un aspecto característico de esta reacción es la necesidad de un agente reductor tal como el ascorbato para mantener el átomo de hierro de la enzima en forma ferrosa. Cada mol de 3-4 prolina que se hidroxila a hidroxiprolina da lugar a la formación de un mol de agua tritiada, que una vez destilada del medio de incubación puede cuantificarse mediante un contador de centelleo.

1.2. PREPARACION DEL SUSTRATO MARCADO.

La prolina 3-4 tritiada se obtiene comercialmente (Amersham International, AE: 40 Ci/mmol) pero para que sea reconocida por la enzima debe estar unida a una cadena de aminoácidos. Para ello se utilizaron 15 embriones de pollo decapitados, de 8-9 días (15 embriones decapitados

Prolil-hidroxilasa

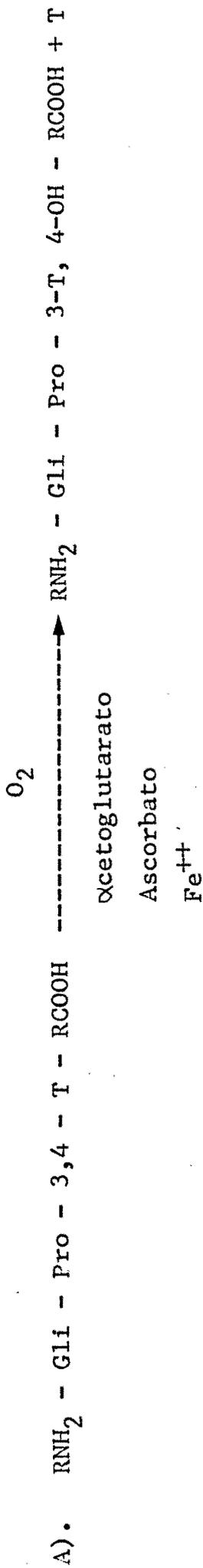


Figura 6. Hidroxilación de la 3-4 prolina por la 4 prolil-hidroxilasa. (T = Tritio). A). Reacción de hidroxilación. B). Formación de agua tritiada.

equivalen a unos 6 gramos), que fueron troceados y suspendidos en 8,5 ml de un tampón de Krebs-Ringer modificado, conteniendo NaCl 22 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM y D-Glucosa 10 mM, al que se añadió 1 mM de α - α' -dipiridilo y 500 μ Ci de prolina 3-4 tritiada. Se procedió entonces a una incubación aeróbica de la mezcla en un baño metabólico oscilante a 37 \circ C durante 90 minutos. A continuación el homogeneizado se centrifugó a 4 \circ C y 3.500 x g durante 40 minutos desechándose el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de ácido acético 0,5 N durante 90 minutos a 4 \circ C y se agitó suavemente con objeto de solubilizar y extraer el sustrato marcado. Luego se centrifugó a 4 \circ C y 3.500 x g durante 40 minutos y se recogió el sobrenadante. Con el fin de obtener el máximo sustrato marcado el precipitado se resuspendió de nuevo en ácido acético y se procesó de la misma manera. El líquido obtenido en cada una de las dos extracciones, conteniendo prolina libre y prolina unida a cadenas de aminoácidos de embrión de pollo, se dializó en frío durante 18 horas efectuando 3 cambios de agua con objeto de eliminar del medio la

prolina no incorporada al sustrato. La figura (7) indica el rendimiento de la diálisis tras 1 o 2 extracciones pudiéndose observar que en ambos casos fue similar. Se comprobó que a partir de 12 horas de diálisis, la eliminación de la prolina libre del dializado era máxima llegando al equilibrio.

Finalizada la diálisis se mezclaron ambos dializados y se determinó la actividad específica del sustrato marcado obtenida que fue de $6,05 \times 10^6$ dpm/mg de proteína. Las proteínas del medio fueron determinadas por el método de Lowry (261). Los 110 ml de dializado fueron repartidos en alícuotas de 1,6 ml y congeladas a -20°C hasta su posterior utilización en cada ensayo.

1.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA EN TEJIDO HEPATICO.

Poco antes de la realización del ensayo las muestras de tejido hepático que se conservaban en nitrógeno líquido se descongelaron , a temperatura ambiente, y se pesaron en húmedo en una balanza de precisión (Mettler H43). A continuación se realizó el ensayo cuyos pasos

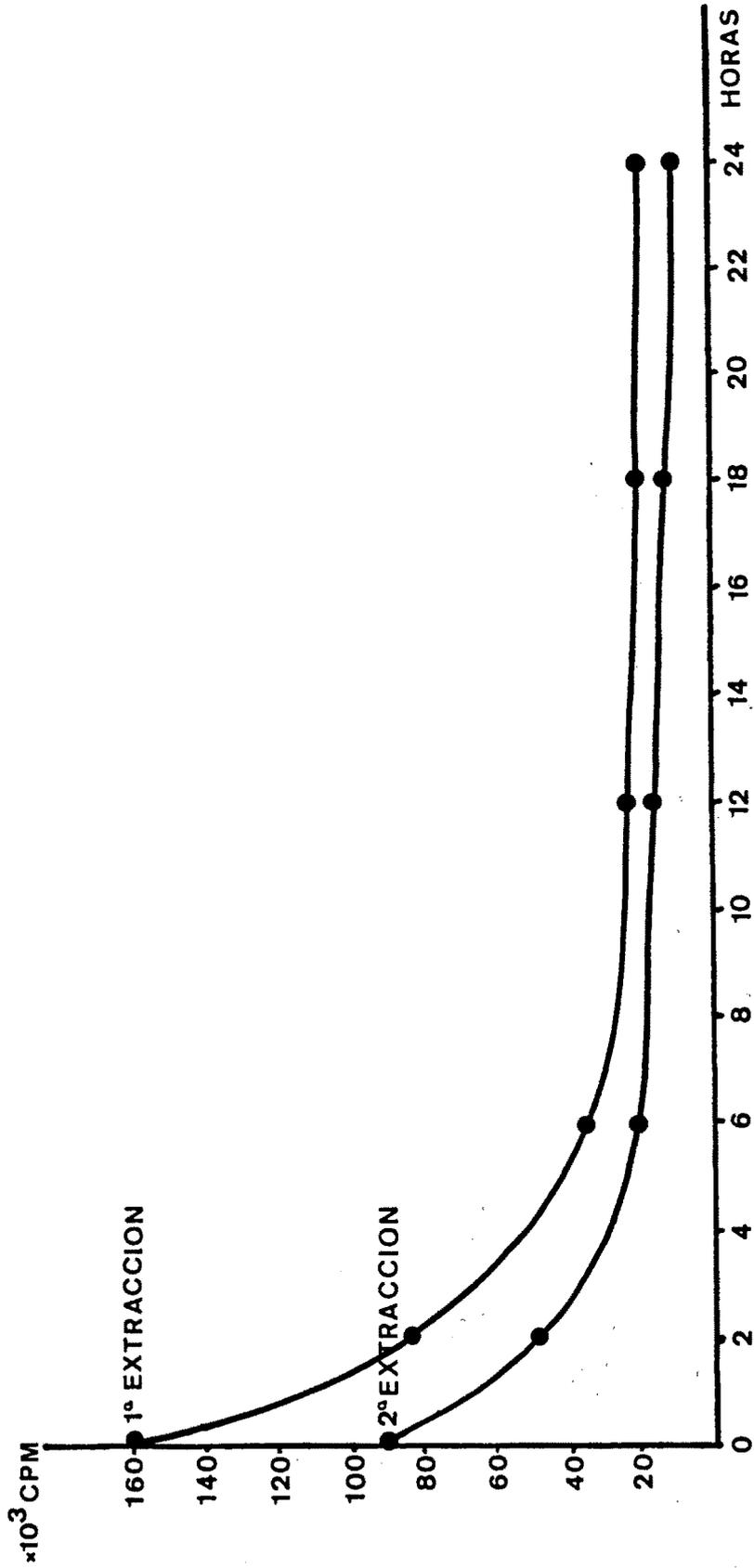


Figura 7. Curva de desaparición de la radioactividad en el líquido dializado a lo largo del tiempo de diálisis.

fundamentales fueron:

1.3.1. HOMOGENEIZACION.

La muestra de tejido hepático se homogeneizó con un émbolo de teflón Elvehem-Potter. Las características de la homogeneización fueron: diámetro 7,82 mm, aclaramiento 11-15 mm, temperatura 0-4°C y el número de descensos del émbolo 10. La relación peso de la muestra/volumen del medio de homogeneización utilizada fue de 7 mg/0,5 ml. El tampón de homogeneización utilizado fue Tris-HCl 0,05 M a pH 7,2 conteniendo Sacarosa 0,25 M, Etilendiaminotetraacetato-disódico (EDTA) 10^{-5} M, Ditioneitol 10^{-3} M, Fluoruro de fenil-metil-sulfona (PMSF) 50 µg/ml y Triton X-100 0,1%. El PMSF se disolvió previamente en propanol-2. El tampón de homogeneización se preparó inmediatamente antes de realizar cada experiencia. El homogeneizado se centrifugó a 4°C y 500 x g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Se guardó una muestra del homogeneizado para la determinación posterior de la concentración de proteínas.

1.3.2. INCUBACION.

La incubación del homogeneizado hepático se llevó a cabo inmediatamente después de la homogeneización del tejido hepático para evitar la pérdida de actividad enzimática. El volumen de la reacción de incubación fue de 1 ml, compuesto de 0,1 ml de homogeneizado hepático, 0,1 ml del sustrato marcado (previamente calentado a 30°C durante 15 minutos) y 0,8 ml de tampón de incubación. El tampón de incubación fue Tris-HCl a pH 7,2 conteniendo Sulfato amónico ferroso 1 mM, Albúmina sérica bovina (BSA) desnaturalizada 2 g/l, Catalasa 0,4 g/l, α -cetoglutarato 2 mM, Ditioneitol 0,1 mM y finalmente Ascorbato sódico 50 mM. El ascorbato sódico fue el último componente añadido para evitar su oxidación.

La reacción de incubación se realizó por duplicado, en un incubador metabólico oscilante a temperatura constante de 30°C y durante 30 minutos. La reacción se detuvo tras añadir 0,1 ml de tricloracético al 50% en frío a cada alícuota. Tras una ligera agitación las alícuotas se mantuvieron en reposo durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente fueron cen-

trifugadas a 4°C y 3.000 x g durante diez minutos. Tras este proceso se recogió el sobrenadante.

1.3.3. DESTILACION.

El sobrenadante fue destilado en un destilador acoplado a una bomba de vacío para evitar que la temperatura de ebullición fuese superior a 60°C. El rendimiento obtenido fue del 90%.

1.3.4. RESULTADO.

En cada ensayo se incluyeron dos blancos en los que el homogeneizado hepático (0,1 ml) fue sustituido por tampón de homogeneización.

La radioactividad presente en el agua destilada de cada ensayo se valoró mediante un contador de centelleo líquido (Intertecnicque, Compteur a Scintillation liquide SL 4000), expresando el resultado en cpm/mg de proteína del homogeneizado previa sustracción de las cpm de los blancos. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (261).

1.4. VALIDACION DEL METODO.

La linealidad del ensayo y la cinética de incubación se determinaron en fragmentos de tejido hepático obtenidos mediante punción percutánea inmediatamente después del fallecimiento en un paciente afecto de una hepatopatía alcohólica.

1.4.1. LINEARIDAD DEL ENSAYO.

Con objeto de analizar si cantidades crecientes de prolil-hidroxilasa daban lugar a la formación proporcional de cantidades crecientes de agua tritiada se efectuó un ensayo de linealidad. Se obtuvo una buena relación lineal entre cantidades crecientes (25,50,100,150 y 200 μ l) del homogeneizado de tejido hepático y las cpm obtenidas en el destilado. Cada uno de los puntos se efectuó por triplicado. Los resultados están expresados como la media y la desviación standard de cada uno de ellos (fig.8). El coeficiente de variación de los triplicados osciló entre el 3,03% y el 9,3%.

1.4.2. CINETICA DE INCUBACION.

Para comprobar que la reacción enzimática

LINEARIDAD DE LA DETERMINACION DE LA PROLIL-HIDROXILASA

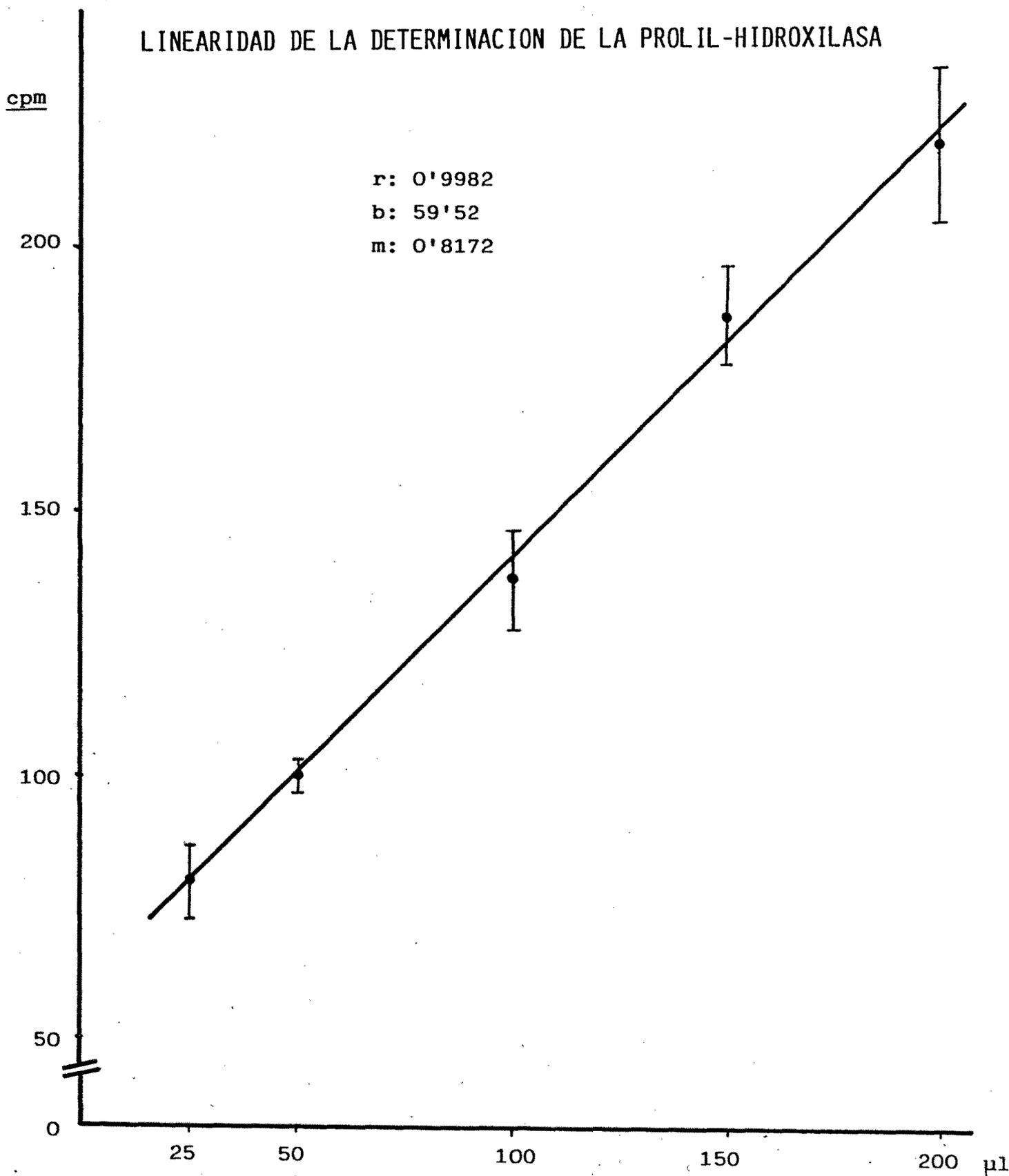


Figura 3.

fué lineal en el periodo de tiempo de incubación utilizado en el ensayo, se determinó la actividad prolil-hidroxilasa de una misma muestra de homogeneizado hepático a tiempos de incubación progresivamente crecientes (0,5,6,7,8, 9,60 y 90 minutos) (fig.9). Cada punto se determinó por triplicado y el coeficiente de variación de los triplicados osciló entre 2,9% y 12,1%. El ensayo mantuvo la linealidad en el periodo de tiempo estudiado.

1.4.3. CONSERVACION DEL SUSTRATO MARCADO.

Con el fin de determinar si la congelación y descongelación del sustrato marcado afecta a la reacción enzimática, se determinó la actividad prolil-hidroxilasa de una muestra hepática, con un sustrato marcado recién obtenido y se repitió la determinación en la misma muestra con el mismo sustrato tras su congelación durante una semana. La experiencia se realizó por triplicado, obteniéndose valores similares en las dos determinaciones (200 ± 18 frente a $189 \pm 19,8$ cpm/mg).

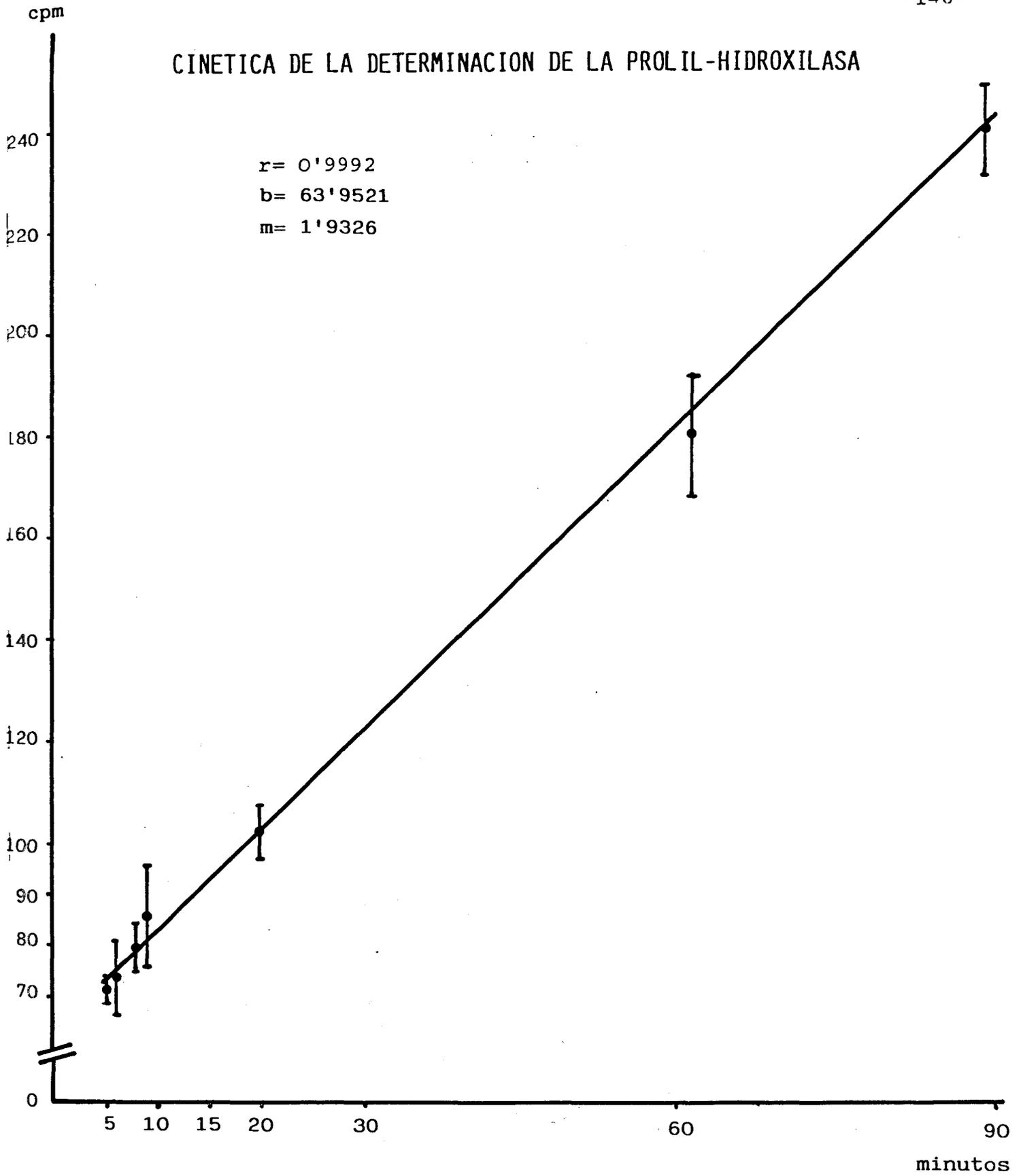


Figura 9.

1.4.4. PRECISION.

1.4.4.1. INTRAENSAYO.

Se determinó simultáneamente la actividad prolil-hidroxilasa de una misma muestra de tejido hepático de rata 10 veces, obteniéndose un coeficiente de variación de 6,7% ($X \pm SD$) (688 ± 46 cpm/mg) (tabla VII).

1.4.4.2. INTERENSAYO.

Previamente al inicio de los ensayos para la determinación de la actividad prolil-hidroxilasa hepática se sacrificó una rata, cuyo hígado fue dividido en fragmentos que oscilaron entre 7 y 10 mg de peso y que fueron congelados en nitrógeno líquido. El coeficiente de variación de la actividad prolil-hidroxilasa en 10 ensayos efectuados a lo largo de un año fue de 15,8% ($X \pm SD$) ($503,4 \pm 79,9$ ng/ml) (tabla VIII).

Como control en cada uno de los ensayos efectuados en tejido hepático humano se utilizaron fragmentos del hígado de esta misma rata.

T A B L A VII

REPRODUCTIBILIDAD INTRAENSAYO

	<u>cpm/mg</u>
Muestra 1	733,3
Muestra 2	756,6
Muestra 3	730
Muestra 4	653
Muestra 5	666,6
Muestra 6	633
Muestra 7	720
Muestra 8	720
Muestra 9	666,6
Muestra 10	640
	<hr/>
	($\bar{X} \pm SD$) 688 \pm 46

Coefficiente de variación: 6,7%

Reproductibilidad intraensayo. Valores de actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático de una misma rata efectuados por decuplicado.

T A B L A VIII

REPRODUCTIBILIDAD INTERENSAYO

	<u>cpm/mg</u>
Muestra 1	658
Muestra 2	420
Muestra 3	509
Muestra 4	467
Muestra 5	430
Muestra 6	525
Muestra 7	522
Muestra 8	413
Muestra 9	484
Muestra 10	606

($\bar{x} \pm SD$) 503,4 \pm 79,9

Coefficiente de variación: 15,8%

Reproductibilidad interensayo. Valores de actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático de una misma rata en 10 ensayos sucesivos efectuados en el transcurso de un año.

2. DETERMINACION SERICA DEL PEPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III (P-III-P).

2.1. RADIOINMUNOANALISIS.

La determinación en suero del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (P-III-P) se efectuó utilizando un kit de radioinmunoanálisis (Calbiochem-Berhing-Corp.). Esta técnica basicamente consiste en un radioinmunoanálisis de no equilibrio con una primera incubación del antígeno frio y el anticuerpo de 24 horas, seguida de una segunda incubación de 2 horas con el antígeno marcado. La separación de las fases libre y ligada al anticuerpo se realizó por el método del segundo anticuerpo. Este se añadió al medio de incubación y después de una incubación de 20 minutos se centrifugó a 1.500 x g durante otros 20 minutos, para precipitar la fase ligada al anticuerpo. Seguidamente se decantó el sobrenadante con la fase libre y se contó el precipitado en un contador de centelleo sólido (Abbott ANSR Modelo 70403). Todo el proceso se realizó a 40 C.

La casa comercial del kit recomienda practicar sistemáticamente varios puntos de dilución

de cada suero problema y utilizar como fiables únicamente aquellos valores de dilución próximos al B_{50} (B/B_0 al 50%) de la curva patrón, ya que las curvas de dilución de las muestras problema no son paralelas a la curva patrón.

En la presente tesis Doctoral se ha introducido una modificación de la técnica anterior añadiendo un lavado del precipitado con agua destilada después de la centrifugación, procediendo luego a centrifugarlo de nuevo. Con esta modificación, el ligado inespecífico disminuye y las curvas de dilución de las muestras problema resultan paralelas a la curva patrón (fig.10).

A pesar de esta modificación, en nuestro estudio, no pudo evitarse la práctica de diluciones sistemáticas en los sueros problema. Ello fue debido a que la concentración sérica de P-III-P en el grupo de pacientes hepatópatas estudiados fue a menudo elevada y por tanto dichas concentraciones no quedaban incluidas en las del intervalo de la curva patrón. En cada suero problema se efectuaron cuatro puntos de dilución.

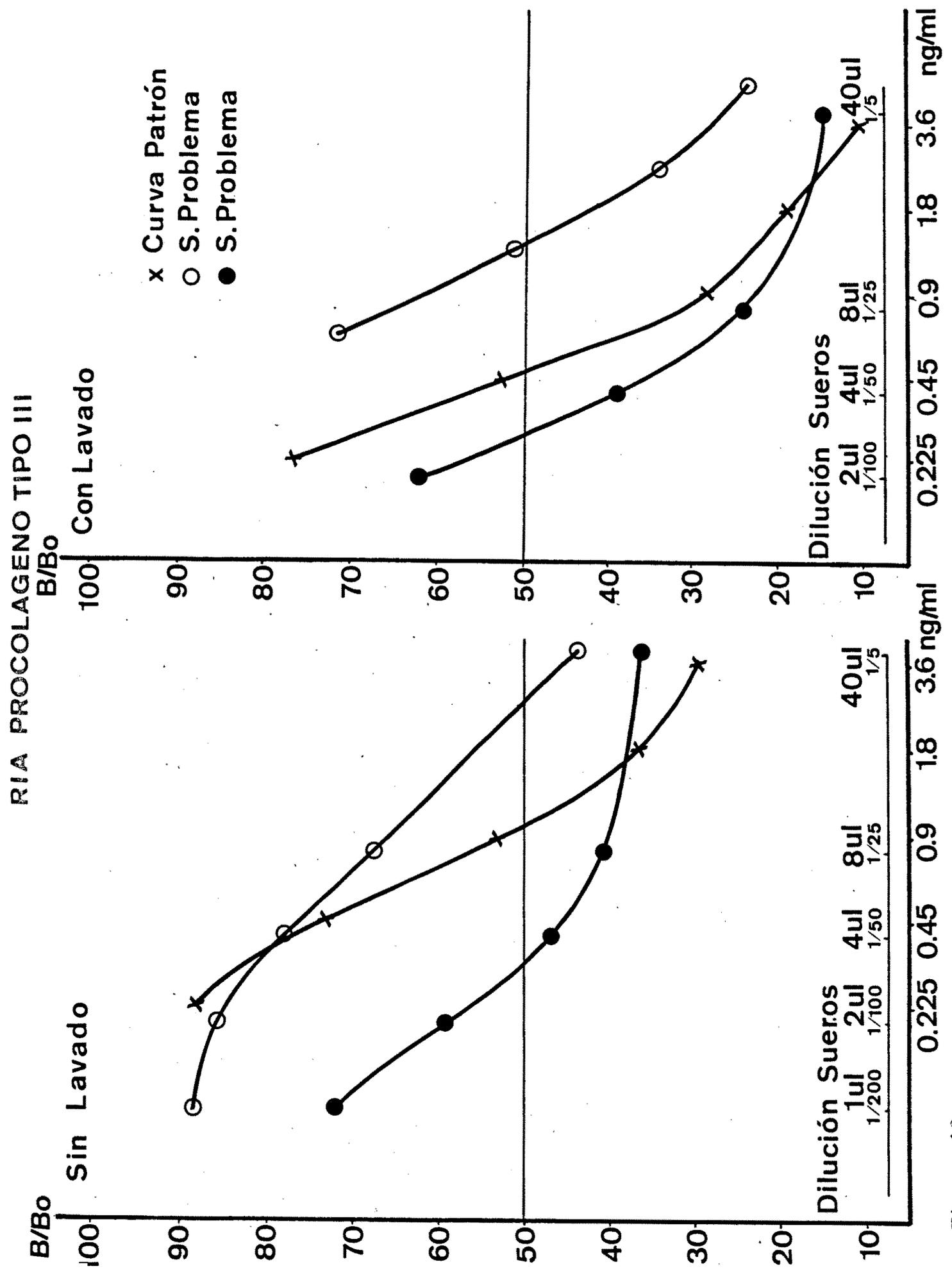


Figura 10.

2.2. VALIDACION DEL METODO.

2.2.1. PRECISION.

2.2.1.1. INTRAENSAYO.

Se realizaron simultáneamente diez determinaciones de dos sueros humanos, uno procedente de un paciente con un hígado normal y otro procedente de un hepatópata. Los valores de P-III-P fueron ($X \pm SD$) ($7,38 \pm 0,30$ ng/ml y $34,9 \pm 3,21$ ng/ml, respectivamente). El coeficiente de variación osciló entre 4,06% y 9,19% respectivamente (tabla IX).

2.2.1.2. INTERENSAYO.

Se utilizaron alícuotas de un suero humano, conservadas a $-20^{\circ}C$ durante seis meses. En diez ensayos sucesivos se incluyó una de dichas alícuotas, obteniéndose un coeficiente de variación del 11% ($X=14,76 \pm 1,72$ ng/ml) (tabla X).

2.2.2. SENSIBILIDAD.

La sensibilidad del método se calculó como la mínima concentración de patrón que se distinguió dos desviaciones standard del patrón "0"

T A B L A IX

REPRODUCTIBILIDAD INTRAENSAYO

	A		B
	ng/ml		ng/ml
Muestra 1	8	Muestra 1	34
Muestra 2	7,52	Muestra 2	36
Muestra 3	7,5	Muestra 3	36
Muestra 4	7,04	Muestra 4	30
Muestra 5	7,2	Muestra 5	36
Muestra 6	7,5	Muestra 6	33
Muestra 7	7,04	Muestra 7	36
Muestra 8	7,5	Muestra 8	32
Muestra 9	7,5	Muestra 9	42
Muestra 10	7,04	Muestra 10	34
	<hr/>		<hr/>
X ± SD:	7,38 ± 0,3		34,9 ± 3,2
Coefficiente			
de variación:	4,06%		9,19%

Reproductibilidad intraensayo. Valores de P-III-P sérico en dos pacientes (A) normal (B) hepatópata. El ensayo se efectuó diez veces en cada uno de los dos sueros.

T A B L A X

REPRODUCTIBILIDAD INTERENSAYO

	ng/ml
Muestra 1	16
Muestra 2	13
Muestra 3	12,3
Muestra 4	12,8
Muestra 5	17,6
Muestra 6	14,4
Muestra 7	16
Muestra 8	14,2
Muestra 9	16,2
Muestra 10	15,1
	<hr/>
X \pm SD	14,76 \pm 1,72
Coefficiente de variación:	11%

Reproductibilidad interensayo. Valores de P-III-P sérico en el suero de un mismo paciente en 10 ensayos sucesivos.

y fue de 0,23 ng/ml.

2.2.3. EXACTITUD.

La exactitud del ensayo se estudió determinando el porcentaje de recuperación (296) de una muestra de suero de concentración conocida (34,2 ng/ml) a la que se añadió una determinada cantidad de patrón (16 ng/ml). Este porcentaje de recuperación fue del 100,4%.

3. ANALISIS HISTOLOGICO DE LA BIOPSIA HEPATICA.

3.1. DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.

Para el análisis histológico se utilizaron dos tercios del espécimen de la biopsia hepática obtenida en cada paciente. Todas las biopsias fueron fijadas en formol al 4% y posteriormente incluídas en parafina. Los especímenes se cortaron en secciones de 5 micras de grosor y fueron teñidos con hemetoxilina y eosina, reticulina y tricrómico de Masson. Las biopsias fueron examinadas bajo código por un mismo observador y se clasificaron en las siguientes categorías: 1). Hígado normal o cambios mínimos inespecíficos, 2). Esteatosis, cuando se apreciaron múltiples vacuolas grasas sobre un hígado de arquitectura normal, 3). Fibrosis, cuando se observaron grados variables de fibrosis portal con o sin vacuolas grasas, 4). Hepatitis alcohólica, si habían focos de necrosis celular e infiltración polinuclear. La presencia de hialina de Mallory no se consideró indispensable para el diagnóstico, y 5). Cirrosis hepática, cuando se observaron nódulos de regeneración rodeados por tractos fibrosos.

3.2. INTENSIDAD DE LA FIBROSIS.

En todas las biopsias se estableció una gradación de la fibrosis de 0 a 3 + examinando las preparaciones teñidas con tricrómico de Masson. El grado 0 se aplicó cuando no existía fibrosis, una + cuando existía una moderada esclerosis portal, dos + si se observó una prolongación de los espacios porta hacia el parénquima en forma de tractos fibrosos, y tres + cuando existían septos conectivos que unían espacios porta entre sí o con áreas centrolobulillares y cuando había una cirrosis.

3.3. OTRAS ALTERACIONES HISTOLOGICAS.

En las biopsias de los pacientes sin cirrosis hepática, se analizó la presencia de fibrosis sinusoidal, lipocitos, hialina de Mallory, necrosis lobulillar, portitis, esteatosis y colestasis tisular.

4. CALCULO ESTADISTICO.

Los cálculos se realizaron en un computador Hewlett-Packard 9845 B (Hewlett-Packard Computer Division. 3404 East Harmony Road, Fort Collins, Colorado 80525) especialmente programado para la resolución de problemas estadísticos. Los tests utilizados han sido obtenidos de la referencia (297).

Para la comparación de dos proporciones se utilizó el método de la X^2 (tablas 2 x 2) con la corrección de Yates si alguno de los efectivos calculados fue inferior a 5 y el test de Fisher cuando alguno de los efectivos calculados fue inferior a 3.

En la comparación de dos medias se comprobó primero su distribución normal mediante el test de Kolgomorov y la igualdad de variancias mediante el coeficiente de Snedecor. Al no cumplirse las condiciones de aplicación de la ley de Student-Fisher se emplearon tests no paramétricos, el test de Mann-Whitney para datos independientes y el test de Wilcoxon para datos apareados.

En la comparación de un carácter cuantitativo con un carácter cualitativo con más de

dos categorías continuas se empleó el test de Kruskal-Wallis.

El estudio de la relación entre dos variables cuantitativas se realizó mediante el cálculo del Coeficiente de Regresión.

La sensibilidad se definió como el porcentaje de positivos entre los que tenían enfermedad. La especificidad como porcentaje de negativos entre los que no la tenían y la precisión diagnóstica como el porcentaje de resultados verdaderos.

B). R E S U L T A D O S

1. ANALISIS HISTOLOGICO DE LA BIOPSIA HEPATICA EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

1.1. DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.

Los criterios histológicos definidos anteriormente permitieron clasificar a los 60 pacientes alcohólicos crónicos en seis grupos. El primer grupo estuvo constituido por 7 pacientes (11,7%) con un hígado histológicamente normal. Seis pacientes (10%) tenían una esteatosis hepática. En 10 pacientes (16,6%) el análisis histológico demostró la existencia de una fibrosis con mayor o menor grado de esteatosis. Doce pacientes (20%) cumplían los criterios de hepatitis alcohólica sin cirrosis y en 7 pacientes (11,7%) además de la hepatitis alcohólica había una cirrosis hepática. Finalmente en 18 pacientes (30%) se diagnosticó una cirrosis hepática sin otras anomalías. La distribución de los pacientes según estos grupos histológicos se expresa en la tabla XI.

1.2. INTENSIDAD DE LA FIBROSIS.

La extensión de la fibrosis hepática fue valorada intencionadamente según los criterios

T A B L A · X I

DISTRIBUCION DE LOS PACIENTES SEGUN EL DIAGNOS-
TICO HISTOLOGICO DE LA BIOPSIA HEPATICA.

	<u>Nº</u>	<u>%</u>
Hígado histologicamente normal	7	11,7
Esteatosis	6	10
Fibrosis	10	16,6
Hepatitis alcohólica	12	20
Cirrosis con hepatitis alcohólica	7	11,7
Cirrosis	18	30
TOTAL	<u>60</u>	<u>100 %</u>

ya expuestos anteriormente. Este análisis histológico de la fibrosis reveló que 10 biopsias (16,6%) no tenían fibrosis, 11 biopsias (18,3%) tenían fibrosis grado 1, 10 biopsias grado 2 (16,6%) y 29 biopsias (48,3%) fibrosis grado 3. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla XII.

1.3. OTRAS ALTERACIONES HISTOLOGICAS.

En aquellos pacientes que no presentaban cirrosis hepática se analizó la existencia o no de otras características histológicas como fibrosis sinusoidal, lipocitos, hialina de Mallory, necrosis lobulillar, portitis, colestasis y esteatosis (tabla XIII). En 19 pacientes (54,2%) existió fibrosis sinusoidal en la biopsia hepática. Se constató la existencia de lipocitos en las biopsias de 12 pacientes (34,3%). En 9 pacientes (25,7%) se evidenció hialina citoplasmática de Mallory en la biopsia hepática. En 20 pacientes (57,1%) existían fenómenos de necrosis lobulillar. Otros 20 pacientes (57,1%) presentaron signos de inflamación portal y 25 pacientes (71,4%) esteatosis. Sólo 2 pacientes (5,7%) presentaron signos de colestasis tisular.

T A B L A X I I

VALORACION HISTOLOGICA DE LA FIBROSIS HEPATICA

	<u>Nº pacientes</u>	<u>%</u>
Fibrosis 0	10	16,6
Fibrosis 1	11	18,3
Fibrosis 2	10	16,6
Fibrosis 3	29	48,3
TOTAL	<u>60</u>	<u>100 %</u>

T A B L A XIII

DIVERSAS CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS ANALIZADAS EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA NO CIRROTICA.

	<u>Nº biopsias</u> (n=35)	<u>%</u>
Fibrosis sinusoidal	19	54,2
Lipocitos	12	34,3
Hialina de Mallory	9	25,7
Portitis	20	57,1
Necrosis lobulillar	20	57,1
Colestasis	2	5,7
Esteatosis	25	71,4

2. ACTIVIDAD PROLIL- HIDROXILASA (PH-asa) EN TEJIDO HEPATICO EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

2.1. VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA SEGUN EL DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.

La actividad prolil-hidroxilasa hepática de los pacientes alcohólicos crónicos osciló entre 229 cpm/mg y 3389 cpm/mg (tabla XIV). En las biopsias que no tenían anomalías histológicas la actividad PH-asa fue de 581 ± 66 cpm/mg ($X \pm$ ESM), en las que tenían esteatosis como única alteración la actividad fue de 724 ± 146 cpm/mg. En las biopsias con hepatitis alcohólica aislada la actividad PH-asa fue de 842 ± 155 cpm/mg. Los valores más elevados de actividad prolil-hidroxilasa se obtuvieron en el tejido hepático que mostraba una mayor intensidad de la fibrosis ya que en las biopsias diagnosticadas de fibrosis la actividad PH-asa fue de 1170 ± 177 cpm/mg, y en las diagnosticadas de cirrosis con y sin hepatitis alcohólica fue de 1158 ± 145 cpm/mg y 1133 ± 177 cpm/mg, respectivamente (fig.11).

Existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la actividad PH-asa hepática de las biopsias normales (581 ± 66

T A B L A XIV.

<u>Paciente</u>	<u>PH-asA (cpm/mg)</u>	<u>P-III-P (ng/ml)</u>	<u>Diagnóstico histológico</u>
nº 1	738	15	Hígado normal
nº 2	643	11	"
nº 3	595	5	"
nº 4	270	10	"
nº 5	553	7	"
nº 6	469	--	"
nº 7	799	--	"
nº 8	303	17	Esteatosis
nº 9	902	--	"
nº 10	344	17	"
nº 11	704	--	"
nº 12	848	9	"
nº 13	1243	10	"
nº 14	2175	42	Fibrosis
nº 15	2042	18	"
nº 16	995	39	"
nº 17	1026	11	"
nº 18	573	13	"
nº 19	547	14	"
nº 20	698	30	"
nº 21	1094	7	"
nº 22	1168	21	"
nº 23	1384	11	"
nº 24	1423	33	Hepatitis Alcohólica
nº 25	360	14	"
nº 26	762	19	"
nº 27	772	26	"
nº 28	1996	91	"
nº 29	542	15	"
nº 30	1518	34	"
nº 31	845	14	"
nº 32	229	14	"
nº 33	708	15	"
nº 34	639	18	"
nº 35	314	28	"
nº 36	610	29	Cirrosis + H. Alcohólica
nº 37	1763	74	"
nº 38	1249	40	"
nº 39	845	68	"
nº 40	1473	--	"
nº 41	1142	30	"
nº 42	1022	35	"
nº 43	518	19	Cirrosis
nº 44	873	15	"
nº 45	482	38	"
nº 46	893	24	"
nº 47	759	27	"
nº 48	1180	36	"
nº 49	713	20	"
nº 50	805	12	"
nº 51	2078	24	"
nº 52	525	34	"
nº 53	1503	--	"
nº 54	1156	--	"
nº 55	230	16	"
nº 56	1073	25	"
nº 57	3389	34	"
nº 58	1273	28	"
nº 59	2074	20	"
rp 60	873	18	"

cpm/mg) con los de las biopsias diagnosticadas de fibrosis (1170 ± 177 cpm/mg, $p < 0,05$), con la de las biopsias diagnosticadas de cirrosis aislada (1133 ± 177 cpm/mg, $p < 0,05$) y con las biopsias que además de la cirrosis tenían una hepatitis alcohólica (1158 ± 145 cpm/mg, $p < 0,01$). Aunque los niveles medios de actividad PH-asa fueron más elevados en las biopsias con esteatosis y con hepatitis alcohólica sin cirrosis que en el grupo de alcohólicos con hígado normal, no se hallaron diferencias significativas.

Considerando como límite superior de la normalidad de actividad PH-asa hepática el más elevado hallado en el grupo de alcohólicos con hígado normal, se pudo establecer que el 33,3% de las biopsias con hepatitis alcohólica aislada, el 50% con esteatosis, el 66,6% con cirrosis aislada, el 70% con fibrosis y el 71,4% con cirrosis y hepatitis alcohólica tenían unos niveles de PH-asa hepática elevados.

2.2. RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA Y LA INTENSIDAD DE LA FIBROSIS.

Existió un incremento progresivo de los valores de la actividad prolil-hidroxilasa en las

biopsias a medida que lo hacía la severidad de la fibrosis hepática. Los 10 pacientes que no presentaban fibrosis en la biopsia hepática tuvieron valores de actividad prolil-hidroxilasa hepática de 655 ± 90 cpm/mg ($X \pm$ ESM). Los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática en los 11 pacientes con fibrosis grado 1 fueron de 756 ± 99 , en los 10 pacientes con fibrosis grado 2 de 983 ± 178 cpm/mg y en los 29 pacientes con fibrosis grado 3, de 1173 ± 125 cpm/mg (fig.12) (Prueba de Kurskal-Wallis $H=8,13$, $p < 0,05$). Estas diferencias fueron debidas fundamentalmente a los valores hallados en las biopsias con fibrosis muy intensa (grado 3) ya que se hallaron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de actividad PH-asa entre las biopsias con fibrosis grado 3 y fibrosis grado 1 ($p < 0,05$), y con fibrosis grado 3 y sin fibrosis ($p < 0,05$).

2.3. RELACION ENTRE ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA Y OTRAS ALTERACIONES HISTOLOGICAS.

Se analizó la posible relación entre los niveles de actividad de la prolil-hidroxilasa hepática y otras lesiones histológicas. No exis-

tieron diferencias en los niveles de actividad hepática de la prolil-hidroxilasa entre aquellos pacientes que presentaban fibrosis sinusoidal en la biopsia hepática (19 pacientes) y aquellos que no la presentaban (16 pacientes) ($X \pm \text{ESM}$) (887 ± 124 frente a 870 ± 130 cpm/mg). Los pacientes que tenían lipocitos en la biopsia hepática (12 pacientes) tampoco tuvieron valores distintos de actividad de la enzima frente a aquellos que no tenían (23 pacientes) (884 ± 160 frente a 878 ± 110 cpm/mg). La existencia de cuerpos hialinos de Mallory en la biopsia hepática (9 pacientes) no se acompañó de diferencias en la actividad prolil-hidroxilasa hepática frente a los pacientes alcohólicos que no tenían esta lesión histológica (26 pacientes) (875 ± 213 frente a $882 \pm 96,5$ cpm/mg). Tampoco existieron diferencias significativas en los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática entre los pacientes que tenían fenómenos de necrosis celular (20 pacientes) y aquellos que no los tenían (15 pacientes) (851 ± 118 frente a 930 ± 138 cpm/mg), ni entre los pacientes que tenían signos de inflamación portal (20 pacientes) y aquellos que no los tenían (15 pacientes) (963 ± 116 frente

766 \pm 147 cpm/mg), ni tampoco existieron diferencias en los niveles de actividad de esta enzima hepática entre los pacientes que presentaban esteatosis hepática (25 pacientes) y aquellos que no la presentaban (10 pacientes) (871 \pm 100 frente a 944 \pm 194 cpm/mg). En las dos biopsias con colestasis tisular los niveles de PH-asa hepática fueron de 360 y 344 cpm/mg.

3. CONCENTRACION SERICA DEL PEPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III (P-III-P) EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

Se incluyó en el estudio un grupo control compuesto por 30 sujetos sanos de edad y sexo similares al grupo de pacientes alcohólicos estudiados. Los niveles séricos de P-III-P en este grupo control fueron ($X \pm SD$) ($9,5 \pm 2,1$ ng/ml) y se estableció como límite superior de normalidad a 13,7 ng/ml que corresponde a la media más dos desviaciones standard.

3.1. VARIACIONES DE LA CONCENTRACION SERICA DE P-III-P SEGUN EL DIAGNOSTICO HISTOLOGICO.

En 53 de los 60 pacientes incluidos en el estudio clínico de esta tesis doctoral, se determinó la concentración sérica del P-III-P cuyos valores se detallan en la tabla (XIV). Los valores del P-III-P en los pacientes alcohólicos oscilaron entre 5 y 91 ng/ml. La media de P-III-P en los pacientes alcohólicos fue significativamente más elevada que la del grupo control

($X \pm \text{ESM}$) ($24,3 \pm 2,3$ frente a $9,5 \pm 0,7$ ng/ml, $p < 0,01$). Cuarenta y dos de los 53 pacientes (79,3%) alcohólicos presentaron valores elevados de P-III-P sérico, uno de los cinco pacientes (20%) con hígado histológicamente normal, dos de los cuatro pacientes (50%) con esteatosis, seis de los diez pacientes (60%) con fibrosis, 21 de los 22 pacientes (95,5%) con cirrosis hepática y los 12 pacientes (100%) con hepatitis alcohólica. Los valores séricos de P-III-P fueron analizados de acuerdo con el diagnóstico histológico (fig.13). Los cinco pacientes con hígado histológicamente normal presentaron valores séricos de P-III-P de ($X \pm \text{ESM}$) $9,6 \pm 1,7$ ng/ml. Los cuatro pacientes con esteatosis tuvieron una concentración sérica de P-III-P de $13,2 \pm 1,8$ ng/ml. En los diez pacientes con fibrosis los niveles séricos de P-III-P fueron de $20,6 \pm 3,5$ ng/ml. Los doce pacientes con hepatitis alcohólica tuvieron valores de P-III-P de $26,7 \pm 5,7$ ng/ml. Los 16 pacientes con cirrosis sola presentaron niveles séricos de P-III-P de $24,4 \pm 1,9$ ng/ml y los seis pacientes con cirrosis y hepatitis alcohólica de 46 ± 8 ng/ml.

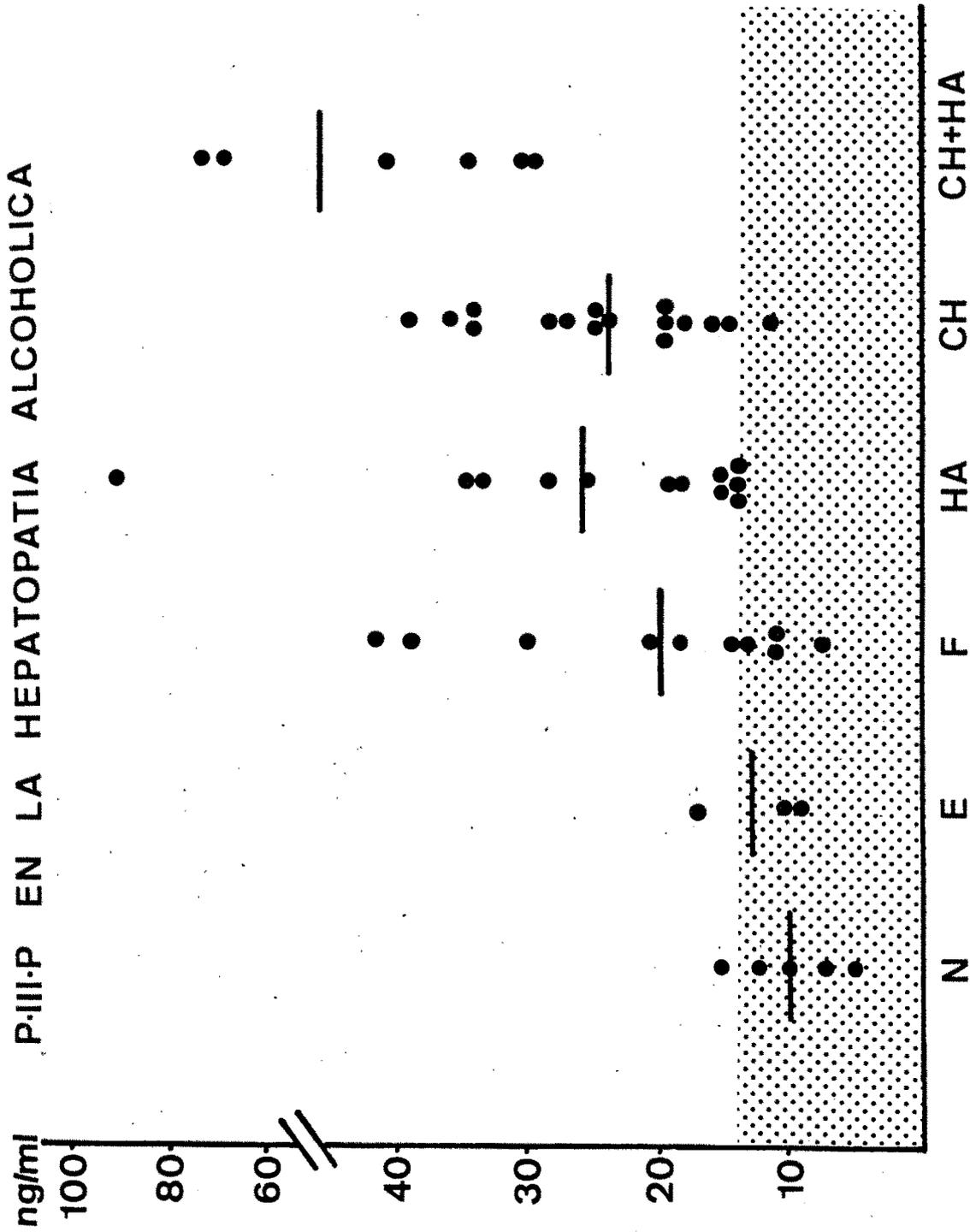


Figura 13.

No existieron diferencias significativas entre los niveles de P-III-P de los controles sanos y de los alcohólicos con hígado normal ($9,5 \pm 0,7$ y $9,6 \pm 1,7$ ng/ml p: ns). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los niveles de P-III-P de los pacientes con esteatosis y de los pacientes con fibrosis con los que tenían un hígado normal, aunque la media de P-III-P de los pacientes con esteatosis ($13,2 \pm 1,8$ ng/ml) y con fibrosis ($20,6 \pm 3,5$ ng/ml) fue mas elevada. Por el contrario se observaron diferencias significativas entre los niveles de P-III-P de los pacientes con histología normal y los diagnosticados de hepatitis alcohólica ($26,7 \pm 5,7$ ng/ml $p < 0,01$), cirrosis hepática aislada ($24,4 \pm 1,9$ ng/ml $p < 0,001$) y cirrosis con hepatitis alcohólica (46 ± 8 ng/ml $p < 0,01$).

Los pacientes con hepatitis alcohólica asociada a una cirrosis son los que presentaron valores más elevados de P-III-P sérico. Los niveles del péptido en estos pacientes fueron superiores a los presentados por los pacientes del resto de grupos histológicos incluido el grupo de cirrosis aisladas con el que también se es-

tablecieron diferencias significativas ($p < 0,01$).

Se analizó la fiabilidad de la determinación sérica del P-III-P, con objeto de detectar los pacientes alcohólicos con hepatopatía de aquellos que no la presentaban. La mayoría de pacientes alcohólicos con lesión hepática (77%), tenían elevados los niveles de P-III-P, hecho que solo se observó en un alcohólico crónico sin lesión hepática (20%). Estos resultados indican que el P-III-P tiene una sensibilidad del 77%, una especificidad del 80% y una precisión diagnóstica de lesión hepática en los alcohólicos crónicos del 77%.

3.2. RELACION ENTRE LA CONCENTRACION SERICA DE P-III-P Y LA INTENSIDAD DE LA FIBROSIS.

Los niveles séricos del P-III-P, se encontraron progresivamente más elevados cuando aumentaba la intensidad de la fibrosis en el tejido hepático.

Los 7 pacientes sin fibrosis en la biopsia hepática presentaron niveles séricos de P-III-P de ($X \pm ESM$) $10,7 \pm 1,5$ ng/ml. En los 10 pacientes con fibrosis grado 1 se hallaron niveles séricos de P-III-P de $17,8 \pm 2,4$ ng/ml. Los va-

lores de P-III-P hallados en los otros 10 pacientes con fibrosis grado 2 fueron de $20,3 \pm 3$ ng/ml y en los 26 pacientes con fibrosis grado 3 de $32,2 \pm 3,7$ ng/ml. Existió una correlación significativa entre los niveles séricos de P-III-P y la intensidad de la fibrosis (Test de Kruskal-Wallis $H=19,6$ $p < 0,001$) (fig.14).

3.3. RELACION ENTRE LOS NIVELES SERICOS DE P-III-P Y OTRAS ALTERACIONES HISTOLOGICAS.

En los pacientes sin cirrosis se analizaron los niveles séricos del P-III-P en relación con otras lesiones o hallazgos histológicos. Los 19 pacientes con fibrosis sinusoidal presentaron niveles séricos de P-III-P significativamente superiores a los que presentaron los 12 pacientes sin fibrosis sinusoidal ($X \pm$ ESM) ($23,8 \pm 4$ frente a $14,5 \pm 2,9$ ng/ml, $p < 0,01$) (fig.15). De igual forma se observó que los 12 pacientes alcohólicos con lipocitos en la biopsia presentaron niveles significativamente superiores a los de los 19 pacientes alcohólicos sin lipocitos ($27,8 \pm 6$ frente a $13,7 \pm 1,2$ ng/ml $p < 0,05$) (fig.16) y que los 9 pacientes con cuerpos hialinos de Mallory en la biopsia hepática

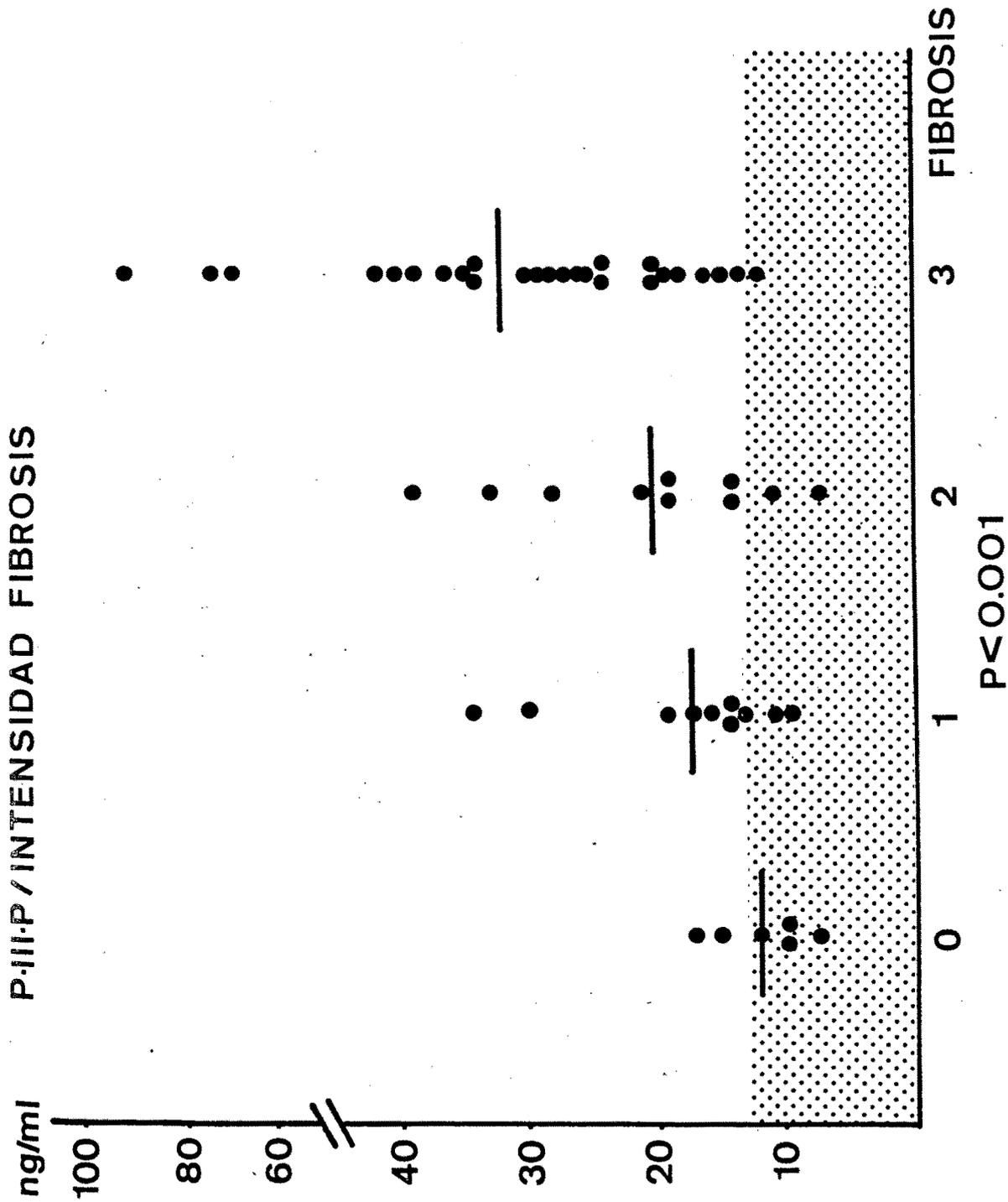


Figura 14.

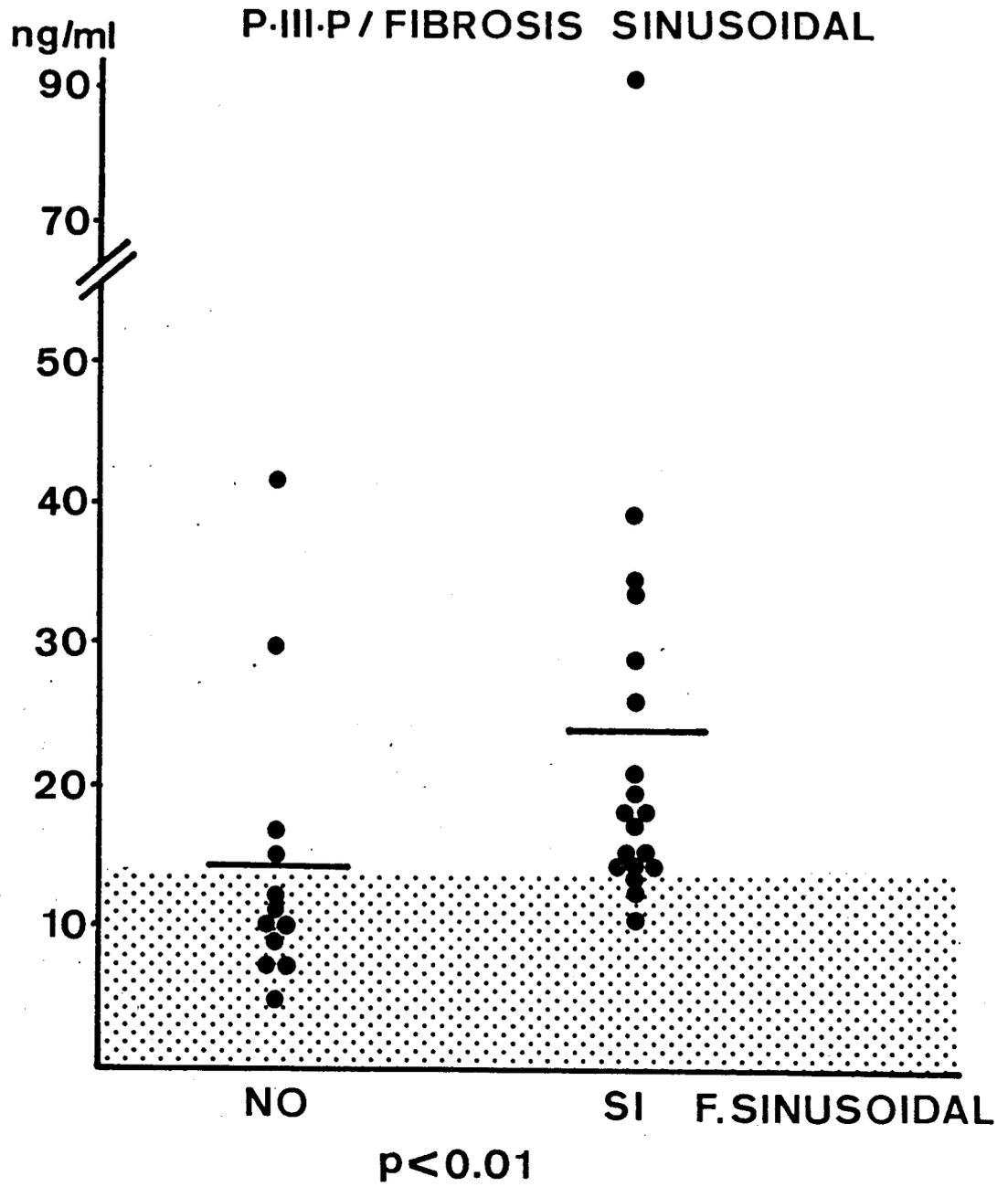


Figura 15.

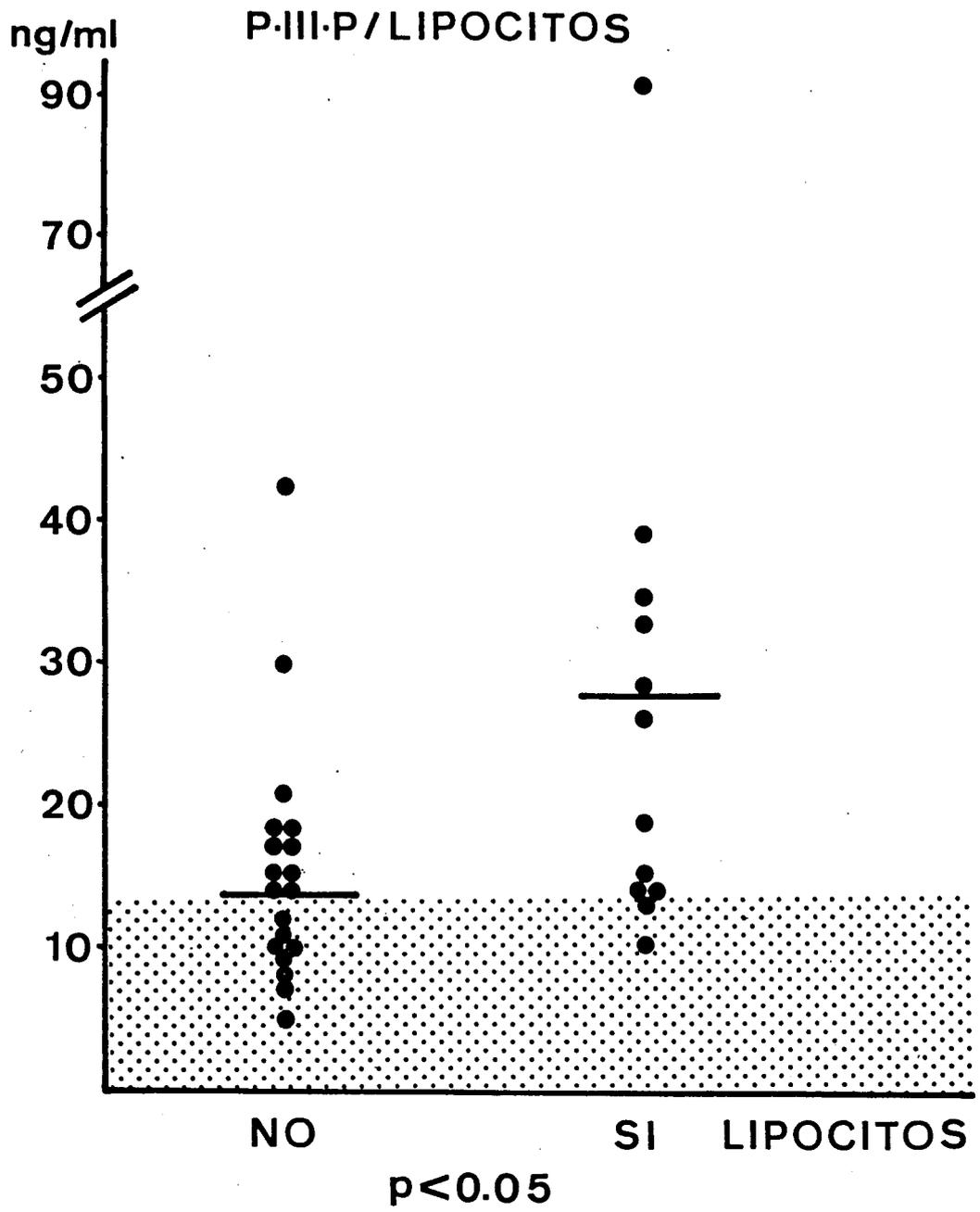


Figura 16.

también presentaron niveles del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III significativamente superiores a aquellos que no los presentaban (22 pacientes) ($29,5 \pm 7,6$ frente a $16,5 \pm 2$ ng/ml, $p < 0,05$) (fig.17). Por el contrario no existieron diferencias significativas entre los niveles séricos de P-III-P en los 20 pacientes con o los 11 sin necrosis lobulillar ($13,8 \pm 2$ frente a $22,3 \pm 4$ ng/ml), ni entre los 19 pacientes con o los 12 sin signos de portitis ($23,2 \pm 4,2$ frente a $16,6 \pm 2,7$ ng/ml), ni entre los 23 pacientes con y los 8 sin esteatosis ($22,3 \pm 3,6$ frente a $14,5 \pm 2,3$ ng/ml). Los 2 pacientes que presentaron coléctasis tisular tenían unos niveles de P-III-P de 14 y 17 ng/ml. (tabla XV).

Se analizó si existía una asociación entre la presencia de fibrosis portal y fibrosis sinusoidal con el resto de lesiones histológicas. La fibrosis portal se asoció con la existencia de fibrosis sinusoidal ya que 19 de los 26 pacientes (73%) con fibrosis portal también tenían fibrosis sinusoidal lesión que no se observó en ninguno de los siete pacientes sin fibrosis portal (Test de Fisher, $p=0,0008$) (tabla XVI). La presencia de necrosis lobulillar, lipocitos,

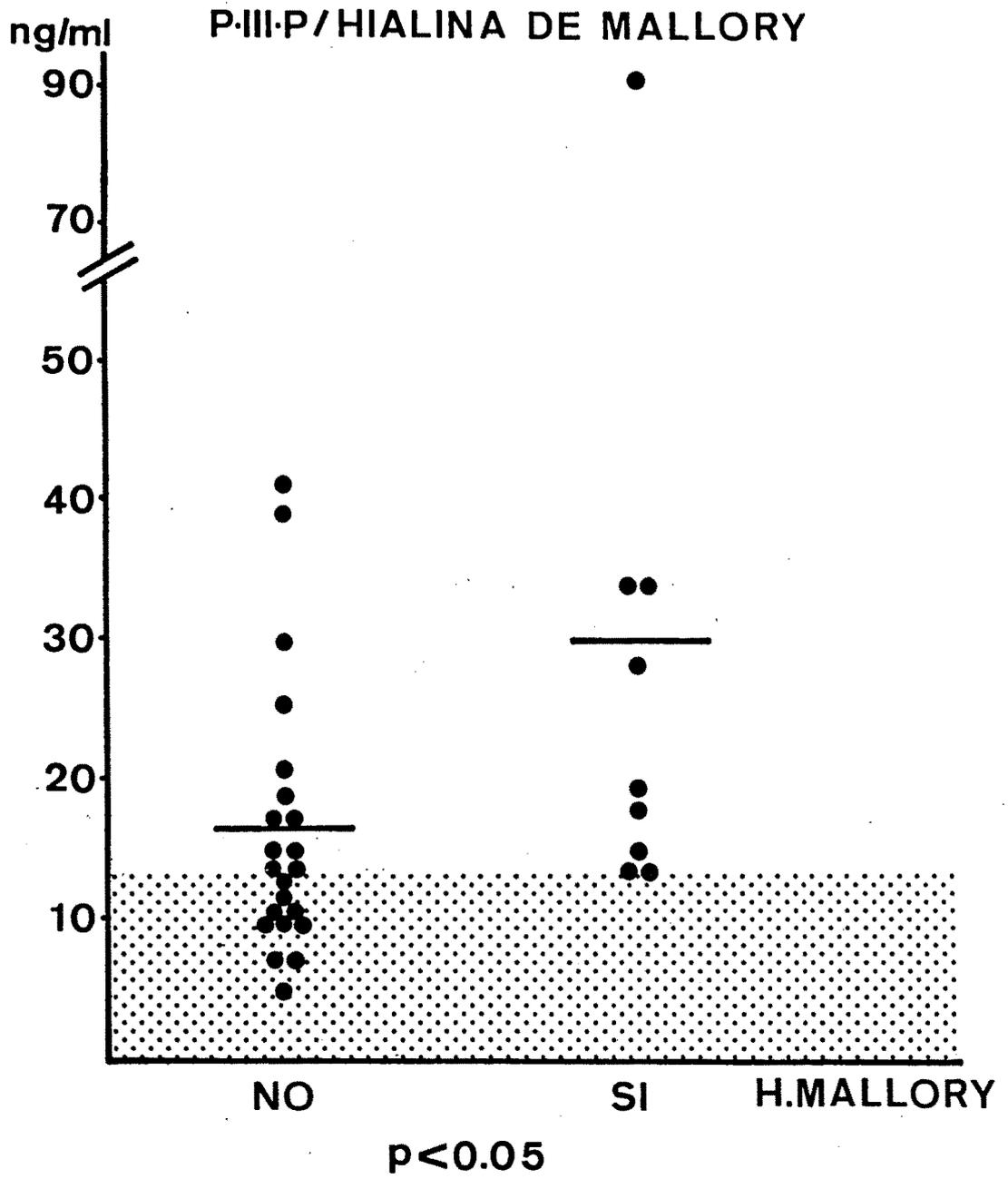


Figura 17.

T A B L A XV

	<u>SI</u>		<u>NO</u>	
Fibrosis sinusoidal	(n=19) 23,8 ± 4	(n=12)	14,5 ± 2,9	p < 0,01
Lipocitos	(n=12) 27,8 ± 6	(n=19)	13,7 ± 1,2	p < 0,05
Hialina de Mallory	(n=9) 29,5 ± 7,6	(n=22)	16,5 ± 2	p < 0,05
Necrosis lobulillar	(n=20) 13,8 ± 2	(n=11)	22,3 ± 4	p: ns
Portitis	(n=19) 23,2 ± 4,2	(n=12)	16,6 ± 2,7	p: ns
Esteatosis	(n=23) 22,3 ± 3,6	(n=8)	14,5 ± 2,3	p: ns

Análisis de los niveles séricos de P-III-P (X ± ESM) ng/ml en relación a la existencia o no de ciertas lesiones histológicas.

T A B L A XVI

RELACION ENTRE LA EXISTENCIA DE FIBROSIS SINUSOIDAL Y OTRAS LESIONES HISTOLOGICAS HEPATICAS.

	<u>FIBROSIS SINUSOIDAL</u>		p
	<u>SI</u>	<u>NO</u>	
Fibrosis portal	(n=19) 100%	(n=7) 50%	$p = 0,008$
Lipocitos	(n=12) 63,1%	(n=0) 0%	$p < 0,001$
Hialina de Mallory	(n=9) 47,3%	(n=0) 0%	$p < 0,001$
Necrosis lobulillar	(n=15) 78,9%	(n=6) 42,8%	$p < 0,05$

cuerpos hialinos de Mallory, inflamación portal, esteatosis y colestasis era independiente de la existencia de fibrosis en los espacios porta.

Por el contrario, la fibrosis sinusoidal se relacionó con la existencia de lipocitos ya que todos los pacientes con lipocitos tenían fibrosis sinusoidal, hecho que solo se observó en 7 biopsias (33%) sin lipocitos ($X^2=13,89$ $p<0,001$). También se observó una asociación entre la presencia de hialina de Mallory y la fibrosis sinusoidal ya que todos los pacientes con hialina de Mallory tenían fibrosis en los sinusoides, lesión que sólo presentaron 10 pacientes (41,6%) que no tenían hialina de Mallory ($X^2=9,44$ (Modificación de Yates) $p<0,001$). La existencia de necrosis lobulillar también fue más frecuente en las biopsias con fibrosis sinusoidal ya que se observó en 15 pacientes (78,9%) con fibrosis sinusoidal y por el contrario en 42,8% de los pacientes sin fibrosis sinusoidal ($X^2=4,53$ $p<0,05$) (tabla XVI).

4. RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA Y LA CONCENTRACION SERICA DEL PEPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA.

Existió una relación lineal directa entre la actividad de la prolil-hidroxilasa hepática y los niveles séricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en los pacientes con una hepatopatía alcohólica ($r:0,41$; $p<0,01$) (fig.18).

5. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA Y DE LA CONCENTRACION SERICA DEL PEPTIDO AMINOTERMINAL DEL PROCOLAGENO TIPO III EN LOS PACIENTES CON HEPATITIS ALCOHOLICA.

En los pacientes con hepatitis alcohólica sola (12 pacientes) o asociada a cirrosis (7 pacientes) se analizaron especialmente los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática y los de P-III-P sérico en relación a la intensidad de la fibrosis. Los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática fueron significativamente inferiores en los pacientes con fibrosis moderada (fibrosis grado 1 y 2) respecto a los que presentaron fibrosis severa (fibrosis grado 3) ($X \pm$

RELACION ENTRE EL PEPTIDO TERMINAL DEL PROCOLAGENO (P III P)
Y LA PROLIL-HIDROXILASA HEPATICA EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA

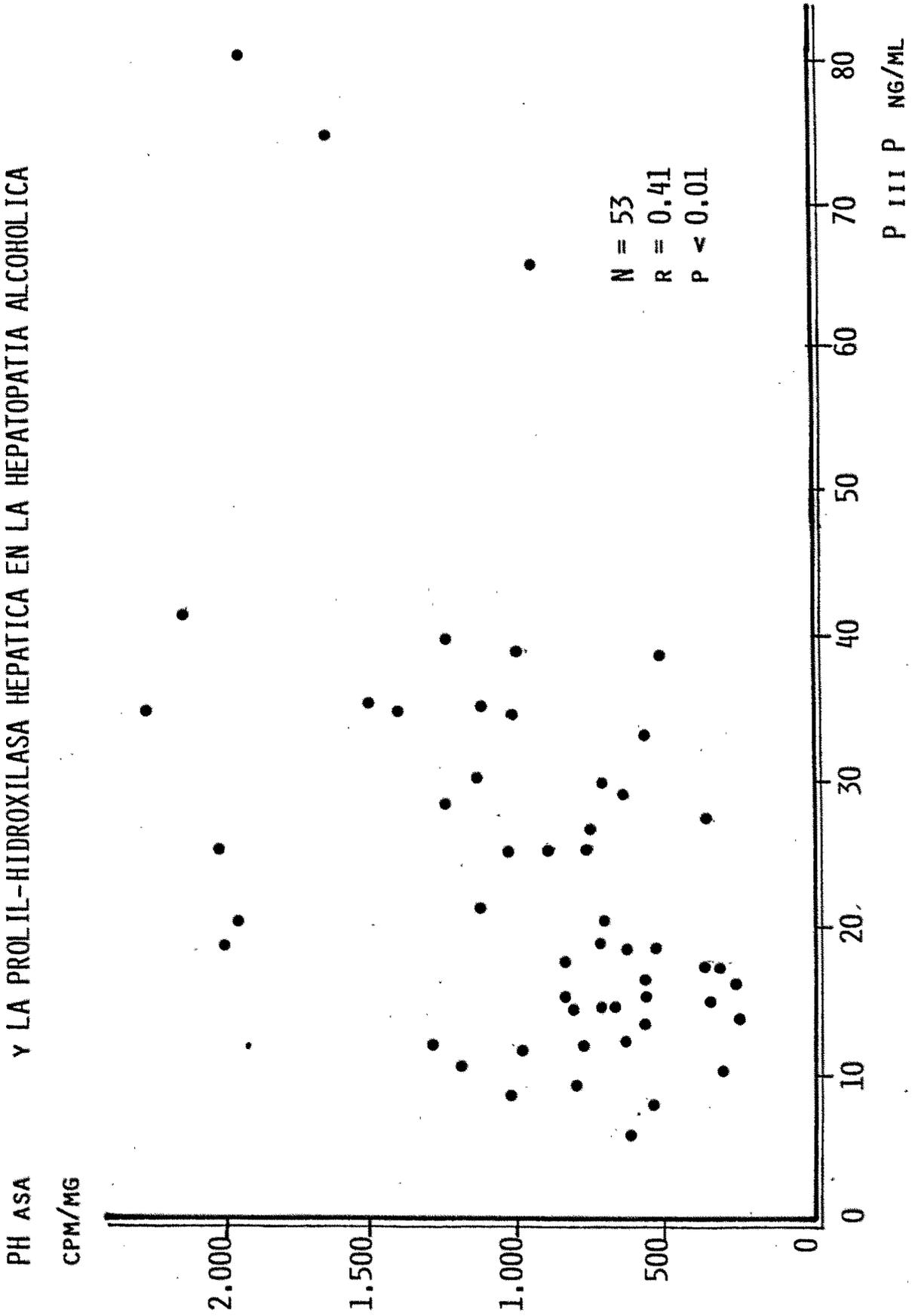


Figura 13.

ESM) (734 ± 138 frente a 1208 ± 154 cpm/mg, $p < 0,05$) (fig.19). También existió una diferencia significativa entre los niveles de P-III-P sérico entre los pacientes con fibrosis moderada y severa ($X \pm$ ESM) ($20,4 \pm 2,6$ frente a $49,1 \pm 8,8$ ng/ml $p < 0,01$) (fig.20). Además se observó una correlación lineal directa altamente significativa entre los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática y los niveles séricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en los 9 pacientes con hepatitis alcohólica analizados ($r=0,75$, $p < 0,001$) (fig.21).

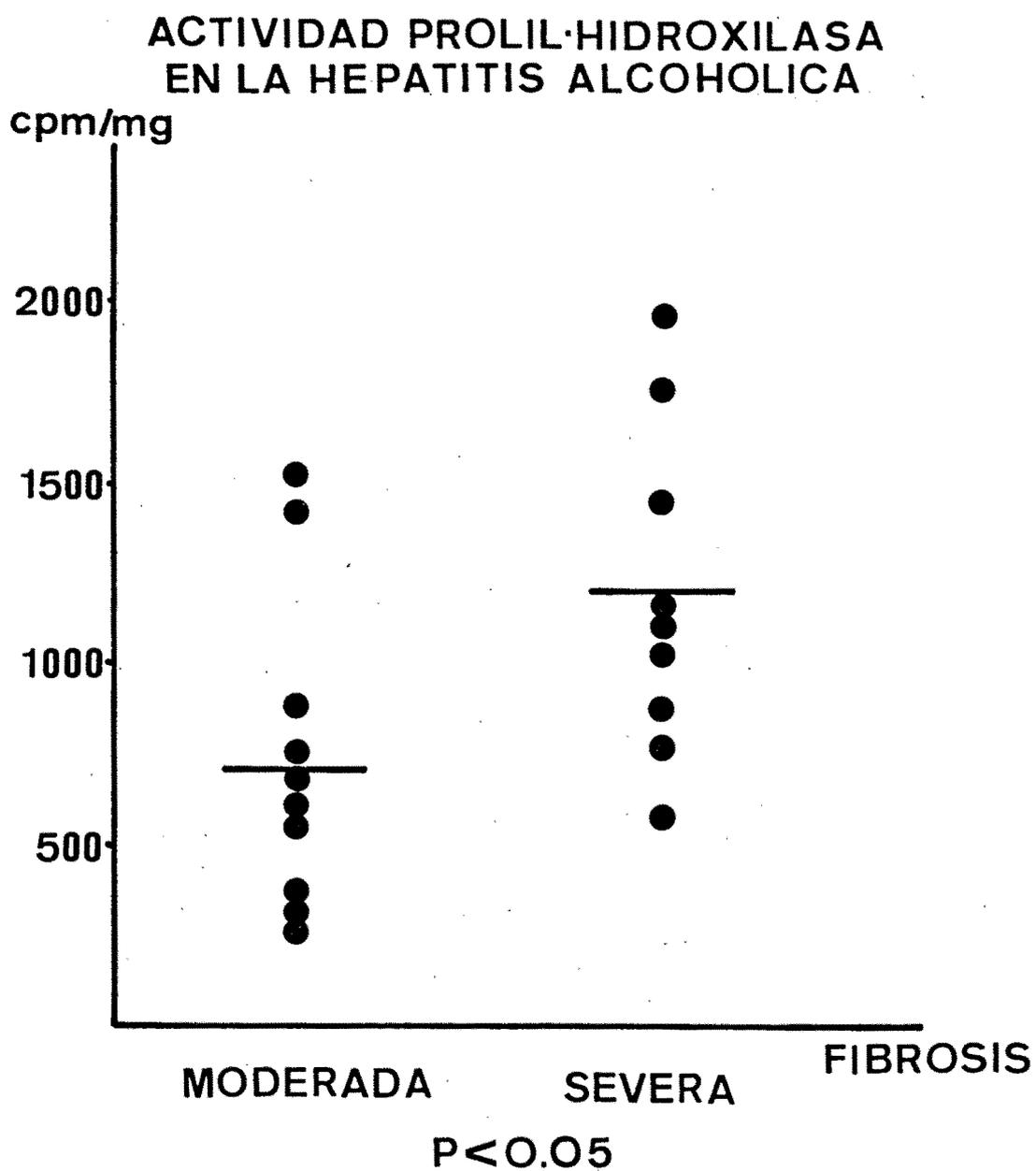


Figura 19.

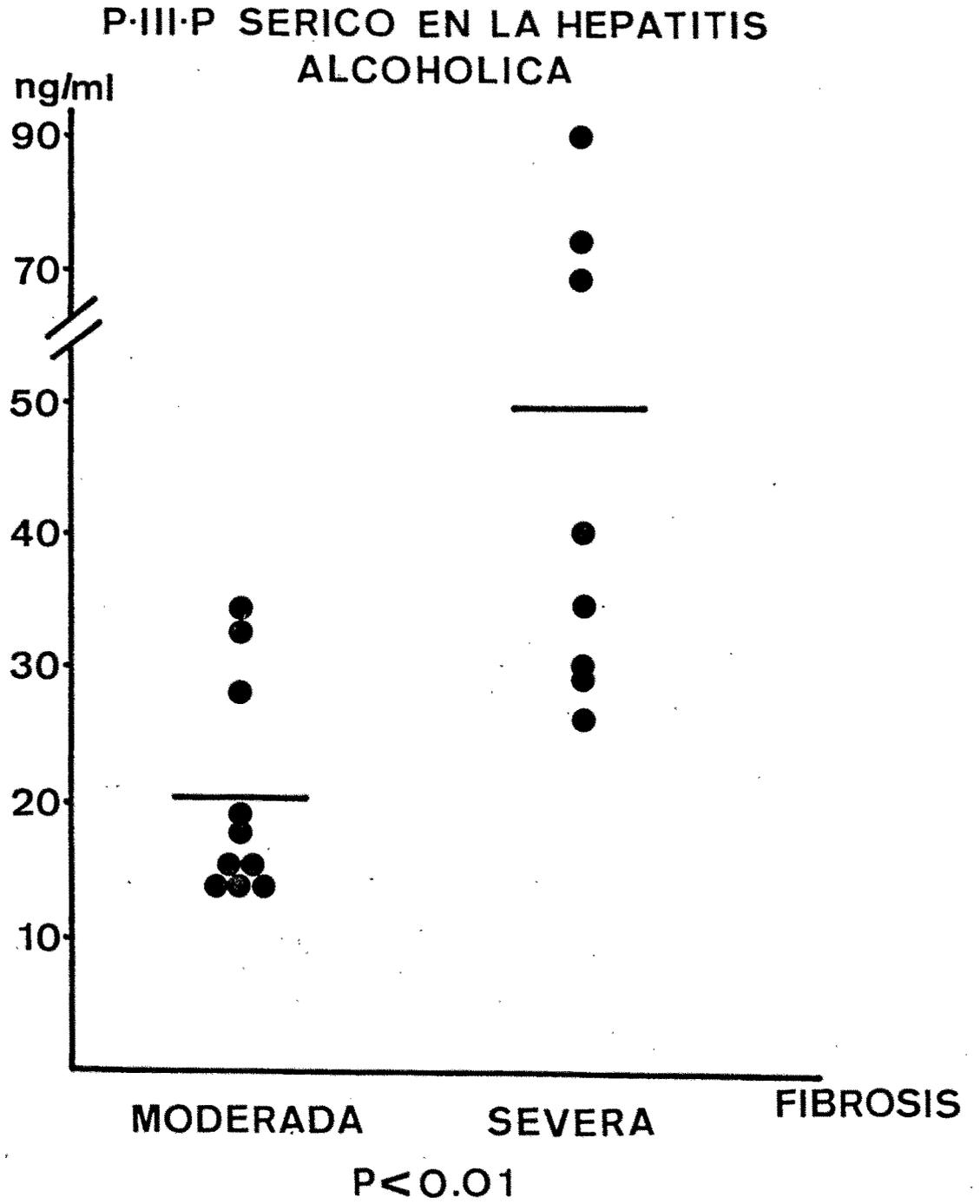


Figura 20.

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD PROLILHIDROXILASA HEPATICA Y P-III-P SERICO EN LA HEPATITIS ALCOHOLICA

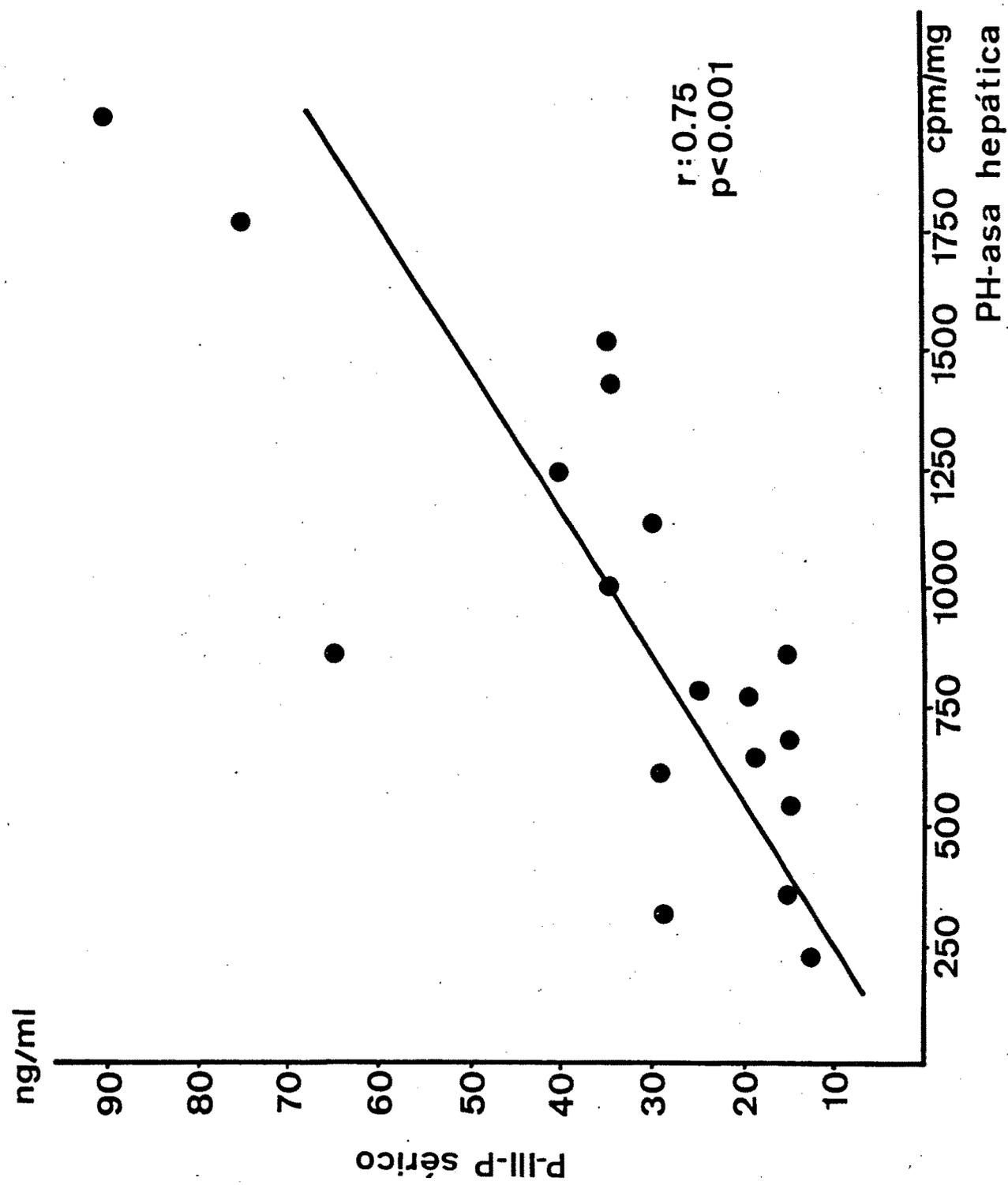


Figura 21.

D I S C U S I O N

La prolil-hidroxilasa es una enzima que interviene en la síntesis del colágeno y es la encargada de hidroxilar la prolina en las cadenas proalfa del procolágeno. Ya que esta enzima forma parte del proceso de síntesis del colágeno, es lógico pensar que la determinación de su actividad en tejido hepático sería un índice de fibrogénesis hepática tal como ha sido referido en algunos estudios.

En esta Tesis se demuestra que la actividad prolil-hidroxilasa hepática (PH-asa) se halla aumentada en el 58,5% de los pacientes con una hepatopatía alcohólica, en comparación a los niveles de actividad PH-asa observados en los pacientes alcohólicos sin lesiones hepáticas. Esto ocurrió en el 33% de los pacientes con hepatitis alcohólica, en el 50% de los pacientes con esteatosis, en el 70% de los pacientes con fibrosis, en el 66,6% de las cirrosis y el 71,4% de las cirrosis con hepatitis alcohólica. La actividad prolil-hidroxilasa hepática estuvo particularmente elevada en los pacien-

tes con fibrosis y cirrosis. En los pacientes con esteatosis y hepatitis alcohólica sin cirrosis, la actividad prolil-hidroxilasa también fue superior, aunque no significativamente, cuando se comparó con los alcohólicos sin lesión hepática.

En general estos resultados son similares a los observados por otros autores que han determinado la actividad prolil-hidroxilasa en el tejido hepático de pacientes alcohólicos crónicos (242-245,248,249,298,299). Sin embargo en algunos casos es difícil establecer equivalencias ya que los valores obtenidos se comparan en unos casos con la actividad enzimática de controles sanos no alcohólicos y en otros con la de alcohólicos sin lesiones hepáticas. Otros factores que dificultan esta comparación son las modificaciones efectuadas en el método para la determinación de la PH-asa y la forma de expresar los resultados. De todos modos los ocho estudios que determinan la actividad prolil-hidroxilasa hepática en pacientes alcohólicos indican que existe un aumento de la actividad enzimática, especialmente en los pacientes con hepatitis alcohólica y cirrosis activas (tabla XVII). También

T A B L A XVII

INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA EN RELACION
A CONTROLES SANOS O A ALCOHOLICOS CON HISTOLOGIA HEPATICA NORMAL.

	<u>ESTEATOSIS</u>	<u>FIBROSIS</u>	<u>HEPATITIS ALCOHOLICA</u>	<u>CIRROSIS INACTIVA</u>	<u>CIRROSIS ACTIVA</u>
Mc Gee (1974) ⁺	x 2,6	--	x 3,1	--	--
Mezey (1976) ⁺	x 2,2	--	x 5,6	x 1,3	--
Mc Phie (1980) ⁺	x 1,3	--	x 2,3	x 2,7	--
Lindner (1984) ⁺	x 2,3	--	--	x 2,1	x 6,5
Vidins (1977) ⁺⁺	x 5	--	x 7	x 7	x 10
Tsujii (1977) ⁺⁺	x 1	--	x 2	--	--
Mann (1979) ⁺⁺	x 1,3	--	x 2,3	x 2,5	x 3,3
Torres (1984) ⁺⁺	x 1,24	x 2,01	x 1,4	x 1,5	x 1,9

+ Referidos a controles sanos no alcohólicos.

++ Referidos a alcohólicos con histología hepática normal.

se ha encontrado un aumento de la actividad pro-
lil-hidroxilasa hepática en las hepatopatías de
origen no alcohólico, si bien han sido menos es-
tudiadas y las series suelen ser más cortas (243,
245-247,299,300).

Un dato importante a considerar en esta Te-
sis es la gran superposición de valores de PH-asa
cuando se compararon los diferentes grupos his-
tológicos como se puede observar en la figura 11,
por lo que la medición de la actividad PH-asa no
puede utilizarse para distinguir los distintos
tipos de lesión hepática alcohólica.

Estas observaciones son parecidas a las re-
cojidas por otros autores especialmente en los
estudios de Mezey (244) y Mc Phie (249). Este he-
cho indica que dentro de cada tipo de lesión his-
tológica existe una amplia variabilidad en cuan-
to a la actividad fibrogénica en cada paciente.
Sin embargo en esta Tesis se demuestra que las
variaciones de la actividad PH-asa hepática es-
tuvieron directamente relacionadas con el grado
de fibrosis hepática ya que se observó un incre-
mento escalonado de la PH-asa al aumentar la fi-
brosis. En las biopsias sin fibrosis la PH-asa
era de $(\bar{X} \pm \text{ESM}) 655 \pm 50$ cpm/mg, en las biopsias

con fibrosis grado 1 de 756 ± 99 cpm/mg, en aquellos con fibrosis grado 2 de 983 ± 178 cpm/mg y en aquellos con fibrosis grado 3 de 1173 ± 125 cpm/mg (fig.12). De todas formas también se observó que existía una gran variabilidad de los niveles de PH-asa en relación a la cantidad de fibra en el tejido hepático por lo que es probable que existan otros fenómenos que puedan favorecer la actividad PH-asa. En esta Tesis se ha analizado si la presencia de necrosis celular, signos de inflamación portal, o la existencia de hialina de Mallory o lipocitos en la biopsia hepática estaban relacionados con la actividad PH-asa y no se ha observado que estas lesiones modificaran los niveles de actividad fibrogénica hepática. No se puede ser concluyente en estas observaciones ya que en otras patologías como la hepatopatía que pueden presentar los pacientes obesos sometidos a una derivación intestinal (hepatopatía que es casi indistinguible a la que presentan los pacientes con hepatitis alcohólicas) se han encontrado hallazgos diferentes. Así Mezey et al (301) determinaron los niveles de actividad PH-asa en 10 pacientes obesos sometidos a una derivación yeyuno-ileal y

observaron que los niveles de actividad PH-asa aumentaron sólo en los 3 pacientes que presentaban fibrosis asociada a necrosis hepatocelular, pero no en los pacientes que presentaron fibrosis sola.

En el presente estudio existieron dos grupos de pacientes claramente diferenciados en la hepatitis alcohólica, uno con niveles de actividad PH-asa similar a la de los alcohólicos sin lesiones hepáticas (8 pacientes) y otro con niveles elevados (4 pacientes) respecto a los pacientes alcohólicos con histología normal. Este hecho podría ser debido a varios factores. El primero a considerar es el tiempo de abstinencia. Aunque prácticamente todos los pacientes ingirieron bebidas alcohólicas hasta poco antes de ingresar en el hospital, transcurrieron aún 10 días desde el ingreso hasta la práctica de la biopsia hepática que podrían haber influido en la disminución de la actividad PH-asa en estos pacientes como refirió Mezey et al (244) en un estudio en que encuentra una disminución de la actividad PH-asa en 16 pacientes afectados de una hepatopatía alcohólica transcurridas 5 semanas de la primera determinación. En nuestro estudio

no obstante no creemos que este fuera el único motivo ya que todos los pacientes estuvieron sometidos a las mismas condiciones y el tiempo transcurrido hasta la realización de la biopsia fue muy inferior a 5 semanas. La escasa actividad PH-asa en los ocho pacientes con hepatitis alcohólica aislada indicaría la inclusión de hepatitis alcohólicas con poca actividad fibrogénica. En un estudio reciente efectuado por nosotros (302) en el que se analizaba la evolución histológica de 26 pacientes con hepatitis alcohólica aislada, durante un periodo de tiempo que oscilaba entre 1 y 3 años se observó que aproximadamente un tercio de los pacientes tenían una cirrosis hepática y que casi el 40% de los pacientes habían resuelto su lesión inducida por el alcohol. En este estudio se observó que la persistencia de ingesta alcohólica así como la pertenencia al sexo femenino fueron condiciones que influyeron en la mala evolución de la hepatitis alcohólica hacia la cirrosis. El conocimiento de los niveles de PH-asa en estos pacientes quizás hubiera podido ser un buen indicador de la mala evolución de la hepatitis alcohólica. De hecho evolucionaron desfavorablemente

los pacientes que siguieron bebiendo alcohol y presumiblemente eran aquellos con niveles de lactato elevados en el suero. A esta última sustancia se le ha imputado un efecto fibrogénico. Así se ha demostrado que los pacientes con cirrosis alcohólica y aquellos con hepatitis alcohólica presentan niveles de ácido láctico elevados independientemente de los niveles de alcoholemia directamente relacionados con los niveles séricos y hepáticos de prolina (18). En estos pacientes también se ha observado un aumento del depósito hepático de prolina y un aumento del depósito hepático de colágeno (206). Por otro lado se sabe que el ácido láctico incrementa, en un cultivo de fibroblastos, la agregación de monómeros inactivos de prolil-hidroxilasa en tetrameros activos (253). Tanto el incremento de la actividad enzimática (prolil-hidroxilasa) como del sustrato (prolina) podrían facilitar la síntesis de colágeno. Es posible que otros factores todavía desconocidos puedan influir sobre la capacidad fibrogénica hepática. Es conocido que los pacientes alcohólicos crónicos tienen ciertas deficiencias de algunos oligoelementos como el zinc, que interviene como cofactor en

muchas reacciones enzimáticas, entre ellas sobre la alcohol deshidrogenasa. En un estudio reciente de Anttinen et al (303) efectuado en ratas sometidas a cirrosis experimental con tetracloruro de carbono se demostraba el efecto protector del zinc para el desarrollo de cirrosis cuando se les añadía a la dieta, ya que las ratas que recibían zinc presentaron una disminución del acúmulo de colágeno en el hígado. Estos autores sugerían que el zinc podría tener un efecto inhibitorio sobre la hidroxilación de la prolina. En un análisis efectuado en un grupo de alcohólicos crónicos se ha demostrado una reducción de los niveles plasmáticos de zinc en aquellos pacientes con mayor grado de lesión hepática (cirróticos y hepatitis alcohólica) y que además existía una relación lineal inversa entre la actividad prolil-hidroxilasa y los niveles de zinc plasmáticos. Si bien aún no disponemos de los niveles de zinc en tejido hepático, estos resultados apoyarían la hipótesis de que el zinc podría influir en la capacidad fibrogénica hepática y explicaría que algunos defectos nutricionales serían de capital importancia para el desarrollo de cirrosis (304).

Mezey et al (244) observaron que los pacientes con hepatitis alcohólica tenían una mayor actividad PH-asa hepática que el grupo de pacientes con esteatosis y el grupo control, respecto a los datos observados en la presente Tesis. Probablemente estas diferencias sean debidas a la severidad de las hepatitis alcohólicas ya que Mezey incluía pacientes que tenían una hepatitis alcohólica y cirrosis simultaneamente.

En dos estudios previos realizados en pacientes alcohólicos por Mann et al (248) y Vidins et al (298), estos autores encontraron una relación entre los niveles de actividad de la PH-asa hepática y la síntesis de colágeno hepático. En esta Tesis se demuestra una estrecha relación entre la actividad PH-asa hepática y la extensión de la fibrosis medida por un método semicuantitativo, y por lo tanto confirma los resultados de estos autores. De todas formas debe considerarse que no es lo mismo medir la síntesis hepática de colágeno que la extensión de la fibrosis. De hecho existieron algunos pacientes con una histología sin fibrosis en los cuales se detectó un incremento de la actividad prolil-hidroxilasa hepática, particularmente algún caso de esteatosis

hepática aislada. Esta observación podría indicar que el incremento de la actividad fibrogénica precede al depósito de colágeno y que en caso de que desaparezca el agente inductor de la actividad enzimática puede ser que no aparezca fibrosis. Es conocido que algunos pacientes con esteatosis alcohólica pueden evolucionar hacia una hepatopatía crónica fibrosante incluida la cirrosis. Nakanó et al (305) encontraron que los pacientes con esteatosis que tenían un grado más o menos acusado de fibrosis alrededor de la vena central podían evolucionar hacia la cirrosis. Es factible que estos pacientes tuvieran una mayor actividad de la prolil-hidroxilasa y quizá los pacientes con esteatosis y PH-asa elevada del presente estudio serían los que podrían evolucionar hacia una cirrosis alcohólica. Takeuchi et al (300) demostraron que en ratas con fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, los niveles de actividad de la PH-asa aumentaban unas cuatro veces respecto a su valor basal y este aumento era previo al depósito hepático de fibrosis.

Así mismo han sido descritas elevaciones de la prolil-hidroxilasa hepática determinada por un método inmunoreactivo (los niveles de la enzima

determinados por este método se correlacionan con la actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático) en pacientes afectos de un carcinoma hepatocelular, atribuyéndose la elevación de la enzima al incremento en la síntesis de colágeno que acompaña a este tipo de tumor (306).

En otros estudios que determinan la actividad prolil-hidroxilasa en tejido hepático procedente de pacientes con hepatopatías de etiología no alcohólica como hepatitis crónica activa (243,245,247) y cirrosis biliar primaria (246) también se ha hallado una relación entre los niveles de actividad PH-asa y la extensión de la fibrosis hepática. Además en el estudio de Jain et al (246) que analiza los pacientes con cirrosis biliar primaria, se halló que la actividad prolil-hidroxilasa sólo se relacionaba con la intensidad de la fibrosis y no se pudo hallar ninguna relación con el grado de inflamación portal ni de necrosis hepatocelular, resultados que son similares a los de esta Tesis que ha analizado hepatópatas alcohólicos.

El colágeno se sintetiza en forma de un precursor de mayor peso molecular denominado procolágeno que posee unos péptidos adicionales en

sus extremos amino y carboxiterminal. Durante el proceso de síntesis del colágeno, a nivel extracelular, el procolágeno se convierte en colágeno al perder los extremos amino y carboxiterminal que son escindidos por medio de unas proteasas específicas. Los niveles séricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (P-III-P) pueden ser medidos por medio de un radioinmunoanálisis. El significado de la concentración sérica de dicho péptido en las hepatopatías no está bien establecido. Se ha sugerido que la concentración sérica de P-III-P sería un buen marcador de la síntesis hepática de colágeno pero también se ha referido que podría intervenir en la degradación del mismo (275).

Rohde et al (274) en 1979 determinaron por primera vez el P-III-P sérico en 141 pacientes. Incluyeron en su estudio pacientes con diversos tipos de enfermedades hepáticas (hepatopatía alcohólica, hepatitis vírica aguda y crónica, miscelánea de enfermedades hepáticas) y otros pacientes con enfermedades extrahepáticas la mayoría de ellas relacionadas con alteraciones del metabolismo del colágeno. Los valores más elevados de P-III-P sérico los presentaron

aquellos pacientes afectos de una hepatopatía alcohólica seguidos de aquellos con hepatitis aguda y hepatitis crónica. Los pacientes con artritis reumatoide presentaron ligeras elevaciones del P-III-P. Estos autores analizaron, en los pacientes alcohólicos, la concentración sérica de P-III-P y la fibrosis valorada por un método semicuantitativo y no encontraron relación entre ambos parámetros.

En el presente estudio se ha observado que los pacientes alcohólicos con histología normal presentaron valores séricos idénticos a los de los sujetos sanos del grupo control y que el 77% de los pacientes con una hepatopatía alcohólica tenían concentraciones séricas de P-III-P superiores a las que tenían los alcohólicos con histología normal. Por tanto el análisis de la concentración sérica del P-III-P podría ser útil para detectar aquellos pacientes alcohólicos crónicos con una lesión hepática (sensibilidad y especificidad del 77% y 80% respectivamente). Sin embargo estos resultados deben valorarse con cierta precaución ya que el grupo de pacientes con histología normal era muy reducido, de sólo 5 pacientes. Otros autores

también hallaron que la determinación de P-III-P podría ser útil para detectar los pacientes alcohólicos con hepatopatía. Así Mendenhall et al (307) analizando un grupo de 38 pacientes con hepatitis alcohólica encontraron una especificidad del 98% y una sensibilidad del 95%. Los resultados de esta Tesis indican sin embargo que la determinación del P-III-P no es un buen índice discriminativo del tipo de lesión hepática ya que el P-III-P sérico estuvo elevado en el 50% de los pacientes con esteatosis, el 60% de aquellos con fibrosis, en el 100% de las hepatitis alcohólicas y en el 95,5% de las cirrosis. Los valores medios más elevados de P-III-P sérico los presentaron aquellos pacientes que tenían lesiones histológicas de fibrosis, hepatitis alcohólica y cirrosis. Los valores individuales de P-III-P sérico más elevados los presentaron los pacientes con cirrosis y hepatitis alcohólica que siempre tuvieron valores superiores a 29 ng/ml. Tres de los pacientes con hepatitis alcohólica y tres con fibrosis presentaron también valores de P-III-P superiores a esta cifra. La mitad de los pacientes con hepatitis alcohólica de nuestro estudio presentaron valores poco elevados de

P-III-P sérico (inferiores a 18 ng/ml) de forma similar a lo que sucedió con los valores de actividad prolil-hidroxilasa en estos mismos pacientes indicando probablemente la escasa actividad fibrogénica de estas hepatitis alcohólicas. La concentración sérica de P-III-P no fue útil para distinguir entre los pacientes que tenían una esteatosis y aquellos con fibrosis moderadas ya que dos de los cuatro pacientes con esteatosis presentaron valores séricos de P-III-P ligeramente elevados que no se acompañaron de una evidencia histológica de fibrosis ni de una elevación de la actividad prolil-hidroxilasa hepática. En los pacientes con cirrosis hepática aislada, los niveles de P-III-P estuvieron elevados pero en menor proporción que en las cirrosis que tenían hepatitis alcohólica. Este hecho indica que existe una desproporción entre la intensidad de la fibrosis y los niveles de P-III-P que cabría esperar. Este fenómeno podría explicarse porque en esta cirrosis existiría un depósito de colágeno estable y no habría por tanto un recambio del mismo, hecho que también quedaría reflejado por los distintos niveles de actividad prolil-hidroxilasa. Por otra

parte en la cirrosis ya totalmente establecida se ha demostrado que existe un incremento total y relativo del colágeno tipo I con respecto al tipo III (170) y en el presente estudio sólo se ha determinado el procolágeno tipo III.

La superposición de valores de P-III-P sérico observada en los pacientes con fibrosis, hepatitis alcohólica y cirrosis, impiden que este péptido pueda tener valor para distinguir los distintos tipos de hepatopatía alcohólica y en este sentido sigue siendo imprescindible la realización de una biopsia hepática. Los resultados de esta Tesis son muy similares a los publicados recientemente por Niemela et al (279) (tabla XVIII). Estos autores tampoco fueron capaces de distinguir el tipo de hepatopatía alcohólica según los niveles séricos de P-III-P. Estos autores también encontraron que los pacientes en cuya biopsia coexistían lesiones de cirrosis y hepatitis alcohólica presentaron valores séricos de P-III-P superiores a 30 ng/ml. Los valores del P-III-P sérico en el grupo de pacientes con cirrosis sola o con hepatitis alcohólica varió algo en relación al presente estudio, probablemente debido al grado de actividad de las

T A B L A XVIII

CONCENTRACION SERICA DE P-III-P (ng/ml) EN LA HEPATOPATIA ALCOHOLICA EN
DIVERSOS ESTUDIOS.

<u>Diagnóstico histológico</u>	<u>Savolainen et al (abstract)(1982)</u>	<u>Niemela et al (1983)</u>	<u>Torres (1984)</u>
Hígado normal	10 ± 2	8 ± 2	9,8 ± 1,5
Esteatosis	17 ± 10	14 ± 5	13,2 ± 1,8
Fibrosis	16 ± 7	-----	20,6 ± 3,5
Cirrosis + Hepatitis Alc.	41 ± 24	62	46 ± 8
Cirrosis	33 ± 13	15 ± 9	24,4 ± 1,9
Hepatitis alcohólica	-----	-----	26,7 ± 5,7

cirrosis incluidas en cada estudio. Resultados muy similares a los nuestros han sido también observados por Savolainen et al (308) en un estudio publicado en forma de resumen en el que analizan los niveles de P-III-P en un grupo de pacientes con hepatitis alcohólica (tabla XVIII).

Los resultados de esta Tesis indican que existe una buena relación entre los niveles séricos de P-III-P y la extensión de la fibrosis en la biopsia hepática ya que se observaron niveles de P-III-P progresivamente crecientes en los pacientes sin fibrosis y con fibrosis grado 1, 2 y 3. Por otra parte se observó una correlación lineal significativa entre la actividad PH-asa hepática y los niveles de P-III-P; reforzando la hipótesis de que el P-III-P es un buen marcador de fibrogénesis. Otros autores han dado resultados de P-III-P en relación a la fibrosis en hepatopatías no alcohólicas. Raedsh et al (278) hallaron una buena relación entre los niveles séricos de P-III-P en pacientes con hepatitis crónica persistente y hepatitis crónica activa con la extensión de la fibrosis evaluada por un método histomorfométrico.

Weigand et al (309) también observaron que

existía una buena correlación entre la fibrosis medida por un método histomorfométrico y los niveles séricos de P-III-P en pacientes con hepatopatía crónica de diversas etiologías. Estos mismos autores refieren que esta correlación se mantuvo en el seguimiento de 4 pacientes (período de seguimiento entre 2 y 9 años) afectados de una hepatopatía crónica en los que se comparó la fibrosis cuantificada por histomorfometría y el P-III-P sérico.

En un estudio realizado por Caballería et al (310) en 1982 en pacientes con cirrosis biliar primaria en los que se analizó el P-III-P sérico se observó la existencia de una relación entre la concentración sérica del mismo y el estado histológico de la enfermedad que en definitiva implican el grado de fibrosis hepática.

Recientemente se han publicado algunos resúmenes indicando que el P-III-P sérico se relaciona con el grado de fibrosis hepática en la hepatopatía alcohólica (307,311). Los resultados de esta Tesis confirman la hipótesis de que el P-III-P es un buen marcador de la fibrosis hepática y muy probablemente de la actividad fibrogénica.

Las vías de eliminación del P-III-P del organismo son la biliar y la urinaria, siendo la eliminación biliar la cuantitativamente más importante tanto en los sujetos normales como en los cirróticos (281). En algunos trabajos se ha descrito una relación entre la concentración sérica de bilirrubina y la de P-III-P (279,307). En nuestro estudio no se analizó especialmente este punto, aunque los dos únicos pacientes que tenían signos de colestasis en la biopsia hepática presentaron niveles de P-III-P, uno normal (14 ng/ml) y el otro ligeramente elevado (17 ng/ml).

En nuestro estudio el análisis de otras lesiones histológicas demostró que los niveles de P-III-P fueron significativamente superiores en los pacientes que tenían fibrosis sinusoidal, lipocitos o hialina de Mallory en la biopsia hepática. Se encontró también una relación estadísticamente significativa entre la existencia de fibrosis portal y sinusoidal y también entre la existencia de fibrosis sinusoidal con la existencia de lipocitos y con la de hialina de Mallory. Por el contrario no existió relación alguna entre la presencia de fibrosis portal y la exis-

tencia de lipocitos o hialina de Mallory. Estos hallazgos estarían de acuerdo con las teorías que mantienen que la fibrosis sinusoidal se origina en las células de Ito o lipocitos perisinusoidales, células que en el hígado normal son las encargadas de almacenar vitamina A y que en los pacientes alcohólicos adquieren la capacidad de sintetizar colágeno y son las responsables de la fibrosis sinusoidal en estos pacientes (195, 196).

La relación observada entre la presencia de fibrosis sinusoidal y la de cuerpos hialinos de Mallory en las biopsias de nuestros pacientes probablemente sea debida a la frecuente asociación de ambas lesiones en la hepatitis alcohólica. Así pudo observarse que doce de los 19 pacientes con fibrosis sinusoidal tenían una hepatitis alcohólica y que nueve de estos doce pacientes tenían cuerpos hialinos de Mallory en las biopsias. Savolainen et al (308) también encontraron que los pacientes con hepatitis alcohólica y cuerpos de Mallory son los que presentaron los valores más elevados de P-III-P respecto a las hepatitis alcohólicas que no tenían esta lesión histológica.

En nuestro estudio y a diferencia de los resultados obtenidos por Rohde et al (274) no encontramos relación entre la existencia de inflamación portal o necrosis celular y la concentración sérica de P-III-P.

Se ha demostrado, además, que existe una buena correlación entre los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática, enzima que interviene en el proceso intracelular de la síntesis del colágeno y la concentración sérica de P-III-P, péptido que a nivel extracelular es liberado a la sangre de forma estequiométrica durante la síntesis de cada molécula de colágeno tipo III ($r: 0,41, p < 0,01$). Aceptando que la prolil-hidroxilasa es un buen índice de fibrogénesis ya que es una enzima que interviene activamente en la síntesis de colágeno, la buena relación existente entre esta enzima hepática y los niveles séricos de P-III-P apoyan la hipótesis de que la medición del P-III-P sérico en los pacientes alcohólicos pueda ser un buen indicador de fibrogénesis hepática. Sin embargo el mayor incremento de P-III-P observado por Raedsh et al (281) en los pacientes con colestasis indicaría que debe tenerse en cuenta este

fenómeno como un posible factor de error. La relación de ambos parámetros con la intensidad de la fibrosis observada en la biopsia hepática indicaría además que tanto la prolil-hidroxilasa como el P-III-P serían también marcadores de fibrosis. Estos hallazgos fueron mucho más evidentes en las hepatopatías alcohólicas muy activas como la hepatitis alcohólica. En estos pacientes (n=19) la correlación entre actividad prolil-hidroxilasa hepática y P-III-P sérico fue mucho más significativa ($r: 0,75$, $p < 0,001$). En estos pacientes también existió una relación entre los niveles de ambos parámetros de fibrogénesis y la intensidad de la fibrosis. Los pacientes con fibrosis severa (fibrosis grado 3) presentaron niveles de actividad PH-asa hepática y de P-III-P sérico superiores a los que presentaron aquellos con fibrosis moderada (fibrosis grado 1 y 2) ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente).

Estos resultados indican que la determinación seriada de los niveles séricos de P-III-P en los pacientes con hepatopatía alcohólica pueden ser un buen marcador para conocer la progresión de la fibrosis hepática.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente Tesis se han analizado la actividad prolil-hidroxilasa hepática y la concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III en un grupo de pacientes afectos de una hepatopatía alcohólica. A los 60 pacientes incluidos en el estudio se les practicó una biopsia hepática con una aguja de Trucut. La mayor parte del espécimen (2/3 aproximadamente del cilindro) fue utilizada para realizar el análisis histológico, que incluyó el diagnóstico del tipo de enfermedad hepática alcohólica, la valoración mediante un análisis semicuantitativo de la intensidad de la fibrosis y la existencia de otras lesiones tales como la fibrosis sinusoidal, la existencia de lipocitos, necrosis celular, portitis, esteatosis o hialina de Mallory. El tercio restante de la biopsia fue conservado en nitrógeno líquido hasta el momento de realizar la determinación de la actividad prolil-hidroxilasa hepática. En 53 de los pacientes se obtuvo una muestra de sangre extraída el mismo día en que se practicó la biopsia hepática, para la determinación sérica del pép-

tido aminoterminal del procolágeno tipo III que fue realizada mediante un método de radioinmunoanálisis.

Se analizaron los niveles de actividad prolil-hidroxilasa hepática y la concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III según los tipos de enfermedad hepática y también con la intensidad de la fibrosis, obteniéndose los resultados que se detallan a continuación:

- 1º Más de la mitad de los pacientes con una hepatopatía alcohólica tienen un incremento de la actividad fibrogénica hepática que viene expresada por un aumento de la actividad prolil-hidroxilasa, enzima que interviene en la síntesis del colágeno.
- 2º La variabilidad de la actividad prolil-hidroxilasa existente en los diferentes tipos de lesión hepática inducida por el alcohol, indica una distinta actividad fibrogénica hepática en cada tipo histológico de hepatopatía alcohólica.
- 3º La mayor actividad fibrogénica se ha observado particularmente en aquellas biopsias con una

mayor extensión de la fibrosis hepática que corresponden a los pacientes con fibrosis y cirrosis.

- 4º La actividad prolil-hidroxilasa hepática es directamente proporcional a la intensidad de la fibrosis lo que indica que en los pacientes alcohólicos crónicos con hepatopatía existe una relación entre el proceso de fibrogénesis y el depósito de colágeno en el hígado.
- 5º La mayoría de biopsias sin fibrosis tienen una actividad prolil-hidroxilasa inferior a la de las biopsias con fibrosis. Sin embargo el hallazgo en algunos casos de una actividad prolil-hidroxilasa elevada en biopsias sin fibrosis, sugiere que el incremento de la actividad fibrogénica puede preceder al depósito de colágeno en el hígado.
- 6º La concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III se halla elevada en casi las cuatro quintas partes de los pacientes alcohólicos crónicos con lesión hepática. Los niveles normales del péptido, generalmente sólo se encuentran en aquellos pa-

cientes con una lesión hepática poco evolucionada, y excepcionalmente en pacientes con una hepatitis alcohólica o una cirrosis.

- 7º La determinación sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III podría ser un buen marcador para discriminar los pacientes alcohólicos crónicos con lesión hepática, de aquellos que tienen un hígado histologicamente normal.
- 8º La concentración sérica del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III está aumentada en los pacientes alcohólicos crónicos con fibrosis y particularmente en aquellos cuya biopsia hepática demuestra la presencia de cirrosis y signos de hepatitis alcohólica. Sin embargo la determinación de este péptido no permite distinguir los distintos tipos de hepatopatía alcohólica.
- 9º Los niveles séricos del procolágeno tipo III se relacionan estrechamente con la intensidad de la fibrosis observada en la biopsia hepática de los pacientes alcohólicos crónicos, lo que sugiere que la determinación sé-

rica de este péptido puede ser de utilidad para controlar la evolución de la enfermedad hepática alcohólica. Asimismo la determinación sérica del péptido aminoterminal del procolágeno también podría ser útil para conocer la eficacia terapéutica de distintos fármacos antifibrogénicos.

- 10º El péptido aminoterminal del procolágeno tipo III puede ser considerado como un índice de fibrogénesis hepática en los pacientes con una hepatopatía alcohólica, particularmente en aquellos en los que los signos de actividad de la enfermedad son más evidentes, ya que se ha hallado una buena relación directa entre los niveles séricos del procolágeno tipo III y la actividad prolil-hidroxilasa hepática.

De los resultados de esta Tesis se puede concluir que en la hepatopatía alcohólica:

- 1º La actividad prolil-hidroxilasa hepática está relacionada con la intensidad de la fibrosis. No obstante la existencia de una actividad enzimática relativamente elevada en biopsias sin fibrosis sugiere que el aumento de la fibrogé-

nesis hepática precede al depósito de colágeno.

2º Los niveles séricos del péptido aminoterminal del procolágeno tipo III están relacionados con la intensidad de la fibrosis hepática, y con la actividad prolil-hidroxilasa hepática. Estos datos sugieren que la concentración sérica de este péptido es también un índice de fibrogénesis hepática.

B I B L I O G R A F I A

1. ALONSO F. Epidemiología del alcoholismo en España. En hígado y alcohol. Ed. por Herrerías, JM. Sevilla. pp 31-46, 1980.
2. SANTO DOMINGO J. Ponencia XVIII Congreso Internacional de alcoholismo y Toxicomanías. Sevilla, 1972. pp 27-34. Ed. por Liade, 1973.
3. GILI M, ORLA D, SALLERAS L, CANELA J, LARA N, MARTI C. L'impacte de l'alcoholisme sobre la mortalitat a España, 1951-1977. Tortosa 1981. Ponències del curs de drogodependències. Ed. per Departament de Sanitat i Seguretat Social. pp 81-95, 1982.
4. SCHMIDT W, DELINT J. Causes of death of alcoholics. Q. J. STUD ALCOHOL 33: 171-185, 1972.
5. JOLLITE N, JELLINECK EM. Vitamin deficiencies and liver. Q. J. STUD ALCOHOL. 2: 544-583, 1941.
6. LELBACH WK. Epidemiology of alcoholic liver disease. En Progress in liver diseases. Ed. por

Popper H y Chaffner F. Grune and Stratton.
New York. pp 494-515, 1976.

7. LELBACH WK. Cirrhosis in the alcoholic and its relation to de volume of alcohol abuse. ANN N. Y. ACAD SCI 285: 85-105, 1975.
8. PEQUINOT G. About the geographical aspects of cirrhosis. En Alcohol and the liver. Ed. por Gerok N, Sickinger y Henneskenser NH, Stuttgart, 1971.
9. FREIXA F, SOLER-INSA PA. En Aspectos historico-culturales y socioeconómicos. Toxicomanías. Un enfoque multidisciplinario. Ed. por Fontanella. Barcelona. pp 53-64, 1981.
10. LIEBER CS, DE CARLY LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding. SCIENCE 162: 917-918, 1968.
11. KORSTEN MA, MATSUZAKI SI, FEIMAN L, LIEBER CS. High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. N ENGL J MED 292: 386-389, 1975.

12. LUNDQUIST F. Acetaldehyde and aldehyde dehydrogenases-central problems in the estudy of alcoholism. EUROP J CLIN INVEST 13: 183-184, 1983.
13. BRUGUERA M,. Efectos del alcohol sobre el hígado. En La enfermedad alcohólica. Ed. por Químicos Unidos SA. Barcelona. pp 183-206, 1978.
14. BRUGUERA M, BERTRAN A, BOMBI JA, RODES J. Giant mitochondria in hepatocytes. A diagnostic hint for alcoholic liver disease. GASTROENTEROLOGY 73: 1383-1387, 1977.
15. ZAKIM D, BOYER TD, MONTGOMERY C, KANAS N. Alcoholic liver disease. En Hepatology. A text book of liver disease. Ed. por Zakim y Boyer WB Saunders O. Philadelphia. pp 759-789, 1982.
16. MADISON LL, LOCHNER A, WOLFF J. Ethanol-induced hypoglycemia. DIABETES 16: 252-258, 1967.

17. LIEBER CS. Pathogenesis and significance of the fatty liver and toxic effects of ethanol/ acetaldehyde on cell organelles. En Postgraduate Course Alcoholism and alcohol-induced liver disease. Ed. por The American Association for the Study of Liver Diseases. Chicago. pp 184-207, 1981.
18. KERSHENOBICH D, GARCIA-TSAO G, ALVAREZ SALDAÑA S, ROJKIND M. Relationship between blood lactid acid and serum proline in alcoholic liver cirrhosis. GASTROENTEROLOGY 80: 1012-1015, 1981.
19. SALASPURO MP, LIEBER CS. Alcoholic liver disease. En Liver and biliary disease. Ed. por Wright R, Alberti KG.MM. Karran y Millward-Sadler GH. WB Saunders Company Ltd. London. pp 735-773, 1979.
20. ORREGO H, ISRAEL Y, BLENDIS LM. Alcoholic liver disease: Informations in Search of Knowledge. HEPATOLOGY 1: 267-283, 1981.
21. ROJKIND M, DUNN MA. Hepatic fibrosis. GAS-

TROENTEROLOGY 76: 849-863, 1979.

22. PEREZ-TAMAYO R. Cirrhosis of the liver: A reversible disease?. ANN PATH 183-213, 1979.
23. VAN WAES L, LIEBER CS. Early perivenular sclerosis in alcoholic fatty liver: an index of progresive liver injury. GASTROENTEROLOGY 73: 646-650, 1977.
24. TORRES SALINAS M. ¿ Que haría usted ante un paciente icterico ?. MEDICINA INTEGRAL 1 (6): 355-365, 1980.
25. PARES A, BOSCH J, BRUGUERA M, RODES J. Características clínicas y criterios pronósticos de la hepatitis alcohólica. GASTROENTEROLOGIA Y HEPATOLOGIA 1: 118-123, 1978.
26. TERES J, BRUGUERA M, VIVANCOS J, POU JM, GASULL MA. Syndrome de Zieve. A propos de deux observations. OUEST MED 26: 427-431, 1973.
27. GLOVER SC, Mc PHIL JL, BRUNT PW. Cholestasis in acute alcoholic liver disease. LANCET 2: 1305-1306, 1977.

28. ANONIMO. Screening test for alcoholism. LANCET 2: 1117-1118, 1980.
29. ROSALKI SB, RAU D. Serum-glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. CLIN CHIM ACTA 39: 41-47, 1972.
30. WU A, CHANARIN I, LEVI AJ. Macrocytosis of chronic alcoholism. LANCET 1: 829-831, 1974.
31. CONN HO. Steroid treatment of alcoholic hepatitis the yeas and the nays. GASTROENTEROLOGY 74: 319-326, 1978.
32. NASRALLAH SM, GALAMBOS JT. Aminoacid therapy of alcoholic hepatitis. LANCET II: 1276-1277, 1980.
33. ORREGO H, KALANT H, ISRAEL Y, BLAKE J, MEDLINE A, RANKIN JG, ARMSTRONG A, KAPUR B. Effect of short term therapy with propylthiouracil in patients with alcoholic liver disease. GASTROENTEROLOGY 76: 105-115, 1979.
34. HALLE P, PARE P, KAPTEIN E, KAHEL G, REDE-

- KER A, REYNOLDS TB. Double-blind controlled trial of propylthiouracil in patients with severe acute hepatitis. GASTROENTEROLOGY 82: 925-931, 1982.
35. MEZEY E, POTTER J, IBER FL, MADDREY WC. Hepatic collagen proline hydroxylase activity in alcoholic hepatitis: effect of d-penicillamine. J LAB CLIN MED 93: 92-100, 1979.
36. KERSHENOBICH D, UGARTE M, SUAREZ GI, MATA JM, PEREZ-TAMAYO R, ROJKIND M. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. GASTROENTEROLOGY 77: 532-536, 1979.
37. GAY S, MILLER EJ. Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue. New York, Fischer, 1978.
38. RAMACHANDRAN GN, RAMACHANDRAN C, REDDI AH (Editors). Biochemistry of Collagen. New York, Plenum Press. pp 45-84, 1976.
39. HANCE AJ, CRYSTAL RG. The connective tissue of lung. AM REV RESPIR DIS 112: 657-711, 1975.

40. MILLER EJ. Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagens MOL CELL BIOCHEM 13: 165-192, 1976.
41. BURGESSON RE, EL ADLI FA, KAITILA II, HOLLISTER DW. Fetal membrane collagens: Identification of two new collagen alpha chains. PROC NATL ACAD SCI USA 73: 2579-2583, 1976.
42. EYRE DR, MUIR H. The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig. BIOCHEM J 151: 595-602, 1975.
43. LAYMAN DL, EPSTEIN EH Jr, DODSON RF, TITUS JL. Biosynthesis of types I and III collagens by smooth muscle cells from human aorta. PROC NATL ACAD SCI USA 74: 671-675, 1977.
44. MADRI JA, FURTHMAYR II. Isolation and tissue localization of type AB₂ collagen from lung parenchyma. AM J PATHOL 94: 323-330, 1979.
45. TIMPL R, FURTHMAYR H, HAHN E, BECKER U, STOLTZ.

- Immunochemistry of collagen. BEHRINGWERK MITT 53: 66-79, 1973.
46. TRELSTAD RL, KANG AH, IGARASHI S, GROSS J. Isolation of two distinct collagens from chick cartilage. BIOCHEMISTRY 9: 4993-4998, 1970.
47. WIEDEMANN H, CHUNG E, FUJII T, MILLER EJ, KUHN K. Comparative electron-microscope studies on type III and type I collagen. EUR J BIOCHEM 51: 363-368, 1975.
48. EPSTEIN EH Jr. $[\alpha I(III)]_3$ human skin collagen: Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. J BIOL CHEM 249: 3225-3231, 1974.
49. GAY S, FIETZEDK PP, REMBERGER K, EDER M, KUHN K. Liver cirrhosis: Immunofluorescence and biochemical studies demonstrate two types of collagens. KLIN WOCHESCHR 53: 205-208, 1975.
50. VOSS B, RAUTERBERG J, ALLAM S, POTT G. Distribution of collagen type I and type III and of two collagenous components of basement

membranes in the human liver. PATH RES PRACT
170: 50-60, 1980.

51. HAHN E , WICK G, PENCEV D, TIMPL R. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: Collagen type IV, laminin and fibronectin. GUT 21: 63-71, 1980.
52. RAUTERBERG J, VOSS B, POTT G, GERLACH U. Connective tissue components of the normal and fibrotic liver: 1. Structure, local distribution and metabolism of connective tissue components in the normal liver and changes in chronic liver diseases. KLIN WOCHENSCHR 59: 767-779, 1981.
53. ROJKIND M, MARTINEZ-PALOMO A. A increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. PROC NATL ACAD SCI USA 73: 539-543, 1976.
54. KENT G, GAY S, INOYUE T, BAHU R, MINICK OT, POPPER H. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver

injury. PROC NATL ACAD SCI USA 73: 3719-3722, 1976.

55. KURKINEN M, VAHERI A, ROBERTS PS, STENMAN S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. LAB INV 43: 47-51, 1980.
56. MOSESSON MW, AMRANI DL. The Structure and Biologic Activities of Plasma Fibronectin. BLOOD 56: 145-158, 1980.
57. RUOSLAHTI E, ENGVALL E, HAYMAN EG. Fibronectin. Current concepts of its structure and functions. COLL RES 1: 95-128, 1981.
58. RUOSLAHTI E. Fibronectin. J ORAL PATHOL 10: 3-13, 1981.
59. MOSHER DF, PROCTOR RA, GROSSMAN JE. Fibronectin: Role in Inflammation. En Advances in inflammation Research. Vol 2. Ed: Gerald Weissmann, Raven Press, New York. pp 187-207, 1981.

60. CHUNG A, JAFFE R, FREEMAN IL, VERGOES JP, BRAGINSKI JE, CARLIN B. Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma derived cell line. CELL 16: 277-287, 1979.
61. KELINMAN HK, KLEBE RJ, MARTIN GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J CELL BIOL 88: 473-485, 1981.
62. RODEN L, HOROWITZ MI. Structure and biosynthesis of connective tissue proteoglycans. In The glycoconjugates. Vol II. Ed: Horowitz MI, Pigman W. Academic Press, New York. pp 3-13, 1978.
63. LINDAHL U, HOOK M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. ANN REV BIOCHEM 47: 385-417, 1978.
64. NINOMIYA Y, HATA RI, NAGAI Y. Glycosaminoglycans synthesis by liver parenchymal cell clones in culture and its change with transfor-

- mation. BIOCHIM BIOPHIS ACTA 629: 349-358, 1980.
65. AKASAKI M, KAWASAKI T, YAMASHINA I. The isolation and characterization of glycopeptides and mucopolysaccharides from plasma membranes of normal and regenerating livers of rats. FEBS LETTERS 59: 100-104, 1975.
66. OLDBERG D, KJELLEN L, HOOK M. Cell-surface heparan sulfate. Isolation and characterization of a proteoglycan from rat liver membranes. J BIOL CHEM 254: 8505-8510, 1979.
67. PRINZ R, KLEIN V, SUDHAKARAN PR, SINN W, ULRICH K, VON FIGURA K. Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in rat hepatocytes. Synthesis of heparan sulfate and distribution into cellular and extracellular pools. BIOCHIM BIOPHIS ACTA 630: 402-413, 1980.
68. BORNSTEIN P. The biosynthesis of collagen. ANNU REV BIOCHEM 43: 567-603, 1974.
69. PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI, TUDERMAN L, GUZMAN NA.

- The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). NEW ENGL J MED 301: 13-23, 1979.
70. FIETZEK PP, KUHN K. The primary structure of collagen. INT REV CONNECT TISSUE RES 7: 1-60, 1976.
71. STRYER. Proteínas del tejido conjuntivo: Colágeno, elastina y proteoglicanos. En Bioquímica. Ed. por Reverté S.A. Barcelona. pp. 167-185, 1982.
72. BERG RA, PROCKOP DJ. The thermal transition of a nonhydroxylated form of collagen: Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 52: 115-129, 1973.
73. PEREZ-TAMAYO R. Pathology of collagen degradation. AM J PATHOL 92: 509-568, 1978.
74. FIETZEK PP, KUHN K. Information contained in the aminoacid sequence of the alpha 1(I) chain of collagen and its consequences upon

the formation of the triple helix, of fibrils and crosslinks. MOL CELL BIOCHEM 8: 141-157, 1975.

75. FUJII K, TANZER ML, COOKE PH. Collagen fibrogenesis and the formation of complex crosslinks. J MOL BIOL 106: 223-227, 1976.
76. TANZER ML. Cross-linking of collagen. SCIENCE 180: 561-566, 1973.
77. GROSS J. Collagen biology: Structure, degradation, and disease. HARVEY LECT 68: 351-432, 1974.
78. ROSENBLOOM J, HARSCH M, JIMENEZ SA. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. ARCH BIOCHEM BIOPHYS 158: 478-481, 1973.
79. BORNSTEIN P, ASH JF. Cell surface associated structured proteins in connective tissue cells. PROC NATL ACAD SCI USA 74: 2480-2484, 1977.

80. LENAERS A, ANSAY M, NUSGENS BV, LAPIERE CM. Collagen made of extended alpha-chains, pro-collagen in genetically-defective dermatos-paraxic calves. EUR J BIOCHEM 23: 533-543, 1971.
81. WEINSTOCK M, LEBLOND CP. Synthesis migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after (³H) proline administration. J CELL BIOL 60: 92-127, 1974.
82. FESSLER JH, FESSLER LI. Biosynthesis of pro-collagen. ANNU REV BIOCHEM 47: 129-162, 1978.
83. OLSEN BR, BERG RA. Posttranslational processing and secretion of procollagen in fibroblasts. PROC BR SOC EXP BIOL 33: 57-78, 1979.
84. STRYER L. Biosíntesis de proteínas. En Bio-química. Ed. por Reverté s.a. Barcelona. pp. 589-614, 1982.
85. KIVIRIKKO KL, RISTELI L. Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological

states. MED BIOL 54: 159-186, 1976.

86. KIVIRIKKO KL, SHUDO K, SAKAKIBARA S, PROCKOP DJ. Studies on procollagen lysine hydroxylase: Hydroxylation of synthetic peptide and the stoichiometric decarboxylation of alpha-ketoglutarate. BIOCHEM 11: 122-129, 1972.
87. UITTO J, PROCKOP DJ. Rate of helix formation by intracellular procollagen and procollagen: Evidence for a role for disulfide bonds. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 55: 904-911, 1973.
88. PINNELL SR. Abnormal collagens in connective tissue diseases. BIRTH DEFECTS 11: 23-30, 1975.
89. UITTO J, LICHTENSTEIN JR. Defects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue. J INVEST DERMATOL 66: 59-79, 1976.
90. DESSAU W, ADELMANN BC, TIMPL R, MARTIN GR. Identification of the sites in collagen alpha-chains that bind serum anti-gelatin factor

(cold-insoluble globulin). BIOCHEM J 169:
55-59, 1978.

91. GRANT ME, PROCKOP DJ. The biosynthesis of collagen. N ENGL J MED 286: 194-199; 242-249; 291-300, 1972.
92. ROSENBERRY TL, RICHARDSON JM. Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase: Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits. BIOCHEMISTRY 16: 3550-3558, 1977.
93. PORTER RR, REID KBM. The biochemistry of complement. NATURE 275: 699-704, 1978.
94. MINOR RR. A comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. En Review article. Ed. por Amer. Assoc. Pathol. Bacteriol. pp. 227-277, 1980.
95. HUTTON JJ Jr, TRAPPEL AL, UDENFRIEND S. A rapid assay for collagen proline hydroxylase. ANALYT BIOCHEM 16: 384-394, 1966.

96. CARDINALE GJ, UDENFRIEND S. Prolylhydroxylase. ADVAN ENZYMOL 41: 245-300, 1974.
97. MINOR RR; CLARK CC, STRAUSE EL, KOSZALKA TR, BRENT RL, KEFALIDES NA. Basement membrane procollagen is not converted to collagen in organ cultures of parietal yolk sac endoderm. J BIOL CHEM 251: 1789-1794, 1976.
98. KEFALIDES NA. Basement membranes: Current concepts of structure and synthesis. DERMATOLOGICA 150: 4-15, 1975.
99. MILLER EJ, ROBERTSON PB. The stability of collagen cross-links when derived from hydroxylsyl residues. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 54: 432-439, 1973.
100. BAILEY AJ, ROBBINS SP, BALIAN G. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen . NATURE 251: 105-109, 1974.
101. DUKSIN D, BORNSTEIN P. Impaired conversion of procollagen to collagen by fibroblasts and bone treated with tunicamycin, an inhibitor

of protein glycosylation. J BIOL CHEM 252:
955-962, 1977.

102. RHODES RK, MILLER EJ. Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. BIOCHEM 17:
3442-3448, 1978.
103. KEFALIDES NA. Structure and biosynthesis of basement membranes. INT REV CONNECT TISSUE RES 6: 63-104, 1973.
104. UITTO VJ, UITTO J, KAO WWY, PROCKOP DJ. Procollagen polypeptides containing cis-4-hydroxy-L-proline are overglycosylated and secreted as nonhelical pro- γ chains. ARCH BIOCHEM BIOPHYS 185: 214-221, 1978.
105. CLARK CC, KEFALIDES NA. Carbohydrate moieties of procollagen: Incorporation of isotopically labeled mannose and glucosamine into propeptides of procollagen secreted by matrix-free chick embryo tendon cells. PROC NATL ACAD SCI USA 73: 34-38, 1976.

106. CLARK CC, KEFALIDES NA. Localization and partial composition of the oligosaccharide units on the propeptide extensions of type I procollagen. J BIOL CHEM 253: 47-51, 1978.
107. BECKER U, TIMPL R, HELLE O, et al. NH₂-terminal extensions on skin collagen from sheep with a genetic defect in conversion of procollagen into collagen. BIOCHEMISTRY 15: 2853-2862, 1976.
108. ENGEL J, BRUCKNER P, BECKER U, et al. Physical properties of the aminoterminal precursor-specific portion of type I procollagen. BIOCHEMISTRY 16: 4026-4033, 1977.
109. GRANT ME, JACKSON DS. The biosynthesis of procollagen. ESSAYS BIOCHEM 12: 77-113, 1976.
110. PROCKOP DJ, BERG RA; KIVIRIKKO KJ, et al. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. En Biochemistry of collagen. Ed. por Ramachandran GN, Reddi AH. New York. Plenum Press. pp. 163-273, 1976.

111. UITTO J, PROCKOP DJ. Biosynthesis of cartilage procollagen: Influence of chain association and hydroxylation of prolyl residues on the folding of the polypeptides into the triple-helical conformation. BIOCHEMISTRY 13: 4586-4591, 1974.
112. HARWOOD R, MERRY AH, WOOLEY DE, et al. The disulfide-bonded nature of procollagen and The role of the extension peptides in the assembly of the molecule. BIOCHEM J 161: 405-418, 1977.
113. LUKENS LN. Time of occurrence of disulfide linking between procollagen chains. J BIOL CHEM 251: 3530-3538, 1976.
114. BYERS PH, CLICK EM, HARPER E, BORNSTEIN P. Interchain disulfide bonds in procollagen are located in a large nontriple-helical COOH-terminal domain. PROC NATL ACAD SCI USA 72: 3009-3013, 1975.
115. NIST C, VON DER MARK K, HAY ED, OLSEN BR, BORNSTEIN P, ROSS R, DEHM P. Location of

procollagen in chick corneal and tendon fibroblasts with ferritin-conjugated antibodies. J CELL BIOL 65: 75-87, 1975.

116. OLSEN BR, BERG RA, KISHIDA Y, PROCKOP DJ. Further characterization of embryonic tendon fibroblasts and the use of immunoferritin techniques to study collagen biosynthesis. J CELL BIOL 64: 340-355, 1975.
117. OLMSTEAD JB, BORISKY GG. Microtubules. ANN REV BIOCHEM 42: 507-540, 1973.
118. BARROW MV, SIMPSON CF, MILLER EJ. Lathyrism: A review. QUART REV BIOL 49: 101-128, 1974.
119. BIENKOWSKI RS, COWAN MJ, McDONALD JA, CRYSTAL RG. Degradation of newly synthesized collagen. J BIOL CHEM 253: 4356-4363, 1978.
120. UITTO J. Biosynthesis of type II collagen: removal of amino and carboxy-terminal extensions from collagen synthesized by chick embryo cartilage cells. BIOCHEMISTRY 16: 3421-3429, 1977.

121. GOLDBERG B, TAUBMAN M B, RADIN B. Procollagen peptidase: Its mode of action on the native substrate. CELL 4: 45-50, 1975.
122. LEUNG MKK, FESSLER LI, GREENBERG DB, et al. Separate amino and carboxylprocollagen peptidases in chick embryo tendon. J BIOL CHEM 254: 224-232, 1979.
123. HOLBROOK KA, BYERS PH, HEGREBERG GA, COUNTS D. Altered collagen fibrils in skin of animals with inherited connective tissue disorders (abstr.). ANAT REC 190: 424, 1978.
124. PATTERSON DF, MINOR RR. Hereditary fragility and hyperextensibility of the skin of cats: A defect in collagen fibrillogenesis. LAB INVEST 37: 170-179, 1977.
125. BAILEY AJ, ROBINS SP, BALIAN G. Biological significance of the intermolecular cross-links of collagen. NATURE 251: 105-109, 1974.
126. EYRE DR. Collagen: Molecular diversity in the body's protein scaffold. SCIENCE 207: 1315-1321, 1980.

127. ADAMS E. Invertebrate collagens. SCIENCE 202: 591-598, 1978.
128. SIEGEL RC, MARTIN GR. Collagen cross-linking. J BIOL CHEM 245: 1653-1658, 1970.
129. PINNELL SR, MARTIN GR. The cross-linking of collagen and elastin: Enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino-adipic- δ -semialdehyde (Allysine) by an extract from bone. BIOCHEMISTRY 61: 708-716, 1968.
130. BAILEY AJ, RANTA MH, NICHOLLS AC, et al. Isolation of alpha-amino adipic acid from mature dermal collagen and elastin: evidence for an oxidative pathway in the maturation of collagen and elastin. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 78: 1403-1410, 1977.
131. TANZER M. Cross-linking. En Biochemistry of collagen. Ed. por Ramachandran GN, Reddi AH. New York. Plenum Publishing. pp. 137-157, 1976.

132. HARRIS ED, GONNERMAN WA, SAVAGE JE, et al. Connective tissue amino oxidase II: Purification and partial characterization of lysyl oxidase from chick aorta. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 341: 332-344; 1974.
133. SIEGEL RC, FU JCC. Collagen cross-linking: Purification and substrate specificity of lysyl oxidase. *J BIOL CHEM* 251: 5779-5785, 1976.
134. STASSEN FLH. Properties of highly purified lysyl oxidase from embryonic chick cartilage. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 438: 49-60, 1976.
135. PIERARD GE, LAPIERE CM. Physiopathological variations in the mechanical properties of skin. *ARCH DERM RES* 260: 231-239, 1977.
136. PIERARD GE, LAPIERE CM. Skin in dermatosparaxis: Dermal microarchitecture and biomechanical properties. *J INVEST DERMATOL* 66: 2-7, 1976.
137. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity

in amphibian tissues: A tissue culture assay. PROC NATL ACAD SCI USA 48: 1014-1022, 1962.

138. HORWITZ AL, HANCE AJ, CRYSTAL RG. Granulocyte collagenase: Selective digestion of type I relative to type III collagen. PROC NATL ACAD SCI USA 74: 897-901, 1977.
139. LASH JW, ROSENE K, MINOR RR, DANIEL JC, KOSHER RA. Environmental enhancement of in vitro chondrogenesis: III. The influence of external potassium ions and chondrogenic differentiation. DEV BIOL 35: 370-375, 1973.
140. BAUM BJ, MOSS J, BREUL SD, CRYSTAL RG. Association in normal human fibroblasts of elevated levels of adenosine 3': 5'-monophosphate with a selective decrease in collagen production. J BIOL CHEM 253: 3391-3394, 1978.
141. BAUM BJ, MOSS J, BREUL SD, BERG RA, CRYSTAL RG. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. J BIOL CHEM 255: 2843-2847, 1980.

142. BERG RA, SCHWARTZ ML, CRYSTAL RG. Regulation of the production of secretory proteins. Intracellular degradation of newly synthesized "defective" collagen. PROC NATL ACAD SCI 77: 4746-4750, 1980.
143. POSTLETHWAITE AE, KESKI-OJA J, BALIAN G, KANG AH. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. J EXP MED 153: 494-499, 1981.
144. WAHL SM, WAHL LM, McCARTHY JB. Lymphocyte mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J IMMUNOL 121: 942-946, 1978.
145. UITTO J. Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in disease. J INVEST DERMATOL 72: 1-10, 1979.
146. MINOR RR, ROSENBLOOM J, LASH JW, VON DER MARK K. Chondrogenic differentiation in cultured somites. In Extracellular Matrix influences on Gene Expression. Ed. por Slavkin

HC, Creulich RC. New York. Academic Press.
pp. 169-174, 1975.

147. MINOR RR, HOCH PS, KOSZALKA TR, BRENT RL;
KEFALIDES NA. Organ cultures of the embryonic rat parietal yolk sac: I. Morphologic and autoradiographic studies of the deposition of the collagen and noncollagen glycoprotein components of basement membrane. DEV BIOL 48: 344-364, 1976.
148. WOOLLEY DE, GLANVILLE RW, ROBERTS DE, EVANSON JM. Purification, characterization and inhibition of human skin collagenase. BIOCHEM J 169: 265-276, 1978.
149. MCKUSICK VA. Heritable Disorders of Connective tissue. St. Louis, Mosby CV. 1972.
150. HAY ED. Origin and role of collagen in the embryo. AM ZOOL 13: 1085-1107, 1973.
151. LASH JW, BURGER MM. Cell and Tissue Interactions. Ed. Lash JW, Burger MM. New York. Raven Press. 1977.

152. MINOR RR. Somite chondrogenesis: A structural analysis. J CELL BIOL 56: 27-50, 1973.
153. PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI, TUDERMAN L, GUZMAN NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts). NEW ENGL J MED 301: 77-85, 1979.
154. STEWART RE, HOLLISTER DW, RIMOIN DL. A new variant of Ehlers-Danlos syndrome: An autosomal dominant disorder of fragile skin, abnormal scarring and generalized periodontitis. BIRTH DEFECTS 13: 85-93, 1977.
155. HOLLISTER DW. Heritable disorders of connective tissue: Ehlers-Danlos syndrome. PEDIATR CLIN NORTH AM 25: 575-591, 1978.
156. BEIGHTON P. X-linked recessive inheritance of the Ehlers-Danlos syndrome. BR MED J 3: 409-411, 1968.
157. JUDISCH GF, WAZIRI M, KRACHMER JH. Ocular Ehlers-Danlos syndrome with normal lysyl hydroxylase activity. ARCH OPHTHALMOL 94: 1489-1491, 1976.

158. KRANE SM, PINNELL SR, ERBE RW. Lysyl-proto-collagen hydroxylase deficiency in fibro-blasts from siblings with hydroxylysine-de-ficient collagen. PROC NATL ACAD SCI USA 69: 2899-2903, 1972.
159. LICHTENSTEIN JR, KOHN LD, BYERS P, MARTIN GR, McKUSICK VA. Procollagen peptidase deficiency in a form of the Ehlers-Danlos syndrome. TRANS AM ASSOC PHYS 86: 333-339, 1973.
160. O'HARA PJ, READ WK, ROMANE WM, BRIDGES CH. A collagenous tissue dysplasia of calves. LAB INVEST 23: 307-314, 1970.
161. SIMAR LJ, BETZ EH. Dermatosparaxis of the calf, a genetic defect of the connective tissue: 2. Ultrastructural study of the skin. HOPPE SEYLER'S Z PHYSIOL CHEM 352: 13-14, 1971.
162. FURTHMAYER H, TIMPL R, STARK M, LAPIERE CM, KUHN K. Chemical properties of the peptide extension of the p-alpha 1 chain of dermatos-paractic skin procollagen. FEBS LETT 28: 247-250, 1972.

163. ANSAY M, GILLET A, HANSET R. La dermatosporaxie hereditaire des bovides: Biochemie descriptive de la peau. ANN MED VET 112: 449-451, 1968.
164. KANG AH, TRELSTAD RL. A collagen defect in homocystinuria. J CLIN INVEST 52: 2571-2578, 1973.
165. BYERS PH, NARAYANAN AS, BORNSTEIN P, HALL J. An X-linked form of cutis laxa due to deficiency of lysyl oxidase. BIRTH DEFECTS 12: 293-298, 1976.
166. WEBER L, MEIGEL WN, SPIER W. Collagen polymorphism in pathologic human scars. ARCH DERMATOL RES 261: 63-71, 1978.
167. HERBERT CM, JAYSON MIV, LINDBERG KA, BAILEY AJ. Biosynthesis and maturation of skin collagen in scleroderma, and effect of D-penicillamine. LANCET 1: 187-192, 1974.
168. LEROY EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: A possible

- defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. J CLIN INVEST 54: 880-889, 1974.
169. LEVENE CL, OCKLEFORD CD, BARBER CL. Scurvy: A comparison between ultrastructural and biochemical changes observed in cultured fibroblasts and the collagen they synthesise. VIRCHOWS ARCHIV CELL PATHOL 23: 325-338, 1977.
170. ROJKIND M, GIAMBRONE MA, BIEMPICA L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. GASTROENTEROLOGY 76: 710-719, 1979.
171. SEYER JM, HUTCHESON ET, KANG AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. J CLIN INVEST 59: 241-247, 1977.
172. ROJKIND M. Antifibrotic therapy in liver disease. ITALIAN J GASTROENTEROL 12: 97-103, 1980.
173. KOIZUMI T, NAKAMURA N, ABE H. Changes in acid mucopolysaccharide in the liver in hepatic fibrosis. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 148: 749-756, 1967.

174. SUZUKI S, NAKAMURA N, KOIZUMI T. The heterogeneity of dermatan sulfate and heparan sulfate in rat liver and chift in the glycosaminoglycan contents in carbon tetrachloride-darnage liver. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 428: 166-181, 1976.
175. CARLSSON R, ENGVALL E, FREEMAN A, RUOSLAHTI E. Laminin and fibronectin in cell adhesion: enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin. PROC NATL ACAD SCI USA 78: 2403-2406, 1981.
176. SCHAFFNER P, POPPER H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. GASTROENTEROLOGY 44: 239-242, 1963.
177. HRUBAN Z, RUSSELL RM, BOYER JL, GLAGOV S, BAGHERI SA. Ultrastructural changes in livers of two patients with hypervitaminosis A. AM L PATHOL 76: 451-461, 1974.
178. LANGNESS U, UDENFRIEND S. Collagen biosynthesis in nonfibroblastic cell lines. PROC NATL ACAD SCI USA 71: 50-51, 1974.

179. POPPER H, SCHAFFNER F, HUTTERER F, et al.
Parenchymal fibrogenesis: the liver. ANN
NY ACAD SCI 86: 1075-1088, 1960.
180. ROSS R. The connective tissue fiber forming
cell. En. Tratisse on collagen, Vol 2 (Ed.
por Gould BS): Biology of collagen, part A.
Ed. por Ramachandran GN. New York. Academic
Press. pp. 1-82, 1968.
181. GUZELIAN PS, DIEGELMANN RF. Localization of
collagen prolyl-hydroxylase to the hepato-
cytes. EXP CELL RES 123: 269-279, 1979.
182. DIEGELMANN RF, COHEN IK, GUZELIAN PS. Rapid
degradation of newly synthesized collagen by
primary cultures of adult rat hepatocytes.
BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 97: 819-826, 1980.
183. FOIDART JM, BERMAN JJ, PAGLIA L, RENNARD S,
ABE S, PERANTONI A, MARTIN GR. Synthesis of
fibronectin, laminin and several collagens
by a liver-derived epithelial line. LAB INV
42: 525-531, 1980.

184. GUZELIAN PS, QURESHI GD, DIEGELMANN RF. Collagen synthesis by the hepatocyte: studies in primary cultures of parenchymal cells from adult rat liver. COLL RES 1: 83-93, 1981.
185. VOSS B, ALLAM S, RAUTERBERG J, ULLRICH K, GIESELMANN V, VON FIGURA R. Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 90: 1348-1354, 1979.
186. HATA R, NINOMIYA Y, NAGAI Y, TSUKADA Y. Biosynthesis of interstitial type collagen by albumin producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. BIOCHEMISTRY 19: 169-176, 1980.
187. GUZELIAN PS, DIEGELMANN RF, QURESHI GD, et al. Immunohistochemical evidence for synthesis of collagen by the hepatocyte. GASTROENTEROLOGY (Abstract) 79: 1024, 1980.
188. MCGEE JO'D, PATRICK RS. The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. An electron microscopic study of acute carbon

tetrachloride liver injury. LAB INVEST 26:
429-440, 1972.

189. BRONFENMAJER S, SCHAFFNER F, POPPER H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. ARCH PATHOL 82: 447-453, 1966.
190. POPPER H. Distribution of vitamin A in tissue as vitalized by fluorescence microscopy. PHYSIOL REV 24: 205-224, 1944.
191. GABBIANI G, LELOUIS M, BAILEY AJ, et al. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. VIRCHOWS ARCH ZELLPATHOL 21: 133-145, 1976.
192. POPPER H, UDENFRIEND S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. AM J MED 49: 707-721, 1970.
193. POPPER H, MARTIN GR. Fibrosis of the liver: The role of the Ectoskeleton. En Progress in Liver diseases 7: 133-156, 1982.
194. WAKE K. Perisinusoidal stellate cells (fat-

storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. INTERNAT REV CYTOL 66: 303-353, 1980.

195. OKANOUE T, BURBIGE EJ, FRENCH SW. The role of the Ito cell in perivenular and intralobular fibrosis in alcoholic hepatitis. ARCH PATHOL LAB MED 107: 459-463, 1983.
196. MINATO Y, HASUMURA Y, TAKEUCHI J. The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. HEPATOLOGY VOL 3 No 4, pp. 559-566, 1983.
197. RUDOLPH R, McCLURE WJ, WOODWARD M. Contractile fibroblasts in chronic alcoholic cirrhosis. GASTROENTEROLOGY 76: 704-709, 1979.
198. BHATHAL PS. Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man. PATHOLOGY 4: 139-144, 1972.
199. IRLE C, KOCHER O, GABBIANI G. Contractility

- of myofibroblasts during experimental liver cirrhosis. J SUBMICROSC CYTOLOGY 12: 209-217, 1980.
200. ROJKIND M, KERSENOVIC D. Fibrosis and cirrhosis. En The Liver Annual 1. Ed. por Arias IM, Frenkel M, Wilson JHP. Experta Medica. Amsterdam. pp. 127-148, 1981.
201. ROJKIND M, DIAZ DE LEON L. Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices: A regulatory mechanism. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 217: 512-522, 1970.
202. DUNN MA, KAMEL R, KAMEL LA, . Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. GASTROENTEROLOGY 76: 978-982, 1979.
203. DUNN MA, ROJKIND M, WARREN KS, HAIT PK, RIFAS L, SEIFTER S. Liver collagen synthesis in murine schistosomiasis. J CLIN INVEST 59: 666-674, 1977.
204. DUNN MA, ROJKIND M, HIAT PK, WARREN KS. Conversion of arginine to proline in murine schis-

- tosomiasis. GASTROENTEROLOGY 75: 1010-1015, 1978.
205. EHRMPREIS MN, GIAMBRONE MA, ROJKIND M. Liver proline oxidase activity and collagen synthesis in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 629: 184-193, 1980.
206. MATA JM, KERSHENOBICH D, VILLARREAL E, ROJKIND M. Serum free proline and free hydroxyproline in patients with chronic liver disease. GASTROENTEROLOGY 68: 1265-1269, 1975.
207. KOWALOFF EM, PHANG JM, GRANGER AS, DOWNING SJ. Regulation of proline oxidase activity by lactate. PROC NATL ACAD SCI USA 74: 5368-5371, 1977.
208. LIEBER CS. Alcohol protein metabolism and liver injury. GASTROENTEROLOGY 79: 373-390, 1980.
209. GALAMBOS JT. Pronóstico de la cirrosis. En Cirrosis hepática. Ed. por Doyma. Barcelona.

España. pp.404-409, 1982.

210. ROJKIND M, KERSHENOBICH D Hepatic fibrosis. CLINICS IN GASTROENTEROLOGY VOL 10: 737-754, 1981.
211. POPPER H . Pathologic aspects of cirrhosis. AM J PATHOL 87: 228-258, 1977.
212. BAGGENSTOSS AH. Postnecrotic cirrhosis: morphology, etiology and pathogenesis. En Progress in liver diseases. Vol I. Ed. por Popper H, Schaffner F. New York: Grune and Stratton 14. 1961.
213. BARAONA E, LEO MA, BOROWSKY SA, et al. Alcoholic hepatomegaly: acumulation of protein in the liver. SCIENCE (Wash DC) 190: 794-795, 1975.
214. ISRAEL Y, KHANNA JM, ORREGO H, et al. Studies on metabolic tolerance to alcohol, hepatomegaly and alcoholic liver disease. DRUG AND ALCOHOL DEPEND 4: 109-118, 1979.

215. ORREGO H, BLENDIS LM, CROSSLEY IR, MEDLINE A, MACDONALD A, RITCHIE S, ISRAEL Y. Correlation of intrahepatic pressure with collagen in the Disse space and hepatomegaly in humans and in the rat. GASTROENTEROLOGY 80: 546-556, 1981.
216. BUCHER NLR, MALT RA. Regeneration of liver and kidney. LITTLE BROWN. BOSTON. pp. 176-184, 1971.
217. RABES HM. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. PROGRESS IN LIVER DISEASES 5: 83-99, 1976.
218. GALAMBOS JT, RIEPE SP. En Current hepatology. Ed. por Gitnich GL 2: 117-128, 1982.
219. ROJKIND M, KERSHENOBICH D. Hepatic fibrosis. PROGRESS IN LIVER DISEASES 5: 294-310, 1976.
220. MEZEY E. Alcoholic liver diseases. PROGRES IN LIVER DISEASES 7: 555-572, 1982.

221. STERN R. Experimental aspects of hepatic fibrosis. PROG LIVER DIS 6: 173-185, 1979.
222. FUJIWARA K, SAKAI T, ODA T, . The presence of collagenase in kupffer cells of the rat liver. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 54: 531-537, 1973.
223. FUJIWARA K, SAKAI T, ODA T, . Demonstration of collagenase activity in rat liver homogenates. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 60: 166-171, 1974.
224. OKAZAKI I, MURAYAMA K. Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. NATURE (Lond) 252: 49-50, 1974.
225. TAKAHASHI S, DUNN MA, SEIFTER S. Collagenolytic activities in liver from mice with schistosomiasis (abstr.). FED PROC 36: 677, 1977.
226. ROJKIND M, TAKAHASHI S, GIAMBRONE MA. Collagenase and reversible hepatic fibrosis in the rat (abstr.). GASTROENTEROLOGY 75: 984, 1978.

227. TAKAHASHI S, DUNN MA, SEIFTER S. Liver collagenase in murine schistosomiasis. GASTROENTEROLOGY 78: 1425-1431, 1980.
228. MARUYAMA K, FEINMAN L, OKAZAKI I, LIEBER CS. Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and human liver. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 658: 124-131, 1981.
229. CARTER EA, McCARRON MJ, ALPERT E, ISSELBACHER KJ. Lysyl oxidase and collagenase in experimental acute and chronic liver injury. GASTROENTEROLOGY 82: 526-534, 1982.
230. ROJKIND M, KERSHENOBICH D. Effects of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 378: 415-423, 1975.
231. GLYNN LE. Immunopathology of liver disease. PROGRESS IN LIVER DISEASES 5: 311-325, 1976.
232. WANDS JR. Ethanol and the immune response. In Biochemistry and Pharmacology of Ethanol. Ed.

por Majchrowicz E, Noble EP. New York. Plenum Press. pp. 641-652, 1979.

233. PEREZ-TAMAYO R, MONTFORT I. The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. AM J PATHOL 100: 427-442, 1980.
234. MARUYAMA K, FEINMAN L, FAIN SILBER Z, NAKANO M, OKAZAKI I, LIEBER CS. Measurement of mammalian collagenase in alcohol-Fed baboons and patients with alcoholic liver disease: Decrease in activity with development of cirrhosis. In Connective Tissue of the Normal and Fibrotic Human Liver. Ed. por Gerlach V, Pott G, Rauterberg J, Voss B. Germany: Georg Thieme. Verlag-Stuttgart. pp. 196-198, 1982.
235. MONTFORT I, PEREZ-TAMAYO R. The distribution of collagenase in normal rat tissues. J HISTOCHEM CYTOCHEM 23: 910-920, 1975.
236. MONTFORT I; PEREZ-TAMAYO R. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. AM J PATHOL 92: 411-418, 1978.

237. WEIBEL ER. Stereological methods. Vol 1. En Practical methods for biological morphometry. Academic Press. London. New York. Toronto. Sidney. San Francisco. 1979.
238. PHANG JM, FINERMAN GAM, SINGH B, ROSENBERG LE, BERMAN M. Compartmental analysis of collagen synthesis in fetal rat calvaria. I. Perturbation of proline transport. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 230: 146-159, 1971.
239. FINERMAN GAM, DOWNING S, ROSENBERG LE. Amino-acid transport in bone. II. Regulation of collagen synthesis by perturbation of proline transport. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 135: 1008-1015, 1967.
240. CHVAPIL M, RYAN JM. The pool of free proline in acute and chronic liver injury and its effect on the synthesis of collagen and globular proteins. AGENTS ACTIONS 3: 38-44, 1973.
241. ROJKIND M, GONZALEZ E. An improved method for determining specific radioactivities of proline ^{14}C and hydroxyproline ^{14}C in collagen

and in noncollagenous proteins. ANAL BIOCHEM
57: 1-7, 1974.

242. MCGEE JOD, PATRICK RS, MARION CR, LUTY CM.
Collagen proline hydroxylase activity and
³⁵S sulphate uptake in human liver biopsies.
GUT 15: 260-267, 1974.
243. TSUJI T, KIMURA K, FUKUHARA M, MORITA T, MAT-
SUI T, TAMURA M, MATSUOKA Y. Liver protoco-
llagen proline hydroxylase in human liver di-
sease and experimental liver fibrosis. GAS-
TROENTEROL JPN 12: 21-27, 1977.
244. MEZEY E, POTTER JJ, MADDREY WC. Hepatic co-
llagen proline hydroxylase activity in alco-
holic liver disease. CLIN CHIM ACTA 68: 313-
320, 1976.
245. FULLER GC, NOLAN JC, FINK S, RODIL JV. Prolyl
hydroxylase activity in normal and diseased
human liver. PROC SOC EXP BIOL MED 151: 61-
64, 1976.
246. JAIN S, SCHEUER PJ, MCGEE JOD, SHERLOCK S.

Hepatic collagen proline hydroxylase activity in primary biliary cirrhosis. EUR J CLIN INVEST 8: 15-17, 1978.

247. BRUNNER G, SCHUBOTHE M. Prolyl hydroxylase activity in liver biopsy specimens. An indicator for the activity of connective tissue formation (abstr.). DIGESTION 14: 463, 1976.
248. MANN SW, FULLER GC, RODIL JV, VIDINS EI. Hepatic prolyl hydroxylase and collagen synthesis in patients with alcoholic liver disease. GUT 20: 825-832, 1979.
249. McPHIE JL. Hepatic prolyl hydroxylase activity in human liver disease. HEPATO-GASTRO-ENTEROL 27: 277-282, 1980.
250. RISTELI J, KIVIRIKKO KI. Activities of prolyl hydroxylase, lysyl hydroxylase, collagen galactosyltransferase and collagen glycosyltransferase in the liver of rats with hepatic injury. BIOCHIM J 144: 115-122, 1974.
251. RISTELI J, KIVIRIKKO KI. Intracellular enzymes

of collagen biosynthesis in rat liver as a function of age and hepatic injury induced by dimethylnitrosamine: Changes in prolyl hydroxylase lysyl hydroxylase, collagen galactosyltransferase and collagen glycosyltransferase activities. *BIOCHEM J* 158: 361-367, 1976.

252. TRUPIN JS, RUSSELL JD, RUSSELL SB. Assay of prolyl hydroxylase in cultured fibroblast monolayers. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 121: 219-223, 1982.
253. HEBDA PA, EBERT J, KOU-LIN LEE CHOU, SHIELDS M, WHEI-YANG KAO W. The association between prolyl hydroxylase metabolism and cell growth in cultured L-929 fibroblasts. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 758: 128-134, 1983.
254. MUSSINI E, HUTTON JJ, UDEFRIEND S. Collagen proline hydroxylase in wound healing granuloma formation, scurvy and growth. *SCIENCE* 157: 927-929, 1969.
255. WEINER SL, URIVETZKY M, ISENBERG HD, BELENKO M,

- TALANSKY A, HAVIER R, MEILMAN E. Activation of prolyl hydroxylase in sponge induced granulation tissue: the effect of antineutrophil serum and inhibitor drugs. CONNECT TISSUE RES 5: 97-108, 1977.
256. THAN T, MCGEE JOD, BLUMGART LH. Prolyl hydroxylase in the skin of patients with obstructive jaundice. J CLIN PATHOL 30: 1044-1047, 1977.
257. THOMPSON WD, PATRICK RS. Collagen prolyl hydroxylase levels in experimental paraquat poisoning. BR J EXP PATHOL 59: 288-291, 1978.
258. THOMPSON WD, PATRICK RS. Collagen stimulating factors from lung in experimental paraquat poisoning demonstrated in vitro and in vivo. J CLIN PATHOL 37: 537-541, 1984.
259. PATRICK RS, MARTIN J, THOMPSON WD. The collagen prolyl hydroxylase activity of hepatocytes and mesenchymal cells isolated from normal and regenerating rat liver. DIAG HISTOPATHOL 4: 95-98, 1981.

260. RHOADS RE, UNDEFRIEND S. Purification and properties of collagen proline hydroxylase from newborn rat skin. ARCH BIOCHEM BIOPHYS 139: 329-339, 1970.
261. LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J BIOL CHEM 193: 265-275, 1951.
262. KUUTTI-SAVOLAINEN ER, ANTTINEN H, MIEITINEN A, KIVIRIKKO KI. Collagen biosynthesis enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease. II. Galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase. EUR J CLIN INVEST 9: 97-101, 1979.
263. LIEBER CS, JONES DP, LOSOWSKY MS, DAVIDSON CS. Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. J CLIN INVEST 41: 1863-1870, 1962.
264. LIEBER CS, LEEVY CM, STEIN SW, GEORGE WS, CHERICK GR, ABELMANN WH, DAVIDSON CS. Effect of ethanol on plasma free fatty acids in man. J LAB CLIN MED 59: 826-832, 1962.

265. HOHORST HJ, BERGMAYER HU. Methoden der enzymatischen analyse. VERLAG CHEMIE WEINHEIM S 266 AUFL, 1962.
266. LANGNESS U, GRASEDYCK K, BORGMANN J, LINDNER J. Collagen prolylhydroxylase activity in experimental cirrhosis. En Collagen Methabolism in the Liver. Ed. por Popper H, Becker K. New York. STRATTON INTERCONTINENTAL MEDICAL BOOK CORP. pp. 73-77, 1975.
267. STEIN HD, KEISER HR, SJOERDSMA A. Proline hydroxylase activity in human blood. LANCET 1: 106-109, 1970.
268. CHICHESTER CO, FULLER GC. Evidence for the presence of an endogenous inhibitor of prolylhydroxylase. RES COMMUN CHEM PATHOL PHARMACOL 29: 329-338, 1980.
269. KUUTTI-SAVOLAINEN ER, RISTELI J, MICTTINEN TA, KIVIRIKKO KI. Collagen biosynthesis enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease. I. Prolyl hydroxylase. EUR J CLIN INVEST 9: 89-95, 1979.

270. ANTTINEN H. Collagen glucosyltransferase activity in human serum . CLIN CHIM ACTA 77: 323-330, 1977.
271. ROHDE H, HAHN E, TIMPL R. Radioimmunoassay for aminoterminal procollagen peptides in liver disease. FRESENIUS Z ANALYT CHEM 290: 151-152, 1978.
272. WICK G, BRUNNER H, PENNER E, TIMPL R. The diagnostic application of specific antiprocollagen sera. II. Analysis of liver biopsies. INT ARCH ALLERGY APPL IMMUNOL 56: 316-324, 1978.
273. TAUBMAN MB, GOLDBERG B, SHERR CJ. Radioimmunoassay for human procollagen. SCIENCE 186: 1115-1117, 1974.
274. ROHDE H, VARGAS L, HAHN E, KALBFLEISCH H, BRUGUERA M, TIMPL R. Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. EUR J CLIN INVEST 9: 451-459, 1979.

275. NIEMELA O, RISTELI L, SOTANIEMI EA, RISTELI J. Heterogeneity of the antigens related to the aminoterminal propeptide of type III procollagen in human serum. CLIN CHIM ACTA 124: 39-44, 1982.
276. ROHDE H, LANGER I, KRIEG T, TIMPL R. Serum and urine analysis of the aminoterminal procollagen peptide type III by radioimmunoassay with antibody fab fragments. COLLAGEN REL RES VOL 3. pp. 371-379, 1983.
277. TAUBMAN MB, KAMMERMAN S, GOLDBERG B. Radioimmunoassay of procollagen in serum of patients with Paget's disease of bone. PROC SOC EXP BIOL MED 152: 284-287, 1976.
278. RAEDSCH RA, STIEHL A, WALDHERR R, MALL G, GMELIN K, GOTZ R, WALKERS S, CZYGAN P, KOMMERELL B. Procollagen-type III-peptide serum concentrations in chronic persistent and chronic active hepatitis and in cirrhosis of the liver and their diagnostic value Z. GASTRO-ENT 20: 738-743, 1982.

279. NIEMELA O, RISTELI L, SOTANIEMI EA, RISTELI J. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in serum in alcoholic liver disease. GASTROENTEROLOGY 85: 254-259, 1983.
280. HOCHWEISS S, FRUCHTMAN S, HAHN EG, GILBERT H, DONOVAN PB, JOHNSON J, GOLDBERG JD, BERK PD. Increased serum Procollagen III aminoterminal peptide in Myelofibrosis. AM J HEMATOL 15: 343-351, 1983.
281. RAEDSCH RA, STIEHL A, SIEG A, WALKER S, KOMMERELL B. Biliary excretion of procollagen type III peptide in healthy humans and in patients with alcoholic cirrhosis of the liver. GASTROENTEROLOGY 85: 1265-1270, 1983.
282. ROJKIND M. Inhibition of liver fibrosis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with CCL₄. J CLIN INVEST 52: 2451-2456, 1973.
283. KERSHENOBICH D, ROJKIND M. Effect of the administration of L-azetidine-2-carboxylic acid on albumin and transferrin biosynthesis by

liver slices of rats treated with CCL_4 . BIO-
CHIM BIOPHYS ACTA 319: 216-222, 1973.

284. PEREZ-TAMAYO R. Some aspects of connective tissue of the liver. PROG LIVER DIS 2: 192-210; 1965.
285. KNAUER CM, GAMBLE CN, MONROE LS. The reversal of hemocromatotic cirrhosis by multiple phlebotomies. GASTROENTEROLOGY 49: 667-671, 1965.
286. FALKMER S, SAMUELSON G, SJOLIN S. Penicillamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histochemistry in a case of Wilson's disease. PEDIATRICS 45: 260-268, 1970.
287. FLEMING CR, LUDWIG J, DICKSON ER. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: presentation, histology and results with D-penicillamine. MAYO CLIN PROC 53: 587-593, 1978.
288. EHRLICH HP, ROSS R, BORNSTEIN P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. J CELL BIOL 62: 390-405, 1974.

289. MALECH HL, ROOT RK, GALLIN J. Structural analysis of human neutrophile migration. J CELL BIOL 75: 666-693, 1978.
290. SPILBERG I, MANDELL B, MEHTA J. Mechanism of action of colchicine in acute urate-crystal-induced arthritis. J CLIN INVEST 64: 775-780, 1979.
291. LEONI S, SPAGNUOLO S, CONTI DE VIRGILIS L, et al. Effect of colchicine on rat liver plasma membrane. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 596: 451-455, 1980.
292. NICOLSON GK, POSTE G, JI TH. Dynamic aspects of cell surface. Ed. por Poste G, Nicolson GL. Amsterdam. pp. 73-83, 1977.
293. WILFRED G. Colchicine increases hepatic alkaline phosphatase activity. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 500: 209-212, 1979.
294. KIMIMITSU O, IKEHARA Y. Inhibitory effect of colchicine on translocation of alkaline phosphatase to the plasma membrane concomitant

to its induction in rat liver. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 640: 398-408, 1981.

295. SAVOLAINEN ER, MIETTINEN TA, PIKKARAINEN P, SALASPURO MP, KIVIRIKKO KI. Enzymes of collagen synthesis and type III procollagen aminopropeptide in the evaluation of D-penicillamine and medroxyprogesterone treatments of primary biliary cirrhosis. GUT 24: 136-142, 1983.
296. WALKER WHC, KEANE PH. Theoretical aspects of radioimmunoassay. En Handbook of Radioimmunoassay. Ed. por Guy E. Abraham. Marcel Dekkerinc. New York. pp: 87-130, 1977.
297. DOMENECH I, MASSONS JM. En Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores. Herder, 1977.
298. VIDINS EI, FOX S, FULLER C, KUTTAN R, MANN SW, RODIL JV. Hepatic Prolyl Hydroxylase activity as a parameter of collagen synthesis at initial and subsequent biopsy of patients with alcoholic liver disease. (Abst.)

GASTROENTEROLOGY 73: 1252, 1977.

299. LINDNER J, LANGNESS V, GRASEDYCK K, SCHMIEGELOW P. Experimental TAA-and CCl₄-Liver injury as a model of liver fibrosis. En Connective Tissue of the normal and fibrotic human liver. Ed. por Gerlach V, Pott G, Rauterberg J, Voss B, Georg Thieme, Verlag. New York, 1982.
300. TAKEUCHI T, PROCKOP J. Protocollagen proline hydroxylase in normal liver and in hepatic fibrosis. GASTROENTEROLOGY 56: 744-750, 1969.
301. MEZEY E, IMBEMBO AL. Hepatic collagen proline hydroxylase activity in hepatic disease following jeyunoileal bypass for morbid obesity. SURGERY 83: 345-353, 1978.
302. PARES A, CABALLERIA J, BRUGUERA M, TORRES-SALINAS M, RODES J. Influence of supression of alcohol intake, and sex, in the course of alcoholic hepatitis (Abst.) J HEPOTL SUPPL 1: 105, 1984.

303. ANTTINEN H, RYHANEN L, PUISTOLA V, ARRAUTO A, OIKARINEN A. Decrease in liver collagen accumulation in Carbon tetrachloride-Injured and Normal Growing Rats Upon Administration of Zinc. GASTROENTEROLOGY 86: 532-539, 1984.
304. TORRES M, PARES J, PARES A, CABALLERIA J, JIMENEZ W, HEREDIA D, RODES J. (Datos no publicados).
305. NAKANO M, WORNER TM, LIEBER CS. Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: Ultrastructure and histologic progression. GASTROENTEROLOGY 83: 777-785, 1982.
306. BOLARIN D, ANDY JJ, ALABI ZO. Liver immunoreactive Prolyl Hydroxylase Protein in human primary hepatocellular carcinoma. HEPATO-GASTROENTEROL 30: 230-232, 1983.
307. MENDENHALL C, CHEDID A, MORGAN D, KROMME C. Serum N-Terminal procollagen III (Pro III) Peptide (P) in alcoholic hepatitis (AH) (Abst.) HEPATOLOGY 3: 850, 1983.

308. SAVOLAINEN ER, GOLBERG B, LEO MA, VELEZ M, LIEBER CS. Clinical Value of serum procollagen radioimmunoassays in alcoholic liver disease. (Abst.) HEPATOLOGY 2: 682, 1982.
309. FREI A, ZIMMERMANN A, WEIGAND K. Serum procollagen-III-Amino-peptide (PP) as index of liver fibrosis. New Morphometric evidence. (Abst.) HEPATOLOGY 2: 733, 1982.
310. CABALLERIA J, PARES A, HAHN E, BRUGUERA M, RODES J. Serum procollagen peptide in primary biliary cirrhosis. Proceedings of the 17th Meeting of the European Association for the study of the liver. GOTEBOG (Suecia) pp: 34, 1982.
311. MARUYAMA K, OKAZAKI I, KOBAYASHI T, OKUNO F, KAMEGAYA K, TAKAGI S, ODA M, ISHII H, TSUCHIYA M. Measurement of serum type III procollagen amino-peptide as a parameter of hepatic fibrosis. (Abst.) ACTA HEPATOLOGICA JAPONICA 25: 24, 1984.