

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR COCAINA EN RATON.
ALTERACIONES FUNCIONALES BIOQUIMICAS Y
MORFOLOGICAS DURANTE LA NECROSIS Y REGENERACION
HEPATICAS.

MEMORIA DE TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
M^a DEL PILAR GASCO ALBERICH

Madrid, Septiembre 1993

El presente trabajo ha sido dirigido por la Dra.
MARIA CASCALES ANGOSTO,
Investigadora Científica del C.S.I.C., en la
**Unidad de Investigación BIOQUIMICA
FARMACOLOGICA** del Instituto de
Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM),
CENTRO DE CITOMETRIA DE FLUJO de
la Facultad de Farmacia de la Universidad
Complutense de Madrid e **INSTITUTO
NACIONAL DE TOXICOLOGIA**, en los
cursos académicos 1990-91, 91-92 y 92-93.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias, de una manera muy especial a la Directora de esta Tesis, la Dra. María Cascales Angosto, que me ha introducido en el campo de la investigación Bioquímica, y que ha tenido conmigo una gran paciencia y me ha ayudado, más allá, de lo que corresponde a un Director de Tesis. Siempre le estaré agradecida, y puedo asegurarle que su gran personalidad científica y humana, me han marcado profundamente.

Mi agradecimiento más sincero para el Director del Instituto Nacional de Toxicología, Dr. Manuel Sancho Ruiz, pues sólo gracias a todas las facilidades que me ha dado, su comprensión y apoyo constantes, he podido realizar este Trabajo.

Agradecer al Profesor Manuel Ruiz Amil, la amabilidad con que siempre me ha tratado y el haberme permitido realizar este proyecto.

A la Dra. Lourdes Fernández de Simón debo su importante colaboración en la realización del estudio morfológico y mucho más, ya que su amistad, ha sido para mí fundamental.

Hago extensivo mi agradecimiento a Alberto Alvarez, por su activa participación en todos los trabajos realizados por citometría de flujo.

Muy especialente, quiero dar las gracias a Lola Velasco, que me ha ayudado en todo momento, de manera incansable.

Muchísimas gracias a Javier Piga por su permanente apoyo y colaboración, a Rocío Tena por su aporte en la elaboración técnica del estudio morfológico y a Angela Zamora en fotografía.

No puedo dejar de nombrar a la Dra. Paloma Martín Sanz, al Dr. Lisardo Boscá, a la Dra. Carmen Cascales, y a la Dra. Carmen Díez Fernández. A mis compañeras de Laboratorio Marta Casado y Sonsoles Hortelano y a Martín Monteserín. Gracias a todos por vuestra amabilidad y ayuda.

ABREVIATURAS

ADP = Adenosin difosfato.

ATP = Adenosin trifosfato.

BSA = Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumine).

CPK = Creatina fosfoquinasa.

DNA = Acido desoxiribonucleico.

DTPA = Dietilentriamina pentacético.

DTT = Ditiotreitól.

EDTA = Acido etilendiaminotetracético.

EGF = Factor de crecimiento epidérmico.

FAD = Flavín adenín dinucleótido

GSH = Glutation reducido.

GSSG = Glutation oxidado.

HEPES = Acido N-2-hidroxietil piperazín-N'-2-etanosulfónico.

NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADP⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido fosforilado.

NE = Norepinefrina.

PBS = Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline).

RNA = Acido ribonucleico.

SNC = Sistema nervioso central.

TBA = Acido tiobarbitúrico.

t-BOOH = Terbutíl hidroperóxido.

TCA = Acido tricloroacético.

ENZIMAS

ALAT = L-alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.2.

ASPT = L-aspartate: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1.

CAT = Hidrogeno-peroxido oxidoreductasa, EC 1.11.1.6.

Citocromo P-450 reductasa NADPH, EC 1.6.2.4.

G6PDH = Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (D-Glucosa-6-fosfato: NADP⁺ 1-oxidoreductasa), EC 1.1.1.49.

GGT = Gamma-glutamil transferasa (gamma-glutamil-péptido: aminoácido gamma-glutamil transferasa), EC 2.3.2.2.

GK = Glucoquinasa (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa), EC 2.7.1.2.

GPx = Glutation peroxidasa (GSH: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), EC 1.11.1.9.

GR = Glutation reductasa (NADPH: GSSG oxidoreductasa), EC 1.6.4.2.

GST = Glutation S-transferasa, EC 2.5.1.18.

ICDH = Isocitrato deshidrogenasa (L-isocitrato: NADP⁺ oxidoreductasa descarboxilante), EC 1.1.1.42.

HK = Hexoquinasa (ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasa), EC 2.7.1.1.

ME = Enzima málico (L-malato: NADP⁺ oxidoreductasa descarboxilante), EC 1.1.1.40.

6PGDH = 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (6-fosfo-D-gluconato: NADP⁺ 2-oxidoreductasa descarboxilante), EC 1.1.1.44.

SOD = Superoxido dismutasa, EC 1.15.1.1.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Heterogeneidad funcional del hígado.....	4
1.1.1. Distribución heterogénea de enzimas y estructuras subcelulares en el parénquima hepático.....	8
1.2. Mecanismos de muerte celular. Necrosis y apoptosis.....	11
1.3. Regeneración hepática post-necrótica.....	18
1.3.1. Respuesta mitótica de los hepatocitos.....	19
1.3.2. Reguladores de la regeneración hepática.....	21
1.3.3. Regeneración y función hepática.....	22
1.4. Hepatotoxicidad inducida por cocaína.....	23
1.4.1. Manifestaciones de la hepatotoxicidad de la cocaína en animales de laboratorio.....	30
1.4.1.1. Alteraciones morfológicas.....	31
1.4.1.2. Alteraciones funcionales y bioquímicas.....	31
1.4.2. Metabolismo de la cocaína.....	32
1.4.2.1. Hidrólisis.....	32
1.4.2.2. Metabolismo oxidativo y hepatotoxicidad.....	34
1.4.3. Mecanismos responsables de la hepatotoxicidad de la cocaína.....	35
1.4.3.1. Mecanismo del enlace covalente.....	35
1.4.3.2. Ciclo redox y peroxidación lipídica.....	35
1.5. Citometría de flujo.....	37
1.5.1. Estructura de un citómetro de flujo.....	38
1.5.2. Aplicaciones de la citometría de flujo.....	39
1.6. Ciclo de división celular.....	41
1.6.1. Análisis del DNA por citometría de flujo.....	43
1.7. Objetivos de la investigación propuesta.....	44
2. MATERIAL Y METODOS.....	46
2.1. Aparatos.....	46
2.2. Productos.....	47
2.3. Animales.....	47
2.4. Tratamiento con cocaína.....	48
2.5. Obtención de muestras séricas y hepáticas.....	50

	Página
2.6. Fijación de muestras hepáticas para cortes de tejido....	50
2.7. Aislamiento de hepatocitos.....	51
2.7.1. Obtención de hepatocitos adultos de ratones tratados con cocaína y fenobarbital más cocaína.....	51
2.7.2. Obtención de hepatocitos fetales.....	52
2.8. Preparación de extractos hepáticos y fracciones subcelulares.....	53
2.9. Determinación de actividades enzimáticas.....	55
2.9.1. En suero.....	55
2.9.1.1. Aspartato aminotransferasa.....	55
2.9.1.2. Alanina aminotransferasa.....	56
2.9.1.3. Isocitrato deshidrogenasa NADP ⁺	56
2.9.1.4. Gamma-glutamil transferasa.....	57
2.9.2. En fracciones subcelulares hepáticas.....	57
2.9.2.1. Glucoquinasa y hexoquinasa.....	57
2.9.2.2. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	59
2.9.2.3. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.....	60
2.9.2.4. Enzima málico.....	60
2.9.2.5. Glutation reductasa.....	61
2.9.2.6. Glutation peroxidasa.....	61
2.9.2.7. Glutation-S-transferasa.....	62
2.9.2.8. Superóxido dismutasa.....	62
2.9.2.9. Catalasa.....	63
2.9.2.10. Citocromo P-450.....	64
2.9.2.11. Citocromo b ₅	64
2.9.2.12. Citocromo (P-450) reductasa NADPH.....	64
2.10. Determinación de la concentración de metabolitos.....	65
2.10.1. ATP.....	65
2.10.2. Glutation reducido, glutacion oxidado y GSH/GSSG.....	66
2.10.3. Piruvato.....	67
2.10.4. Malato.....	67
2.10.5. Lactato.....	68
2.10.6. Malondialdehido.....	69
2.10.7. Glucógeno.....	69
2.11. Determinación de proteínas.....	70

	Página
2.12. Análisis de poblaciones de hepatocitos por citometría de flujo.....	70
2.12.1. Determinación del contenido y distribución del DNA genómico.....	70
3. RESULTADOS.....	72
3.1. Seguimiento de los pesos corporal y hepático de ratones después de la administración de la cocaína.....	72
3.2. Parámetros séricos determinantes de necrosis hepática..	77
3.2.1. Niveles de aspartato y alanina aminotransferasas.....	77
3.2.2. Niveles de isocitrato deshidrogenasa.....	83
3.3. Parámetros determinantes de lesión hepática.....	86
3.3.1. Alteraciones en la actividad sérica de la gamma-glutamil transferasa.....	87
3.3.2. Actividad glutatión-S-transferasa en fracción soluble de homogenados hepáticos.....	90
3.3.3. Concentración de ATP en homogenados hepáticos.....	93
3.3.4. Glutatión reducido y oxidado y GSH/GSSG.....	96
3.3.5. Concentración de malondialdehído.....	101
3.4. Actividades enzimáticas que generan NADPH en fracción soluble de homogenados hepáticos.....	104
3.4.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	104
3.4.2. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.....	107
3.4.3. Isocitrato deshidrogenasa NADP ⁺	110
3.4.4. Enzima málico.....	113
3.5. Actividades enzimáticas generadoras de glucosa-6-fosfato.....	116
3.5.1. Glucoquinasa y hexoquinasas.....	116
3.6. Actividades enzimáticas del ciclo redox GSH/GSSG y relacionadas.....	123
3.6.1. Glutatión reductasa.....	123
3.6.2. Glutatión peroxidasa (dependiente de selenio).....	126
3.6.3. Catalasa.....	129
3.6.4. Superóxido dismutasa.....	132
3.7. Sistema microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450.....	138

3.7.1. Niveles de citocromo P-450.....	138
3.7.2. Niveles de citocromo b ₅	141
3.7.3. Actividad NADP-citocromo P-450 reductasa.....	144
3.8. Otros parámetros relacionados con la disfunción hepática.....	147
3.8.1. Glucógeno.....	147
3.8.2. Estados de óxido-reducción citosólicos dependientes del NADP ⁺ y del NAD ⁺	150
3.9. Proteínas de fracciones subcelulares de homogenados hepáticos.....	158
3.10. Citometría de flujo.....	163
3.10.1. Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo en hepatocitos aislados de ratón.....	163
3.11. Morfología en preparaciones histológicas de hígado de ratón.....	174
3.11.1. Cálculo del índice mitótico.....	188
4. DISCUSION.....	190
4.1. Parámetros bioquímicos y morfológicos de lesión hepática.....	191
4.2. Sistemas citosólicos generadores de NADPH.....	192
4.3. Sistemas relacionados con el metabolismo del glutation y el metabolismo peroxidativo.....	194
4.4. Sistemas microsómicos dependientes del citocromo P-450.	198
4.5. Otros parámetros relacionados con el metabolismo glucolítico y energético.....	200
4.6. Regeneración hepática post-necrótica inducida por cocaína.....	202
4.7. Caracterización de la ploidia y distribución del DNA genómico en las distintas fases del ciclo de división celular.....	204
5. CONCLUSIONES.....	209
6. BIBLIOGRAFIA.....	211

1.- INTRODUCCION

La destrucción selectiva de células hepáticas en la región periportal o perivenosa del acino hepático, producida por una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones pretratados o no con fenobarbital (Kloss et al 1982a) y el proceso regenerativo que tiene lugar inmediatamente después, han permitido estudiar en este modelo experimental las fases de necrosis y regeneración hepatocelular originadas por esta droga hepatotóxica. La secuencia de reacciones celulares que conducen a la necrosis hepática, inducida por xenobióticos, se debe principalmente a las especies químicas reactivas generadas en el proceso de biotransformación de estos agentes. La necrosis hepatocelular inducida por la cocaína, se asocia con una serie de alteraciones hepáticas debidas a la formación de metabolitos reactivos, derivados de la cocaína como son la N-hidroxinorcocaína (Benuck et al 1989) y la cocaína nitróxido· (Rauckman et al 1981). La formación masiva de estas especies químicas reactivas trae consigo una serie de alteraciones, entre ellas cabe citar las siguientes: el estrés oxidativo, la oxidación y depleción del glutatión (Vos y Bladeren 1990), la oxidación de los tioles protéicos (Nicotera et al 1985), la peroxidación lipídica, la elevación del calcio y la muerte celular (Orrenius y Bellomo 1986; Orrenius y Nicotera 1987).

Existen evidencias contrastadas que demuestran, que el metabolismo oxidativo hepático de la cocaína, juega un papel definitivo en su hepatotoxicidad. Tales evidencias proceden de comparaciones de la potencia hepatotóxica entre la cocaína y sus diversos metabolitos (Misra et al 1976), de correlaciones entre la actividad metabólica y la susceptibilidad a la hepatotoxicidad de la cocaína entre las diferentes especies y razas de animales de laboratorio (Silva et al 1991) y de los efectos de inductores e inhibidores de su metabolismo de la cocaína, sobre la intensidad de la lesión hepática inducida por la cocaína (Peterson et al 1983).

El metabolismo oxidativo de la cocaína se verifica mediante el sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 y se inicia con la N-desmetilación de la cocaína, según el siguiente esquema:

Cocaína ---> Norcocaína ---> N-hidroxinorcocaína <---> Norcocaína nitróxido•

Permanece aún sin resolver la identidad de los mecanismos mediante los cuales, estos metabolitos N-oxidados, inducen la muerte celular. Se ha propuesto (Silva et al 1991; Powell et al 1991), que la hepatotoxicidad de la cocaína se debe a la peroxidación lipídica originada por la formación del anión superóxido, en el ciclo fútil entre la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido•, que consume NADPH en ambos sentidos. Otro mecanismo posible que puede justificar la lesión hepática y muerte celular inducida por cocaína es el producido por la unión covalente de uno de sus metabolitos reactivos a macromoléculas celulares, con la interferencia de alguna función celular vital (Bartolome et al 1988).

Existen evidencias histopatológicas que demuestran, que la región intraacinar de la necrosis inducida por cocaína, puede ser alterada por pretratamiento con un inductor del sistema monooxigenasa microsómico, como el fenobarbital, o por continuadas dosis de la misma droga (Powell et al 1991). Este hecho que muestra la peculiaridad de la hepatotoxicidad de la cocaína, nos ha permitido lograr dos tipos de lesión hepática, periportal o perivenosa, según que la cocaína se administre a ratones pretratados o no con fenobarbital, respectivamente.

El proceso de **regeneración hepática** subsiguiente a la lesión y muerte hepatocelular originada por la cocaína supone la restauración de la funcionalidad hepática. La caracterización de parámetros relacionados con la proliferación celular post-necrótica presenta un gran interés desde el punto de vista fisiopatológico y clínico. La hepatectomía parcial, como modelo de proliferación celular sincrónoma, ha sido ampliamente estudiado por numerosos grupos de investigadores. Sin embargo, el proceso regenerativo post-necrótico, inducido por hepatotóxicos, apenas ha merecido atención y son muy pocas las publicaciones que se refieren a este tema (Mehendale 1991).

Hasta el momento ningún estudio experimental acerca de la hepatotoxicidad de la cocaína, se ha ocupado del proceso regenerativo subsiguiente a la lesión hepática, por tanto, el objetivo de nuestro trabajo es el estudio en profundidad de la restauración de la funcionalidad

hepática, después de una dosis subletal de cocaína a ratones. Trabajos anteriores en el Instituto de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, han estudiado estos fenómenos en un modelo de regeneración post-necrótica inducido por la administración del hepatotóxico tioacetamida a ratas (Cascales et al 1992; Díez Fernández 1992a; Díez Fernández et al 1993a). En este modelo ha sido fácil conseguir, tanto una clara necrosis masiva selectiva de la región venosa, como un proceso regenerativo contundente, evidenciado por evaluación de la ploidia y la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular. El incremento de la síntesis del DNA en 20 veces en el período que fluctúa entre las 36 y las 48 horas de la administración del hepatotóxico, y la aparición de numerosas células en mitosis en cortes de hígado, son prueba evidente de la proliferación celular regenerativa en hígado post-necrótico.

El modelo experimental básico, tema de investigación que se presenta en esta Memoria Doctoral, es conseguir una lesión hepática en ratones, mediante la administración de una dosis subletal de cocaína por vía intraperitoneal. La rata es el animal de experimentación más utilizado en estudios bioquímicos, pero es muy poco sensible al efecto hepatotóxico de la cocaína, debido a que posee unas esterasas en plasma e hígado, que hidrolizan la cocaína dando lugar a derivados de la benzoilecgonina no tóxicos (Englert et al 1976; Freeman y Harbison 1981a). El ratón (Powers et al 1992) así como el humano (Perino et al 1987), poseen también estas esterasas, pero en menor concentración, de forma que una parte de la cocaína que llega al hígado, puede metabolizarse vía oxidativa y originar los metabolitos reactivos hepatotóxicos antes citados.

En todo modelo de muerte celular hay que distinguir dos formas: apoptosis y necrosis (Boobis et al 1989). Ambas se manifiestan en hígado en casos de intoxicación con sustancias hepatotóxicas y ambas se evidencian por incremento de las aminotransferasas séricas y por parámetros de lesión hepática. Actualmente la apoptosis puede ser diferenciada con gran exactitud por medio de citometría de flujo, en hepatocitos aislados en suspensión, tratados con yoduro de propidio (Vindelov et al 1983).

En el modelo que presentamos se da la oportunidad, de estudiar la respuesta regenerativa

derivada de un proceso de muerte celular, por apoptosis o necrosis, ubicada en la región periportal o perivenosa. La unidad microcirculatoria del hígado, el acino hepático, consiste en hepatocitos heterogéneos desde el punto de vista funcional y bioquímico debido a la distinta exposición a oxígeno, nutrientes y otros factores. Estas diferencias son de un gran interés en estudios de hepatotoxicidad ya que la respuesta regenerativa post-necrótica, tiene que estar condicionada a la región del acino que sufre la muerte celular, por efecto del hepatotóxico. Los modelos tan estudiados de hepatectomía parcial pueden servirnos para comparar la evolución de la restauración de la funcionalidad hepática después de la necrosis inducida por cocaína con la que se observa en animales hepatectomizados.

1.1.- Heterogeneidad funcional del hígado

Cuando los animales de laboratorio se exponen a xenobióticos, aparece una respuesta tóxica, que es mayor en el hígado que en otros órganos. Esto se debe fundamentalmente, a la alta capacidad metabólica de este órgano, y al aporte de sangre por la vena porta. En el hígado es donde se metabolizan la mayor parte de los xenobióticos, dando lugar a metabolitos, en ocasiones más tóxicos que la sustancia de partida. Debido a su misión como vía primaria de detoxificación, el hígado actúa protegiendo a otros órganos, aunque ello le acarree su propio daño (Cascales 1987).

En rata y ratón, adultos, el hígado constituye el 4-5 % del peso del cuerpo. Tiene cuatro lóbulos: izquierdo, medio, derecho y caudado. Los tres últimos, compuestos a su vez por dos sublóbulos. En el ratón, la vesícula biliar, se localiza en una hendidura entre los dos sublóbulos del lóbulo medio. Recoge la bilis a través del conducto cístico desde el conducto hepático, el cual continúa al duodeno como un conducto biliar común.

El hígado está formado por cinco clases de células, que se clasifican en parenquimatosas (hepatocitos) y no parenquimatosas (Kupffer, endoteliales, del conducto biliar y del tejido conjuntivo). La célula del parénquima hepático es el hepatocito, que constituye aproximadamente, el 60 % del total de células del hígado y el 80 % del volumen hepático. Los hepatocitos, muestran una uniformidad histológica, pero revelan diferencias

histoquímicas. De esta heterogeneidad descriptiva (Novikoff 1959; Rapaport 1960) y funcional (Jungermann y Sasse 1978) de las células parenquimatosas del hígado, existen diferentes revisiones (Jungermann y Katz 1982).

Las células no parenquimales están constituidas por las células sinusoidales, perisinusoidales y biliares. Las células de Kupffer, son células fagocíticas mononucleares, que derivan de la médula osea, son de forma estrellada y se sitúan en la superficie de las células endoteliales, proyectándose al interior del espacio vascular.

Los hepatocitos son células poliédricas, con núcleo central redondeado y abundante citoplasma. La membrana celular tiene tres localizaciones: perisinusoidal, intercelular y pericanalicular. El canaliculo está localizado en el polo opuesto del sinusoides. La bilis, secretada en el canaliculo, fluye alrededor de los conductos biliares porta. Los hepatocitos están orientados en cordones, compuestos por una simple fila de células, separadas del sinusoides vascular por células endoteliales. La sangre fluye a través del sinusoides, desde la región portal a la región venosa.

El hígado recibe un doble aporte de sangre, la arterial, a través de la arteria hepática y la venosa, a través de la vena porta que procede del drenaje venoso esplénico. La circulación y la excreción biliar están compartimentalizadas para facilitar el intercambio entre sangre y hepatocitos.

La sangre llega al hígado por la arteria hepática y por la vena porta. La arteria hepática aporta oxígeno, mientras que por la vena porta, se transfieren las sustancias nutritivas, absorbidas por el tracto gastrointestinal, para su metabolización y eliminación.

La arteria hepática asciende directamente desde el eje celíaco y se divide en dos ramales gástrico y gastroduodenal siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal ya como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta representa el único canal venoso que atraviesa otro órgano, el hígado, antes de retornar

al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa portal se encuentran en el sinusoides y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior.

La arquitectura hepática se encuentra organizada en modelos lobulillares o acinares y la sangre aferente arterial y venosa viajan separadamente dentro del tejido conjuntivo interlobular o interacinar antes de mezclarse completamente en la región perivenosa. Las arteriolas terminales se vacían tanto en el interior de los capilares venosos, como en el interior de los sinusoides hepáticos. Observaciones directas de las oscilaciones en el flujo de la circulación sinusoidal sugieren que el intercambio (entrada y salida) del flujo sanguíneo sinusoidal se regula mediante esfínteres.

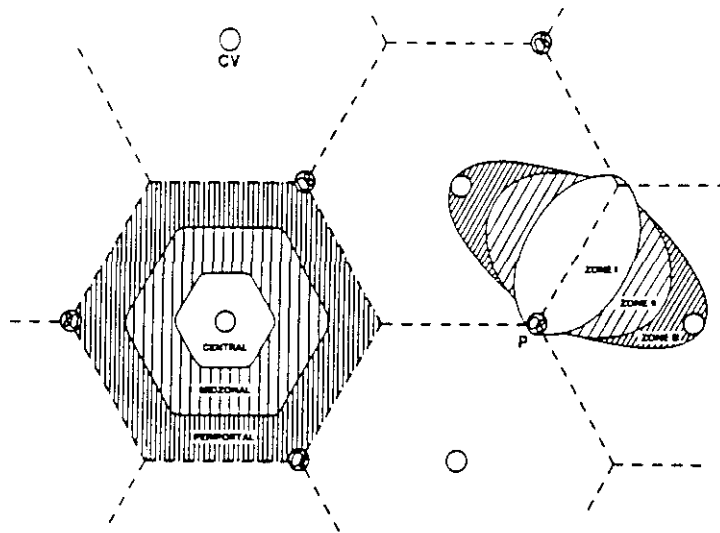
El sinusoides hepático es un capilar recubierto por un endotelio que posee poros o fenestras a través de los cuales circula el plasma sanguíneo. Las células de Kupffer o fagocitos especializados se distribuyen entre las células endoteliales. En algunas especies, las paredes de las venas hepáticas poseen esfínteres musculares potentes, pero en humanos las paredes de estos canales vasculares son muy finas (Witte y Witte 1974). Una porción del flujo hepático arterial pasa a través de una fina red capilar que encierra conductos biliares antes de mezclarse con la sangre venosa portal.

Anatómicamente, los hepatocitos están distribuidos en tres áreas, definidas por su proximidad a los terminales circulatorios: periportal, mediozonal y perivenosa. Funcionalmente, se considera que los hepatocitos residen en acinos, compuestos por tres zonas metabólicas:

Zona 1: Mayor aporte de sustratos y oxígeno. Se considera cercana al área periportal.

Zonas 2 y 3: Menor proximidad al aporte vascular.

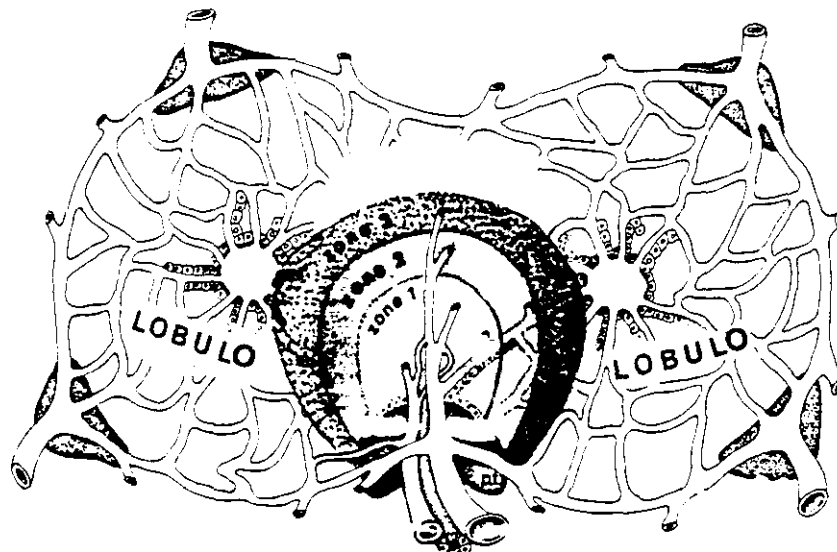
Las diferencias en la distribución anatómica y en la función metabólica se traducen así mismo en ligeras variaciones morfológicas en los hepatocitos. Así, los hepatocitos perivenosos, tienden a ser de mayor tamaño que los periportales, y poseen el retículo endoplásmico liso más desarrollado y menos lípidos citoplásmicos (Popp y Cattley 1991).



Arquitectura hepática. Organización del parénquima según los conceptos de lóbulo y acino.
 (CV) vena central, (P) espacio porta (Popp y Cattley 1991).

La mayoría de las funciones de los hepatocitos solo varían en magnitud de las realizadas por otras células, pero también tienen funciones específicas, como es el caso del ciclo de la urea y la formación de bilis.

Se encuentra aún en debate el concepto de unidad estructural de hígado que englobe la totalidad de las células hepáticas para formar una unidad funcional. El clásico lóbulo en su modificación de "zona falciforme" (Matsumoto et al 1979) se caracteriza por una zona de influjo de sangre directamente del tracto portal que forma zonas falciformes de equipotencial hemodinámico. El acino (Rappaport 1976), por el contrario, se define como un influjo lineal de sangre que forma estructuras de tipo granuloso de equipotencial hemodinámico alrededor del eje vascular aferente. De acuerdo con el flujo sanguíneo pueden delimitarse dos regiones, tanto en el acino como en la zona falciforme de los lóbulos: la región periportal (aferente) regada con sangre rica en oxígeno, sustratos y hormonas, y la región perivenosa (eferente) que recibe sangre pobre en oxígeno, sustratos y hormonas, pero rica en CO_2 y otros productos. Como la calidad de la sangre cambia durante su paso por el hígado, puede asumirse que la localización de las células en las diferentes zonas del parénquima hepático cualquiera que sea la organización funcional que posean, han de tener estructuras, capacidad enzimática y funcionalidad diferentes.



Relación entre lóbulo y acino en la estructura hepática (Scheuer 1980).

Los métodos para estudiar la heterogeneidad del hígado son de diversa naturaleza. Análisis morfométrico mediante citología e histología cuantitativa. También la histoquímica ha representado un medio importante ya que ha permitido distinguir actividades enzimáticas en las diferentes clases de células y en el interior de los compartimentos celulares. Mediante técnicas inmunohistoquímicas pueden incluso establecerse diferencias entre isoenzimas. La separación de los hepatocitos en periportales y perivenosos (Kera et al 1987), es uno de los medios más importantes para el estudio de la heterogeneidad celular del hígado. Por último, la fluorescencia de superficie, es una técnica que usa guías microluminosas para analizar procesos metabólicos en regiones periportales y perivenosas del hígado (Ji et al 1981).

1.1.1.- Distribución heterogénea de enzimas y estructuras subcelulares en el parénquima hepático.

Metabolismo energético oxidativo

El catabolismo de los sustratos energéticos, tales como la glucosa, alanina o palmitato, pueden subdividirse en dos fases: la degradación inicial a acetil CoA y su oxidación final a CO₂. Todos los hepatocitos catalizan la oxidación final, pero las células periportales al recibir más oxígeno parecen ser más capaces del metabolismo oxidativo ya que contienen un mayor volumen mitocondrial, actividades más elevadas de los enzimas del ciclo tricarbóxico y de la cadena respiratoria (Wimmer y Pette 1979).

La rotura de aminoácidos, ácidos grasos y glucosa parece que se distribuyen recíprocamente. Esta localización inversa está de acuerdo con la desigual distribución del metabolismo oxidativo final. El catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos a acetil CoA es posible sólo en presencia de oxígeno, por tanto, los hepatocitos periportales se encuentran equipados preferentemente con alanina aminotransferasa, tirosina aminotransferasa y beta-hidroxibutiril CoA deshidrogenasa (Welsh 1972). El catabolismo inicial de la glucosa (en su parte glucolítica) es posible en ausencia de oxígeno. Por tanto, las células perivenosas son las que poseen predominantemente la glucoquinasa (Fischer et al 1982) y la piruvato quinasa (Guder y Schmidt 1976).

El hígado elimina el exceso de glucosa de la sangre sintetizando glucógeno o transformándolo en triacilglicéridos, vía glucolisis y liponeogénesis. De manera inversa, el hígado mantiene el suministro de glucosa a los tejidos, sistema nervioso central y eritrocitos, mediante la liberación de glucosa de sus reservorios de glucógeno o sintetizándola *de novo* a partir de lactato, aminoácidos y glicerol, vía gluconeogénesis.

El metabolismo del glucógeno parece estar distribuido heterogeneamente dentro del parénquima hepático. Todos los hepatocitos pueden sintetizar y degradar glucógeno, pero el tiempo y la velocidad de estos procesos son diferentes en células periportales o perivenosas. Son muchos los factores, que delimitan estas diferencias: composición de la dieta, ritmo diario de ingestión, etc. Generalizando con algunas reservas, en ratas alimentadas con una dieta normal rica en carbohidratos, la degradación de glucógeno durante el período de luz (ayuno) es más intensa en la zona periportal, mientras que la síntesis de glucógeno durante el período de oscuridad (alimentación) ocurre más rápidamente en la zona periportal, el glucógeno se encuentra distribuido casi por igual en el parénquima (Sasse et al 1975).

La glucolisis como también la liponeogénesis parece que son predominantes en la zona perivenosa. Esto se debe a la localización mayoritaria en la zona perivenosa de los enzimas clave de la glucolisis: glucoquinasa, piruvatoquinasa y enzimas generadores de NADPH (Rieder 1981), todos ellos implicados en la síntesis de ácidos grasos (Gibson et al 1972).

La heterogeneidad hepática es compleja respecto a la localización de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Rieder 1981). Con técnicas de microdissección se ha comprobado que la elevada actividad de este enzima en el área periportal se debe a la elevada actividad que poseen las células no parenquimatosas localizadas en la zona que rodea al terminal venoso.

La gluconeogénesis aparece predominante en las células de la región periportal, debido a la localización de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa. Los enzimas lactato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa, que mediante la conexión entre lactato y alanina con la vía gluconeogénica, muestran actividades más elevadas en la región periportal (Katz et al 1977; Teutsch 1978). La predominancia de la gluconeogénesis es un proceso endergónico que ha de acoplarse al catabolismo oxidativo, de ello su localización en la región periportal que posee mayor cantidad de oxígeno. La glucólisis anaeróbica y la liponeogénesis, por el contrario, que son procesos exergónicos que no necesitan oxígeno, se sitúan en los hepatocitos del área perivenosa.

Un proceso que depende del NADPH, como la ureogénesis a partir de aminoácidos, mecanismo general de detoxificación se localiza en la zona perivenosa (Sies et al 1977).

Biotransformación

El hígado es el principal órgano cuando se trata de la biotransformación de los xenobióticos. Las sustancias extrañas son *destoxificadas* por oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación. La oxidación está, en su mayoría catalizada por hidrolasas (monooxigenasas) dependientes del NADPH ubicadas en el retículo endoplásmico liso. Este retículo es predominante en la región perivenosa y se induce en esta zona por los barbituratos (Wanson et al 1975). Los enzimas generadores de NADPH, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y el enzima málico, predominan en el espacio perivenoso. También los enzimas consumidores de NADPH como la citocromo P-450 NADPH reductasa y la glutatión reductasa predominan en las inmediaciones del terminal venoso. El enzima clave de la oxidación del etanol, la alcohol deshidrogenasa (Morrison y Brock 1967) se sitúa en el espacio perivenoso. Puede por tanto,

concluirse que la biotransformación de los xenobióticos es una función preferencial del espacio venoso. Los hepatocitos perivenosos muestran una susceptibilidad incrementada frente a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos formados a través del sistema dependiente del citocromo P-450.

1.2.- Mecanismos de muerte celular. Necrosis y apoptosis.

Las células hepáticas responden ante la agresión de un tóxico, pudiendo llegar a producirse una necrosis, o muerte celular. Los patrones de necrosis se pueden reproducir en animales, siendo similares, a los descritos en casos de personas que han estado expuestas a diferentes productos químicos y drogas.

La necrosis perivenosa, es con mucho la más frecuente, en animales expuestos de forma aguda a agentes hepatotóxicos. Esta necrosis tiene lugar en el área central del lobulillo hepático, con los hepatocitos necrosados rodeando totalmente la terminación de la vena central. Este tipo de necrosis se denomina, por su distribución morfológica como centrolobulillar, central o zona 3 del acino, haciendo referencia a la zona metabólica. También recibe el nombre de perivenosa en base a su distribución alrededor de las venas centrales. La lesión se encuentra generalmente repartida por todo el hígado, con al menos el área central, si no todo el lóbulo afectado. El porcentaje de células dañadas depende del agente y de la dosis. La necrosis, se presenta generalmente como una necrosis coagulativa y puede limitarse a una simple fila de hepatocitos alrededor de la vena central, o extenderse a través del lóbulo. Una célula bajo el efecto de una necrosis coagulativa muestra un incremento en la eosinofilia del citoplasma cuando se tiñe con hematoxilina y eosina, debido a la pérdida del citoplasma, normalmente basófilo, asociado normalmente con el RNA (ácido), y un incremento de la unión de eosina a las proteínas desnaturalizadas (básicas). Las células presentan, frecuentemente una apariencia homogénea opaca, por la pérdida de partículas de glucógeno, que da al citoplasma una apariencia granular. Las mitocondrias aparecen hinchadas. Eventualmente se vacuolizan las células y puede haber una calcificación. El núcleo de la célula muerta aparece encogido y basófilo, picnótico, con un acumulo de cromatina. Se puede romper en pequeños fragmentos diseminándose en el citoplasma

(carioresis) o disolverse y desaparecer progresivamente (cariolisis). El tejido necrosado va normalmente unido a un proceso inflamatorio.

La necrosis perivenosa se comienza a reparar a las 24 horas de su inicio y solo queda, una fibrosis mínima en la zona de necrosis, en caso de que se dañen las células sinusoidales. Los hepatocitos perivenosos, tienen mucha mayor concentración de citocromo P-450 y sus enzimas asociados, que los hepatocitos periportales.

La necrosis mediozonal, es la menos frecuente. Consiste en una banda de necrosis, equidistante entre la zona porta y la vena central, generalmente es una zona muy estrecha, que afecta solo a dos o tres células del centro del lobulillo.

La necrosis periportal, es menos frecuente que la perivenosa. Los hepatocitos necrosados rodean al terminal porta, y en este tipo de necrosis no suele aparecer hemorragias. Su localización se trata de explicar, teniendo en cuenta, que el área periportal es la primera que se entra en contacto con la toxina, que se encuentra en la sangre, lo que sugiere que los hepatocitos periportales, pueden recibir dosis mayores de sustancia tóxica, por la mayor actividad metabólica de esta zona, con una mayor tensión de oxígeno, que el área perivenosa (Popp y Cattley 1991).

La apoptosis, o muerte celular programada, es una forma especial de muerte individual que se ha descrito como *suicidio celular* (Bursch et al 1992). Al contrario que la necrosis, no hay liberación de contenido de las células muertas. No se presentan células propias de procesos inflamatorios, como neutrófilos y macrófagos. Los cuerpos apoptóticos se observan como hepatocitos individuales que se contraen y se caracterizan histológicamente por su estructura eosinofílica, con cromatina densa y a veces fragmentada. Algunos cuerpos apoptóticos son fagocitados por los hepatocitos adyacentes.

La apoptosis es la forma fisiológica de pérdida celular. En el hígado se presenta con una frecuencia muy baja y se restringe en principio al área perivenosa, representando la pérdida fisiológica de los hepatocitos senescentes, aparece incrementada en hígado hiperplásico que

regresa a su tamaño normal, tras sufrir un tratamiento con agentes químicos o sustancias, que dan lugar a la proliferación de peroxisomas (Popp y Cattley 1991).

Numerosos agentes químicos, así como otros estímulos tóxicos, pueden lesionar las células y originar en ellas una secuencia compleja de reacciones que culminen en la muerte celular. La lesión celular originada por xenobióticos conduce generalmente a la necrosis, muerte celular originada por el fallo de sistemas endógenos necesarios para mantener el equilibrio. A veces esta lesión puede conducir a que se inicie el proceso activo que lleve a la apoptosis.

El estudio de los *mecanismos bioquímicos* que se encuentran implicados en la muerte celular tiene una importancia fundamental, a nivel toxicológico, para conseguir medios efectivos para hacer frente a los numerosos agentes citotóxicos que ingresan en el organismo. Hasta la fecha, los intentos para la identificación de las reacciones celulares que tienen lugar en casos de intoxicación celular, se han encontrado entorpecidos por las limitaciones de los sistemas experimentales disponibles y por la gran variedad de alteraciones que tienen lugar en el interior de la célula cuando se lesionan los mecanismos reguladores de la homeostasis. Muchas de estas alteraciones van unidas a una pérdida de la viabilidad sin que sean ellas mismas la causa de la muerte celular. Actualmente, mediante el uso de células aisladas se ha progresado mucho en la identificación de aquellas reacciones bioquímicas directamente relacionadas con la muerte celular.

Inmediatamente después de la agresión tóxica, las células sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos. Una de las primeras respuestas de los hepatocitos frente al ataque de una gran variedad de hepatotoxinas, es la aparición de prominencias en la superficie de la membrana plasmática (Mesland et al 1981). Este fenómeno surge antes de que se observe cambio alguno en la permeabilidad celular y es irreversible.

Se cree que la muerte celular sobreviene, en sus últimas consecuencias, por la rotura de estas prominencias con la consiguiente pérdida del contenido celular (Lemasters et al 1987).

A pesar de los esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigadores, no están aún

definidos los mecanismos mediante los cuales los tóxicos originan la muerte celular. Se sabe que muchos compuestos muestran su toxicidad a través de metabolitos reactivos, bien directamente, o como resultado de la generación de especies activas de oxígeno. Cada vez son más evidentes las pruebas que llevan a considerar que la perturbación de la homeostasis del calcio se asocia a la toxicidad de muchos compuestos.

El estado actual de los conocimientos permite proponer el siguiente esquema: a) formación de especies químicas reactivas, b) depleción del glutatión y modificación de los tioles proteicos y c) aumento del calcio citosólico.

a) Formación de especies químicas reactivas:

La hepatotoxicidad de los agentes químicos se debe, en general, a la formación de especies químicas reactivas, capaces de reaccionar con los constituyentes celulares hepáticos (Pessayre 1987). Estas especies reactivas, pueden ser metabolitos electrofílicos y/o radicales libres. Estos últimos pueden actuar directamente o a través de la formación de un radical superóxido u otras especies reactivas de oxígeno.

La oxidación está catalizada por una monooxigenasa, que contiene citocromo P-450, unida a la membrana (retículo endoplásmico). El citocromo P-450 unido al sistema monooxigenasa, constituye una familia de isoenzimas involucrados en la oxidación y reducción de compuestos solubles en lípidos y es responsable de la biotransformación de la mayoría de los xenobióticos.

Es realmente una superfamilia, compuesta por cuatro familias génicas y subfamilias de enzimas que se definen en base a los aminoácidos que las forman. Las diferentes familias se denominan con las letras "CYP", seguido por un número (I-IV), que designa la familia y una letra mayúscula, para la subfamilia, y otro número (arábigo) para indicar la forma individual (González 1992). Poseen estructura de hemoproteínas, que contienen hierro, con protoporfirina IX como grupo prostético. Las diversas formas del citocromo P-450 difieren con respecto a la estructura primaria de la apoproteína, y como consecuencia presentan

distinta especificidad por los sustratos. Un sustrato puede ser catalizado por varios isoenzimas.

Se conocen un total de 20 isoenzimas (Jeffery 1991). Recientemente, se ha avanzado mucho en el estudio del citocromo P-450 humano, mediante purificación de proteínas (Cholerton et al 1992). Es importante la capacidad genética de los diferentes isoenzimas del citocromo P-450 en el metabolismo de xenobióticos, ya que la definición genética de alguno de estos isoenzimas puede ser de pronóstico fatal frente a cualquier tipo de intoxicación, fácilmente superable por individuos normales (Guengerich 1989).

Junto con el citocromo P-450, la actividad del sistema monooxigenasa depende de otro enzima, el NADPH-citocromo P-450 reductasa. Se trata de una flavoproteína que transfiere electrones al citocromo P-450 y usa NADPH como fuente del equivalente reductor (Porter y Coon 1991). Al incrementarse la actividad del citocromo P-450, se incrementa la del NADPH-citocromo P-450 reductasa.

Con el sistema monooxigenasa de función mixta se encuentra asociada otra hemoproteína denominada citocromo b₅, cuyo papel no está aún perfectamente esclarecido (Kyle y Farber 1991). Esta hemoproteína aparece en numerosos tejidos como riñón, pulmón, garganta y epitelio nasal, pero alcanza su concentración más alta en el hígado.

La mayoría de los xenobióticos que son transformados por el citocromo P-450 hepático a metabolitos reactivos, causan necrosis perivenosa, lo cual parece debido a que la mayor concentración de citocromo P-450, se encuentra a este nivel.

La región periportal, con alto contenido en oxígeno, contiene así mismo la mayor parte de los enzimas del metabolismo intermediario para la síntesis de las proteínas plasmáticas y para el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La necrosis de la región periportal se suele asociar con una acción directa de hepatotoxinas, que penetran en el hígado por la vena porta y no requieren bioactivación.

El ritmo mediante el cual el citocromo P-450 se une a los diferentes sustratos para que sean metabolizados, puede ser elevado mediante agentes inductores (Ayrton et al 1991), entre los que se encuentra el fenobarbital (Bars y Elcombe 1991). La respuesta adaptativa a estos agentes, da lugar a un incremento del retículo endoplásmico liso (SRE) y de la actividad monooxigenasa del citocromo P-450. Se inducen al menos dos isoenzimas del citocromo P-450, y se incrementan las actividades de la epoxido hidrolasa y de la glucuronil transferasa. La actividad de la superóxido dismutasa se eleva en condiciones de prolongado estrés oxidativo (Jeffery 1991). Todo esto conduce a una hipertrofia aparente en los hepatocitos perivenosos, que muestran el citoplasma eosinofílico.

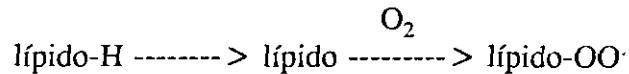
b) Depleción de glutatión y modificación de los tioles protéicos:

Por mecanismos diferentes, los metabolitos electrofílicos y los radicales libres producen una disminución del glutatión hepatocelular y una alteración de los grupos tioles de las proteínas.

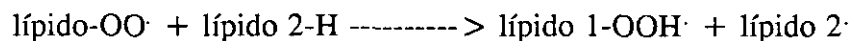
Los metabolitos reactivos electrofílicos reaccionan con el grupo tiol, nucleófilo, del glutatión (L-gamma-glutamilcisteinil-glicina) y también con los grupos $-SH_2$ de las proteínas con lo cual desaparece el GSH y se origina una arilación o alquilación de las proteínas celulares.

Mientras que la reacción entre el glutatión y los grupos electrofílicos puede ocurrir de manera no enzimática, la conjugación se facilita por un grupo de enzimas, conocido como glutatión-S-transferasa, presentes en citosol (Koss et al 1991). En reacciones catalizadas por la glutatión-S-transferasa, el átomo de azufre del GSH proporciona los electrones para el ataque del sustrato electrofílico. El conjugado así formado se hidroliza eliminando el residuo glutámico y glicólico y se excreta como mercapturato, el derivado acetilado del conjugado de cisteína (Kyle y Farber 1991). La gamma-glutamil transpeptidasa, cataliza el primer paso en la degradación del glutatión extracelular y un incremento en su actividad, conlleva una acción protectora frente a la depleción de glutatión (Rajpert-De Meyts et al 1992).

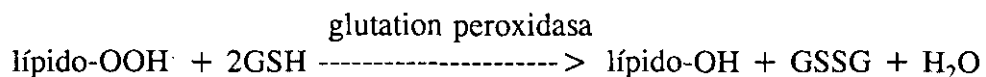
Por otro lado, los radicales libres actúan atrapando un átomo de H^+ de un lípido insaturado dando lugar a un radical lipídico, que fija oxígeno y forma un radical lipoperóxido.



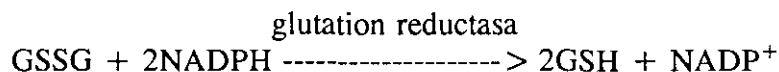
El lípido peróxido reacciona con un segundo lípido insaturado y origina un lipohidroperóxido y un segundo radical lipídico, responsable de la propagación del proceso de peroxidación:



La glutatión peroxidasa transforma el hidroperóxido lipídico en alcohol (lípido-OH) con la oxidación concomitante del GS en GSSG:



El GSSG formado se reduce mediante la acción de la glutatión reductasa y se regenera el GSH:



La actividad de la glutatión reductasa consume NADPH, coenzima suministrado por las deshidrogenasas, dependientes del NADP⁺, del ciclo de las pentosas fosfato, principalmente la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Cuando el hepatocito se encuentra sometido a un estrés oxidativo importante, se produce GSSG a una mayor velocidad, lo cual altera el equilibrio de par GSH/GSSG. Esto entraña un rechazo hacia el GSSG formado en exceso que tiene que salir del hepatocito. La extrusión del GSSG origina consecuentemente un descenso en la concentración de GSH hepático. El aumento del cociente GSSG/GSH va acompañado de una oxidación de los grupos -SH₂ de

las proteínas (Orrenius y Nicotera 1987).

La superóxido dismutasa y la catalasa tienen una acción protectora frente a la oxidación pues impiden la formación de radicales activos de oxígeno que desencadenan el proceso.

c) Aumento del calcio citosólico:

Las condiciones citadas anteriormente confluyen para desembocar en un aumento del calcio intracelular. La membrana plasmática alterada por peroxidación lipídica o fijación covalente, deja entrar calcio en grandes cantidades (Lauterburg 1987). La disminución de NAD(P)H, observada en ciertas situaciones de estrés oxidativo, aminora la capacidad mitocondrial para acumular calcio (Bellomo et al 1982). La oxidación de los tioles protéicos disminuye la actividad de las ATPasas dependientes del calcio del retículo endoplásmico y de la membrana (Nicotera et al 1990), lo cual permite que el calcio penetre libremente en el citosol, que no se acumule en la mitocondria ni en el retículo endoplásmico y que no encuentre rechazo suficiente que le obligue a salir del hepatocito. El resultado es un aumento importante y prolongado del calcio en el espacio citoplásmico del hepatocito (McConkey et al 1989).

1.3.- Regeneración hepática post-necrótica

Una de las características de los organismos vivos es su capacidad para superar las lesiones producidas por xenobióticos. Para ello han generado una serie de mecanismos de defensa con el fin de prevenir la lesión después del ataque nocivo y para superar la lesión una vez producida, mediante la renovación y cicatrización del tejido. El estudio de los procesos que participan en la prevención de la lesión celular o tisular, ha ocupado la atención de los investigadores durante mucho tiempo y ha sido sólo hace poco, cuando aquellos sistemas encargados de la regeneración celular y la restauración tisular han empezado a interesar de manera especial.

El hepatocito de los mamíferos es una célula que posee una amplia capacidad funcional y a pesar de su elevado grado de especialización, conserva la capacidad de proliferar en

determinadas circunstancias. El estímulo más común para la división, que afecta al parénquima hepático, es la pérdida de las propias células del hígado; esta pérdida puede deberse a tres causas: infección, intoxicación química o hepatectomía parcial. La respuesta celular es aparentemente la misma en cualquiera de estos tres casos. El modelo de regeneración hepática más utilizado para el estudio de la respuesta proliferativa sincrónoma se consigue en ratas por hepatectomía de porciones de hígado que pueden superar hasta un 70 % del total. La regeneración hepática puede lograrse también mediante la administración de agentes químicos hepatotóxicos que producen, según la dosis administrada, diversos grados de necrosis.

1.3.1.- Respuesta mitótica de los hepatocitos

Aunque son células altamente diferenciadas, los hepatocitos se dividen para poder reemplazar a las células que se han dañado por alguna causa. Normalmente el ritmo de división de los hepatocitos es muy bajo. En condiciones normales el hepatocito se encuentra en la fase G0/G1 del ciclo de división celular, lo cual no impide que el hígado sea uno de los tejidos del organismo transcripcionalmente más activo. La baja incorporación de precursores metabólicos en la molécula de DNA, se debe a que un porcentaje muy bajo (< 1 %) de los hepatocitos se encuentran en la fase S. En condiciones normales, el DNA mitocondrial muestra también, un mínimo recambio metabólico (Cascales y Martín-Sanz 1990), si bien se puede incrementar como consecuencia de un fenómeno tóxico, que viene seguido de un efecto restaurador que trata de reparar la pérdida celular inducida por necrosis química. Esta respuesta sería comparable, a la que sigue a un proceso de hepatectomía parcial.

El hígado, mediante hepatectomía parcial, se convierte en un modelo experimental de proliferación celular. La síntesis del DNA se inicia unas 18 horas después de la amputación quirúrgica y alcanza su máximo entre las 24 y las 48 horas. Ensayos con precursores metabólicos radioactivos han mostrado que los máximos de incorporación se alcanzan primero en los hepatocitos y después en las células epiteliales y en las de Kupffer. En condiciones normales, la división tiene lugar principalmente en la región periportal y se desplaza posteriormente hacia las áreas perivenosas. De esta manera, en un plazo de 2 a 3

semanas el segmento hepático remanente, recupera tanto el número de células como el peso originario del hígado. En el curso de esta hiperplasia compensatoria, el 90 % de los hepatocitos se divide entre las 24 y las 48 horas después de la hepatectomía (Bucher et al 1978).

Para comprender la regulación del crecimiento hepático después de la hepatectomía parcial, es fundamental conocer los cambios que tienen lugar en la función del hepatocito. Durante las transiciones proliferativas se verifica la desdiferenciación celular, proceso que implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo. Sin embargo, este estado desdiferenciado es distinto al correspondiente al desarrollo ontogénico o carcinogénico. Los hepatocitos en regeneración, antes de su división, se pueden reconocer por pérdida del citoplasma basófilo (dispersión de ribosomas desde el retículo endoplásmico rugoso) y depleción de glucógeno. Ocasionalmente, se observan mitosis, que pueden ser cuantificadas.

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, el hígado sufre necrosis hepatocelular infligida por el mecanismo de bioactivación de la toxina. Por mecanismos aún no completamente esclarecidos, el hígado responde estimulando la proliferación y con ello la regeneración hepatocelular. A dosis débiles del hepatotóxico, la necrosis afecta sólo a pocas células y la regeneración tiende a iniciarse aproximadamente a las 6 horas, desapareciendo a las 24 horas los síntomas de lesión. Es frecuente que reaparezca con posterioridad alguna muestra de lesión remanente y que entre las 36 y las 48 horas tenga lugar una segunda fase de división celular (Mehendale 1991).

El extraordinario fenómeno de la regeneración hepática va unido a otro fenómeno no menos notable. Las células recién divididas son *resistentes* a la acción citotóxica de agentes químicos. Por tanto, además de la reposición de las células y de la restauración de la morfología hepatolobular, merced a la propiedad de resistencia que poseen las nuevas células, el tejido hepático se encuentra capacitado para superar la inminencia de una agresión tóxica en las fases posteriores, evitando, por una parte, la expansión de la lesión y por otra, acelerando el proceso de la recuperación total (Díez-Fernández et al 1993b).

Otra forma de proliferación hepatocelular, es la debida a productos químicos capaces de producir hiperplasia, como es el caso del fenobarbital, y la proliferación de peroxisomas en ratas y ratones, que normalmente, acompaña a la inducción de la actividad enzimática del citocromo P-450, con un aumento en el tamaño del hígado, debido a hiperplasia e hipertrofia de los hepatocitos. Esto no se asocia con una necrosis detectable microscópicamente, o con alteraciones enzimáticas. La hiperplasia se puede reconocer por un incremento en la mitosis y por cambios en el citoplasma que indican que existe una inducción enzimática.

Tras el nacimiento, a las dos semanas de edad, la mayoría de los hepatocitos de las ratas son mononucleares diploides. Conforme van teniendo más edad, el estado de ploidia cambia, siendo entre el 50-70 % de los hepatocitos adultos, mononucleares tetraploides. Durante este cambio, hay un incremento en los hepatocitos binucleares diploides. El incremento en la ploidia se puede reconocer por microscopía óptica, como un aumento en el tamaño del núcleo. El cambio en la ploidia, puede estar estimulado por la exposición a agentes químicos, de manera semejante a lo que ocurre tras una hepatectomía parcial, dando lugar a la conversión de hepatocitos binucleares diploides en mononucleares tetraploides, por un proceso de citokinesis amitótica (Popp y Cattley 1991).

1.3.2.- Reguladores de la regeneración hepática

Muchos investigadores han utilizado la regeneración hepática como uno de los modelos más interesantes para investigar los mecanismos reguladores de la proliferación celular y los que gobiernan la entrada de las células en la fase de replicación del DNA. En los últimos años se ha demostrado la existencia de síntesis replicativa del DNA en hepatocitos aislados de ratas adultas, mantenidas en cultivo de monocapa durante varios días. Es un hecho conocido que una serie de biocatalizadores desempeñan una misión destacada o son esenciales para la replicación del DNA en tales cultivos. Entre estos agentes cabe citar las hormonas (Bucher 1982) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como otras sustancias como el piruvato, el calcio y aminoácidos, además de otros factores de crecimiento no definidos aún completamente (Jirtie y Michalopoulos 1982; Enat et al 1984). Existen pruebas evidentes que atribuyen un papel importante al EGF en la proliferación de los hepatocitos de rata *in vivo*

(Nakamura et al 1984) e *in vitro* (Enat et al 1984). Otras investigaciones confirman que el EGF se une a receptores específicos y estimula la síntesis del DNA en hepatocitos en cultivo de rata adulta (Michalopoulos et al 1984). Otro grupo de sustancias, las poliaminas, se han considerado desde hace tiempo implicadas en los procesos de proliferación celular, debido a que la ornitina descarboxilasa, enzima responsable de su síntesis, aparece enormemente incrementada en tejidos en proliferación.

1.3.3.- Regeneración y función hepática

El hígado, ya hemos visto, es un órgano notable, que responde a una agresión tóxica que causa necrosis hepatocelular, mediante la inducción de la proliferación de los hepatocitos remanentes; y después de un período de tiempo, no superior a las dos semanas, es capaz de recuperar su masa y celularidad inicial (Fausto 1990; Michalopoulos 1990). Experimentos con timidina tritiada han puesto de manifiesto un elevado porcentaje de núcleos marcados con tritio en hígado en regeneración en comparación con hígado control. También en hígado en regeneración, se ha observado una mayor proporción de núcleos hepáticos con un contenido tetraploide u octoploide de DNA ya que, los hepatocitos con núcleos poliploides son prueba de un estado de proliferación rápida típico de regeneración hepática. El desarrollo de la masa total hepática después de un proceso necrótico o de amputación quirúrgica es una prueba de la enorme capacidad regenerativa de las células hepáticas. Sin embargo, aún no se ha resuelto una cuestión importante concerniente a la identidad de las células progenitoras implicadas en el proceso regenerador. Se ha descrito que una clase de células hepáticas progenitoras existentes en los conductos biliares terminales o intermedios, puede proliferar en respuesta a un recambio normal hepatocelular o a cualquier forma de lesión hepática (Sell 1991). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que son los hepatocitos maduros los que son capaces de llevar a cabo la regeneración y que, tanto durante el desarrollo del hígado normal, como durante la regeneración hepática, los nuevos hepatocitos surgen de los hepatocitos preexistentes (Fausto 1990; Michalopoulos 1990). Por tanto, existe un *pool* de células maduras con potencial regenerativo que hace que las células progenitoras sean innecesarias en el proceso regenerativo. Durante mucho tiempo se ha creído que la deficiencia en la masa hepatocelular era el agente que desencadenaba la expansión de las

células remanentes, pero en caso de hígados de ratones transgénicos con una supresión somática (Sandgren et al 1991), se inicia la regeneración sin que existan cambios en el peso o en el número de células hepáticas, lo que indica que el agente desencadenante tiene que ser algún indicador de la función hepática y que solo cuando la masa hepática satisface la demanda de funcionalidad es cuando la proliferación celular cesa en respuesta a la señal que indica que la regeneración está completa. El fenotipo hepático demuestra el notable potencial proliferativo de las células hepáticas, ya que sólo unos pocos hepatocitos podrían efectivamente repoblar el órgano completo. El modelo de ratones transgénicos puede ser utilizado para el estudio de las señales implícitas en la regeneración hepática y en la naturaleza de la respuesta celular.

1.4.- Hepatotoxicidad inducida por cocaína

La cocaína (2-β-carbometoxy-3β-benzoxo-tropano), es un alcaloide, obtenido a partir de las hojas del *árbol de la coca* o *Erytroxylon coca* (*E. bolivianum*), que representa la subespecie tipo, de los Andes del Perú y Bolivia.

Los primeros conocimientos sobre el uso de la cocaína los sugiere el hecho, de encontrar hojas de coca, en tumbas de momias indias de 600 años antes de Cristo. Durante siglos, los aborígenes del Perú y Bolivia masticaron hojas de coca, y esta práctica, que todavía persiste, les producía una sensación de bienestar, y les endurecía frente al trabajo extenuante.

Aunque los conquistadores españoles advirtieron este hecho, hasta 1855 no se aisló el principio activo de las hojas, por parte de Gardeke, y años más tarde, en 1858, Albert Niemann aisló el alcaloide a partir de las hojas del arbusto *Erytroxylon coca*, lo caracterizó químicamente y lo llamó cocaína. En 1880 von Anrep, la recomendó como anestésico local. En 1884, Freud señaló el efecto fisiológico de la cocaína y Köller demostró su utilidad en oftalmología. En el mismo año, Hall la introdujo en odontología y, al año siguiente, Halsted en cirugía (Cregler y Mark 1986).

Su constitución química se elucidó gracias al esfuerzo conjunto de muchos científicos,

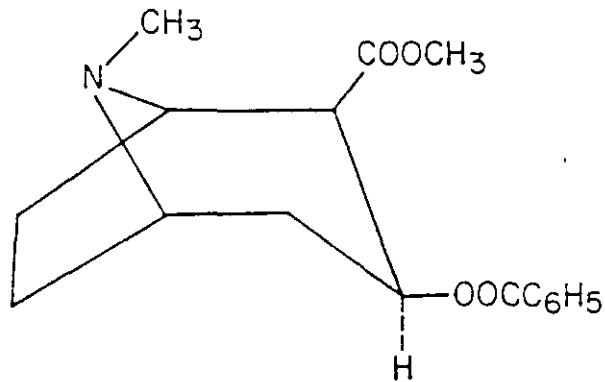
especialmente por parte de Willstätter. En 1890 fue incorporada a una variedad de patentes y tónicos, como la *coca cola* (que no la contiene desde 1910) y en 1914 fué incluida como sustancia narcótica.

La cocaína se extrae de las hojas del arbusto *Erythroxylon coca* Lamark y de otras especies del mismo género, o puede sintetizarse a partir de la ecgonina. Cuando los principios activos de las hojas se aíslan e inyectan o inhalan de forma concentrada, los efectos son muy diferentes a los tradicionalmente buscados por los indígenas. Las hojas contienen un 1% de cocaína, y la vía oral retarda la absorción y decrece la toxicidad.

Es utilizada como droga estimulante, capaz de producir sensación de bienestar, energía psíquica, y autoconfianza. Todo ello durante un espacio muy corto de tiempo, pero de forma muy intensa. Influye en gran medida el estado psicológico del individuo y el medio ambiente en que vive (Khantzian 1985). Su uso como droga social tuvo un resurgimiento en los años 70. Los cambios en la forma de administración, llevan consigo cambios en cuanto a las complicaciones clínicas que es capaz de producir (Barrio et al 1990; Rubin y Neugarten 1992). Se ha tratado de utilizar, sin éxito, en curas de desintoxicación de heroínómanos (Hunt et al 1984; Gawin, 1988).

La cocaína ($C_{17}H_{21}NO_4$), de peso molecular 303,36 D, es una sustancia levorotatoria, que se presenta en forma de cristales o como polvo cristalino, de color blanco, poco soluble en agua (1 g de cocaína se disuelve en 600 ml de agua). Es soluble en alcohol (1/6,5), cloroformo (1/0,7), éter (1/3,5) y benceno. Punto de fusión 98 °C. Sensible a la luz y a la humedad.

Es una amina terciaria, forma fácilmente sales cristalinas, tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, citrato, borato, benzoato y salicilato (Korolkovas y Burckhalter 1978).



La cocaína clorhidrato, es una sal soluble, de peso molecular 339,81 D, que se presenta en forma de cristales o como polvo blanco, ligeramente amargo y capaz de adormecer labios y lengua. Solubilidad en agua (1/0,4), alcohol (1/3,2) y cloroformo (1/12,5). Insoluble en éter. Punto de fusión 195 °C. Se descompone en caliente.

En los primeros estudios farmacológicos se pudo comprobar que la cocaína actuaba como un anestésico local, por bloqueo de la iniciación y conducción del impulso eléctrico, previniendo el rápido incremento en la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, durante la despolarización.

En estudios posteriores, se vio que a nivel sistémico, inhibía la recaptación presináptica del neurotransmisor norepinefrina, produciendo un exceso de esta sustancia a nivel de receptores postsinápticos. La activación del sistema nervioso simpático, por este mecanismo, produce vasoconstricción, elevación de la presión arterial, taquicardia y predisposición a arritmias ventriculares. Así mismo puede dar lugar a midriasis y a un estado de hiperglucemia e hipertermia.

Inhibe también la recaptación de dopamina y serotonina. La inhibición de la recaptación de dopamina, produce un efecto complejo sobre el sistema dopaminérgico (Galloway 1988). A corto plazo actúa como estimulante de la neurotransmisión, pero a largo plazo, se cree que la depleción de dopamina, puede contribuir a la sensación de disforia y puede ser responsable de un patrón compulsivo (Cregler y Mark 1986).

Experimentalmente se ha podido comprobar, que existe una notable similitud entre alguna de las propiedades farmacológicas de la cocaína y la anfetamina (Fischman y Schuster 1982). Así, en cuanto al efecto discriminativo (Garza y Johnson 1986), el comportamiento estereotipado, el incremento en la actividad locomotora y la dependencia de dosis en el comportamiento operante. Se puede producir además, con estas dos sustancias, una tolerancia y sensibilización cruzadas.

El efecto discriminativo en animales es utilizado para medir experimentalmente el efecto subjetivo en el hombre (Winsauer y Thompson 1991). Los animales son entrenados para discriminar entre una inyección de cocaína y del vehículo y, de igual manera entre anfetamina y el vehículo. De esta forma se ha comprobado (Balster 1988), que anfetamina y cocaína, tienen un patrón de autoadministración, muy similar. Esto indica el abuso compulsivo de la cocaína, la necesidad de tomar la droga. En estudios realizados con monos, se ha visto que pueden llegar a autoadministrarse hasta la muerte, lo que no ocurre con otros estimulantes (Gold y Verebey 1984).

Al estudiar el efecto discriminativo de la cocaína, con respecto a los simpaticomiméticos, se pudo comprobar que no se pueden sustituir entre sí, mientras que con anestésicos locales, como la procaína se consigue una sustitución parcial. Además la cocaína y la procaína son dosis dependiente.

El papel de la dopamina sobre el efecto discriminativo de la cocaína, no es del todo conocido. Los bloqueadores dopaminérgicos no siempre actúan como antagonistas sobre los efectos estimulantes de la cocaína (Balster 1988), si bien se ha comprobado que los receptores D1 y D2 de dopamina juegan un papel importante en los efectos sobre el comportamiento de los estimulantes psicomotores (Rapoza y Woolverton 1991).

La farmacología del comportamiento de la cocaína, difiere de la de agonistas dopaminérgicos, como apomorfina y amantidina, incluyendo el efecto de estímulo discriminativo y de refuerzo. Esto, parece indicar, una interacción de la cocaína con otros neurotransmisores, además de con dopamina.

A diferencia de la anfetamina, no se ha visto que la cocaína, produzca liberación de catecolaminas, sino que actúa inhibiendo la recaptación. Esto se podría relacionar con lo que ocurre con los antidepresivos tricíclicos.

Parece ser que existe una relación, entre la propiedad de algunos anestésicos locales de producir un efecto de refuerzo y la inhibición de la recaptación de dopamina (Dunwiddie 1988). Otros anestésicos locales, pero no todos, tienen este mismo efecto de refuerzo. La relación entre el efecto anestésico local y euforizante de la cocaína no está del todo clara. Podría explicarse por una actividad excesiva sobre el sistema límbico, lo que daría lugar a la sensación de euforia.

La cocaína, en forma de clorhidrato, se absorbe rápidamente tras ser administrada por vía nasal. El 40 % de las personas que consumen cocaína lo hacen por esta vía. Otra forma de administración, que utilizan el 30 % de los cocainómanos, es el *crak*, que consiste en fumar cocaína, en forma de base libre, con lo cual es muy volátil. Por esta vía se absorbe rápidamente debido a la gran superficie pulmonar, el efecto se pone de manifiesto en 8 segundos (Laposata y Mayo 1993). Otro 20 % de adictos a cocaína, utilizan la vía intravenosa, obteniendo una respuesta a los 15-30 segundos y el 10 % restante una combinación, incluso se ha llegado a administrar por vía rectal, vaginal y ocular (Dougherty 1984). Se absorbe bien a través de mucosas nasal, oral, rectal y vaginal.

Realizando estudios en humanos, se ha comprobado que la administración de 100 mg de cocaína por vía intranasal, ó 10 mg por vía intravenosa, son suficientes para la aparición de efectos subjetivos y cardiovasculares (Foltz et al 1980). Los efectos de la cocaína tras una dosis de 25 a 150 mg (una línea de coca contiene 20-30 mg), son: euforia, rara vez disforia, incremento de la energía, de la agudeza mental y estado de alerta incremento sensorial, anorexia, pérdida del sueño, disminución de la sensación de fatiga, incremento de la autoconfianza y egocentrismo.

En general se admite una dependencia psíquica (Gawin y Kleber 1984), pero no física para la cocaína, si bien se presentan síntomas debido a una descarga simpática generalizada. El

cuadro de abstinencia se manifiesta como paranoia, depresión, fatiga, ansiedad, agitación, sudor, escalofríos, insomnio, náuseas y vómitos.

Tras la absorción, la cocaína se hidroliza rápidamente en plasma, va a hígado, atraviesa la barrera hematoencefálica. La cinética de la cocaína sigue un modelo monocompartimental abierto, con eliminación de primer orden. La vida media es de $41,4 \pm 8,2$ minutos, con un rango entre 19 y 64 minutos. Es dosis dependiente (Barnett et al 1981; Javaid et al 1983).

La droga como tal, se excreta por orina en cantidad inferior al 20 %, y en ocasiones solo el 1 %, dependiendo de la acidez de la orina. También se elimina por bilis.

Los principales metabolitos que se encuentran en orina son benzoilecgonina y ecgonina, que se detectan hasta 36 horas después de la administración. Tras la administración intranasal se puede detectar benzoilecgonina en orina en un período de 1 a 4 horas, teniendo un máximo a las 10-12 horas.

Por cromatografía de gases y espectrometría de masas, se han llegado a detectar en la orina de adictos a cocaína, hasta once metabolitos diferentes. Cuatro de estos metabolitos, ecgonina, norecgonina-metil-ester, norecgonidina-metil-ester y m-hidroxi-benzoilecgonina, se encuentran en un primer tiempo. Otros metabolitos presentes en orina son: benzoilecgonina, ecgonina-metil-ester, ecgonina, ecgonidina-metil-ester, norcocaína, p-hidroxi-cocaína y m-hidroxicocaína (Zhang y Foltz 1990).

Alteraciones fisiológicas

A nivel del Sistema Nervioso Central produce la estimulación adrenérgica que da lugar a un incremento de la presión sanguínea, pudiendo originar accidentes cerebro-vasculares.

A nivel cardiovascular la cocaína produce un incremento del ritmo cardíaco, de la presión arterial sistólica y de la demanda de oxígeno por parte del miocardio, pudiendo dar lugar a un infarto agudo de miocardio (Gradham 1988). El incremento de la estimulación del

miocardio, por bloqueo de la recaptación de NE, por las terminaciones nerviosas presinápticas, ocasiona arritmias cardíacas (Karch y Billingham 1988). En pacientes hipertensos, puede dar lugar a ruptura de la aorta ascendente, si fuman durante varias horas la base libre.

A nivel renal se ha descrito rhabdomyolisis traumática y no traumática, en pacientes cocainómanos, a veces complicada con fallo renal agudo, en general tras la administración intravenosa.

En el intestino produce un incremento de la resistencia vascular, por encontrarse a este nivel receptores α -adrenérgicos, que son estimulados por NE. La cocaína causa una intensa vasoconstricción y reduce el flujo de sangre, lo que puede dar lugar a isquemia (Garfía et al 1990).

El uso de cocaína durante el periodo de gestación, se ha visto que reduce el peso al nacer e incrementa el riesgo de malformaciones y muerte fetal (Wiggins y Ruiz 1990). La vasoconstricción placentar, hace que decrezca el flujo de sangre al feto, y el incremento de NE conduce a la contracción uterina. Se han realizado estudios, que indican que la cocaína es biotransformada por la placenta humana (Roe et al 1990). Se produce hiponatremia, en neonatos de madres adictas a cocaína (Dollberg et al 1989).

Tras el uso en forma aguda de cocaína, se puede producir hipoprolactinemia, mientras que en períodos intermitentes de abstinencia a cocaína se ha observado hiperprolactinemia (Cocores et al 1986; Mendelson et al 1988). Estudios realizados con monos rhesus, revelan que la administración aguda de cocaína da lugar a caída de los niveles de prolactina plasmática, seguida de recuperación e hiperprolactinemia (Mello et al 1990). La secreción de prolactina se regula por vía dopaminérgica en el SNC y la hiperprolactinemia que sigue al abuso de cocaína es debida a una inadecuada supresión dopaminérgica de la secreción de dopamina. Esto ocurre por un efecto adverso de la cocaína sobre las neuronas dopaminérgicas, en el hipotálamo basal (Teoh et al 1990). Se observa una elevación del nivel

de creatina fosfokinasa sérica (CPK) y los factores de la coagulación se presentan alterados (Singhal et al 1990).

La intoxicación por cocaína da lugar a: Euforia, disminución del apetito, desórdenes del sueño, ideas paranoides, alteraciones sexuales, hipertensión, hipertermia, parálisis respiratoria, arritmias cardíacas y muerte. La administración intranasal produce necrosis y perforación del tabique nasal. Cuando se fuma la cocaína produce edema pulmonar.

1.4.1.- Manifestaciones de la hepatotoxicidad de la cocaína en animales de laboratorio.

La cocaína es un potente hepatotóxico en ratón, al ser administrada por vía intraperitoneal (Shuster et al 1977). Tras diferentes estudios experimentales, se ha puesto en evidencia que la cocaína puede dar lugar a productos hepatotóxicos, al ser metabolizada por vía oxidativa, mediante el sistema FAD-monooxigenasas de función mixta dependiente del citocromo P-450 (Thompson et al 1979; Kloss et al 1982b). La inducción del citocromo P-450 incrementa la toxicidad. Los metabolitos formados son norcocaína, N-hidroxynorcocaína y norcocaína nitróxido (Evans y Harbison 1978).

Realizando diferentes estudios experimentales, se ha podido comprobar (Smolen y Smolen 1990), que el ratón es la especie más sensible a la acción hepatotóxica de la cocaína. Existe una dependencia de factores hormonales, siendo más tóxica para los machos (Thompson et al 1984). La actividad enzimática está inducida por los andrógenos. Esto se relaciona con la dependencia a andrógenos de algunos isoenzimas del citocromo P-450. Además se ha comprobado (Leibman et al 1990), que la actividad colinesterásica es más alta en las hembras. También influye la cepa de la que proceden los animales, por la distinta actividad de la N-demetilasa, existiendo cierto *confusionismo* entre diferentes autores en cuanto a la importancia que tiene utilizar una determinada cepa. Otro de los puntos, no suficientemente aclarado, es la necesidad de utilizar animales previamente inducidos, ya que algunos autores, como Evans y Harbison (1978) y Smith et al (1981), señalan que la cocaína solo es hepatotóxica, en animales que han sido inducidos previamente. La localización de la necrosis alrededor del espacio porta, o del espacio venoso, depende en gran medida del diferente

gradiente de oxígeno en ambas zonas (Jungermann y Katz 1982). Hoy parece claro que la localización intraacinar del daño hepático está relacionada con el pretratamiento de los animales con agentes inductores del sistema oxidativo microsómico (Roth et al 1992). Todos estos razonamientos se apoyan en el conocimiento de que la hepatotoxicidad de la cocaína no es debida a la droga como tal, sino a sus metabolitos.

De esta forma los diferentes grados de hepatotoxicidad que presenta la cocaína según la especie animal, depende del porcentaje en que esta droga sea metabolizada por vía oxidativa (Connors et al 1990). En humanos el metabolismo de la cocaína por vía oxidativa es entre un dos y un seis por ciento del total (Inaba et al 1978), mientras que en la rata es de un catorce a un diecisiete por ciento (Englert et al 1976; Stewart et al 1978) y en el ratón de un cuarenta y cinco por ciento (Werner 1961).

1.4.1.1. Alteraciones morfológicas

Histológicamente se ha observado, por microscopía óptica, depleción de glucógeno en hepatocitos perivenosos, una hora después de la administración. La degeneración de estos hepatocitos progresa hasta llegar a franca necrosis en un período de ocho horas. Por microscopía electrónica, se aprecian las primeras alteraciones una hora después de la administración. Se produce una extensa dilatación del retículo endoplásmico rugoso, acompañado de cambios en las mitocondrias. A las dos horas se observan cambios sorprendentes en los peroxisomas de las células perivenosas. Aunque la densidad de peroxisomas disminuye en todas las células, es más notoria en las perivenosas. En ratones no inducidos el mayor volumen de retículo endoplásmico liso aparece en los hepatocitos perivenoso, lo cual explica la formación de metabolitos tóxicos en mayor proporción a este nivel del acino hepático (Gottfried et al 1986).

1.4.1.2. Alteraciones funcionales y bioquímicas

Desde el punto de vista bioquímico la hepatotoxicidad de la cocaína se manifiesta por un incremento de las transaminasas séricas, que suele ser máximo a las dieciocho horas de la

administración. Así mismo se aprecia una disminución de los niveles de glutatión, que es deplecionado en un 20-30 % una hora después de la administración de la droga (Thompson et al 1979). La depleción de glutatión es transitoria y precede a una significativa peroxidación lipídica. Todo ello ocurre tras la administración de dosis muy elevadas de cocaína (50 - 70 mg/Kg) a ratones. Existe una relación clara entre la dosis de cocaína y la lesión hepática que produce (Tena 1987). La administración de dosis repetidas durante cinco días a la semana, en periodos de una, dos y tres semanas, de 10, 20 y 30 mg/Kg de cocaína a ratones, da lugar (Freeman y Harbison 1981b) a necrosis periportal, dependiendo de la dosis y del tiempo que dure la administración. La lesión hepática varía desde vacuolización de los hepatocitos, a franca necrosis. Los niveles de transaminasas se presentan muy elevados y los de citocromo P-450 deprimidos. Según estos autores la acción hepatotóxica en ratón, tras la administración de cocaína en dosis repetidas, es independiente de la inducción del sistema de oxidasas de función mixta y la lesión producida se debida a la dosis de cocaína acumulada. Si se inhibe la depleción de glutatión, con antagonistas α -adrenérgicos, como fentolamina y yombina, decrece la acción hepatotóxica de la cocaína (James et al 1987).

Los efectos agudos de la cocaína en hígado perfundido de rata, son vasculares, debido a la vasoconstricción que produce, y funcionales, por alteración en la formación de bilis (Garhart et al 1989).

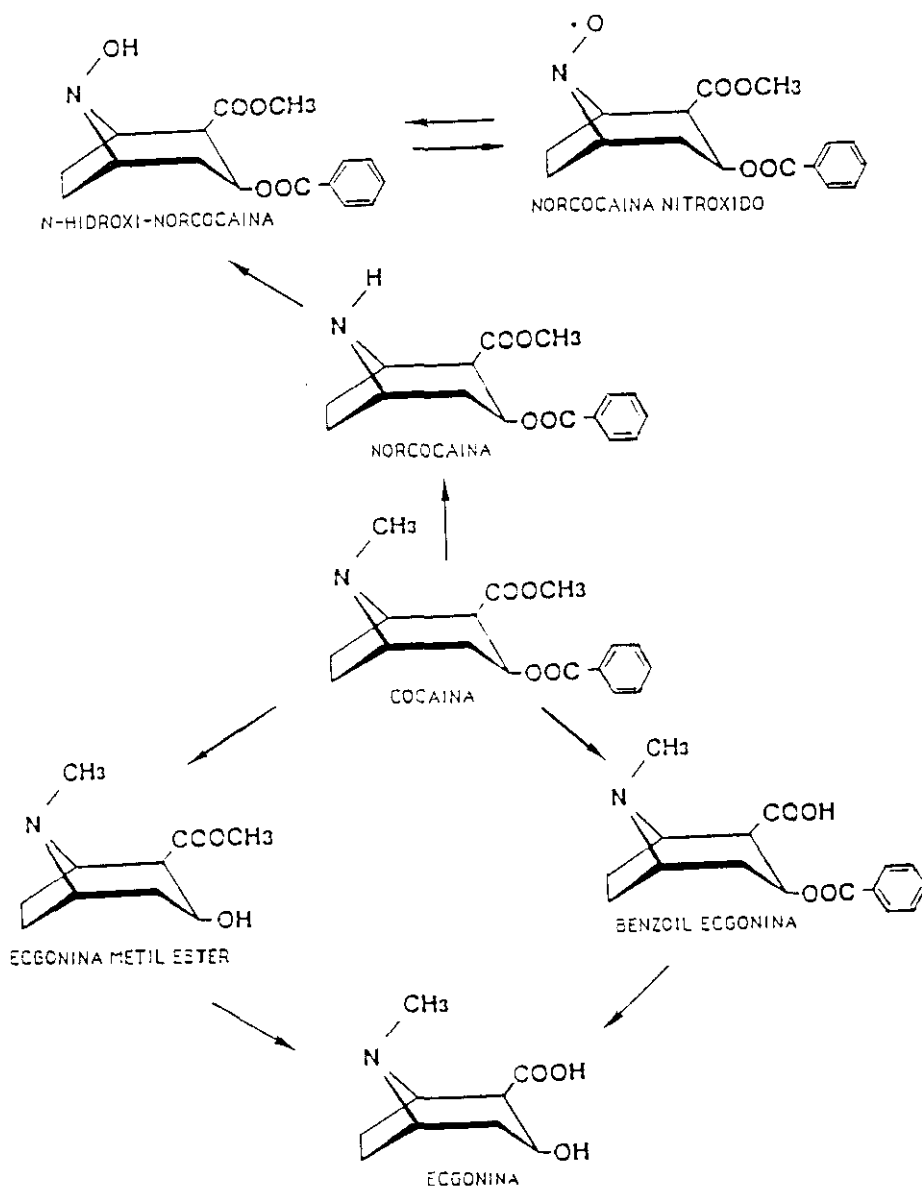
1.4.2.- Metabolismo de la cocaína

1.4.2.1.- Hidrólisis

El 90 % de la cocaína se metaboliza rápidamente por hidrólisis, mediante la acción de unas esterasas presentes en suero y en hígado, que dan lugar a benzoilecgonina, ecgonina metil ester y ecgonina (Stewart et al 1979). Ninguno de estos derivados presentan hepatotoxicidad cuando se administran a ratones en dosis elevadas, lo que indica que la hidrólisis de la cocaína no conduce a metabolitos tóxicos (Thompson et al 1979; Evans 1983). Si se inhibe la acción de las esterasas por diazinon o tri-orto tolifosfato, se origina un notorio incremento de la hepatotoxicidad de la cocaína en ratón (Thompson et al 1979; Freeman y Harbison

1981b; Evans 1983), lo que confirma que la hidrólisis catalizada por esterasas es una vía de detoxificación de la cocaína.

Como las esterasas compiten con los enzimas oxidativos (Citocromo P-450 y monooxigenasas dependientes del FAD) en el proceso de biotransformación de la cocaína, la inhibición de las esterasas da lugar a concentraciones más elevadas de metabolitos oxidados (Benuck et al 1989). Se ha comprobado que la administración de diazinon a ratones elevó 60 veces la concentración hepática de N-hidroxinorcocaína (Shuster et al 1983).



1.4.2.2.- Metabolismo oxidativo y hepatotoxicidad

La vía secundaria del metabolismo de la cocaína es la oxidativa, que da lugar a metabolitos hepatotóxicos. Este proceso gira en torno al nitrógeno del anillo del tropano. La cocaína puede ser demetilada o N-oxidada y posteriormente demetilada. La cocaína demetilada, norcocaína, es rápidamente oxidada a N-hidroxicocaína, que puede dar lugar por último a norcocaína nitróxido, que se cree es el metabolito responsable de la hepatotoxicidad (Rauckman et al 1981; Benuck et al 1989).

Se han realizado estudios *in vitro* (Jover et al 1990), para profundizar en el mecanismo por el cual la cocaína es hepatotóxica. Se han utilizado microsomas hepáticos, obtenidos a partir de ratas, inducidas y no inducidas, hamster y ratones, en presencia de un sistema generador de NADPH. Se produce norcocaína nitróxido, a partir de N-hidroxicocaína. Esta reacción está mediada por el citocromo P-450, ya que la inducción con fenobarbital, incrementa marcadamente la producción del derivado nitróxido (Rauckman et al 1981). El paso anterior a la producción de N-hidroxicocaína, fué estudiado por Kloss et al (1982b). Estos autores, obtienen N-hidroxicocaína, a partir de norcocaína, utilizando una suspensión microsomal y FAD-monooxigenasa purificado.

La inhibición del metabolismo de la cocaína, se ha estudiado *in vitro* en microsomas hepáticos, con agentes antihistamínicos, como la cimetidina, lo que hace que decrezca su hepatotoxicidad (Peterson et al 1983).

En hepatocitos aislados de rata, la cocaína se manifiesta como hepatotóxica, lo cual no ocurre *in vivo*, debido a que el contenido en esterasas de los microsomas hepáticos es mucho menor que la actividad esterásica en plasma (Roberts et al 1990). Bouis y Boelsterli en 1990, realizaron cultivos de hepatocitos de rata y los expusieron a concentraciones de 10^{-6} a 10^{-4} M de cocaína y norcocaína nitróxido. Utilizaron *in vivo* un inductor del citocromo P-450. Esto favorece el metabolismo de cocaína a norcocaína y se observa una inhibición de la biosíntesis protéica, que es restaurada si se bloquea el metabolismo oxidativo con un inhibidor del citocromo P-450. La depleción de glutatión incrementa la unión de cocaína a

macromoléculas hepáticas y aumenta el efecto inhibitor sobre la biosíntesis protéica.

1.4.3.- Mecanismos responsables de la hepatotoxicidad de la cocaína

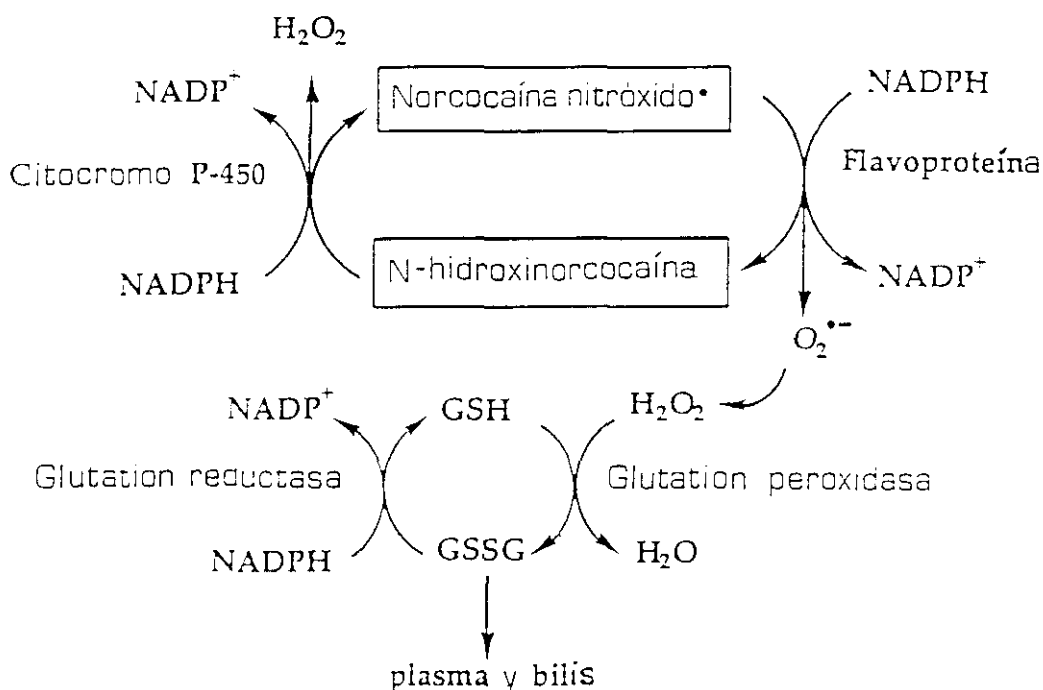
Se han propuesto dos mecanismos fundamentales para explicar los efectos tóxicos de la cocaína sobre el hígado. Uno de los mecanismos propuestos implica la formación de un metabolito de cocaína extremadamente reactivo que al unirse a macromoléculas celulares críticas altera de tal manera la función de la célula que origina su muerte (Evans y Harbison 1978; Evans 1983). El segundo mecanismo propuesto consiste en un ciclo redox fútil entre dos metabolitos oxidados de la cocaína que, al generar especies activas de oxígeno y consumir NADPH, dará lugar a la peroxidación lipídica, a la lesión hepática y a la muerte celular (Kloss et al 1984).

1.4.3.1.- Mecanismo del enlace covalente

La evidencia de un papel importante del enlace covalente (o irreversible) de los productos de la biotransformación de la cocaína, con macromoléculas, en la hepatotoxicidad, se deduce de la estrecha correlación que existe entre el enlace covalente y la lesión tisular. Aunque está demostrado que el metabolismo oxidativo de la cocaína es fundamental para generar la forma de la cocaína que reacciona con las proteínas, se desconoce aún la identidad de tal metabolito.

1.4.3.2.- Ciclo redox y peroxidación lipídica

La cocaína induce la peroxidación lipídica, según se ha visto en hepatocitos de rata y ratón, por evaluación del malondialdehído, metabolito indicador de la degradación lipídica. El metabolito activo responsable de la inducción del proceso de peroxidación es la norcocaína nitróxido.



Ciclo redox fútil entre metabolitos de la cocaína (Kloss et al 1984)

Se produce un ciclo fútil entre N-hidroxinorcocaína y norcocaína nitróxido, que da lugar al anión superóxido, conduciendo a peroxidación lipídica y depleción de NADPH (Kloss et al 1984).

El sistema de defensa mas crítico frente al peróxido de hidrógeno es la glutacion peroxidasa, la cual elimina los peroxidos a expensas de la conversión de glutacion reducido (GSH), a su forma oxidada (GSSG). El GSH se regenera mediante la GSSG-reductasa, que es un enzima NADPH dependiente (Donnelly et al 1988). Si disminuye el NADPH se deprime el glutacion celular y comienza la hepatotoxicidad.

Hasta la fecha la mayor parte de las investigaciones sobre el metabolismo de la cocaína y el daño celular asociado, se han realizado en modelos animales, experimentalmente en ratón, sin embargo existen casos descritos y estudiados de hepatotoxicidad en el hombre. Se han recogido casos de esteatosis, congestión, infiltrado inflamatorio portal y necrosis centrolobulillar con zona hemorrágica, en intoxicación por cocaína (Copeland 1989). Kanel

et al (1990), describen un caso de fallo hepático fulminante y rhabdomyolisis aguda, por el uso de cocaína, asociado a barbitúricos y alcohol. Los hallazgos morfológicos encontrados son, necrosis mediozonal y perivenosa de tipo coagulativo y microvesículas grasas periportales, en todos los lóbulos del hígado. Perino et al en 1987, han descrito un caso de necrosis periportal en un paciente consumidor de cocaína, en cuya orina detectaron también la presencia de barbitúricos.

Existe una relación directa entre hepatotoxicidad y empleo de la cocaína a dosis muy altas (Tabasco-Minguillan et al 1990). Para poder evaluar la acción hepatotóxica de la cocaína en el hombre, parece muy importante tener en cuenta la idiosincrasia de cada individuo, ya que esta droga presenta una toxicidad mayor cuando el nivel de colinesterasas es bajo (Wanless et al 1990; Silva et al 1991).

1.5.- Citometría de flujo

La citometría de flujo, es una técnica para el análisis de células aisladas en suspensión, y también se puede utilizar, para separar células, basándose en sus características fenotípicas específicas. Permite obtener datos individuales en un grupo de células mediante la emisión de señales de fluorescencia. Los cambios celulares pueden medirse estudiando la cinética celular, teniendo el tiempo como parámetro. Se debe estudiar simultáneamente una población control.

Esta técnica se ha desarrollado durante los últimos treinta años, para el conteo y medición de partículas. El primer analizador de partículas fué descrito en 1965, y hacia 1970 se desarrollaron aparatos capaces de medir dos o más emisiones de fluorescencia (Camplejhon 1992).

El principio en que se basa un citómetro de flujo es sencillo. Las células, o núcleos, pasan individualmente a través de un haz de luz, producido en la mayoría de los casos por láser. La banda lumínica produce una excitación de las diferentes tinciones fluorescentes, que pueden relacionarse con diferentes componentes celulares. Se puede excitar simultáneamente,

más de un colorante fluorescente. La señal de fluorescencia, se recoge a través de un sistema de lentes y espejos. Los detectores convierten las señales de fluorescencia en electrónicas, que son almacenadas y analizadas por una computadora.

Las técnicas de citometría de flujo, miden frecuentemente cinco parámetros, con tres colores. En la práctica se miden dos parámetros usando un ángulo de transmisión de la dispersión de la luz para medir el tamaño celular y una dispersión lumínica de 90° para examinar la superficie celular. Estos dos parámetros se utilizan para identificar y seleccionar subpoblaciones específicas. Las señales de fluorescencia de estas células se recogen y cuantifican. Una simple célula puede ser identificada como positiva o negativa, según el fluorocromo utilizado.

1.5.1.- Estructura de un citómetro de flujo

Un citómetro de flujo se compone de tres sistemas instrumentales integrados: un sistema de inyección y manejo de la muestra, un detector físico y óptico de los parámetros citológicos que interesa medir y un sistema digitalizado para el proceso de los datos (Magdelenat 1991).

El sistema de inyección y manejo de la muestra recibe el nombre de célula de flujo. Consiste en un mecanismo hidráulico presurizado al que se incorpora la suspensión de células para analizar. Esta suspensión es transportada hacia un conducto capilar estrechado por una corriente coaxial de líquido sobre el que incide un estrecho haz de luz. La inyección se realiza habitualmente por un sistema volumétrico compuesto de bomba y jeringa capaz de inyectar un volumen exacto de la suspensión celular.

Según el carácter del haz explorador se distinguen dos tipos de citómetros de flujo: a) de lámpara de mercurio; b) multiparamétrico, o de luz láser. Los primeros se basan en la utilización de una fuente lumínica no coherente con gran dispersión e interferencias entre los fotones que constituyen el haz luminoso. Debido a ello, estos citómetros han sido sustituidos por los de tipo láser, donde la radiación fotónica empleada se encuentra en fase, lo cual proporciona a este tipo de luz una gran uniformidad en la dirección y cromaticidad así como

una gran intensidad frente a las fuentes de radiación no coherentes.

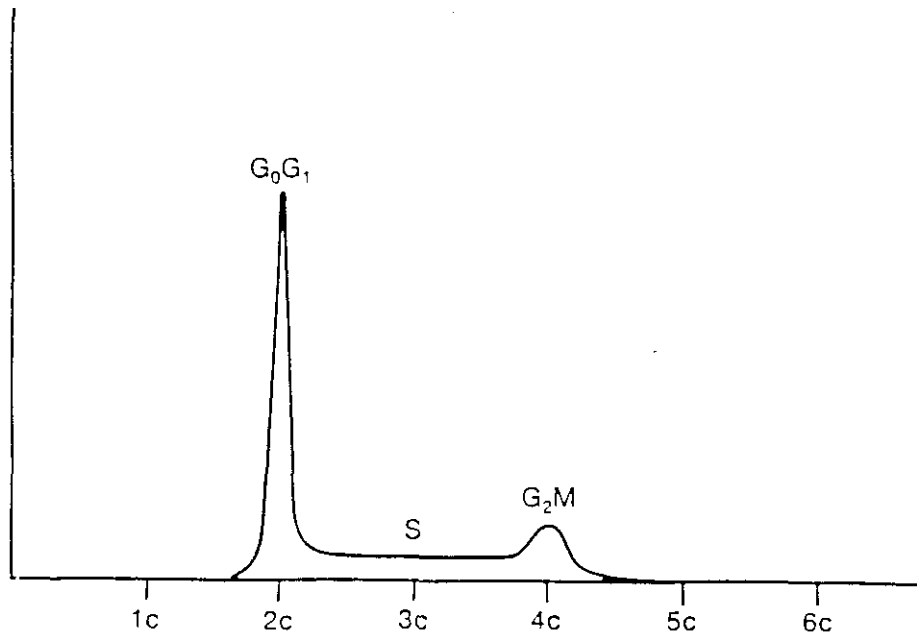
El sistema de detección consta de: a) un contador volumétrico de tipo Coulter para el recuento de las unidades celulares que fluyen por el capilar; b) sistema óptico, formado por una lente colectora en ángulo recto, un filtro espacial de selección, diversas lentes de enfoque del rayo láser sobre el haz de flujo celular y ciertos filtros y espejos que permiten seleccionar determinadas longitudes de onda en la radiación reflejada por la columna en estudio, y c) los fotodetectores capaces de recoger y transformar la luz reflejadas en una débil corriente eléctrica. El sistema electrónico digital y de análisis de datos consta de diversos amplificadores de señal; un transformador analógico-digital para convertir los pulsos electrónicos en información digital y un ordenador que almacena y analiza los datos, proporcionando estudios estadísticos y representación gráfica de éstos (García del Moral et al 1993).

1.5.2.- Aplicaciones de la citometría de flujo

Se utiliza, principalmente para medir la cantidad relativa de DNA y la distribución de los ácidos nucleicos, en los diferentes estadios del ciclo celular. Su ventaja principal es la rapidez, en pocos segundos se pueden medir hasta 10000 células. Para ello se utilizan diferentes tinciones que permitan visualizar mediante un foco lumínico, propiedades físicas de las células, como su tamaño y la granularidad de su citoplasma. Esto, junto con la propiedad de poder detectar la fluorescencia, emitida a diferentes longitudes de onda, por el DNA o RNA, mediante el uso de tinciones intercalantes, amplían la utilidad de esta técnica (Dallas y Evans 1990).

La citometría de flujo, usa un flujo continuo para el análisis óptico de células aisladas y, puede ser utilizado para separar células. Es muy eficiente para ver que células hay en suspensión y aproximadamente, cuantas. Proporciona información cuantitativa sobre el tamaño celular, características de la superficie celular y número y tipo de macromoléculas asociadas con las células individuales, si esas macromoléculas pueden ser marcadas específicamente con componentes fluorescentes. Se pueden excluir ciertas células comparando

específicamente parámetros de poblaciones celulares, como tamaño y otros parámetros que se pueden medir por marcaje fluorescente.



Histograma de DNA por citometría de flujo

La citometría de flujo está especialmente indicada para el estudio del ciclo celular, usando líneas celulares o suspensiones de células simples, obtenidas por medios físicos o electrónicos. El ciclo celular puede ser seguido en sus diferentes fases, G₀/G₁, S y G₂ + M, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA. Esto permite clasificar las células en G₁, S, o G₂. Otras tinciones ligadas a ambos, DNA y RNA, como el naranja de acridina, permiten identificar células en G₀.

La citometría de flujo tiene un gran campo de aplicación, en la inmunocitotoxicidad y en citotoxicología. Se puede estudiar, mediante esta técnica la influencia que pueden tener diferentes drogas, en la evolución normal del ciclo celular.

La medida del DNA, célula a célula, en el ciclo celular, es importante en los estudios de células cancerígenas porque las células malignas tienen alterado con frecuencia el contenido en DNA o su citocinética.

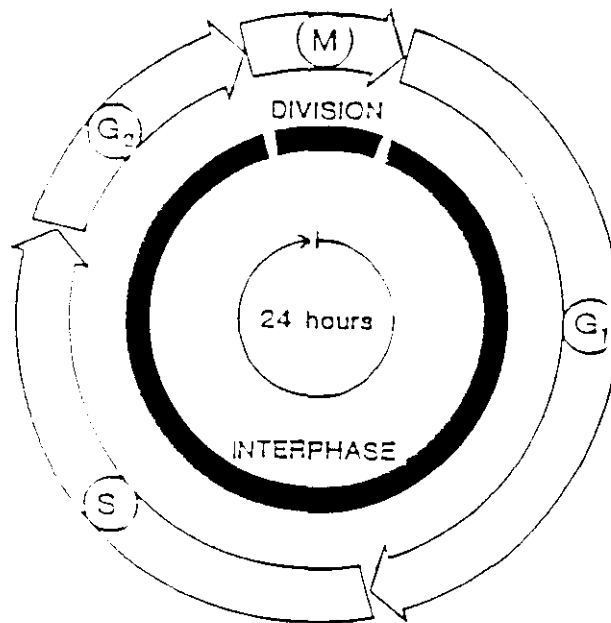
Una de las aplicaciones más excitantes de la citometría de flujo es la caracterización de los cambios celulares por drogas.

Los cambios en la membrana plasmática dan lugar a alteraciones en el transporte o endocitosis, que puede ser cuantificada por citometría de flujo. Las alteraciones en la membrana se han estudiado usando tinciones de fluorescencia, que indican cambios en el potencial de membrana. La tinción se distribuye en el espacio intra y extracelular como resultado, principalmente, de un gradiente electroquímico. El valor absoluto del potencial de membrana no se puede determinar por estos métodos, pero sí es una técnica muy sensible para detectar alteraciones. La transferencia de alta energía que se obtiene usando la excitación por láser, permite usar concentraciones muy pequeñas de colorantes, con lo que se evita los efectos tóxicos que estos pudieran tener. Se puede utilizar la citometría de flujo para estudiar el daño celular. Los cambios en el potencial de membrana se pueden apreciar con tinciones específicas, tras la exposición de las células a drogas.

1.6.- Ciclo de división celular

La citocinética, es el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y poblaciones de células. Los cambios en la cinética de las células de los tejidos, durante la exposición a agentes tóxicos, puede ayudar a conocer su mecanismo de acción y la patogénesis, que da como resultado una lesión (Evans et al 1991). Los estudios de citocinética se basan en el ciclo celular, que se define, como el tiempo entre el final de la mitosis de las células parentales y el final de la mitosis de las células hijas.

El ciclo celular comprende cuatro fases: G1, o fase postmitótica, S, o período de síntesis del DNA, G2, o fase premitótica y M, o mitosis (Sandberg 1992). La única fase apreciable microscópicamente, es la mitosis. En general, la fase S, dura entre 7 y 8 horas, la G2, entre 2 y 4 horas y la M menos de 1 hora, mientras que la duración de la fase G1 es la más variable.



Fases del ciclo celular

Durante la fase G₁ tiene lugar la síntesis de RNA, el transporte de proteínas, cambios en la concentración intracelular de iones, el transporte de nutrientes dentro de la célula y la síntesis de enzimas específicos, necesarios para la síntesis del DNA. Durante la fase S se sintetiza el DNA y la mayoría de proteínas, histonas.

Durante la fase G₂ tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas como preparación para la mitosis. Finalmente, durante la fase M, ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis proteica decrece y cesa la síntesis de RNA.

La célula es por esto muy diferente en cada fase del ciclo celular. La progresión de la célula a través del ciclo hace necesario una serie de cambios bioquímicos, antes de que el siguiente estadio del ciclo comience. Hay factores, como el tratamiento con drogas, que pueden producir alteraciones del ciclo.

Dentro de la población celular, hay siempre algunas células, que no se comportan de forma normal. Estas células pueden estar en el estadio G₀, dentro de ellas podríamos citar a los hepatocitos y células de Kupffer, que normalmente no se dividen, si no es, por ejemplo, tras

una hepatectomía parcial.

La fracción en crecimiento, o fracción de células en la población, que participa en el ciclo celular, es un concepto importante en el análisis de la población celular. La fracción en crecimiento se incrementa durante la reparación, tras el daño celular, siendo las células en G₀ estimuladas para participar en el ciclo celular.

La fracción en crecimiento decrece cuando la reparación es completa. La mitosis se puede observar microscópicamente y nos indica, como primera aproximación, el ritmo de proliferación. El índice mitótico es la proporción de células en mitosis en la población celular total, en un tiempo concreto.

1.6.1.- Análisis del DNA por citometría de flujo

La mayoría de los estudios cinéticos se basan en un marcaje específico para el DNA y el seguimiento de este marcaje a través de las fases del ciclo celular.

Normalmente, para cuantificar el DNA celular, se marcan las células con una o varias de las siguientes tinciones, yoduro de propídio, naranja de acridina, o bromuro de etídio. Se obtiene y analiza la distribución del DNA en 10-50 x 1000 células. Se puede medir los cambios a que pueden dar lugar diferentes agentes químicos, sobre la ploidía de las células. Células con contenido normal de DNA (2C), células con el doble del contenido del DNA normal (4C), y valores intermedios que se asignan a G₁ (2C), G₂ (4C), o fase S, (valores intermedios del ciclo celular). Mediante la citometría de flujo se ha podido detectar un efecto clastogénico, por el incremento de la dispersión del contenido del DNA celular.

En células en división, se puede producir una distribución desigual del DNA en las células hijas. Esto se puede detectar por un ensanchamiento, en el pico, obtenido para la fase G₁ del ciclo celular. También se puede detectar con rapidez, si se produce una aneuploidia, en la población celular que está expuesta a un agente, supuestamente tóxico.

1.7.- Objetivos de la investigación propuesta

Considerando que la cocaína es hepatotóxica cuando se administra a ratones Swiss machos en dosis de 60 mg/Kg, que produce lesión hepática y muerte celular y que la pérdida de células en hígado desencadena un proceso de proliferación celular (regeneración) para restaurar la funcionalidad hepática, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

- 1.- Diagnosticar y ubicar la zona acinar donde aparece el daño hepático debido a la administración de cocaína por vía intraperitoneal a ratones pretratados o no con fenobarbital.
- 2.- Investigar sobre la naturaleza de la muerte celular por apoptosis y/o necrosis.
- 3.- Establecer una posibilidad de relación entre la ubicación en el acino hepático de la zona lesionada y el tipo de muerte celular.
- 4.- Observar de qué manera se vería afectada la proliferación celular por el pretratamiento con fenobarbital (interacción de xenobióticos) y establecer comparaciones con hepatocitos fetales.

La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en el hígado por efecto de los xenobióticos hepatotóxicos es la siguiente:

Tóxico --- > lesión hepática --- > muerte celular (apoptosis o necrosis) --- > regeneración hepatocelular --- > restauración de la funcionalidad.

Para hacer un seguimiento de estos acontecimientos, se inyectó cocaína (60 mg/Kg) a ratones Swiss albino machos, tratados y no tratados previamente con fenobarbital para inducir el sistema monooxigenasa microsómico dependiente del citocromo P-450.

Para caracterizar el proceso secuencial de lesión hepática, muerte celular (apoptosis y necrosis) y regeneración hepatocelular, se han obtenido muestras de suero, tejido hepático y se han aislado hepatocitos después de la administración de cocaína. Las muestras fueron tomadas a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas y en ellas se han realizado las determinaciones siguientes:

- 1.- Estudio histopatológico de hígado de ratón para diagnosticar la lesión hepática dentro del acino (perivenosa o periportal).
- 2.- Parámetros bioquímicos de lesión hepática y muerte celular (aminotransferasas, isocitrato deshidrogenasa, gamma-glutamil transferasa en suero de ratón)
- 3.- Enzimas generadores y consumidores de NADPH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima málico, isocitrato deshidrogenasa, glutatión transferasa, glutatión reductasa y Citocromo P-450 NADPH reductasa) y estado redox dependiente del NADP^+ y NAD^+ .
- 4.- Enzimas y metabolitos relacionados con la peroxidación y el metabolismo energético (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, niveles de glutatión, glutatión-S-transferasa y cociente GSH/GSSG, ATP y malondialdehído).
- 5.- Evaluación por citometría de flujo de la ploidia y distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular, que permiten caracterizar la muerte celular por apoptosis y para observar el momento de proliferación hepatocelular en el proceso regenerativo post-necrótico.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- Aparatos

- Balanza de precisión y granatario Sartorius, modelos 1203 MP y 1207 MP-2, respectivamente.
- Baño termostatzado Heto-Denmark.
- Baño termostatzado con agitación Unitronic 320 OR.
- Baño termostatzado hasta 100 °C Precisterm S-140.
- Bomba de perfusión Minipuls-2 de Gilson.
- Cámara de contaje de células Neubauer.
- Centrífuga Heraeus Eppendorf Biofuge 13.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Minifuge T.
- Centrífuga refrigerada Kontron, modelo Centrikon H-401.
- Citómetro de flujo FACStar plus (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un laser de argón de 3 W (Coherent, Palo Alto Ca) y un ordenador Hewlet Packard C-30 (Sunnyvale, Ca).
- Cromatógrafo de líquidos: HP 1090, con detector HP DAD 1040 A/M
- Cronómetros Smiths.
- Espectrofotómetro UV-V Kontron, modelo Uvikon 810.
- Homogeneizador Ultraturrax Typ 18-10.
- Homogeneizador Tri-R Instruments con motor Braun-Melsungen, provisto de pistilo de teflón.
- Jaulas de makrolon marca Tecniplast, con cubierta y rejilla de acero inoxidable.
- Material quirúrgico: jeringas, pinzas rectas y curvas, tijeras de diversos tamaños, cánula de plástico (Braunula 1-G16, Braun Melsungen AG, RFA), hilo de sutura.
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5414.
- Microscopio óptico Nikon.
- Microscopio óptico Wild-Herbrugg.
- Microtomo de deslizamiento de la casa comercial Reichert.

- pHmetro Radiometer Copenhagen, modelo 52.
- Pulmón oxigenador de vidrio Afora, modelo U-80622.
- Tubos y placas de incubación estériles de Costar.
- Ultracentrífuga Kontron, modelo Centricon T 2080.

2.2.- Productos

- Clorhidrato de cocaína, con una riqueza en cocaína del 88,5 %, y del 99,5 %, expresado como cocaína base, proporcionada por el Servicio de Restricción de Estupefacientes del Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Fenobarbital sódico de la casa Fluka, con una pureza del 98 %.
- Los ácidos y las sales minerales utilizados fueron de las casas comerciales Merck, Panreac, BDH y Carlo Erba.
- Los sustratos, coenzimas y enzimas fueron suministrados por las casas comerciales Sigma y Boehringer.
- Colagenasa de Boehringer.
- Heparina sódica de la casa Leo.
- Solución fisiológica, Ibys.
- Cycletest Becton Dickinson.
- Monóxido de carbono, SEO.
- Pienso de mantenimiento y cría para rata/ratón de Panlab, en forma de pellet, controlado por el proveedor.

2.3.- Animales

Se utilizaron ratones Swiss albinos, machos, de cinco semanas de edad, con un peso medio, en el momento de la recepción, de $21,7 \pm 1,1$ g, procedentes de Iterfauna Ibérica, S.A. (Barcelona). Fueron estabulados en jaulas Tecniplast, en grupos de cinco animales por jaula, durante todo el periodo que duró la cuarentena, que fué de cinco días. Las condiciones

ambientales se mantuvieron constantes, con una temperatura de 22 ± 2 °C, humedad relativa de 50 ± 5 %, ciclos luz/oscuridad de doce horas, con apagado y encendido progresivo, ventilación forzada a través de filtros de alta eficacia y 18 renovaciones de aire/hora en la sala. Los animales tuvieron libre acceso a comida y bebida, durante todo el tiempo que duró la cuarentena. Transcurrido este período, los animales con un peso medio de $30,1 \pm 1,9$ g, fueron trasladados a jaulas individuales para ratón, con el fin de poder controlar, el consumo de comida y bebida. Las jaulas, de makrolon, están provistas de rejilla de acero inoxidable en el suelo, para evitar que el animal tenga contacto directo con la viruta.

Se realizó el cruce de ratones Swiss (seis semanas de edad), con el fin de obtener hígados fetales. Se hizo un seguimiento del estado de gestación tras el apareamiento, por los procedimientos convencionales. A los 19 días de gestación se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvo el hígado de los fetos a término. Los fetos, tenían un peso medio de 1,6 g y cada hígado fetal pesaba como media 0,10 g. Cada madre tuvo una media de 11 a 12 fetos.

2.4.- Tratamiento con cocaína

La pureza de la cocaína administrada (99,5 %), se determinó por cromatografía de líquidos, utilizando el aparato indicado anteriormente. La precolumna empleada fue: LICHROSPHER RP 18 ($5\mu\text{m}$), la columna: LICHROSPHER 60-SELECT B ($5\mu\text{m}$, 250×4 mm) y las condiciones de flujo de 1 ml/min, fase móvil fosfato buffer (pH 2,8)/ acetonitrilo, isocrático % B-60 y longitud de onda 210/230.

Se administró por vía intraperitoneal a diferentes grupos de ratones, con una dosis subletal de clorhidrato de cocaína (60 mg/kg), preparada extemporaneamente disuelta en ClNa 0,15 M. El volumen administrado se ajustó según el peso de cada animal, utilizando un volumen de referencia de 0,2 ml. El grupo control, recibió por vía intraperitoneal, una dosis de 0,2 ml de ClNa 0,15 M.

GRUPO DE ANIMALES	BEBIDA (5 días)	TRATAMIENTO (i.p.)	TIEMPO TRANSCURRIDO ADMINISTRACION COCAINA/SACRIFICIO
CONTROL	AGUA	0,2 ml ClNa 0,15 M	24H
COCA	AGUA	0,2 ml clorh. Cocaína 10 g/L	12H, 24H, 48H, 72H y 96H
FENOBARBITAL SODICO	Fenobarbital sódico 1 g/L	0,2 ml ClNa 0,15 M	24H
FENOBARBITAL + COCA	Fenobarbital sódico 1 g/L	0,2 ml clorh. Cocaína 10 g/L	12H, 24H, 48H, 72H y 96H

Otro grupo de ratones fué inducido, utilizando fenobarbital sódico al 0,1 % p/v, disuelto en el agua de bebida, durante un período de cinco días consecutivos, antes de la administración por vía intraperitoneal del clorhidrato de cocaína (60 mg/kg). Los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos (0, 12, 24, 48, 72, y 96 horas) después de la administración.

El sacrificio se llevó a cabo por dislocación cervical, o mediante anestesia, dependiendo del parámetro a evaluar. El anestésico utilizado fué pentobarbital sódico (Nembutal) (50 mg/Kg).

Para el estudio enzimático se obtuvo la sangre de los animales y el hígado. Por otro lado, para el estudio histológico se extrajo el hígado, y se fijó en formol, para su posterior estudio por microscopía óptica. La citometría de flujo se llevó a cabo en hepatocitos, obtenidos por perfusión hepática con colagenasa. Para el estudio de los metabolitos, se procedió al sacrificio por dislocación cervical, extrayendo rápidamente el hígado, y procediendo a la técnica de freeze-clamp, en nitrógeno líquido.

2.5.- Obtención de muestras séricas y hepáticas

Los sueros fueron obtenidos tanto de los ratones control como tratados, a diferentes periodos de tiempo, desde la administración de la droga. Los animales estaban previamente anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg). La sangre se extrajo por punción cardíaca. El volumen medio de sangre, obtenido de cada ratón, fué de 1,5 ml. Una vez obtenidas las muestras de sangre, se mantuvieron en tubos perfectamente limpios y secos, sin ningún tipo de anticoagulante, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se separó el coágulo formado de las paredes del tubo con un palito de madera, y se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm. El suero se separó con una pipeta pasteur. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta la determinación de las actividades enzimáticas, que se llevó a cabo siempre dentro de las 24 horas desde la obtención de las muestras.

En las muestras de suero se determinaron las actividades enzimáticas siguientes: gamma-glutamyl transferasa (GGT), Aspartato aminotransferasa (ASPT), Alanina aminotransferasa (ALAT) e Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

Así mismo se procedió a extraer el hígado, para su posterior estudio histológico.

2.6.- Fijación de muestras hepáticas para cortes de tejido

Las muestras de hígado para el estudio morfológico, por microscopía óptica, se obtuvieron a partir de animales de los diferentes grupos, previamente anestesiados. Las muestras de hígado se fijaron en formol al 10 % y posteriormente se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 7 micras que fueron teñidos con hematoxilina y eosina según el siguiente método:

- Desparafinación e hidratación.
- Tinción con hematoxilina al 10 % durante 7 minutos.
- Lavado dos veces en H₂O destilada.

- Tinción con eosina al 4 % durante 45 segundos.
- Lavado dos veces en H₂O destilada.
- Deshidratación y montaje.

Reactivos:

Hematoxilina de Carazzi (H₂O destilada 800 ml; glicerina 200 ml; sulfato aluminico potásico 50 gramos; yodato potásico 0,20 gramos y hematoxilina 1 gramo).

Solución madre de eosina (eosina 1 gramo y H₂O destilada 100 ml).

Eosina 4 % (40 ml de la solución madre y 960 ml de H₂O destilada).

2.7.- Aislamiento de hepatocitos

El aislamiento de los hepatocitos de ratones adultos se llevó a cabo, en animales procedentes de diferentes grupos de tratamiento y a distintos tiempos desde la administración intraperitoneal de una dosis de cocaína de 60 mg/Kg del peso del animal, por perfusión *in situ* del hígado del ratón con medio Hepes (Hepes 20mM, KCl 5mM, SO₄Mg 1mM, PO₄H₂K 5mM, ClNa 150mM y Glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método de Krebs et al (1974) modificado por Hue et al (1975 y 1978). Este método permite obtener hepatocitos con un elevado grado de viabilidad. Los hepatocitos fetales se aislaron a partir de hígados de fetos a término (19 días de gestación), según el método de Martín-Sanz et al (1989).

2.7.1.- Obtención de hepatocitos adultos de ratones tratados con cocaína y fenobarbital más cocaína

Los ratones se anestesiaron con Nembutal, disuelto en solución salina (ClNa 0,15 M), por vía intraperitoneal, en dosis de 50 mg/Kg. La heparinización se realizó por vía femoral (0,1 ml de heparina Leo al 1 %). Posteriormente se procedió a la apertura de la región abdominal y se introdujo en la vena porta una cánula de plástico (Abbocath-T, 22G x 32 mm), que se

fijó por medio de dos ligaduras con hilo de sutura. La cánula se conectó al catéter que hizo fluir el medio a través del hígado. Para facilitar el drenaje se produjo una abertura en la vena cava inferior e inmediatamente se abrió la cavidad torácica y se realizó un orificio en el atrio derecho del corazón por el cual se introdujo otro catéter de plástico y se cerró la abertura de la vena cava inferior. Se desecharon los primeros 200 ml del medio de perfusión con el objeto de eliminar la sangre y lavar el hígado, y a los 100 ml restantes, se le adicionaron 65 mg de colagenasa (0,15 U/mg Boehringer) y Cl_2Ca 5 mM, cerrándose en este momento el circuito para iniciar la recirculación.

Trascurridos 5 minutos de perfusión con el medio con colagenasa, se procedió a la disección y disgregación del hígado. La suspensión así obtenida se filtró a través de gasa para eliminar los trozos no digeridos, y se centrifugó a baja velocidad (a 50 xg, 2 minutos). El sedimento de células se resuspendió y centrifugó para eliminar los restos de membranas. Esta última operación se realizó dos veces.

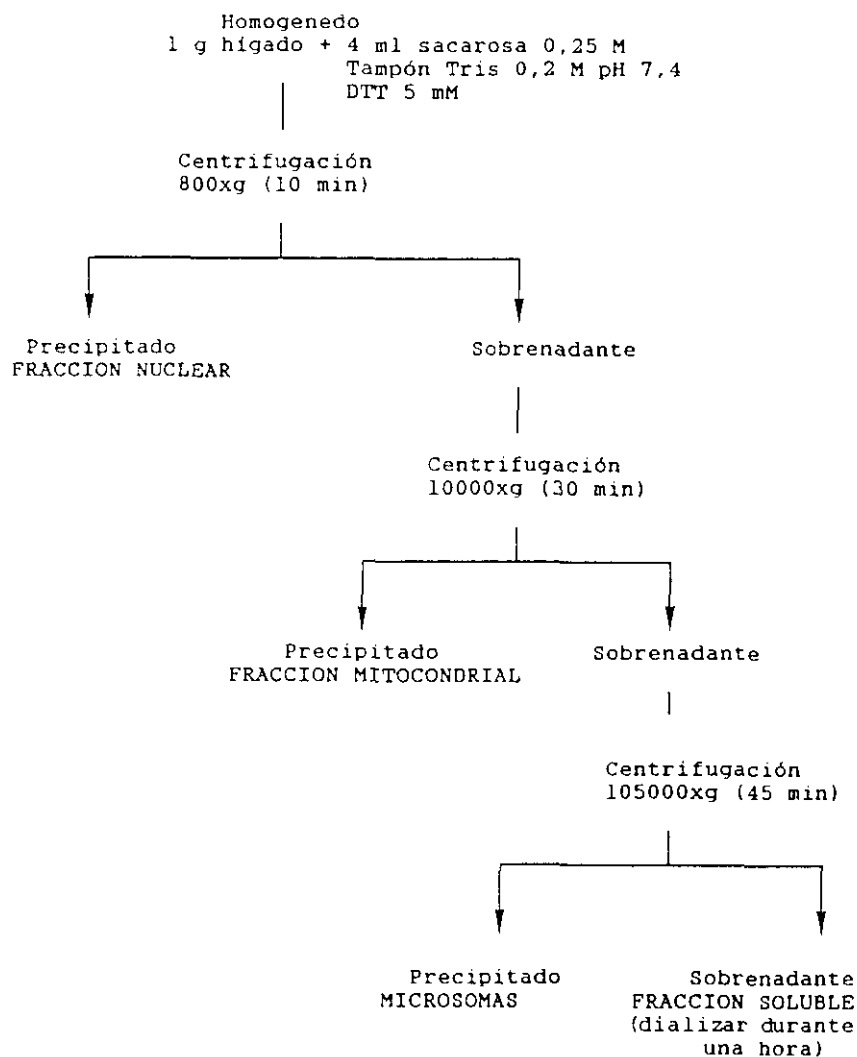
La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (0,2 % en suero salino). El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90 %.

2.7.2.- Obtención de hepatocitos fetales

Se partió de 1 g de hígados, obtenidos a partir de fetos a término, disgregándolos, con tijeras hasta conseguir una papilla homogénea. Se suspendió en Hepes (Hepes 20mM, KCl 5mM, SO_4Mg 1mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5mM, ClNa 150mM y Glucosa 10 mM) y se filtró por una gasa. Después de centrifugar a 50 xg durante 5 minutos, se lavaron las células nuevamente con dicho tampón. Finalmente se resuspendió en Hepes y se realizó el conteo en cámara de Neubauer, utilizando Azul Tripán (0,2 % en suero salino) para ver la viabilidad, como en el caso anterior.

2.8.-Preparación de extractos hepáticos y fracciones subcelulares

Para la obtención de los diferentes extractos hepáticos y de las fracciones subcelulares, se procedió en primer lugar a perfundir, o lavar el hígado, con el fin de obtener las muestras libres de sangre, que podría interferir en las distintas determinaciones. Se abrió la región abdominal de los animales previamente anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg) y posteriormente, se disecó y canuló la vena porta, y tras abrir el esternón se seccionó la vena cava, lavando con suero fisiológico 0,15 M.



Muestras de 1 g de hígado perfundido se homogenizaron en frío, en un vaso provisto de pistilo de teflón, con 4 ml de sacarosa 0,25 M (la solución se preparó sobre tampón TRIS

0,2 M a pH 7,4, añadiendo DTT 5 mM. La relación de dilución del extracto obtenido, resultó ser de 1:5. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos. El sobrenadante separado se volvió a centrifugar a 10.000 xg durante 30 minutos. De esta manera se obtuvo un precipitado, que se corresponde con la fracción mitocondrial y un sobrenadante. Dicho sobrenadante se centrifugó a 105.000 xg durante 45 minutos, obteniendo como precipitado los microsomas y un sobrenadante, que se dializó a una temperatura de 4 °C durante una hora, con agitación, y que constituye la fracción citosólica soluble.

Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron en frío, en vaso con pistilo de teflón, con 4 ml de PO_4KH_2 1 M a pH 6,5. Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos, se obtuvo un sobrenadante, en el que se evaluó la actividad de la glutatión S-transferasa.

Para preparar los extractos necesarios para la determinación de metabolitos, se procedió a sacrificar a los animales por dislocación cervical, extrayendo el hígado, que fué rápidamente prensado y congelado en nitrógeno líquido. Para ello, se utilizaron unas pinzas, cuyos brazos terminan en dos planchas de acero, que se mantuvieron previamente sumergidas en Nitrógeno líquido. A partir de esta muestra de hígado, se pesaron 2 g, que una vez troceados, se suspendieron en 18 ml de ácido perclórico 0,5 M, sobre etanol al 20 %, y se homogeneizaron en ultraturrax durante 2 minutos. El homogenado ácido obtenido, se centrifugó en frío a 3.000 xg durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se extrajo el precipitado con dos volúmenes del mismo medio. Los sobrenadantes ácidos, mezclados y tamponados (TRIS 0,1 M pH 7,4), se llevaron a pH 6,8 - 7, por adición lenta de KOH, con agitación continua. El precipitado de KClO_4 , que se forma al neutralizar, se separó por centrifugación y el sobrenadante se liofilizó, conservándolo a -80 °C, hasta su uso.

Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron en frío en ultraturrax, durante 3 minutos con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Una vez decantado el sobrenadante se volvió a repetir la extracción. Después de centrifugar (15 minutos a 3.000 xg) se reunieron los sobrenadantes y en ellos se determinaron las concentración de glucógeno.

2.9.- Determinación de actividades enzimáticas

Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en las diferentes fracciones subcelulares del homogenado hepático, en condiciones óptimas de pH y temperatura, a saturación de sustrato y cofactores. La reacción fue previamente termostatzada a 25 °C, y en todos los casos se siguió una cinética de orden 0, al menos durante 4 min.

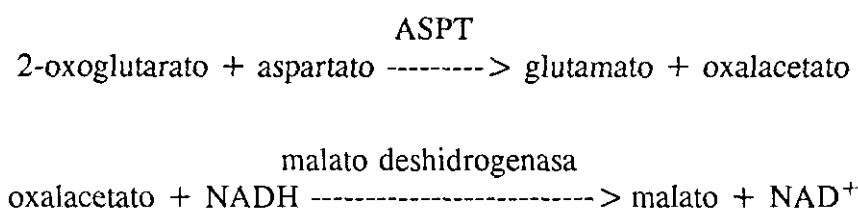
Una gran parte de las actividades enzimáticas ensayadas, se determinaron directamente por reacciones acopladas a la oxidación-reducción del par NAD^+/NADH , siguiendo el cambio de densidad óptica a 340 nm, y empleando en los cálculos un coeficiente de extinción para el $\text{NADH} = 6,2 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (extinción de 1 μmol de NADH en 1,00 ml de solución).

2.9.1.- En suero

Se midieron en suero las actividades enzimáticas: Aspartato aminotransferasa (ASPT), Alanina aminotransferasa (ALAT), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Gamma-glutamyl transferasa (GGT), que son los enzimas que se consideran determinantes del grado de necrosis hepática.

2.9.1.1.- Aspartato aminotransferasa

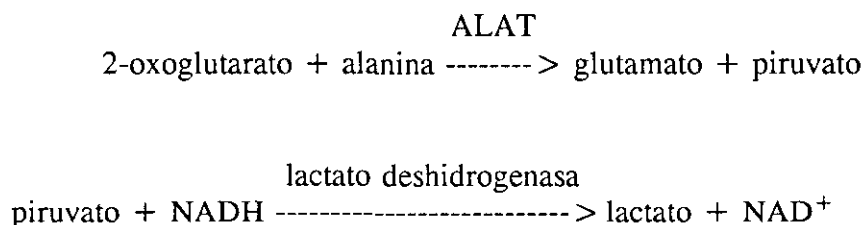
La actividad de este enzima se determinó espectrofotométricamente en suero y fracción soluble, midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD^+ en la reacción acoplada de reducción del oxalacetato a malato, catalizada por la malato deshidrogenasa (Rej y Horder 1984), según el siguiente proceso:



La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: Tampón fosfato 0,8 mM a pH 7,6; NADH 0,2 mM; 2-oxoglutarato 15mM a pH 7; aspartato 0,8 mM y malato deshidrogenasa 20 μ g.

2.9.1.2.- Alanina aminotransferasa

La actividad de la ALAT se determinó espectrofotometricamente midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD^+ en la reacción acoplada de reducción de piruvato a lactato catalizada por la lactato deshidrogenasa (Horder y Rej 1984) según el esquema siguiente:

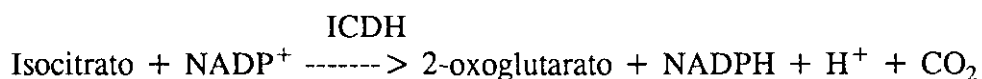


La concentración de los diferentes reactivos en la cubeta es la siguiente: Tampón fosfato 80 mM, a pH 7,4, 2-oxoglutarato 15 mM, alanina 80 mM, NADH 0,2 mM y lactato deshidrogenasa 10 μ g.

2.9.1.3.- Isocitrato deshidrogenasa NADP^+

La actividad del ICDH fue evaluada en suero y en fracción soluble hepática, de acuerdo con el método de Goldberg y Ellis (1987), determinando el incremento de absorbancia a 340 nm por reducción del NADP^+ .

La reacción que cataliza es:

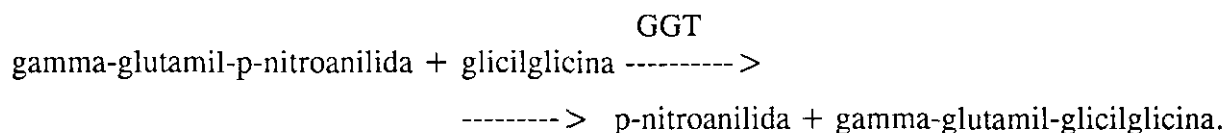


La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Isocitrato, 6,7 mM, NADP, 0,42 mM, ClMn, 1,67 mM, Tampón Tris ClH pH 7,4 65 mM.

2.9.1.4.- Gamma-glutamyl transferasa

En sueros de ratones control y tratados con cocaína, inducidos y no inducidos, se midió la variación de absorbancia a 405 nm utilizando Tris 125 mM pH 8,5, glicilglicina 75 mM y gamma-glutamyl-p-nitroanilida 5 mM, según el método de Wahlefeld y Bergmeyer (1987).

La gamma-glutamyl transferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamilo de la gamma-glutamyl-p-nitroanilida a un dipéptido aceptor, la glicilglicina. La velocidad de formación de p-nitroanilida determinada a 405 nm, es proporcional a la concentración catalítica de gamma-glutamyl-transferasa en la muestra ensayada.



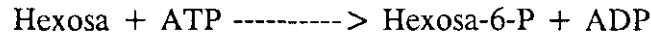
2.9.2.- En fracciones subcelulares hepáticas

En las fracciones subcelulares hepáticas, tanto soluble como microsómica, se han medido las actividades enzimáticas determinantes de lesión hepática y otros enzimas implicados en su funcionalidad.

2.9.2.1.- Glucoquinasa y Hexoquinasas

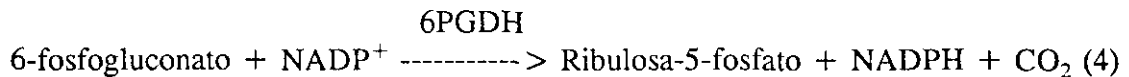
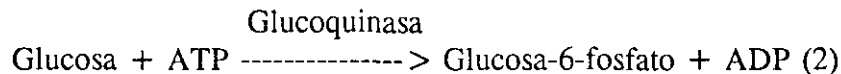
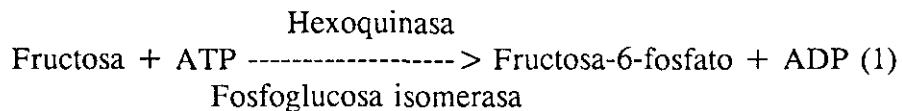
El perfil de las hexoquinasas fue determinado en fracción soluble de acuerdo con el método de Bergmeyer et al (1984), en el que la formación de hexosa-fosfato se acopla a la reacción catalizadora por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NADP⁺.

La reacción catalizada es:



Fundamento:

Consiste en acoplar la fosforilación de la hexosa (fructosa o glucosa) (1 y 2) con dos deshidrogenasas dependientes del NADP^+ , la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (3) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (4).



La formación de NADPH se evalúa espectrofotométricamente por el incremento de la absorción a 340 nm. Cada molécula de hexosa-fosfato se corresponde con dos equivalentes de NADPH, por lo cual las variaciones en densidad óptica obtenidas han de dividirse por dos a la hora de realizar los cálculos.

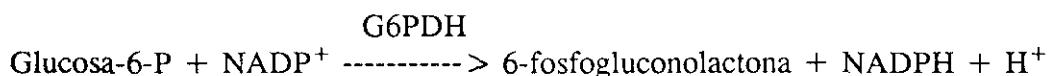
La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tris-ClH pH 7,6 40 mM, Cl_2Mg 7,4 mM, ATP/Mg 7,4 mM, NADP^+ 0,33 mM, G6PDH 7,4 μg y 6PGDH 7,4 μg . A concentraciones de glucosa 100 mM se determinó la actividad de la glucoquinasa. Las otras hexoquinasa se determinaron con fructosa 33 mM y glucosa 0,5 mM.

Cuando la actividad hexoquinasa se determinó con fructosa 33 mM como sustrato, la fructosa 6-fosfato que se forma en la reacción (1) se convierte rápidamente en glucosa 6-fosfato por efecto de la actividad fosfoglucona isomerasa presente en grandes concentraciones en homogenados hepáticos.

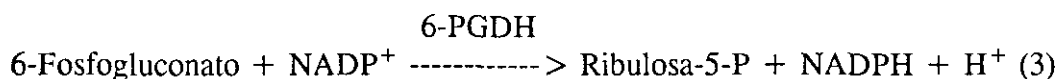
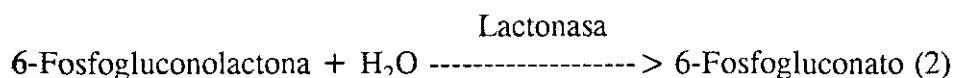
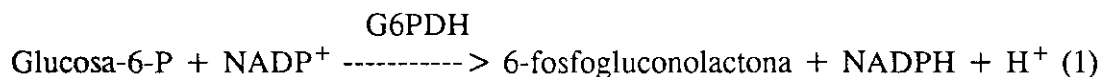
2.9.2.2.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), se determinó en fracción soluble hepática, de acuerdo con el método de Deutsch (1987), por el aumento de absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NADP^+ , en presencia de glucosa 6-fosfato.

La reacción catalizada es:



Fundamento:



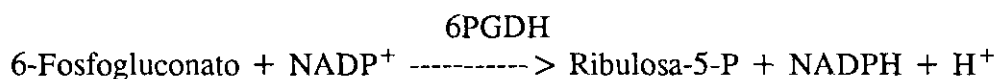
La reacción problema (1), se acopla sucesivamente con la (2) para proporcionar el sustrato de la reacción indicadora (3). La reducción de NADP^+ en la reacción (3) se puede medir espectrofotométricamente por el aumento de densidad óptica a 340 nm. La reacción (1) es prácticamente irreversible, por lo que la reacción total está ampliamente desplazada hacia la derecha, de manera que la reducción del NADP^+ es reflejo cuantitativo de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: NADP⁺ 0,38 mM, Glucosa-6-fosfato 3,3 mM, MgCl₂ 6,3 mM.

2.9.2.3.- 6-Fosfogluconato deshidrogenasa

Como hemos visto en el apartado anterior la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) interviene, dentro de la ruta de las Pentosas Fosfato en una reacción acoplada a la catalizada por la Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, con el fin de obtener NADPH como poder reductor (Deutsch, 1987).

La reacción catalizada es:

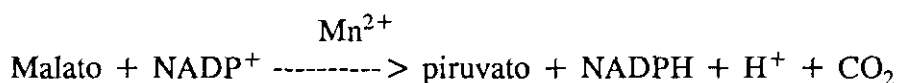


La reducción de NADP⁺ en la reacción se puede medir espectrofotométricamente por el aumento de densidad óptica a 340 nm.

2.9.2.4.-Enzima Málico

La actividad del enzima málico (EM) fue evaluada en la fracción soluble hepática siguiendo el método de Outlaw y Springer (1987), midiendo el incremento de la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NADP⁺.

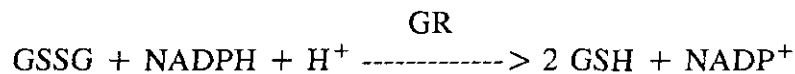
La reacción que cataliza es:



La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Malato 5 mM, NADP 2 mM, ClMn²⁺ 4 mM.

2.9.2.5.- Glutation Reductasa

La actividad de este enzima, GSSG oxidoreductasa, se determinó espectrofotométricamente en fracción soluble de hígado de ratón, obtenido como sobrenadante, después de centrifugar el homogenado hepático a 40.000 xg durante 45 minutos, según el método de Goldberg y Spooner (1987), midiendo la variación de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADPH, según la reacción siguiente:

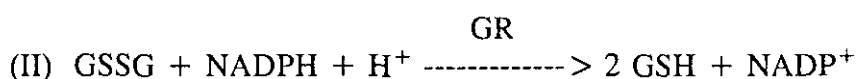
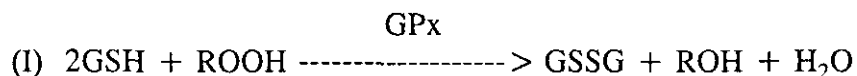


Esta reacción, si bien es reversible, se encuentra muy favorecida en el sentido de la formación de glutatión reducido. Los reactivos utilizados, fueron:

Tampón fosfato potásico 0,12 M, pH 7,5; EDTA 15mM; GSSG 65,3 mM y NADPH 9,6 mM. La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: Tampón fosfato pH 7,2, 100 mM; EDTA 0,5 mM; GSSG 2,20 mM y NADPH 0,17 mM. Fracción soluble (1:10) 10 μ l.

2.9.2.6.- Glutation peroxidasa

La actividad del enzima GSH: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, se determinó espectrofotométricamente en fracción soluble de hígado de ratón, según el método de Günzler et al (1974) modificado por nosotros, midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADPH, según las siguientes reacciones:



Los reactivos utilizados fueron:

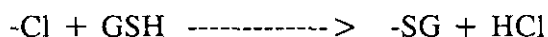
Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; dietilentriamino pentacético (DTPA) 0,5 mM; NADPH 9,6 mM; GSH 100 mM, glutation reductasa Sigma 50 Us/ml y t-butyl hidroperóxido 30 mM.

La concentración que dichos reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente:

Fosfato potásico 45 mM; Dietilenetriamina pentacético (DTPA) 0,45 mM; GSH 2 mM, glutation reductasa (GR) 1 U/ml, NADPH 0,2 mM y terbutil hidroperóxido (t-BOOH) 0,6 mM.

2.9.2.7.- Glutation S-transferasa

La actividad de la glutacion S-transferasa (GST) se determinó según el método de Habig et al (1974), midiendo la variación de absorbancia a 340 nm con glutacion reducido 0,1 mM y 1-cloro 2,4-dinitrobenceno 0,1 mM, según la reacción:



La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: 1-Cloro 2,4-dinitrobenceno 0,5 mM; Glutation 0,5 mM; fosfato potásico 0,5 M a pH 6,5.

2.9.2.8.- Superóxido dismutasa

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), se determinó según el método de Del Maestro et al (1983). Este método se basa en la autooxidación del pirogalol. La SOD, produce un radical superóxido O_2^- , que hace decrecer la autooxidación del pirogalol por una reacción en cadena.

Los reactivos utilizados fueron:

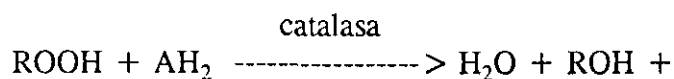
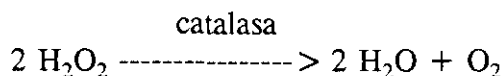
- 1) Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 + Dietilentriamina pentacético (DTPA) 1 mM. Esta solución se prepara en el día a partir de una solución stock de Tris 0,1 M.
- 2) Solución de pirogalol 24 mM en ClH 10 mM (se prepara en el momento).
- 3) Cianuro sódico 0,33 M, disuelto en 2 volúmenes de agua destilada.

Se determinaron la SOD total, SOD no enzimática y SOD verdadera, utilizando diferentes extractos. Para la determinación de SOD total, se utilizó el extracto sin dializar, para la SOD no enzimática se calentó el extracto a 100 °C durante 2 minutos y para determinar la SOD verdadera, se utilizó un extracto dializado, que contiene SOD sensible e insensible al CNK. Como blanco se empleó un extracto dializado y calentado.

SOD total: La reacción se inicia por adición de una solución de pirogalol sobre la muestra y se registra el cambio de densidad óptica a 420 nm, frente al blanco (Tampón Tris + Pirogalol), durante 2 a 3 minutos. La unidad de actividad enzimática de la superóxido dismutasa, se define por su capacidad para inhibir la autooxidación del pirogalol.

2.9.2.9.- Catalasa

La medida de la actividad de la Catalasa (CAT): peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, se llevó a cabo en fracción microsomal de hígado de ratón, siguiendo el método descrito por Aebi (1987), que mide la actividad enzimática a partir de la descomposición del H₂O₂ con liberación de O₂. El H₂O₂ muestra un incremento continuo en la absorción conforme decrece la longitud de onda. La descomposición del H₂O₂, se puede determinar directamente por la disminución de la absorbancia a 240 nm.



La concentración de los reactivos en la cubeta fué la siguiente: Tampón Fosfato pH 7,0 50 mM, peróxido de hidrógeno 10 mM.

2.9.2.10.- Citocromo P-450

El Citocromo P-450 se determinó espectrofotométricamente, por el método de Omura y Sato (1964), midiendo el espectro de absorción característico, con un máximo a 450 nm, que se produce al reducirse el Fe^{3+} del grupo hemo, por unión de la hemoproteína con monóxido de carbono. La determinación se llevó a cabo en la fracción microsomal, en muestras con una concentración de proteínas de 2 mg/ml, y en presencia de Ditionito sódico. Se registró la línea base entre 400 y 500 nm observando la diferente absorción a 450 nm, tras ser burbujeada la muestra problema con monóxido de carbono. La concentración de citocromo P-450, se calcula utilizando el coeficiente de extinción de $91 \text{ cm}^{-1}/\text{mmol}$ y los resultados se expresan como nmoles de citocromo P-450 por mg de proteína de la fracción microsomal.

2.9.2.11.- Citocromo b_5

El citocromo b_5 es otra hemoproteína, presente en la fracción microsomal. El fundamento del método (Bagglioni et al 1970) es la determinación del espectro redox del NADH reducido versus citocromo oxidado. La reducción del citocromo b_5 es catalizada en presencia del enzima microsomal NADH-citocromo b_5 reductasa. Para su determinación se lleva a cabo el registro de la absorbancia entre 400 y 500 nm y tras adicionar una pequeña cantidad de NADH en una de las dos cubetas, que contienen la solución de la fracción microsomal, se vuelve a realizar el espectro de absorción. La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción de $185 \text{ cm}^2/\text{mmol}$

2.9.2.12.- Citocromo (P-450) Reductasa NADPH

Esta reductasa es una flavoproteína microsómica, que transfiere equivalentes reductores desde el NADPH al citocromo P-450, durante la oxidación de xenobióticos (Holtzman 1979). Como

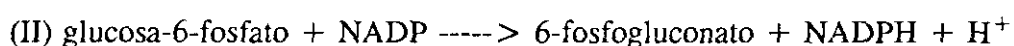
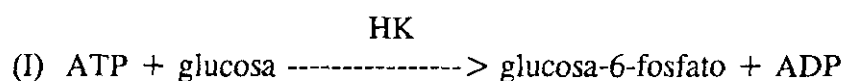
la reducción del citocromo P-450 es difícil de medir directamente, se utiliza normalmente un método que emplea citocromo c exógeno como aceptor de electrones (Schenkman 1972). El principio del ensayo es, que el citocromo c oxidado (Fe^{3+}) se convierte en reducido (Fe^{2+}), el cual alcanza su absorción máxima a 550 nm. Por tanto, la actividad enzimática puede ser evaluada por medida directa del incremento en absorbancia a 550 nm, en función del tiempo. La actividad se mide en un espectrofotómetro termostatzado a 25 °C. Una alícuota de la fracción microsómica, o de la soluble, (25-50 μg de proteína) se incuba en 1ml de tampón Fosfato 0,1 M a pH 7,2, en presencia de 0,1 μmol de EDTA, 50 μmoles de CNK, 0,05 μmol de citocromo c y 0,1 μmol de NADPH. La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción de $20 \times 10^{-3} \text{ M} \times \text{cm}^{-1}$ y los resultados se expresan como nmoles de citocromo C reducido por minuto y por mg de proteína.

2.10.- Determinación de la concentración de metabolitos

La determinación de la concentración de metabolitos se llevó a cabo en extractos hepáticos, obtenidos de hígado de ratón que fueron rápidamente prensados y congelados en nitrógeno líquido y posteriormente tratados con perclórico/etanol, según las técnicas que a continuación se describen para cada uno de ellos.

2.10.1.- ATP

La determinación de ATP, por el método de Trantschold et al (1985), se basa en las reacciones siguientes:



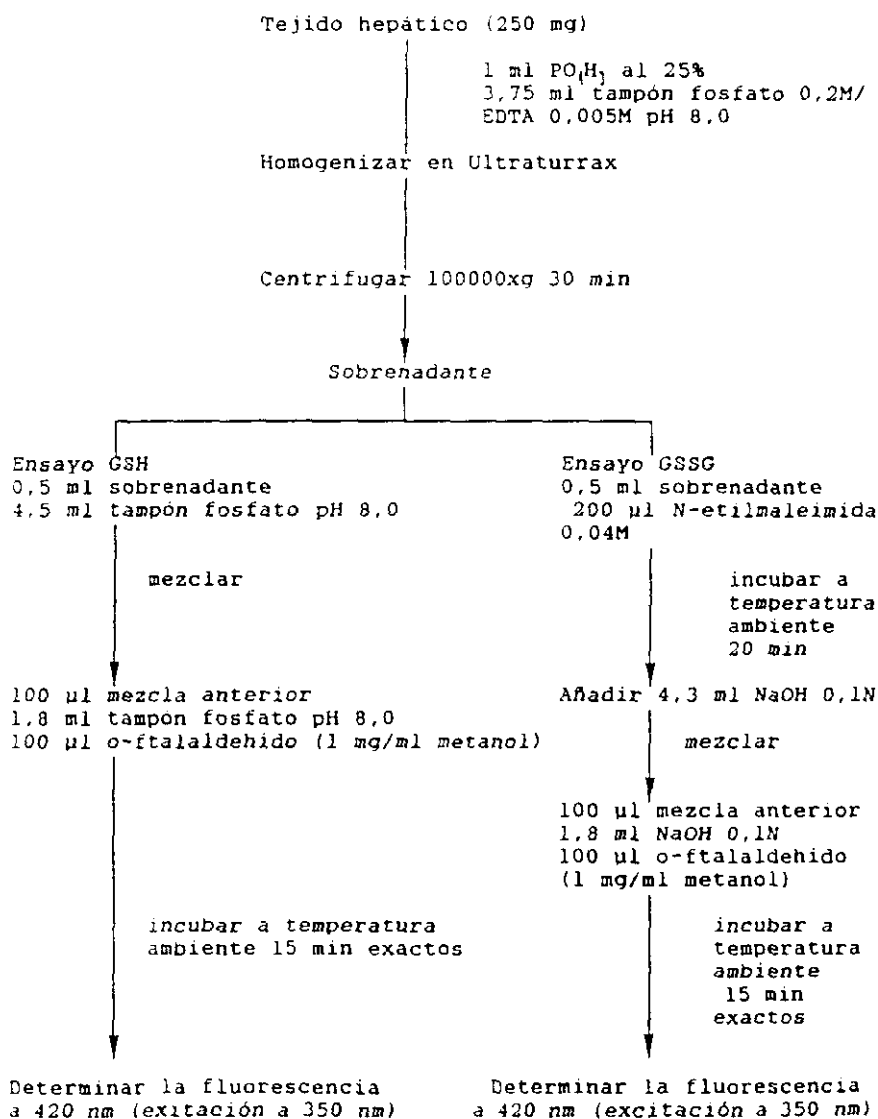
Por cada mol de ATP en la reacción (I), se forma un mol de NADPH, y la concentración de ATP se calcula espectrofotométricamente, de acuerdo con las variaciones en la densidad óptica a 340 nm.

Los reactivos utilizados son:

Tampón Trietanolamina (50 mmol/l, pH 7,5-7,6); NADP 10 mmol/l; Cloruro magnésico (0,1 mol/l); Glucosa (0,5 mol/l); Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH, 140 kU/l); Hexokinasa (HK, 280 kU/l); Acido perclórico (6% p/v); Carbonato potásico (5 mol/l) e Indicador: naranja de metilo.

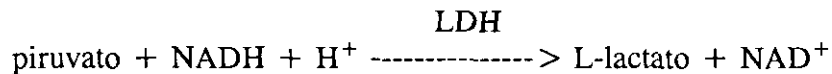
2.10.2.- Glutation reducido, glutacion oxidado y GSH/GSSG

El glutacion total (GSH y GSSG) se determinó siguiendo el método de Hissin y Hilf (1976), evaluando la fluorescencia a 420 nm, producida por el o-ftalaldehído. La reacción se desarrolló de acuerdo con el siguiente esquema:



2.10.3.- Piruvato

La concentración de piruvato se determinó (Lamprecht y Heins 1985), de acuerdo con la siguiente reacción, en la que la cantidad de NAD^+ formada se corresponde proporcionalmente con el piruvato problema:



En solución cercana a la neutralidad, el equilibrio de esta reacción se encuentra desplazado hacia la formación de lactato.

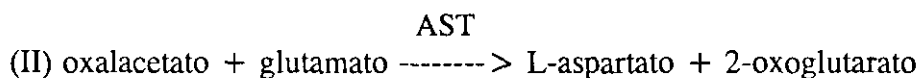
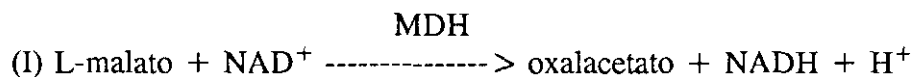
La concentración de piruvato se calcula espectrofotométricamente de acuerdo con la disminución de la densidad óptica a 340 nm.

Los reactivos empleados fueron:

Tampón trietanolamina 0,5 M /EDTA 5 mM a pH 7,6; NADH 7 mM (10 mg/2ml) y LDH

2.10.4.- Malato

Se determinó con malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, según el método de Möllering (1985), en presencia de NAD^+ y glutamato de acuerdo con las reacciones siguientes:



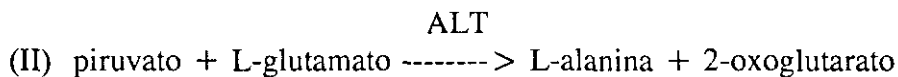
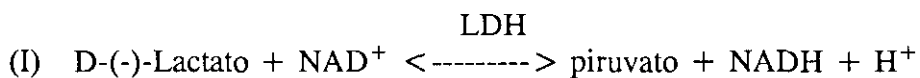
La formación de NADH en la reacción (I) es proporcional a la cantidad de L-malato. Considerando la posición desfavorable del equilibrio de la reacción (I), las determinaciones deben hacerse a pH superior a 9,0 y en presencia de elevadas cantidades de NAD y glutamato. Se aconseja iniciar la reacción con MDH después de la adición de AST, ya que la AST tiene una absorción intrínseca más elevada.

Los reactivos usados fueron:

Tampón glicilglicina/glutamato; NAD⁺ 27 mM (200 mg NAD⁺ en 10 ml de agua); Aspartato aminotransferasa (AST, 2000 U/ml) y Malato deshidrogenasa L-MDH (6000 U/ml).

2.10.5.- Lactato

La concentración de Lactato, se evaluó en extractos de hígado de ratón en las diferentes condiciones, en presencia de lactato deshidrogenasa, NAD⁺, glutamato y alanina aminotransferasa (Gawehn 1985), de acuerdo con las reacciones siguientes:



La cantidad de NADH formado es proporcional a la cantidad de lactato presente en el medio a analizar.

Para conseguir las condiciones óptimas a pesar del equilibrio desfavorable de la reacción (I) hacia la formación de NADH la reacción (II) acoplada a la (I) irá atrapando los productos de la reacción (I) favoreciendo que la reacción se verifique en esta dirección mientras exista lactato. La rapidez de la reacción (I) se verá favorecida también incrementando las concentraciones de glutamato y LDH.

Los reactivos fueron:

Glicilglicina 0,6 M/glutamato 0,1 M a pH 10; NAD⁺ 47 mmol/ml; Alanina aminotransferasa y L-Lactato deshidrogenasa.

2.10.6.- Malondialdehido

El malondialdehido se determinó por el método de Niehaus et al (1969). Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron con 3 ml de ácido tricloracético al 0,1 %. Después de centrifugar a 15.000 xg durante 10 minutos, 0,5 ml del sobrenadante se incubaron con 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5 % en ácido tricloracético al 20 %, a 90 °C en baño de agitación, durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se paró la reacción poniendo los tubos en baño de hielo. Tras centrifugar a 10.000 xg durante 5 minutos, se midió en el sobrenadante la densidad óptica a 532 nm.

2.10.7.- Glucógeno

La concentración de glucógeno en extractos hepáticos se determinó por el método de Carrol et al (1956), de acuerdo con el siguiente protocolo:

Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron con 5 ml de ácido tricloracético al 5 %, durante 3 minutos. Se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos, se extrajo el sobrenadante decantando, y el resto se volvió a homogenizar con 5 ml de ácido tricloracético al 5 % durante otros 3 minutos y se centrifugó, otra vez, a 4.000 rpm durante 15 minutos, extrayendo de nuevo el sobrenadante. A 1 ml de este extracto hepático se le adicionaron 5 ml de etanol al 95 % y la mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas. Después de centrifugar (15 minutos a 2000 xg), de eliminar el sobrenadante y de lavar con agua el precipitado, se añadió a éste 2 ml de reactivo de antrona. La muestra se calentó durante 15 minutos en baño hirviendo y se midieron las absorbancias a 620 nm frente a un patrón de glucosa.

2.11.- Determinación de proteínas

Las proteínas solubles, microsómicas y mitocondriales, se evaluaron por el método de Bradford (1976), en las diferentes fracciones subcelulares, utilizando albúmina de suero bovino como patrón y reactivo de Coomasie. Los cambios de absorción a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

2.12.- Análisis de poblaciones de hepatocitos por citometría de flujo

Una vez aislados los hepatocitos, tanto adultos como fetales, se procedió a su tratamiento con yoduro de propidio para estudiar las variaciones en el DNA celular en poblaciones hepatocelulares. Estas variaciones se consideran de gran precisión para determinar la cito y la genotoxicidad de xenobióticos.

2.12.1.- Determinación del contenido y distribución del DNA genómico.

Las células se analizaron utilizando un test suministrado por Becton Dickinson basado en el método de Vindelov et al (1983). Con los hepatocitos, una vez aislados y lavados, se procedió de la forma siguiente:

A 100 μ l de cada una de las muestras de los hepatocitos, se les añadió 0,9 ml de una solución A: (15 mg de tripsina se disolvieron en 500 ml de una solución stock, preparada de la siguiente manera: 2 g de citrato trisódico (3,4 mM), 2 ml de Nonidet P₄₀ (0,1 %, v/v), tetrahidrocloruro de espermina (1,5 mM) y 121 mg de Tris (hidroximetil)aminometano (0,5 mM), se disolvieron en 2000 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7,6).

Los tubos se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,75 ml de una solución B: (250 mg de inhibidor de tripsina y 50 mg de Ribonucleasa A, se disolvieron en 500 ml de la solución stock A y se ajustó el pH a 7,6). Los tubos se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0,75 ml de una solución C: (208 mg de yoduro de propidio y

580 mg de tetrahidrocloruro de espermina, se disolvieron en 500 ml de la solución stock A y se ajustó el pH a 7,6). La solución se protegió de la luz durante toda la determinación.

Los tubos protegidos de la luz con papel de aluminio se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mantuvieron en baño de hielo hasta el análisis por citometría de flujo.

3.- RESULTADOS

3.1.- Seguimiento de los pesos corporal y hepático de los ratones después de la administración de la cocaína

Los ratones, procedentes de Interfauna Ibérica, S.A. (Barcelona), pesaban en el momento de la recepción $21,7 \pm 1,1$ g y se mantuvieron durante todo el período de cuarentena en condiciones ambientales constantes: temperatura 22 ± 2 °C, humedad relativa de 50 ± 5 % y ciclos luz/oscuridad de 12 horas. Todos los lotes de ratones fueron sometidos diariamente a un control de peso corporal. Los animales *control* y los tratados tanto con *fenobarbital* como con *cocaína* y *cocaína + fenobarbital*, se mantuvieron en jaulas separadas. Una vez sacrificados los ratones y separado el hígado, se pesó este órgano para obtener el cociente peso hígado/peso cuerpo, valor indicativo de hipertrofia hepática.

En la Tabla 1, se puede observar la variación del peso corporal en ratones control, tratados con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg), en el período comprendido entre 0 y 96 horas. En la Figura 1, se muestran los resultados del peso corporal durante el tratamiento. Las diferencias entre los lotes *control*, *cocaína* y *fenobarbital + cocaína* no fueron significativas.

En la Tabla 2, se representan los valores de la evolución del cociente peso hígado/peso cuerpo, en ratones tratados y no tratados con fenobarbital, desde la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) en el período comprendido entre 0 y 96 horas. En la Figura 2, se presentan los resultados obtenidos para el cociente peso hígado/peso cuerpo. Los valores muestran un incremento significativo de este cociente que se debe a una hipertrofia marcada a las 48 horas de la inyección de cocaína, en el lote de ratones pretratados con fenobarbital, llegando a recuperarse a las 96 horas del tratamiento. Los resultados son en todos los casos media de cuatro animales.

TIEMPO (horas)	CONTROL	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	35,63 ± 0,87 (100)	35,55 ± 2,46 (100)	34,36 ± 1,25 (96)
24	35,46 ± 1,34 (99)	33,48 ± 2,66 (94)	33,15 ± 2,06 (93)
48	35,90 ± 1,58 (101)	34,93 ± 2,24 (98)	33,78 ± 2,26 (95)
72	35,48 ± 1,91 (99)	34,96 ± 3,16 (98)	34,00 ± 2,49 (95)
96	36,13 ± 2,04 (101)	35,62 ± 3,80 (100)	34,41 ± 2,64 (97)

Tabla 1.- Relación de la variación de peso corporal a ratones control, tratados y no tratados con fenobarbital con el tiempo transcurrido desde la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg).

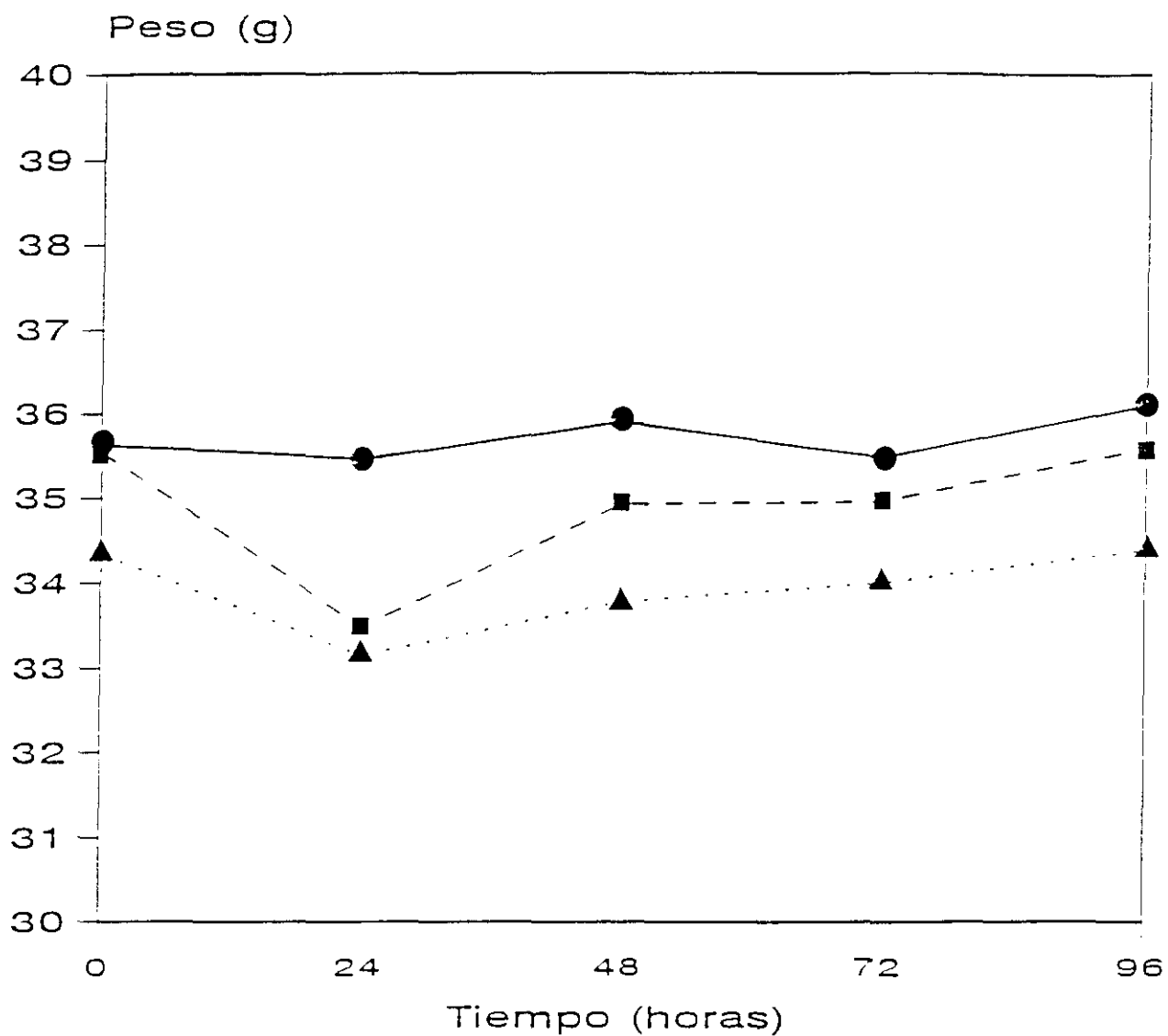


Figura 1.- Relación de la variación de peso corporal en ratones control, tratados y no tratados con fenobarbital, con el tiempo transcurrido desde la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg).

●—● Control. ■-----■ Cocaína. ▲-----▲ Fenobarbital + Cocaína.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	67,58 ± 4,5 (100)	77,60 ± 13,2 (115)
12	59,32 ± 10,6 (88)	86,80 ± 4,2 (128)
24	67,34 ± 9,7 (100)	90,00 ± 8,7 (133)
48	64,32 ± 6,2 (95)	98,40 ± 9,2 (146)*
72	59,78 ± 2,8 (88)	70,00 ± 7,0 (104)
96	60,76 ± 3,9 (90)	64,80 ± 1,8 (96)

Tabla 2.- Evolución del cociente peso hígado/peso cuerpo en ratones desde la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital. Los valores se calcularon como peso hígado (g)/peso corporal (g) x 10³. *p < 0,001.

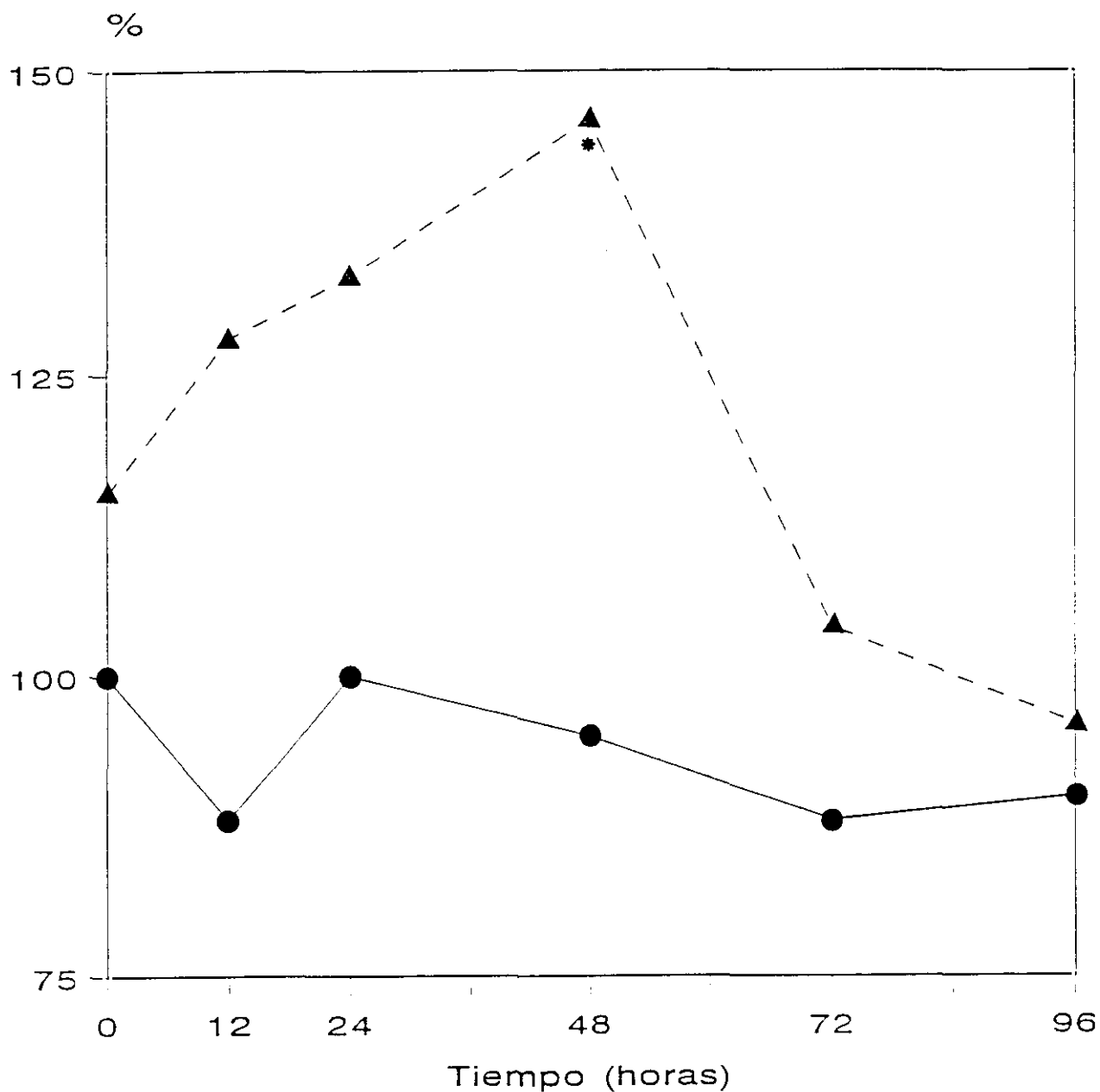


Figura 2.- Evolución del cociente peso hígado/peso cuerpo en ratones desde la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.2.- Parámetros séricos determinantes de necrosis hepática

Uno de los síntomas clínicos de la patología hepática es la aparición en suero sanguíneo de enzimas procedentes de la rotura de los hepatocitos en el proceso de necrosis. Los hepatocitos necrosados vierten su contenido celular al torrente circulatorio y ésta es la causa de que aquellos enzimas más abundantes en la célula funcional hepática aparezcan muy elevados en el suero. Entre estos enzimas hay que destacar las aspartato y alanina aminotransferasas y la isocitrato deshidrogenasa, cuyas actividades séricas se utilizan como determinantes del grado de necrosis hepática en casos de intoxicación o infección.

3.2.1.- Niveles en las aspartato y alanina aminotransferasas

La actividad de la aspartato aminotransferasa (ASPT) se determinó en suero de ratones obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca en ratones anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg peso corporal). Los resultados se expresan en nmoles de sustrato transformados por minuto y por ml de suero a 25 °C y son media de 4 determinaciones experimentales diferentes. En la Figura 3, se muestra la representación gráfica de esta actividad. El máximo de actividad se registró en la muestra de suero obtenida a las 12 horas de la administración de cocaína en el lote de ratones tratados con fenobarbital y a las 24 horas en los animales que recibieron sólo cocaína. Ambos momentos coinciden con el punto máximo de necrosis. En el grupo pretratado con fenobarbital se registra una segunda subida de esta actividad enzimática, que presenta su máximo a las 72 horas del tratamiento con cocaína. Esta segunda subida no aparece en suero de animales tratados sólo con cocaína.

En la Tabla 3 se muestran los valores en tanto por ciento que se corresponden con la Figura 3.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	52 ± 6 (100)	69 ± 3 (133)
12	101 ± 11 (194)*	223 ± 3 (429)*
24	159 ± 18 (306)*	104 ± 2 (200)*
48	70 ± 1 (134)	109 ± 2 (210)*
72	43 ± 5 (83)	156 ± 2 (300)*
96	39 ± 4 (75)	104 ± 2 (200)*

Tabla 3.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la aspartato aminotransferasa sérica. Las muestras de suero se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por ml de suero, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

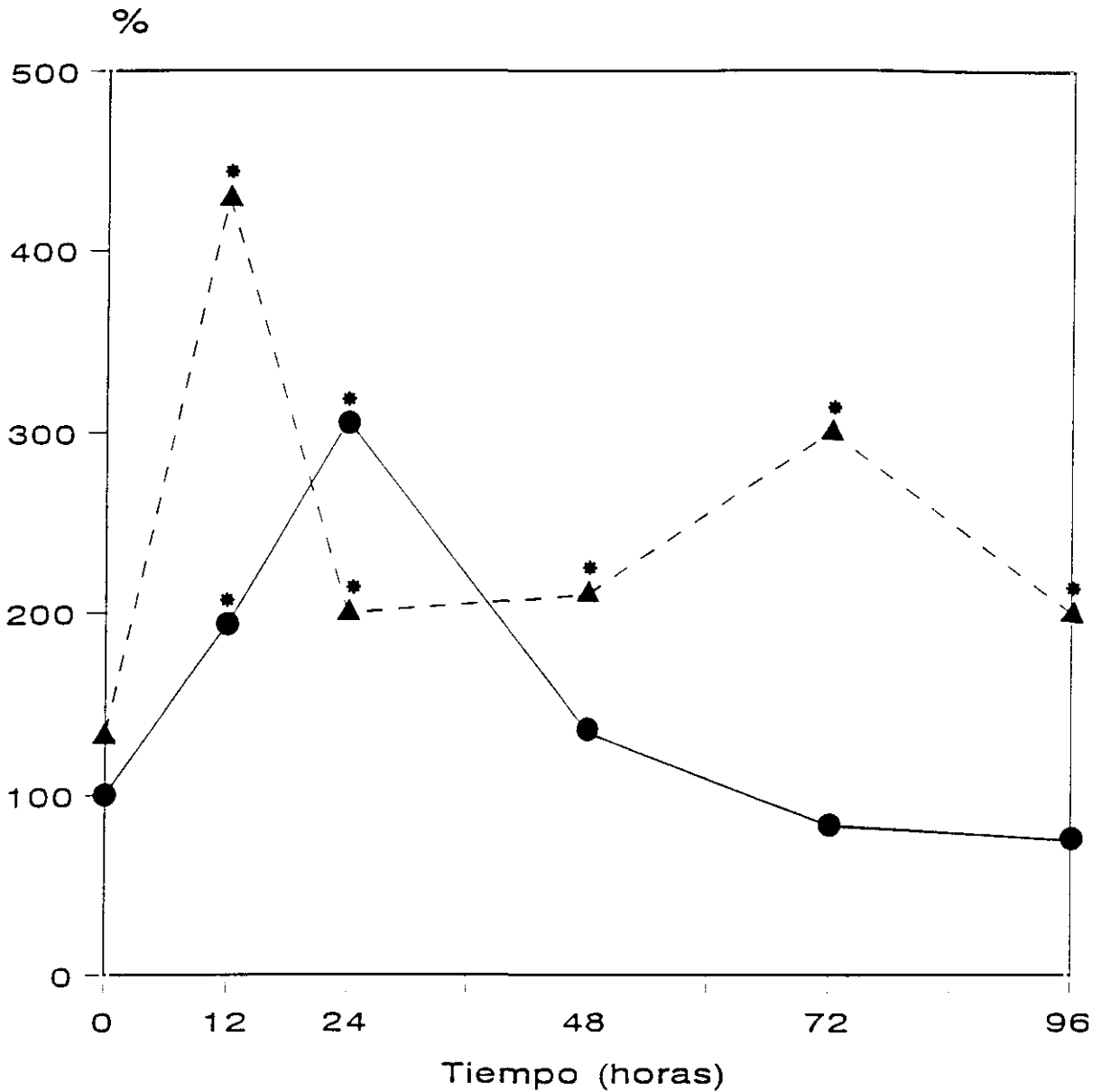


Figura 3.- Actividad de la aspartato aminotransferasa en suero de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/ml se muestran en la Tabla 3.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

Al igual que la aspartato aminotransferasa, la actividad de la alanina aminotransferasa (ALAT) se determinó en suero de ratones obtenido a distintos tiempos después de un tratamiento con fenobarbital y/o una inyección subletal de cocaína (60 mg/Kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca de ratones anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg de peso corporal) se tomaron a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración de la cocaína.

Los resultados se expresan en nmoles/min/ml de sustrato transformado a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes. Su representación gráfica se muestran en la Figura 4.

El punto máximo de actividad se registró a las 12 horas de la administración de cocaína a los ratones pretratados con fenobarbital y a las 24 horas en los animales que recibieron sólo cocaína, este momento coincide con el máximo de necrosis.

En el grupo pretratado con fenobarbital, se registra una segunda subida de esta actividad enzimática, que presenta su máximo a las 72 horas del tratamiento con cocaína. Esta segunda subida no aparece en suero de animales tratados sólo con cocaína.

En la Tabla 4 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 4.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	23 ± 4 (100)	18 ± 2 (78)
12	71 ± 1 (308)*	215 ± 3 (935)*
24	141 ± 2 (613)*	60 ± 7 (260)*
48	35 ± 4 (152)*	80 ± 7 (348)*
72	21 ± 3 (91)	115 ± 10 (500)*
96	20 ± 3 (87)	90 ± 10 (391)*

Tabla 4.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la alanina aminotransferasa sérica. Las muestras de suero se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por ml de suero, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

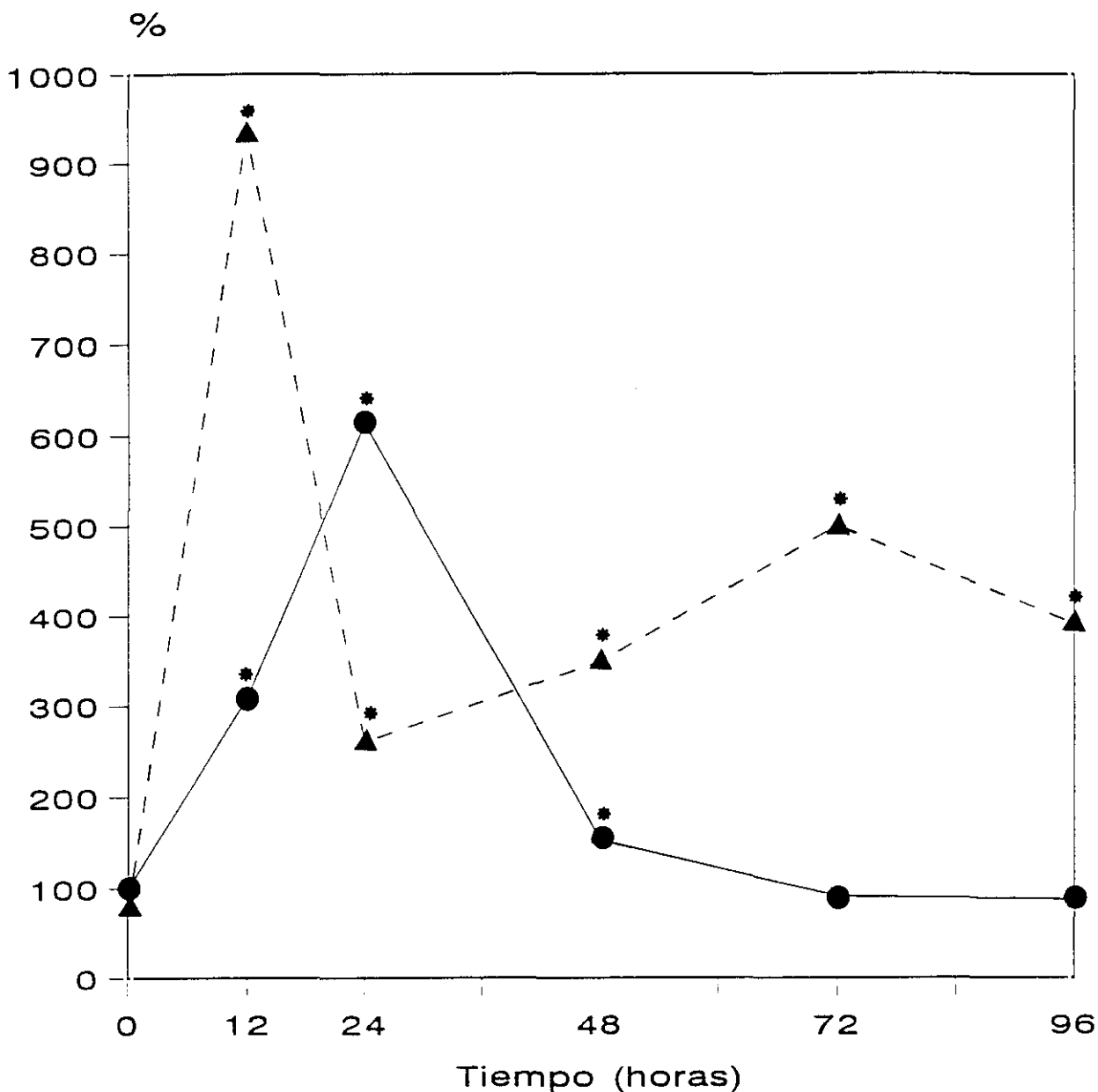


Figura 4.- Actividad de la alanina aminotransferasa en suero de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/ml de suero se muestran en la Tabla 4.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.2.2.- Niveles de la isocitrato deshidrogenasa

La actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente del NADP^+ es otro de los parámetros considerado como marcador de necrosis hepática. Esta actividad se determinó en muestras de suero sanguíneo obtenido por punción cardíaca de ratones anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg de peso corporal) se tomaron a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración de la cocaína.

Los resultados se expresan en nmoles de sustrato transformado por minuto a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes. Su representación gráfica se muestra en la Figura 5.

El punto máximo de actividad se registró a las 12 horas de la administración de cocaína a los ratones pretratados con fenobarbital y a las 24 horas en los animales que recibieron sólo cocaína, que coincide con el momento de máxima necrosis. En el grupo pretratado con fenobarbital, se registra una segunda subida de esta actividad enzimática, que presenta su máximo a las 72 horas del tratamiento con cocaína. Esta segunda subida no aparece en suero de animales tratados sólo con cocaína.

En la Tabla 5 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 5.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	12 ± 1 (100)	9 ± 1 (75)
12	79 ± 8 (658) *	421 ± 45 (3433) *
24	114 ± 12 (1343) *	66 ± 6 (546) *
48	24 ± 3 (198) *	103 ± 10 (860) *
72	9 ± 1 (75)	117 ± 13 (980) *
96	7 ± 1 (58)	105 ± 12 (875) *

Tabla 5.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la isocitrato deshidrogenasa sérica. Las muestras de suero se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de la cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por ml de suero, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

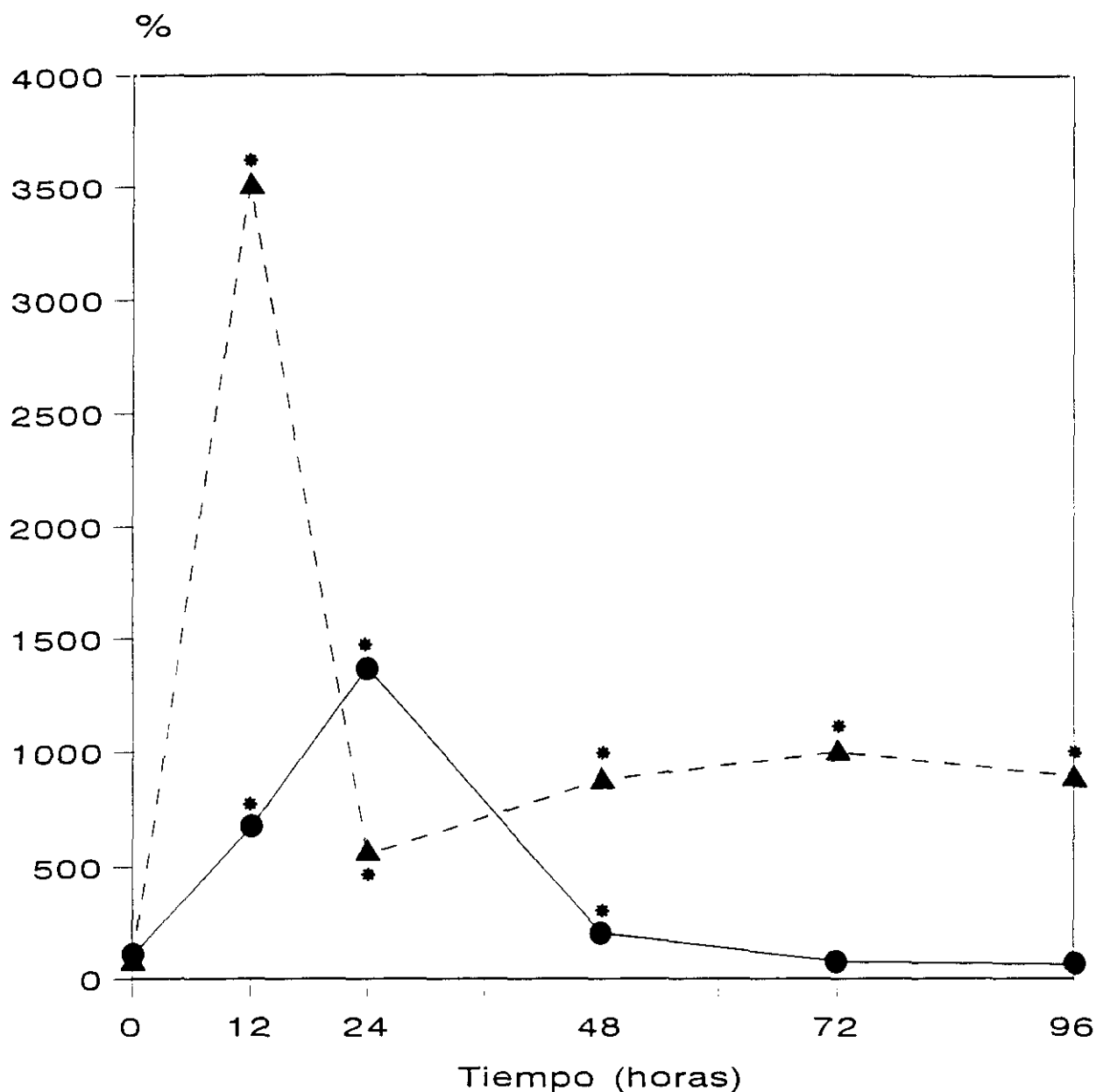


Figura 5.- Actividad de la isocitrato deshidrogenasa en suero de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/ml de suero se muestran en la Tabla 5.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.3.- Parámetros determinantes de lesión hepática

Existen una serie de parámetros hepáticos cuya determinación es muy útil a la hora de diagnosticar las lesiones a este nivel. La lesión hepática inducida por cocaína y fenobarbital + cocaína se origina por la rápida biotransformación de esta droga, la cual a través de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 origina metabolitos electrofílicos que reaccionan por unión covalente con macromoléculas, principalmente aquellas que corresponden a la fracción protéica nuclear (Benuck et al 1989, Rauckman et al 1981).

Entre los parámetros determinantes de lesión hepática, se han evaluado en el presente trabajo la actividad enzimática de la gamma-glutamyl transferasa en suero y la actividad de la glutathion S-transferasa en la fracción soluble de homogenados hepáticos, junto con las concentraciones de ATP en homogenados hepáticos y las concentraciones de glutathion reducido, oxidado y el cociente GSH/GSSG. Se ha evaluado también la concentración de malondialdehído, como indicativa del grado de peroxidación lipídica, originado en el proceso hepatotóxico y cuya elevación demuestra la alteración por peroxidación de los lípidos de las membranas celulares que, puede llegar a conducir a la desintegración y rotura de dichas membranas y a la muerte celular (Chien et al 1977).

3.3.1.- Alteraciones de la actividad sérica de la gamma-glutamyl transferasa

La actividad gamma-glutamyl transferasa, enzima extrahepático encargado de la degradación del glutatión (Mannervik 1985), suele encontrarse elevada en casos de enfermedad hepática obstructiva (hepatobiliar), intoxicación etílica y hepatocarcinogenesis (Cascales et al 1991). Este enzima se determinó en suero de ratones obtenido a distintos tiempos después del tratatamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca en ratones anestesiados con Nembutal (50 mg/Kg peso corporal), se centrifugaron a 3000 r.p.m. para separar el suero. Los resultados se expresan en μ moles de sustrato (gamma-glutamyl p-nitroanilida) transformados por minuto a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes. Su representación gráfica se muestra en la Figura 6.

La actividad GGT ascendió paulatinamente a partir de las 12 horas de la inyección de cocaína, mostrando su punto de actividad máxima a las 96 horas, en ambos lotes de ratones (cocaína y fenobarbital + cocaína), con valores muy superiores al control. El incremento de la actividad GGT fue más temprano en ratones pretratados con fenobarbital. Las actividades se mantienen elevadas a las 96 horas, lo que indica que aún continua la lesión hepática.

En la Tabla 6 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 6.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	27 ± 3 (100)	25 ± 3 (93)
12	35 ± 4 (130)	49 ± 6 (181)*
24	40 ± 5 (148)	55 ± 6 (204)*
48	51 ± 4 (189)*	57 ± 6 (211)*
72	57 ± 7 (211)*	57 ± 8 (211)*
96	62 ± 7 (230)*	62 ± 7 (230)*

Tabla 6.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la gamma-glutamil transferasa sérica. Las muestras de suero se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como μ moles de nitroanilida/min transformados a 25 °C por minuto y por ml de suero, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$).

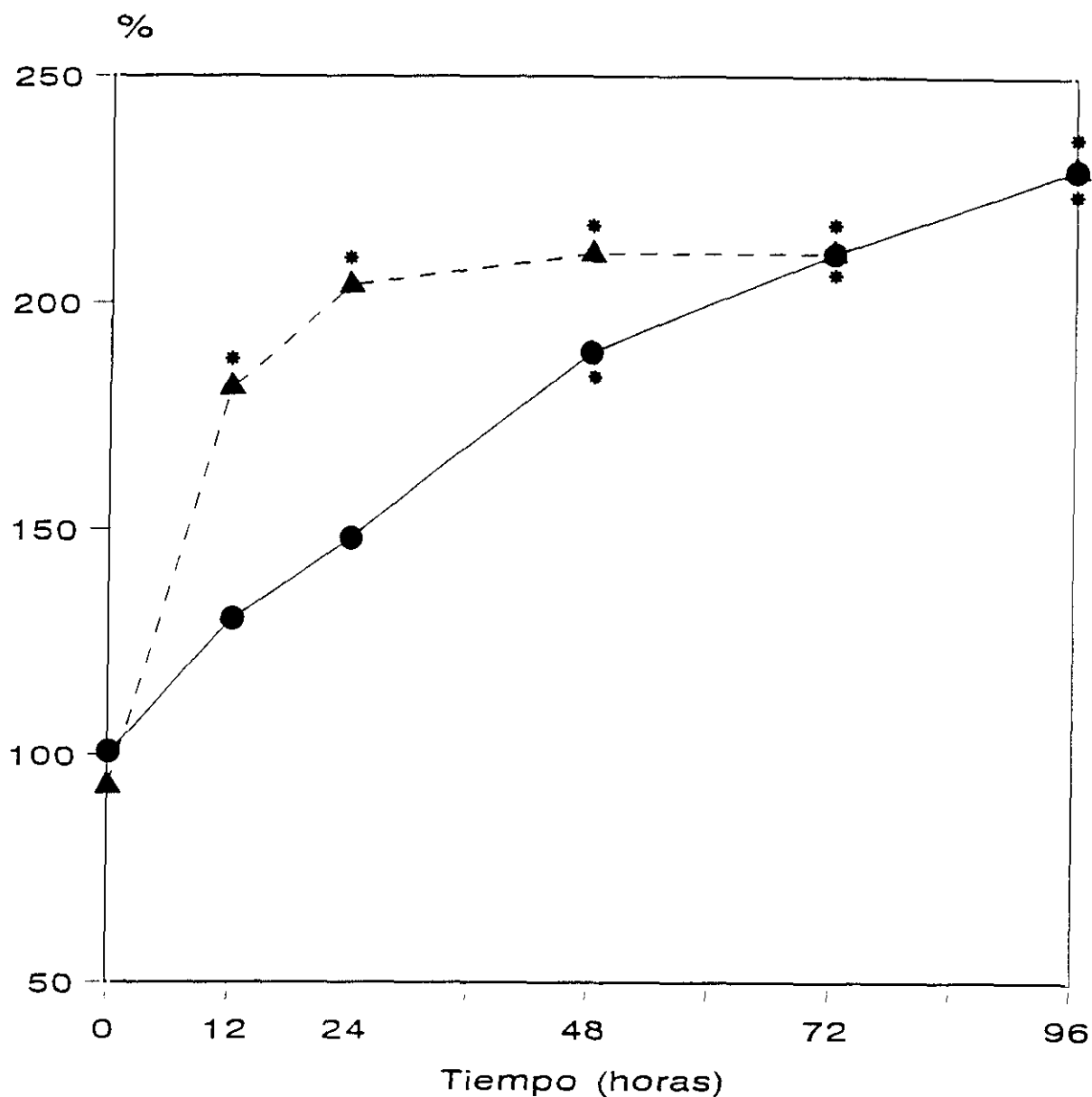


Figura 6.- Actividad de la gamma-glutamyl transferasa en suero de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ de suero se muestran en la Tabla 6.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.3.2.- Actividad glutatión S-transferasa en fracción soluble de homogenados hepáticos

La importancia de las reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas se basan en que el átomo de azufre del GSH proporciona los electrones para el ataque nucleofílico del sustrato electrofílico. La elevación de las glutatión S-transferasas en caso de intoxicación puede ser una de las causas de la depleción del glutatión.

La actividad GST se determinó en la fracción soluble de hígado de ratones obtenida a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y se expresan como μ moles de GSH conjugado por minuto a 25 °C por mg de proteína.

En la Figura 7 se puede ver que la actividad GST se aumentó paulatinamente hasta las 24 horas manteniéndose este aumento hasta las 96 horas. Los máximos de actividad GST son más tempranos que los de los enzimas marcadores de necrosis.

En la Tabla 7 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 7.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	32 ± 4 (100)	58 ± 6 (181)*
12	40 ± 5 (125)	65 ± 7 (203)*
24	43 ± 5 (134)	64 ± 6 (200)*
48	45 ± 5 (140)	64 ± 6 (200)*
72	46 ± 5 (143)	65 ± 6 (203)*
96	45 ± 4 (140)	65 ± 7 (203)*

Tabla 7.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la glutatión S-transferasa en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

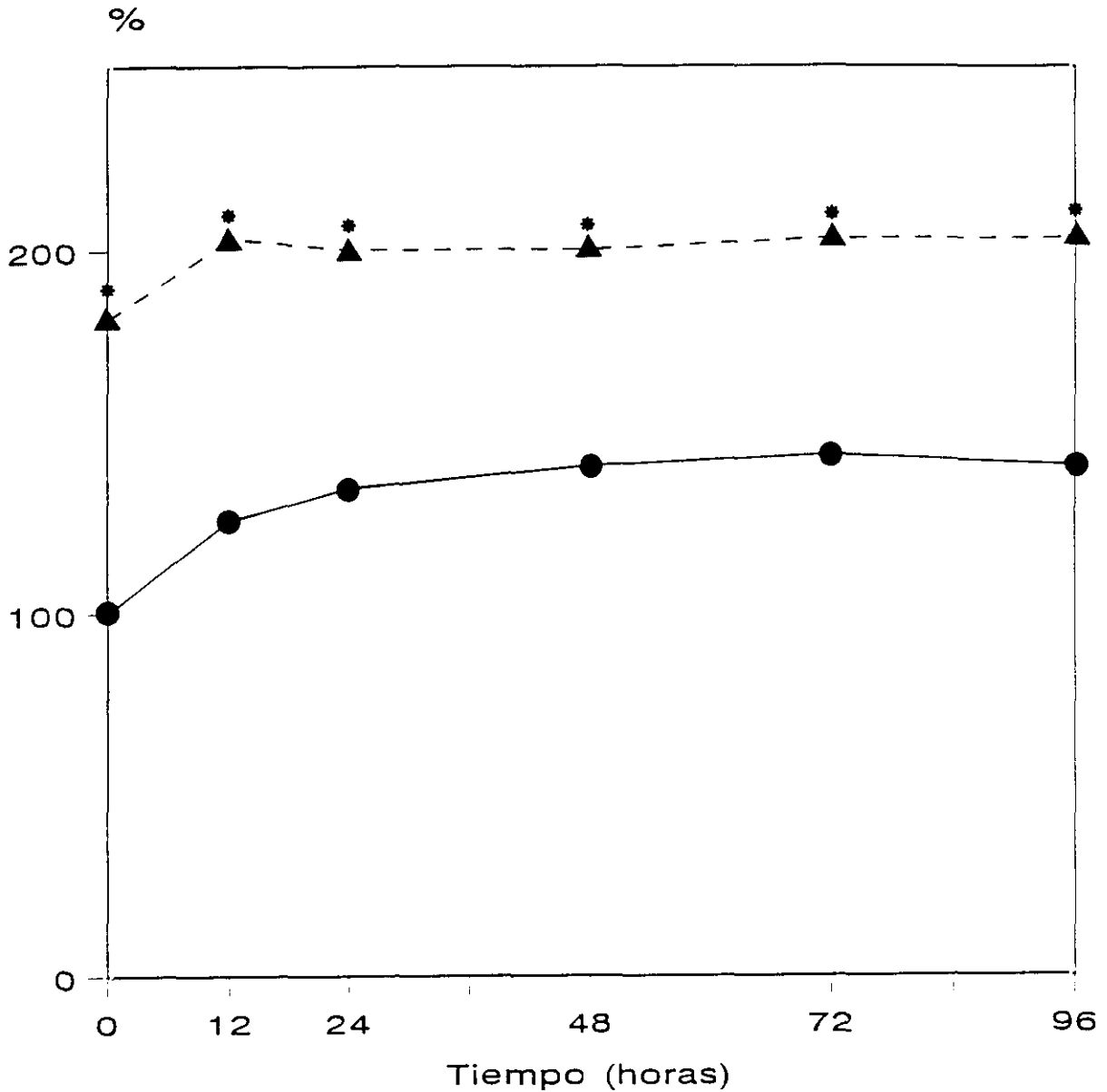


Figura 7.- Actividad de la glutathione S-transferasa en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína, se muestran en la Tabla 7.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.3.3.- Concentración de ATP en homogenados hepáticos

La concentración de ATP se determinó en extractos hepáticos de ratones obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Los extractos hepáticos se prepararon en ácido perclórico 0,5 M-etanol 20 %, después de prensar rápidamente el hígado en nitrógeno líquido.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y se expresan en ng/g de hígado.

En la Figura 8 se observa que la concentración de ATP tiene una caída significativa a las 12 horas del tratamiento recuperándose paulatinamente hasta las 96 horas en donde presenta unos valores casi iguales al valor control (0 horas). En el grupo pretratado con fenobarbital los valores iniciales de ATP fueron muy bajos.

En la Tabla 8 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 8.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	2,8 ± 0,3 (100)	1,6 ± 0,2 (57) *
12	1,6 ± 0,2 (57) *	0,8 ± 0,1 (28) *
24	1,6 ± 0,1 (57) *	0,9 ± 0,1 (32) *
48	1,7 ± 0,2 (60) *	1,4 ± 0,2 (50) *
72	2,2 ± 0,2 (78)	2,1 ± 0,2 (75)
96	2,7 ± 0,3 (96)	2,6 ± 0,3 (92)

Tabla 8.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de ATP en la fracción microsómica de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

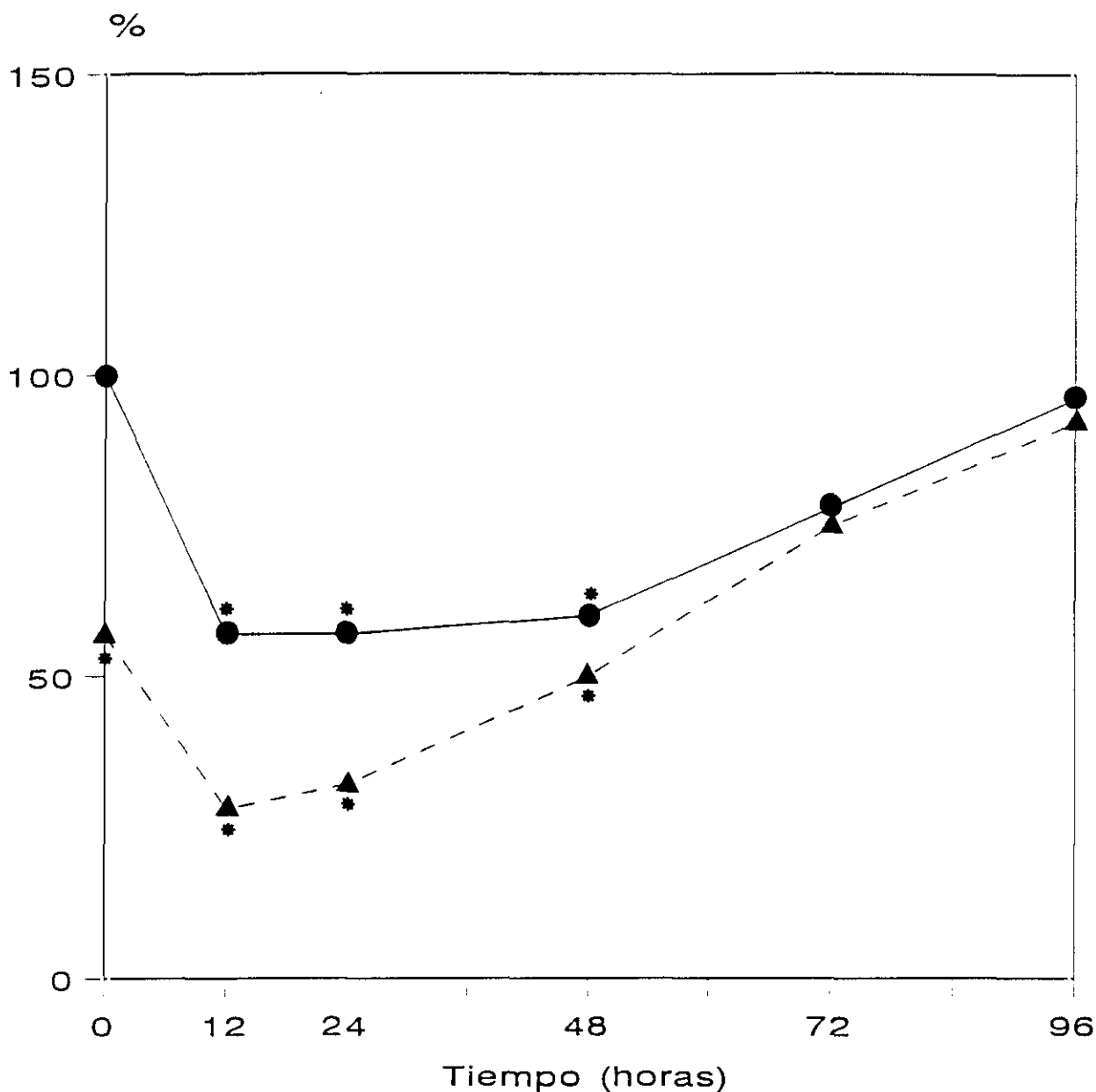


Figura 8.- Concentración de ATP en la fracción microsómica de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en ng/g de hígado se muestran en la Tabla 8.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.3.4.- Glutation reducido y oxidado y GSH/GSSG

Las reacciones de detoxificación consumen el GSH hepático a la vez que promueven una activación compensatoria de la síntesis del GSH (Lauterburg y Smith 1986). Sin embargo, en caso de intoxicación masiva, la velocidad de consumición del GSH en hígado puede sobrepasar la de su síntesis y ello llevará consigo a un agotamiento del glutatión hepático.

Se ha determinado el glutatión reducido, oxidado y el cociente GSH/GSSG en extractos hepáticos de ratones obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y se expresan en nmol/g de hígado.

La concentración de glutatión reducido experimentó una débil bajada a las 12 horas de la administración de la cocaína manteniéndose dicha bajada en tanto que en los ratones que recibieron cocaína + fenobarbital dicha bajada se incremento a las 24 horas (Figura 9A). En el caso del glutatión oxidado se puede observar un brusco descenso en el lote que recibió cocaína + fenobarbital que partió de concentraciones iniciales muy elevadas, mientras que en los ratones que fueron inyectados con cocaína se observa un aumento significativo que se mantiene a lo largo de las 96 horas (Figura 9B).

Respecto al cociente GSH/GSSG hay que destacar, que aún cuando ambos lotes parten de valores iniciales muy diferentes, el valor de este cociente se mantiene disminuído en los dos grupos durante el período de 12 a 96 horas, desmostrando con ello que el estrés oxidativo permanece a las 96 horas de la administración de cocaína (Figura 9C).

En las Tablas 9A, 9B y 9C se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 9.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	3900 ± 410 (100)	3510 ± 400 (90)
12	3460 ± 410 (89)	3240 ± 350 (83)
24	3340 ± 380 (86)	2380 ± 340 (61)*
48	3300 ± 380 (85)	2180 ± 300 (56)*
72	3390 ± 390 (87)	2260 ± 250 (58)*
96	3120 ± 350 (80)	2180 ± 260 (56)*

Tabla 9A.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de glutathion reducido (GSH), en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	284 ± 31 (100)	586 ± 60 (206)*
12	411 ± 46 (145)*	400 ± 42 (141)*
24	408 ± 42 (143)*	272 ± 30 (96)
48	425 ± 46 (149)*	263 ± 30 (93)
72	351 ± 38 (124)	303 ± 31 (107)
96	317 ± 38 (126)	314 ± 34 (111)

Tabla 9B.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de glutatión oxidado (GSSG) en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	13,7 ± 1,5 (100)	5,99 ± 0,6 (44)*
12	8,41 ± 0,9 (61)*	8,10 ± 0,8 (59)*
24	8,17 ± 0,9 (60)*	8,80 ± 0,9 (64)*
48	7,76 ± 0,8 (57)*	8,30 ± 0,9 (60)*
72	9,66 ± 1,0 (70)*	7,46 ± 0,8 (54)*
96	8,74 ± 1,0 (63)*	6,94 ± 0,8 (51)*

Tabla 9C.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de GSH/GSSG en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados obtenidos a partir del cociente GSH/GSSG son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p<0,001).

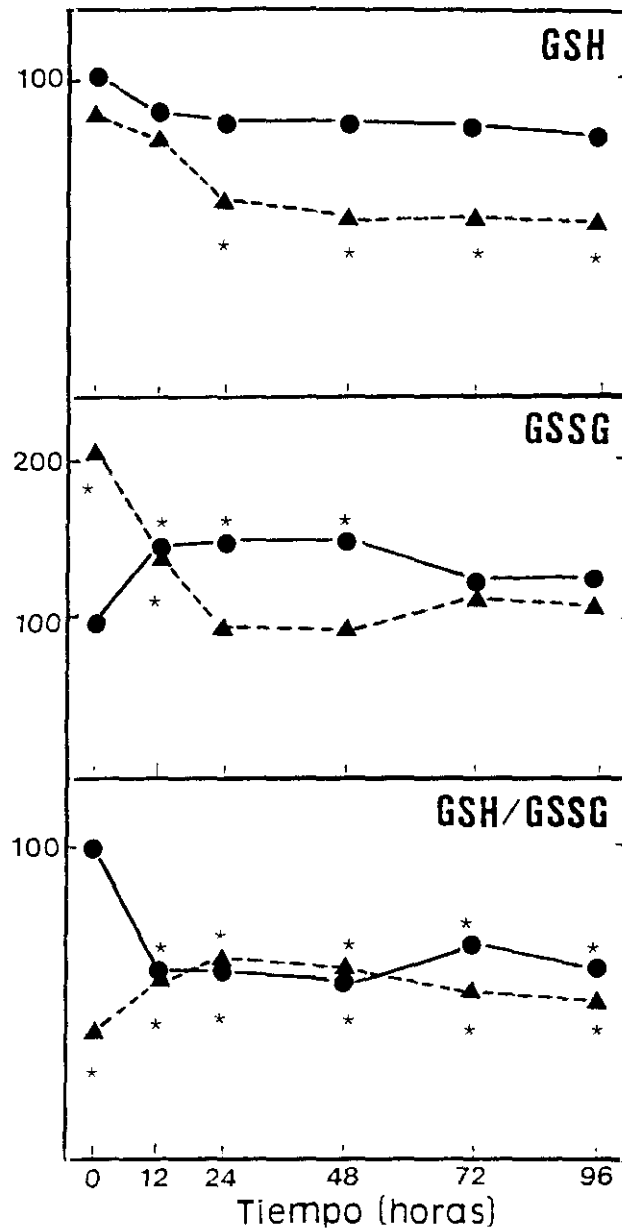


Figura 9.- Concentración de GSH y GSSG y cociente GSH/GSSG en extractos de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmol/g de hígado se muestran en las Tablas 9A y 9B. En la Tabla 9C se muestran los valores del cociente GSH/GSSG.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.3.5.- Concentración de malondialdehido

El malondialdehido es un producto derivado de la rotura de las membranas por peroxidación lipídica. Por tanto, la determinación de este metabolito proporciona un índice de la peroxidación lipídica, producida por los intermediarios reactivos originados en la biotransformación de hepatotóxicos. En la Figura 10 se muestra la concentración de malondialdehido en homogenados de hígado de ratones, obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Los valores iniciales muy elevados por efecto del fenobarbital favorecen la notabilísima subida producida por la cocaína a las 12 horas. El incremento debido sólo a la cocaína, con un máximo del 147 % a las 24 horas, es similar al producido por otras hepatotoxinas (Díez-Fernández et al 1992a).

En la Tabla 10 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 10.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	5,16 ± 0,6 (100)	10,32 ± 1,2 (200) *
12	6,32 ± 0,7 (123)	20,12 ± 2,2 (390) *
24	7,58 ± 0,7 (147)	17,66 ± 2,0 (342) *
48	6,86 ± 0,7 (133)	12,38 ± 1,5 (240) *
72	6,19 ± 0,7 (120)	7,74 ± 0,8 (150)
96	5,30 ± 0,6 (103)	8,61 ± 0,9 (167)

Tabla 10.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de Malondialdehído en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

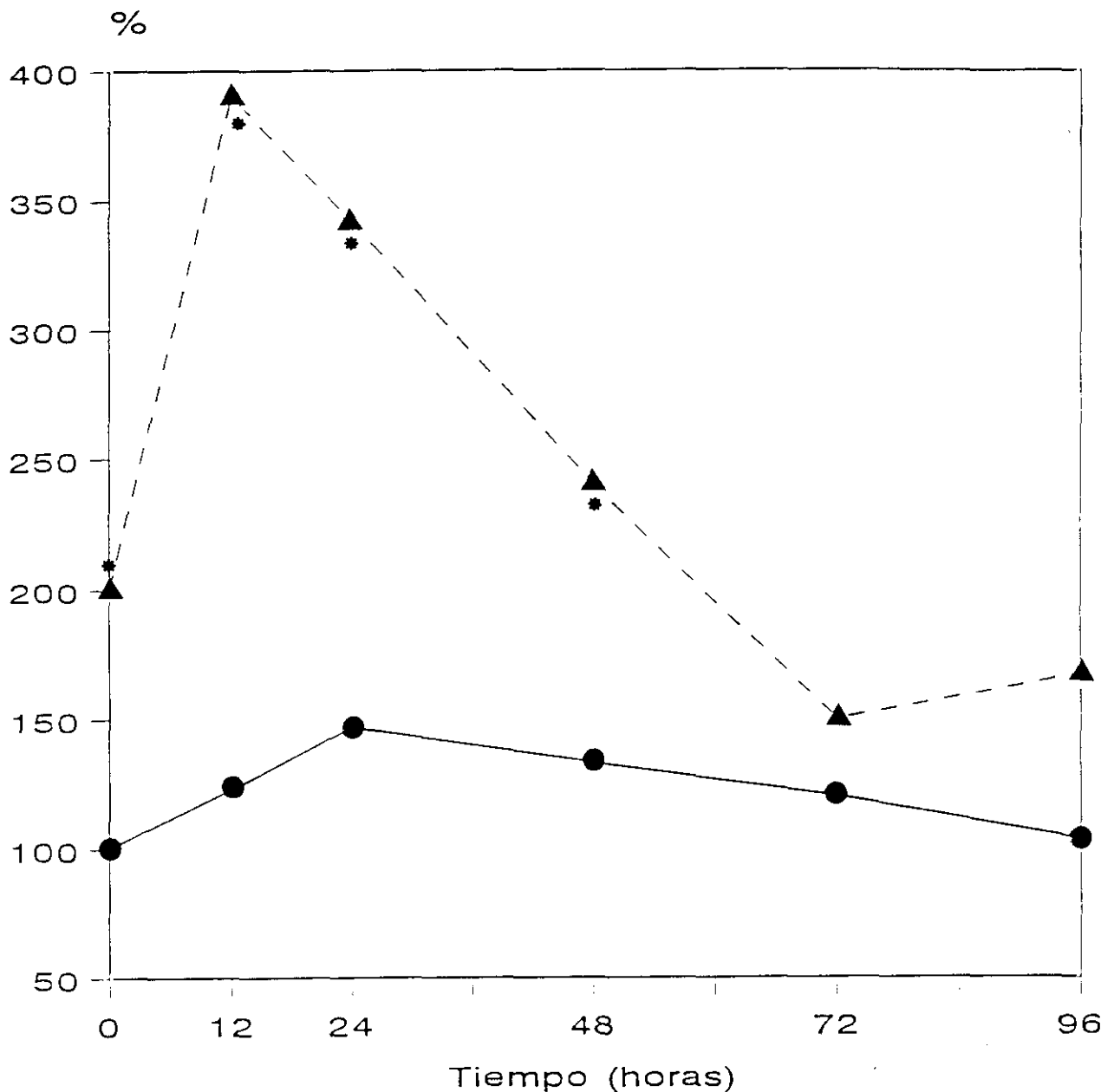


Figura 10.- Concentración de Malondialdehído en extractos hepáticos de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmol/g de hígado se muestran en la Tabla 10.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.4.- Actividades enzimáticas que generan NADPH en fracción soluble de homogenados hepáticos

En este capítulo se incluyen las actividades enzimáticas generadoras de NADPH en fracciones solubles de homogenados hepáticos de ratones albinos Swiss. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal) en ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

3.4.1.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

En la Figura 11 se muestra la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la fracción soluble de homogenados de hígado de ratones obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

La G-6-PDH es el primer enzima del ciclo de las pentosas fosfato que se activan en condiciones fisiológicas en las que se requiere NADPH (lipogénesis, síntesis de ácidos nucleicos y procesos de desintoxicación). La cocaína produce un descenso significativo, que se mantiene en el período que fluctua entre las 12 y las 48 horas, mientras que en el grupo pretratado con fenobarbital las variaciones no son significativas.

En la Tabla 11 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 11.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	39 ± 5 (100)	29 ± 3 (74)
12	23 ± 3 (58) *	42 ± 5 (108)
24	24 ± 3 (61) *	39 ± 4 (100)
48	25 ± 3 (64) *	37 ± 5 (94)
72	40 ± 5 (102)	36 ± 4 (92)
96	39 ± 4 (100)	27 ± 3 (69)

Tabla 11.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

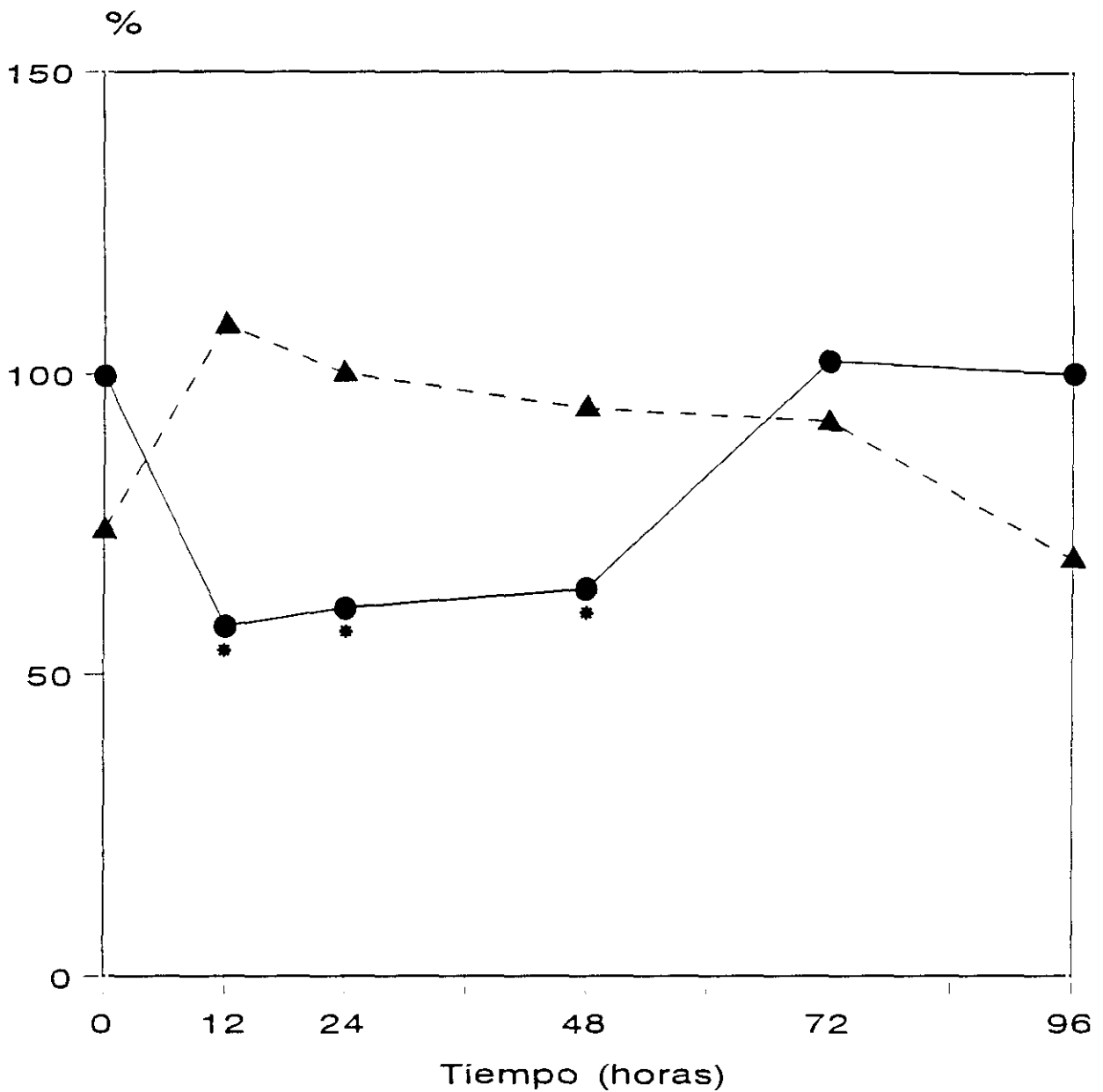


Figura 11.- Actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 11.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.4.2.- 6-Fosfogluconato deshidrogenasa

En la Figura 12 se muestra la actividad enzimática de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en la fracción soluble de homogenados de hígado de ratones obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

La 6-PGDH es la segunda deshidrogenasa del ciclo de las pentosas fosfato. Su actividad se induce en condiciones fisiológicas que requiere NADPH (lipogénesis, síntesis de ácidos nucleicos y procesos de desintoxicación). La cocaína promovió un incremento paulatino que alcanzó su máximo a las 72 horas (157 %, $p < 0,001$). Las variaciones producidas por el fenobarbital en esta actividad enzimática fueron significativas a las 12 y 24 horas (155 % y 147 %, respectivamente). La inducción inicial (a tiempo 0) de esta actividad, producida por el fenobarbital, explica las elevaciones más tempranas en este grupo si se compara con el de la cocaína.

En la Tabla 12 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 12.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	63 ± 7 (100)	82 ± 10 (130)
12	58 ± 7 (92)	98 ± 6 (155)*
24	78 ± 9 (123)	93 ± 11 (147)*
48	82 ± 11 (130)	88 ± 10 (140)
72	99 ± 11 (157)*	82 ± 10 (130)
96	85 ± 10 (135)	88 ± 11 (140)

Tabla 12.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

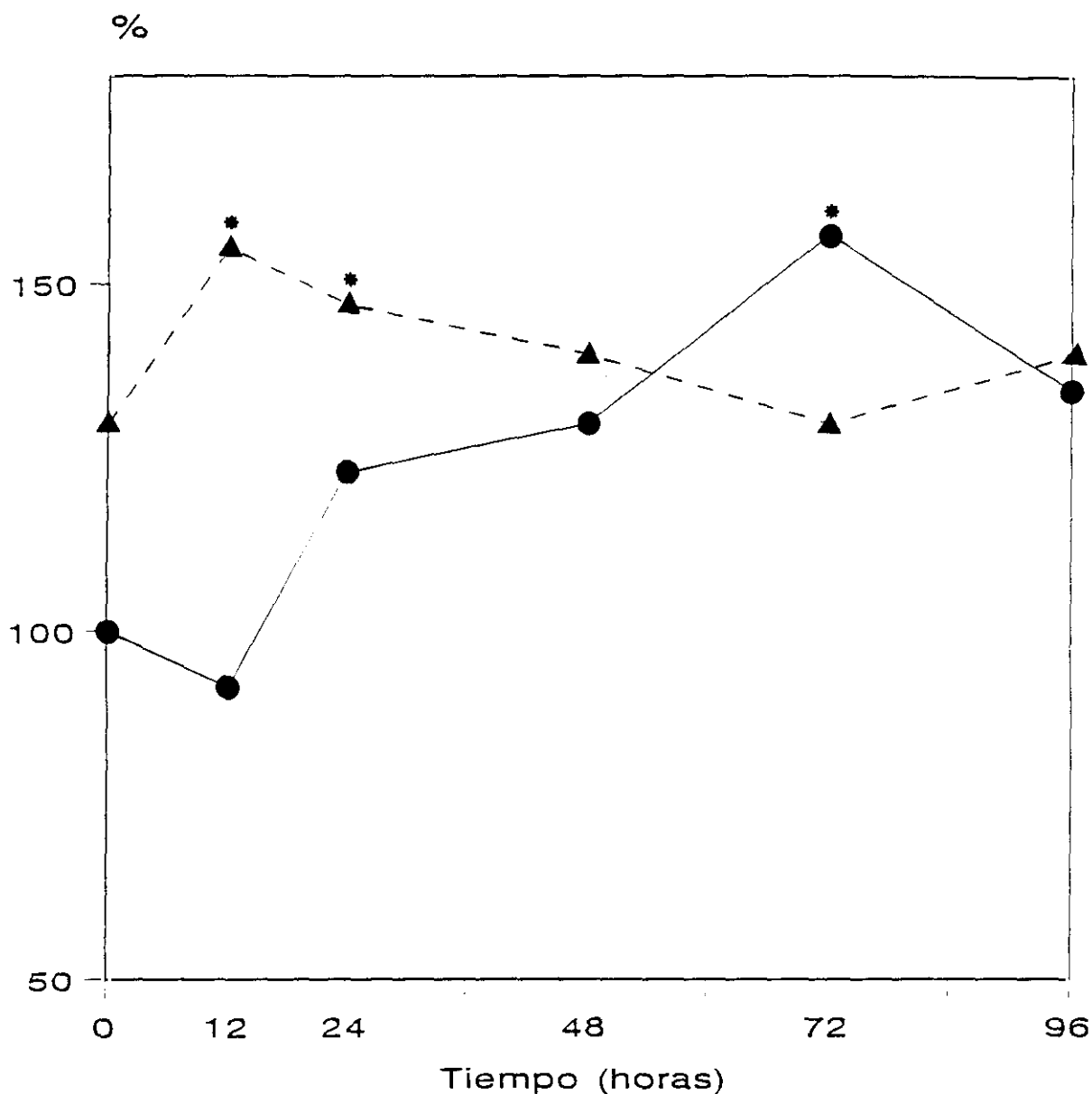


Figura 12.- Actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 12.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.4.3.- Isocitrato deshidrogenasa NADP⁺

En la Figura 13 se muestra la actividad enzimática de la isocitrato deshidrogenasa NADP⁺ en la fracción soluble de homogenados de hígado de ratones, obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

La isocitrato deshidrogenasa, como enzima citosólico dependiente del NADP⁺, se encuentra entre los enzimas generadores de NADPH, que junto con la 6-PGDH y el enzima málico, tienen la característica de ser enzimas descarboxilantes. Al igual que ocurría con la actividad de la 6-PGDH y del ME el fenobarbital indujo una variación inicial sobre la ICDH que se mantuvo hasta las 48 horas. En ambos grupos se registró una tendencia a la elevación, exceptuando una bajada a las 12 horas.

En la Tabla 13 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 13.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	912 ± 100 (100)	1285 ± 130 (141)*
12	862 ± 110 (94)	1053 ± 100 (115)
24	1111 ± 100 (122)	1231 ± 130 (135)
48	1138 ± 110 (124)	1297 ± 140 (142)*
72	1094 ± 100 (120)	1149 ± 120 (126)
96	1091 ± 110 (119)	1130 ± 111 (124)

Tabla 13.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la isocitrato deshidrogenasa dependiente del NADP⁺ en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

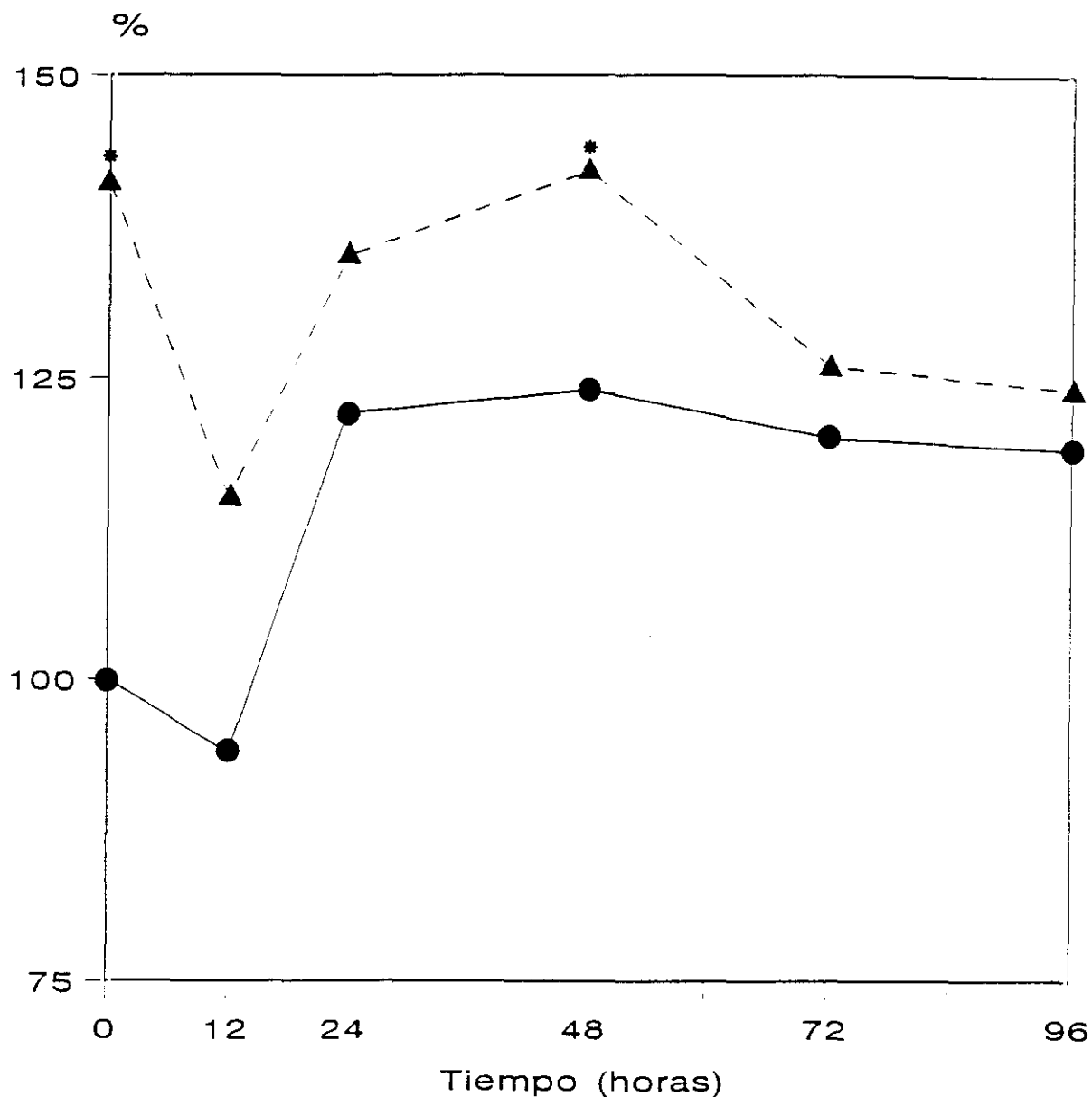


Figura 13.- Actividad de la isocitrato deshidrogenasa dependiente del NADP⁺ en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p<0,001). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 13.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.4.4.- Enzima málico

En la Figura 14 se muestra la actividad del enzima málico en la fracción soluble de homogenados de hígado de ratones, obtenidos a distintos tiempos después del tratamiento con fenobarbital y/o una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal). Los diferentes tiempos fueron: 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

El enzima málico, o malato deshidrogenasa NADP-descarboxilante, es un enzima cuya actividad se ha relacionado con la lipogénesis. Su actividad se eleva en condiciones de hepatotoxicidad (Cerdán et al 1981) y el equilibrio de su reacción se utiliza para determinar el estado óxido-reducción citoplasmático (Veech et al 1969).

La cocaína no produjo variaciones significativas en la actividad del enzima málico, mientras que el pretratamiento con fenobarbital indujo, a partir de un incremento inicial, una subida a las 12, 24 y 48 horas después del tratamiento con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg), con tendencia posterior al descenso.

En la Tabla 14 se muestran los resultados en tanto por ciento correspondientes a la Figura 14.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	229 ± 40 (100)	290 ± 38 (126)
12	217 ± 25 (95)	350 ± 42 (153)*
24	208 ± 18 (91)	366 ± 45 (160)*
48	230 ± 32 (100)	353 ± 40 (154)*
72	240 ± 28 (105)	320 ± 40 (140)
96	277 ± 30 (121)	238 ± 30 (104)

Tabla 14.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad del enzima málico en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

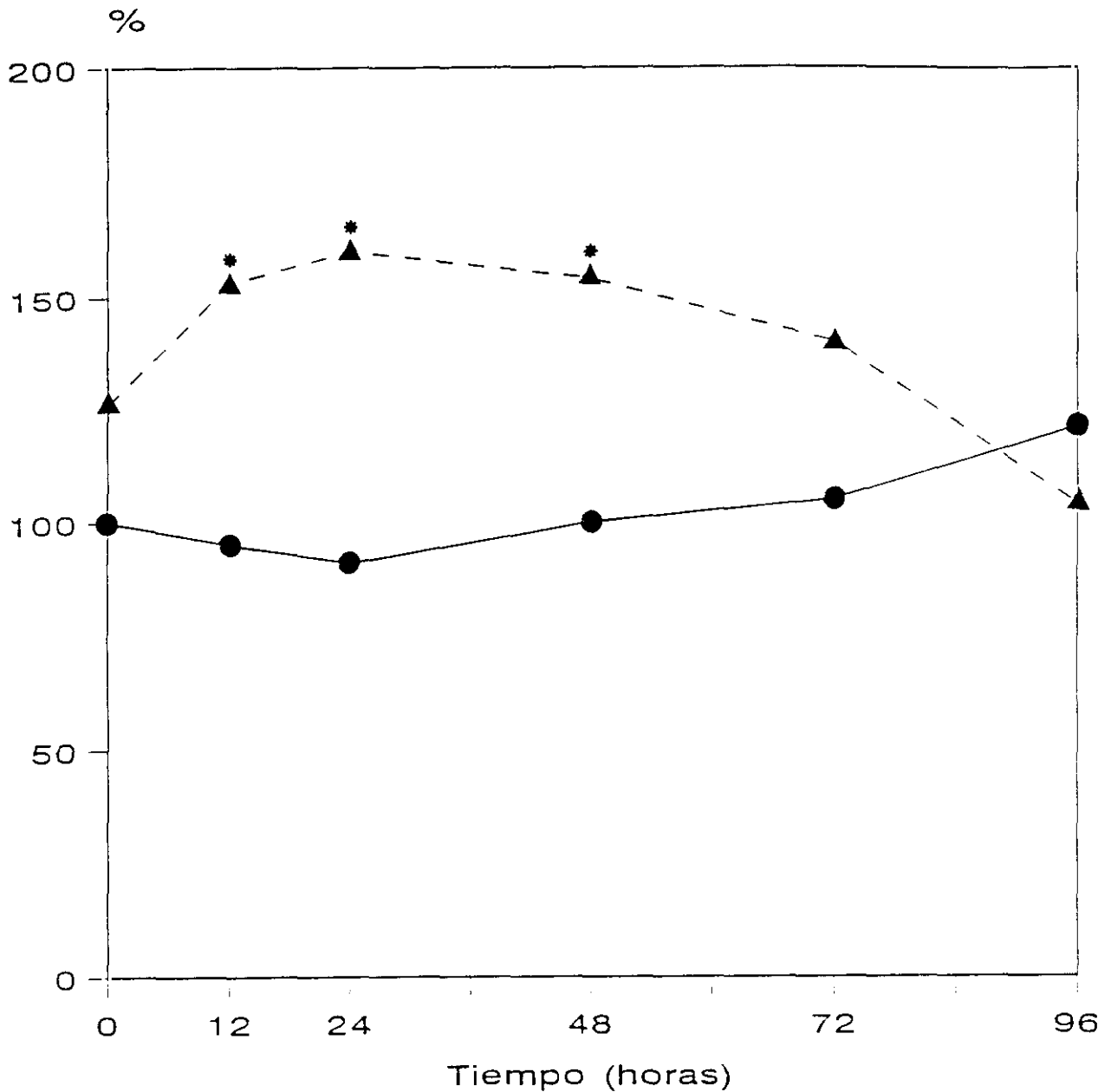


Figura 14.- Actividad del enzima málico en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 14.

●—● Cocaína. ▲ - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.5.- Actividades enzimáticas generadoras de glucosa-6-fosfato

Los enzimas generadores de glucosa-6-fosfato, se encuentran en la encrucijada que partiendo de la degradación de glucógeno es el paso necesario requerido para el inicio de la glucólisis (vía de Embden-Meyerhof) o ruta de las pentosas fosfato.

3.5.1.-Glucoquinasa y hexoquinatas

La glucoquinasa es un isoenzima de las hexoquinatas con baja afinidad por la glucosa. Esta actividad no se afectó por el pretratamiento con fenobarbital. La cocaína produjo una disminución paulatina en su actividad, mientras que el fenobarbital no ocasionó variaciones significativas. Este descenso en la actividad de la hexoquinasa de elevada Km para la glucosa, ha sido ya descrito, para otras hepatotoxinas (Cascales et al 1992).

El isoenzima hexoquinasa, de elevada afinidad por la glucosa, determinado con glucosa 1 mM, se elevó significativamente por efecto de la cocaína. El pretratamiento con fenobarbital, promovió un menor incremento. La elevación en la actividad de esta hexoquinasa, en oposición al comportamiento de la hexoquinasa de baja afinidad por la glucosa, ha sido ya descrita para hepatotóxicos como la tioacetamida en trabajos de nuestro grupo (Cascales et al 1992). El isoenzima hexoquinasa determinado con fructosa 33 mM como sustrato, dió lugar a variaciones poco significativas por efecto de la cocaína y con tendencia a la disminución por efecto del pretratamiento con fenobarbital.

En las Figuras 15, 16 y 17 y en las Tablas 15, 16 y 17 se muestran las actividades de las hexoquinatas y la glucoquinasa, enzimas encargados de fosforilar la glucosa. Se determinaron por sus distintas afinidades por la glucosa (100 mM y 0,5 mM) y por la fructosa (33 mM), en la fracción soluble de hígado en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	8,7 ± 1,0 (100)	8,3 ± 0,9 (95)
12	8,2 ± 0,9 (94)	8,0 ± 0,8 (92)
24	6,9 ± 0,7 (79)	7,3 ± 0,8 (84)
48	5,9 ± 0,6 (68)*	9,2 ± 1,0 (106)
72	5,7 ± 0,6 (66)*	9,3 ± 1,1 (107)
96	6,5 ± 0,8 (75)	9,1 ± 1,0 (105)

Tabla 15.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la glucoquinasa (glucosa 1 M) en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

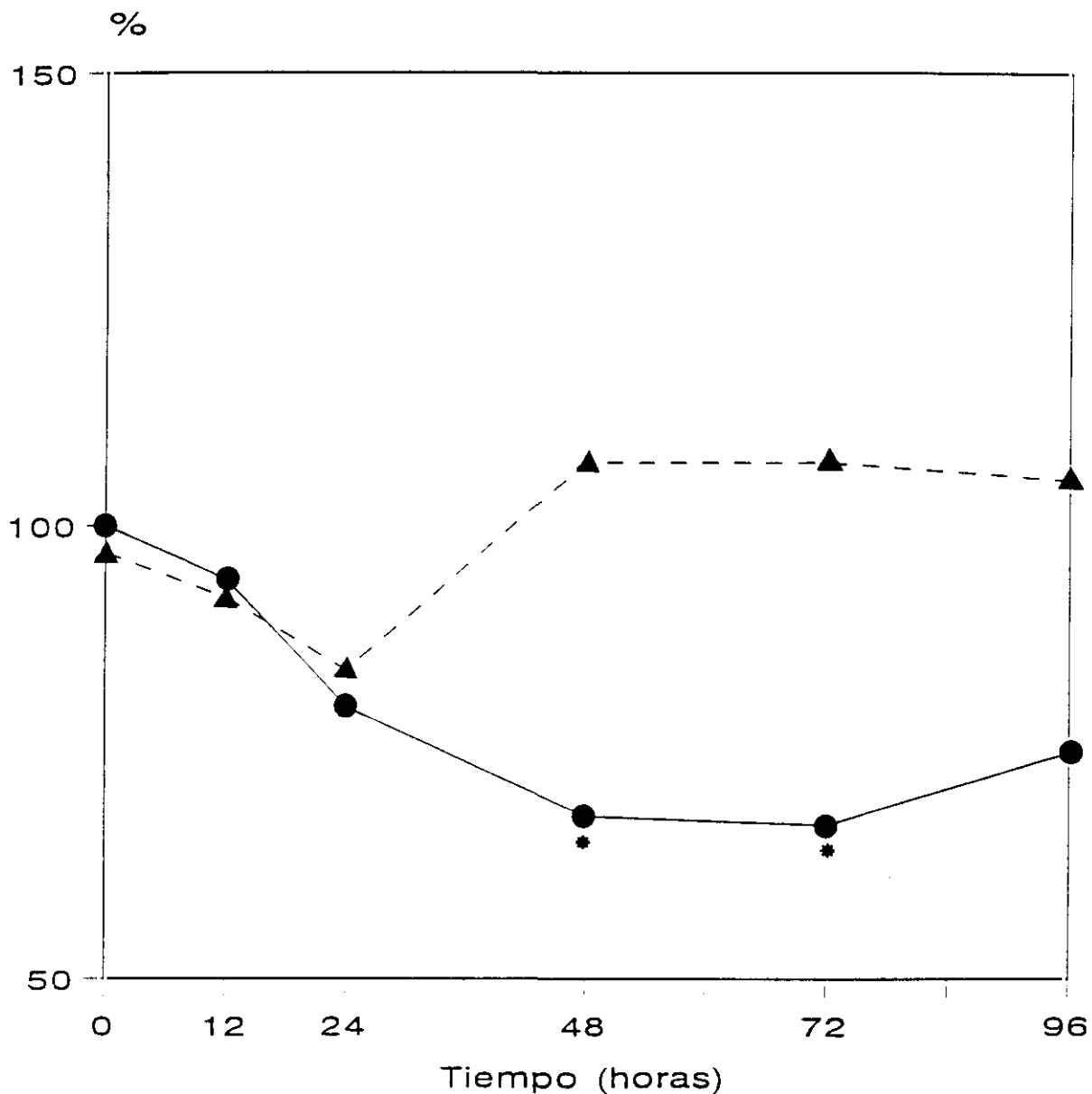


Figura 15.- Actividad de la glucoquinasa (glucosa 1 M) en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa * $p < 0,001$. Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 15.

●—● Cocaína. ▲ - - -▲ Fenobarbital + Cocaína.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	4,0 ± 0,5 (100)	3,6 ± 0,4 (90)
12	5,6 ± 0,6 (140)*	3,2 ± 0,4 (80)
24	6,8 ± 0,7 (170)*	4,0 ± 0,3 (100)
48	7,2 ± 0, (180)*	5,4 ± 0,5 (135)
72	7,3 ± 0,8 (182)*	5,4 ± 0,6 (135)
96	6,4 ± 0,7 (160)*	5,4 ± 0,6 (135)

Tabla 16.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la hexoquinasa (glucosa 1 mM) en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

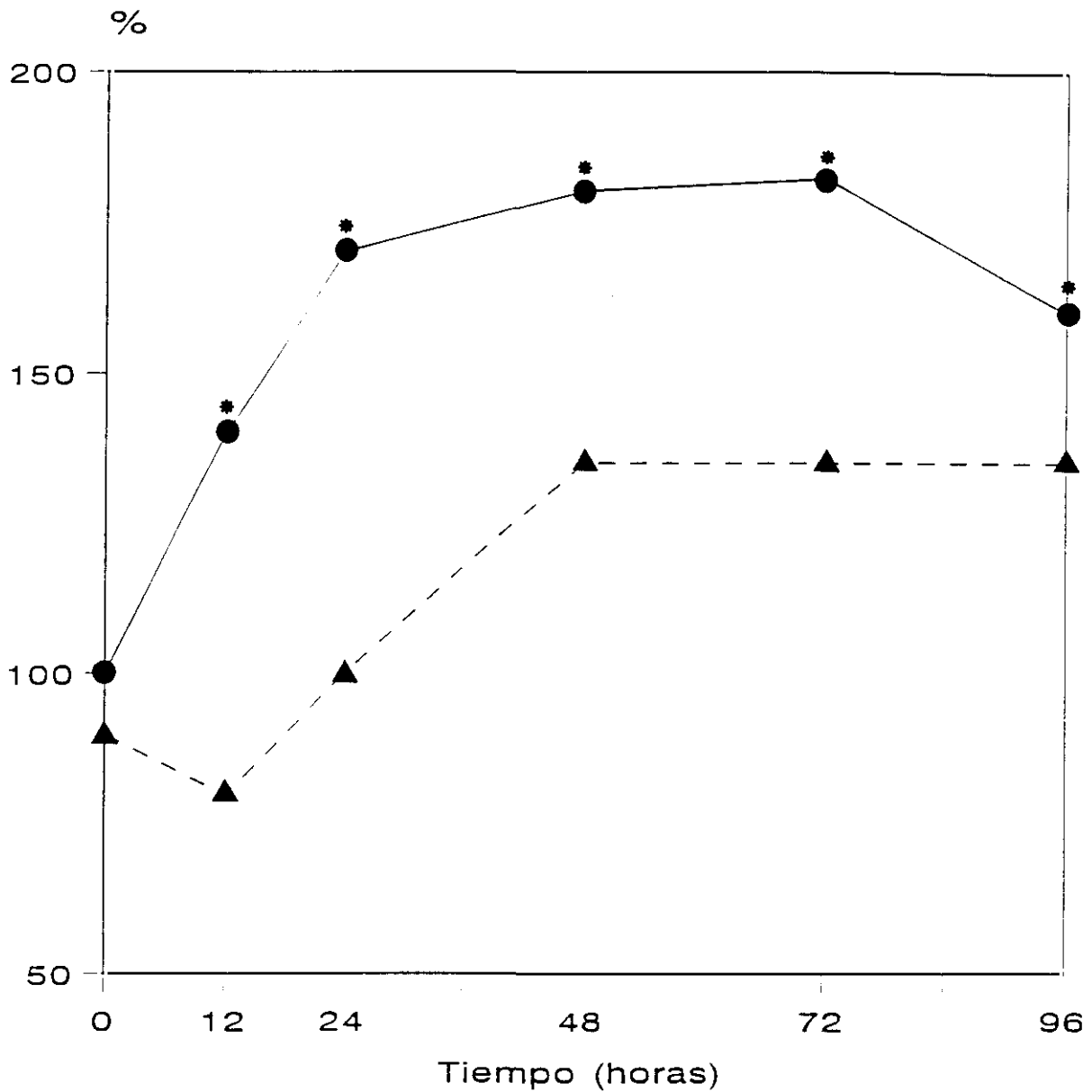


Figura 16.- Actividad de la hexoquinasa (glucosa 1 mM) en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 16.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	3,4 ± 0,3 (100)	2,9 ± 0,3 (85)
12	3,9 ± 0,4 (114)	3,2 ± 0,3 (94)
24	3,4 ± 0,4 (100)	2,5 ± 0,3 (73)
48	3,6 ± 0,4 (105)	2,2 ± 0,2 (65)*
72	4,2 ± 0,5 (123)	2,8 ± 0,3 (82)
96	3,4 ± 0,4 (100)	3,2 ± 0,4 (94)

Tabla 17.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la hexoquinasa (fructosa 33 mM) en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p<0,001).

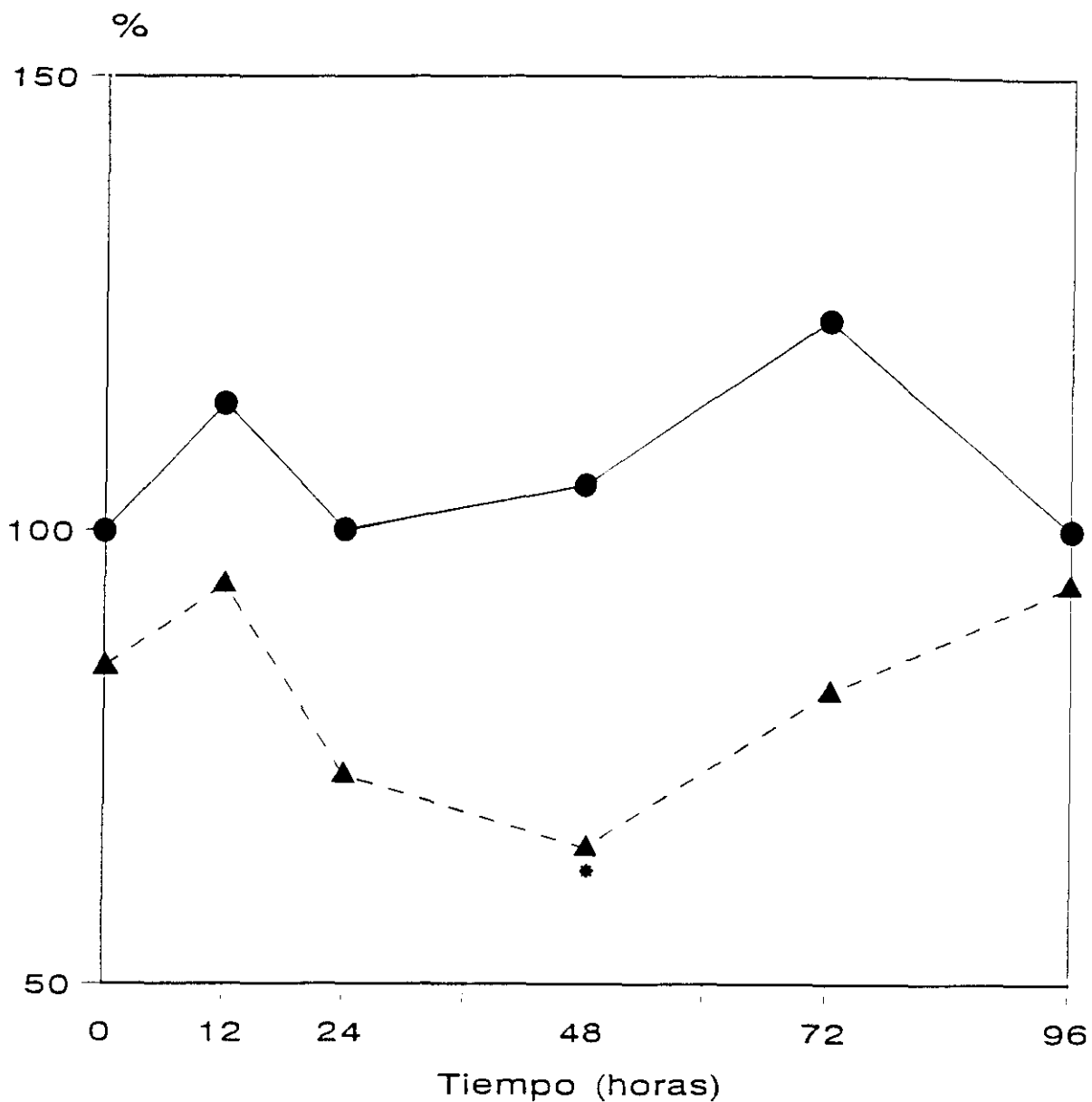


Figura 17.- Actividad de la hexoquinasa (fructosa 33 mM) en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 17.

●—● Cocaína. A - - - A Fenobarbital + Cocaína.

3.6.- Actividades enzimáticas del ciclo redox GSH/GSSG y relacionadas

En este capítulo se incluyen las actividades enzimáticas siguientes: Glutation reductasa, glutacion peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa en homogenados hepáticos de ratones albinos Swiss, a distintos momentos después de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal), tratados y no tratados previamente con fenobarbital.

La glutacion reductasa y la glutacion peroxidasa tienen como sustratos al GSSG y al GSH respectivamente. Por tanto, sus actividades jugarán un papel decisivo en el mantenimiento del cociente GSH/GSSG, siempre que exista un aporte de equivalentes reductores NADPH.

3.6.1.- Glutation reductasa

En la Figura 18 y en la Tabla 18 se muestra la actividad de la glutacion reductasa, en la fracción soluble de hígado en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

Esta actividad enzimática, consume NADPH y regenera el glutacion en su forma reducida (GSH). Las variaciones producidas por administración de cocaína fueron apenas perceptibles, con un máximo (110 %) a las 48 horas. En caso de ratones pretratados con fenobarbital la actividad, que partió de un valor inicial superior al control (124 %), mantuvo una subida progresiva hasta las 72 horas (151 %, $p < 0,001$).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	37 ± 3 (100)	46 ± 4 (124)
12	37 ± 4 (100)	46 ± 5 (124)
24	38 ± 4 (102)	50 ± 6 (135)
48	41 ± 4 (110)	53 ± 5 (143)
72	37 ± 3 (100)	56 ± 6 (151)*
96	37 ± 3 (100)	52 ± 6 (140)

Tabla 18.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la glutatión reductasa en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

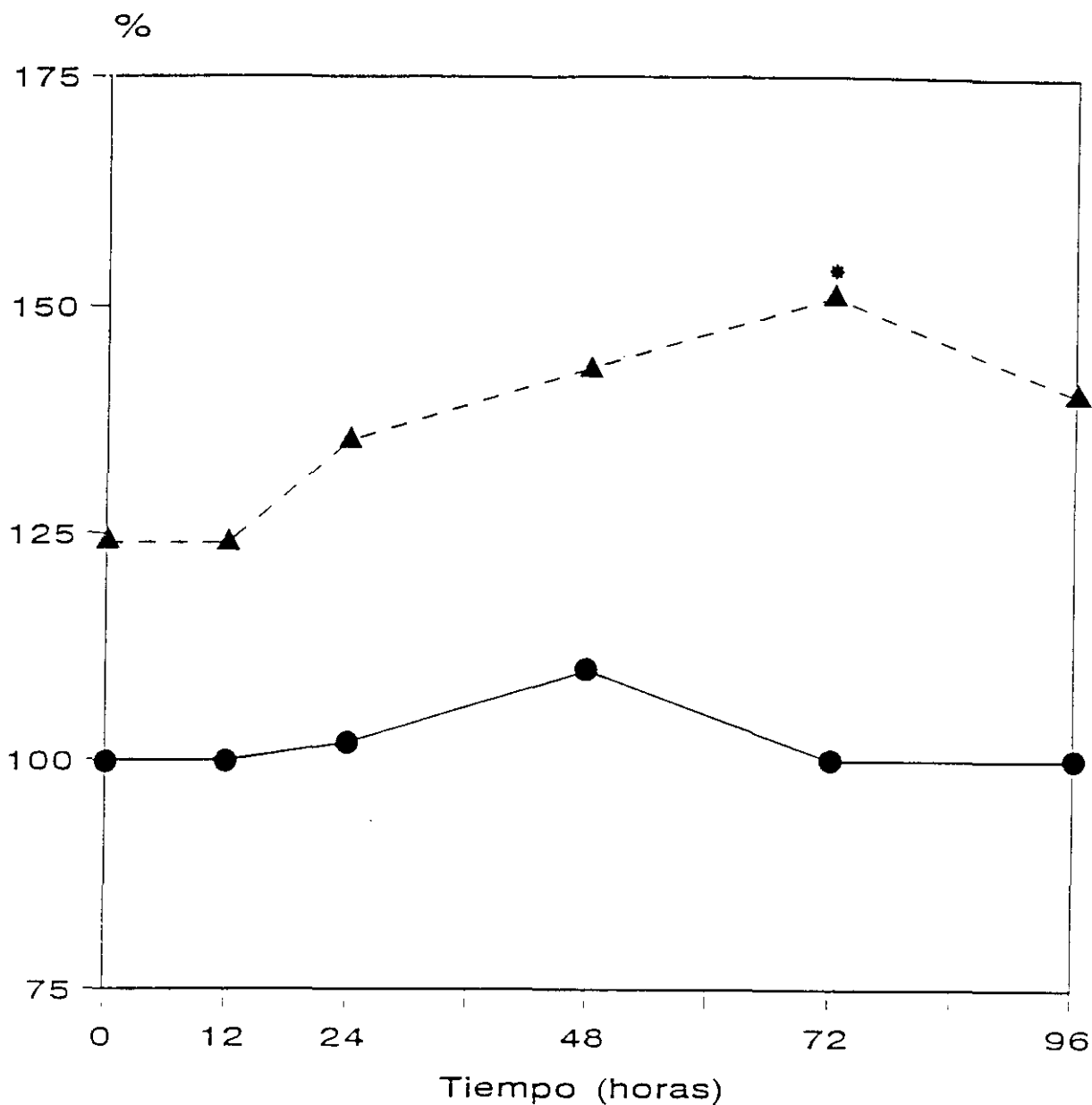


Figura 18.- Actividad de la glutathione reductasa en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 18.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.6.2.- Glutation peroxidasa (dependiente de selenio)

En la Figura 19 y en la Tabla 19 se muestra la actividad de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio, en la fracción soluble de hígado en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

La glutatión peroxidasa, junto con la catalasa, son las dos enzimas encargadas de eliminar los peróxidos existentes en el medio. En su reacción enzimática, la GPX oxida el GSH \rightarrow GSSG. Por efecto de la cocaína esta actividad enzimática muestra unos valores ligeramente elevados (108 %), mientras que en el caso de pretratamiento con fenobarbital los valores fueron acusadamente bajos mostrando un descenso del 4 % ($p < 0,001$) a las 24 horas, que se mantuvo hasta las 96 horas.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	525 ± 37 (100)	472 ± 50 (90)
12	561 ± 55 (107)	299 ± 35 (57)*
24	561 ± 60 (107)	231 ± 30 (44)*
48	567 ± 62 (108)	262 ± 30 (50)*
72	551 ± 50 (105)	252 ± 30 (48)*
96	546 ± 58 (104)	252 ± 32 (48)*

Tabla 19.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la glutatión peroxidasa en fracción soluble de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de la cocaína. Los resultados, expresados como nmoles de sustrato transformado a 25 °C por minuto y por mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

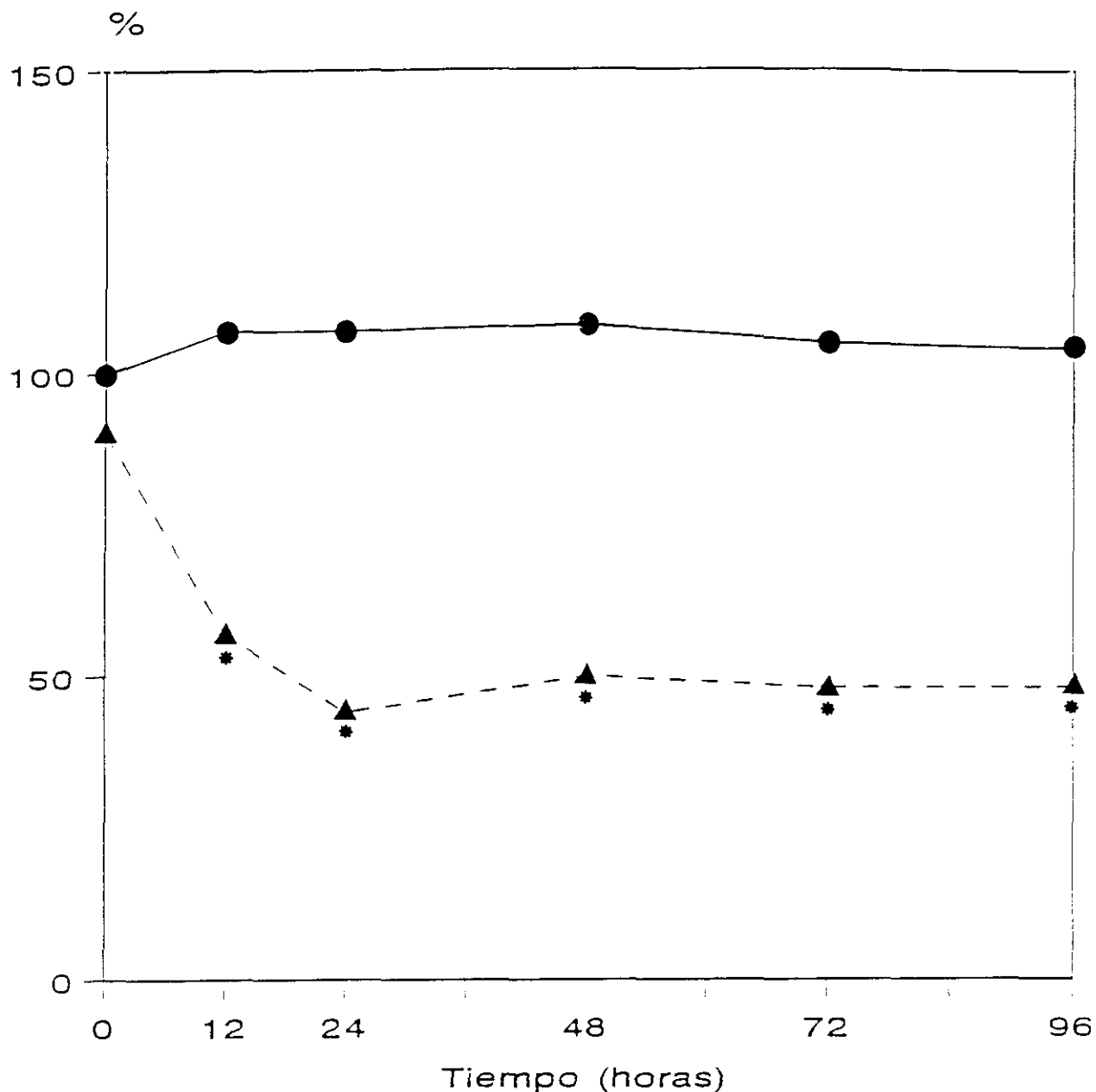


Figura 19.- Actividad de la glutatión peroxidasa en la fracción soluble de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmoles/min/mg proteína se muestran en la Tabla 19.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.6.3.- Catalasa

En la Figura 20 y en la Tabla 20 se muestra la actividad de la catalasa, en homogenados hepáticos 800 - 12.000 xg (peroxisomas, mitocondrias, etc) en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

La catalasa es un enzima que actúa eliminando peróxidos con producción de oxígeno molecular. Esta actividad enzimática disminuye en ambos grupos manteniéndose con niveles de actividad muy bajos durante todo el tratamiento. La diferencia más acusada entre ambos grupos fue que la actividad inicial se encontraba disminuída por efecto del fenobarbital (46 %, $p < 0,001$).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	511 ± 49 (100)	237 ± 40 (46) *
12	258 ± 30 (50) *	228 ± 35 (45) *
24	197 ± 25 (38) *	99 ± 11 (19) *
48	162 ± 22 (32) *	90 ± 12 (18) *
72	178 ± 20 (35) *	157 ± 18 (31) *
96	151 ± 18 (29) *	169 ± 20 (33) *

Tabla 20.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la catalasa en homogenados hepáticos 800 - 12.000 xg (peroxisomas, mitocondrias, etc). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como unidades/mg de proteína, considerando una unidad la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

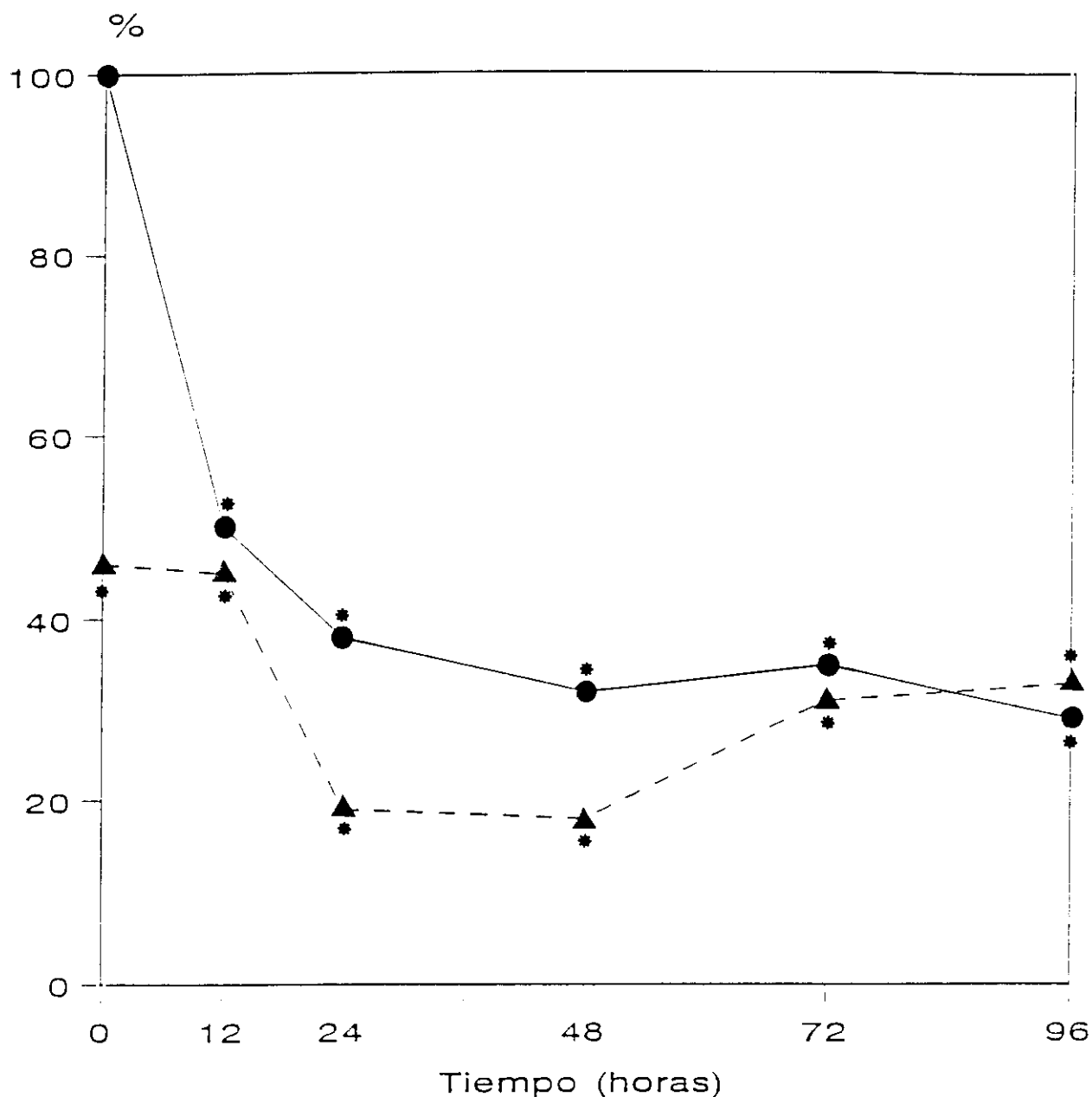


Figura 20.- Actividad de la catalasa en homogenado hepático 800 -12.000 xg (peroxisomas, mitocondrias, etc) de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001). Los resultados se expresan en unidades/mg proteína considerando una unidad la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de H_2O_2 /min y se muestran en la Tabla 20.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.6.4.- Superóxido dismutasa

En la Figura 21 y en las Tablas 21A a 21D se muestra la actividad de la superóxido dismutasa, en homogenados hepáticos (soluble + microsomas) en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

La superóxido dismutasa es el enzima que transforma el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno. Su actuación unida a la de la catalasa o la glutatión peroxidasa evita la formación del radical hidróxido OH^{\cdot} .

Se ha determinado la actividad superóxido dismutasa en sus modalidades isoenzimáticas siguientes: **A)** Total, **B)** Real, **C)** Sensible al CNK y **D)** Insensible al CNK.

Las variaciones por efecto de la cocaína fueron poco destacadas. Sólo en el caso de la superóxido dismutasa sensible al CNK se observaron valores significativamente menores que el control (54 %, $p < 0,001$) por efecto del fenobarbital.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	3,02 ± 0,3 (100)	2,84 ± 0,3 (94)
12	3,36 ± 0,4 (111)	3,68 ± 0,4 (122)
24	3,66 ± 0,4 (121)	2,94 ± 0,3 (97)
48	3,77 ± 0,4 (125)	2,86 ± 0,3 (95)
72	3,60 ± 0,4 (119)	2,98 ± 0,3 (99)
96	3,03 ± 0,3 (100)	2,55 ± 0,3 (84)

Tabla 21A.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la superóxido dismutasa *total* en homogenados hepáticos (soluble + microsomas). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng de SOD requeridos para 1 unidad de actividad/mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001). Una unidad es la que produce un 50% de inhibición en la autooxidación del pirogalol.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	2,80 ± 0,3 (100)	2,83 ± 0,3 (101)
12	3,10 ± 0,3 (111)	3,10 ± 0,3 (111)
24	2,86 ± 0,3 (102)	2,76 ± 0,3 (98)
48	3,24 ± 0,4 (116)	2,62 ± 0,3 (93)
72	3,09 ± 0,3 (110)	2,91 ± 0,3 (104)
96	2,82 ± 0,3 (101)	2,54 ± 0,3 (91)

Tabla 21B.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la superóxido dismutasa *real* en homogenados hepáticos (soluble + microsomas). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng de SOD requeridos para 1 unidad de actividad/mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001). Una unidad es la que produce un 50% de inhibición en la autooxidación del pirogalol.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	0,74 ± 0,10 (100)	0,40 ± 0,04 (54)*
12	0,57 ± 0,06 (77)	0,61 ± 0,06 (82)
24	0,67 ± 0,07 (90)	0,45 ± 0,05 (61)*
48	0,79 ± 0,08 (107)	0,58 ± 0,06 (78)
72	0,59 ± 0,06 (80)	0,61 ± 0,06 (82)
96	0,63 ± 0,07 (85)	0,50 ± 0,05 (67)

Tabla 21C.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la superóxido dismutasa sensible al CNK en homogenados hepáticos (soluble + microsomas). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng de SOD requeridos para 1 unidad de actividad/mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001). Una unidad es la que produce un 50% de inhibición en la autooxidación del pirogalol.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	2,06 ± 0,2 (100)	2,43 ± 0,3 (118)
12	2,53 ± 0,3 (123)	2,49 ± 0,3 (121)
24	2,15 ± 0,2 (104)	2,31 ± 0,3 (112)
48	2,45 ± 0,3 (119)	2,04 ± 0,2 (99)
72	2,50 ± 0,3 (121)	2,30 ± 0,3 (112)
96	2,19 ± 0,2 (106)	2,04 ± 0,2 (99)

Tabla 21D.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la superóxido dismutasa *insensible al CNK* en homogenados hepáticos (soluble+microsomos). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng de SOD requeridos para 1 unidad de actividad/mg de proteína, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p<0,001). Una unidad es la que produce un 50% de inhibición en la autooxidación del pirogalol.

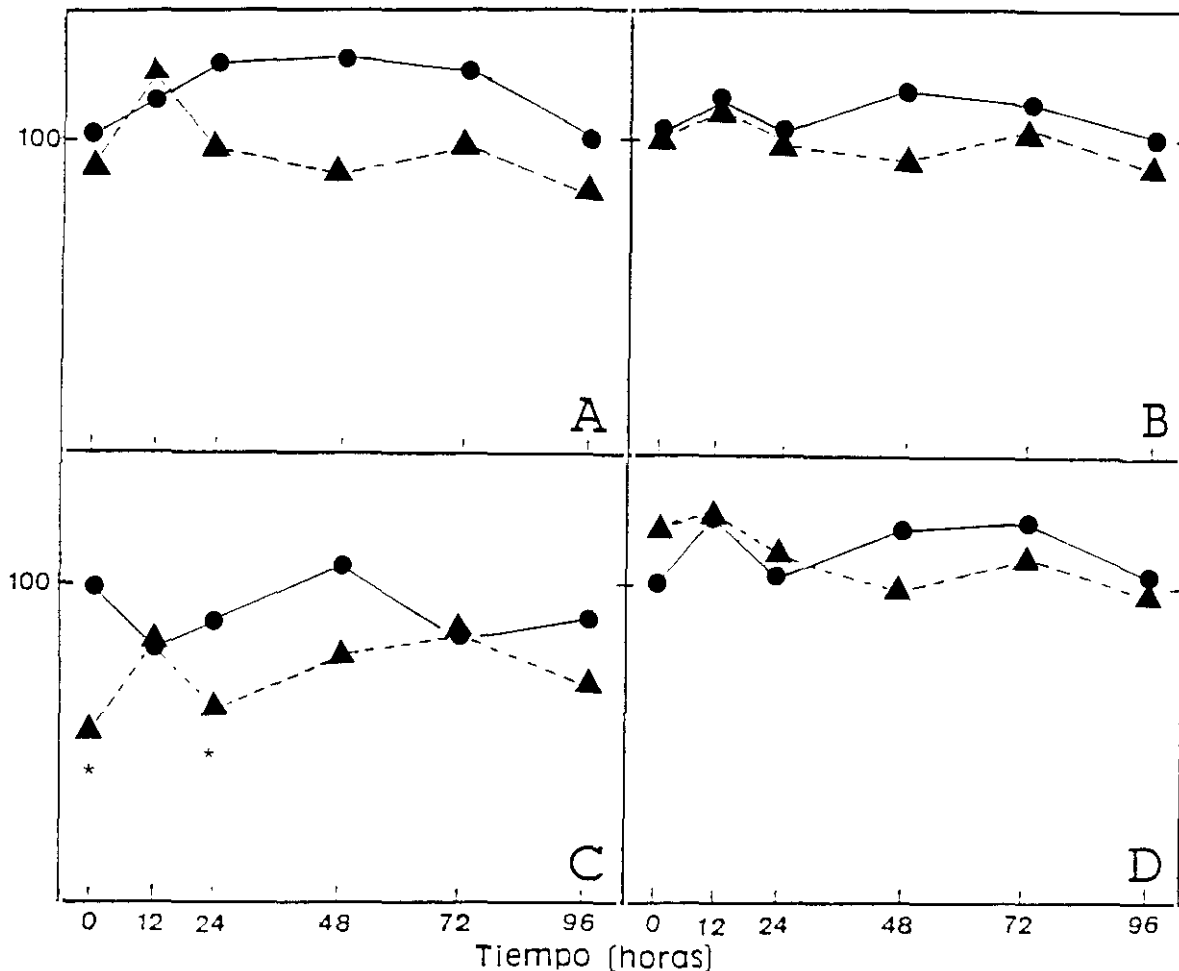


Figura 21.- Actividad de la superóxido dismutasa en homogenado hepático (soluble + microsomas) de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ proteína se muestran en las Tablas 21A a 21D.

A = Total, B = Real, C = Sensible a CNK, D = Insensible a CNK.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.7.- Sistema microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450

El sistema enzimático de óxido-reducción más importante en el hígado, que metaboliza una parte muy considerable de las sustancias tóxicas y/o fármacos (aproximadamente un 50 %) es el sistema del citocromo P-450. Este sistema se compone de una cadena de transporte electrónico asociada con la membrana del retículo endoplásmico, concretamente con la superficie citoplasmática del retículo. El citocromo P-450 está constituido por una familia de hemoproteínas que contiene citocromos P-450, de estructura similar a la hemoglobina. Forman también parte de esta cadena de transporte electrónico, la NADPH citocromo P-450 reductasa, el citocromo b_5 y la citocromo b_5 reductasa.

3.7.1.- Niveles de citocromo P-450

En la Figura 22 y en la Tabla 22 se muestra los niveles del citocromo P-450, en la fracción microsómica en homogenados hepáticos en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

El citocromo P-450 es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, que forma parte del sistema enzimático de óxido-reducción más importante del hígado ubicado en el retículo endoplásmico. Este sistema se induce por fenobarbital. Nuestros resultados muestran una disminución notable, tanto por efecto de la cocaína como del fenobarbital. El número de concentración aparece por efecto de la cocaína a las 24 horas (14 %) en el grupo no pretratado y a las 48 horas (58 %) en el grupo pretratado con fenobarbital. El descenso en la concentración de citocromo P-450 se debe sólo a la cocaína (100 --> 14) y fue más acusado en el grupo pretratado con fenobarbital (228 --> 58).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	0,520 ± 0,04 (100)	1,185 ± 0,12 (228) *
12	0,306 ± 0,03 (59)	0,593 ± 0,06 (114)
24	0,073 ± 0,010 (14)*	0,572 ± 0,06 (110)
48	0,176 ± 0,002 (34)*	0,302 ± 0,03 (58)
72	0,234 ± 0,020 (45) *	0,379 ± 0,04 (73)
96	0,260 ± 0,03 (50) *	0,608 ± 0,06 (117)

Tabla 22.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración del citocromo P-450 en la fracción microsómica de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng/mg de proteína, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

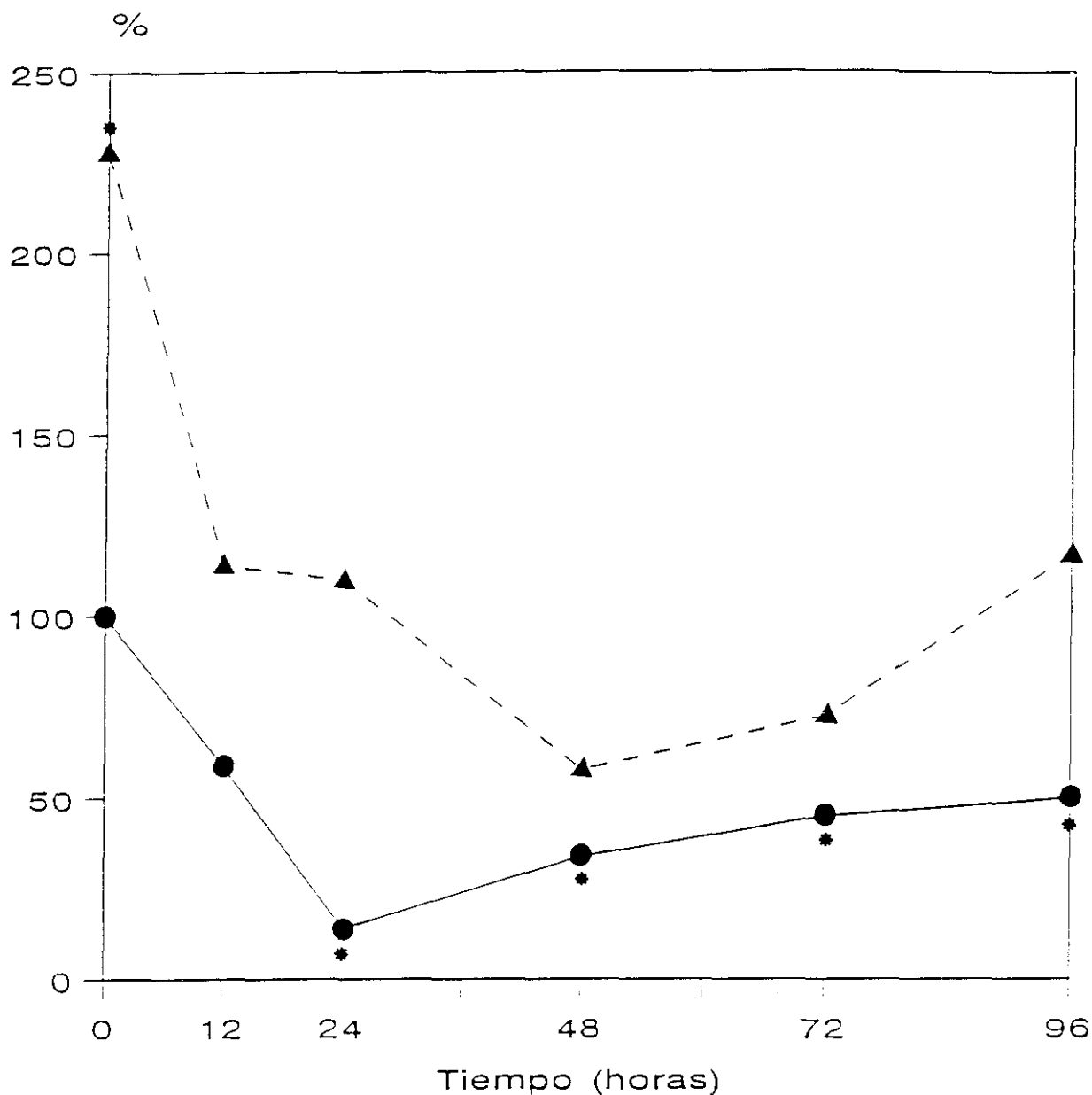


Figura 22.- Concentración del citocromo P-450 en la fracción microsómica de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en ng/mg de proteína se muestran en la Tabla 22.

●—● Cocaína. ▲ - - -▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.7.2.- Niveles de citocromo b₅

En la Figura 23 y en la Tabla 23 se muestra los niveles del citocromo b₅, en la fracción microsómica en homogenados hepáticos en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

El sistema microsómico de óxido-reducción que metaboliza las sustancias tóxicas, se compone de una cadena de transporte electrónico en la que se encuentra involucrado el citocromo b₅, el cual transporta electrones a partir del NADH hasta el citocromo P-450.

El citocromo b₅ es una hemoproteína de pequeño tamaño ligada a la membrana microsómica, que recibe electrones por medio de una flavoproteína la NADH citocromo b₅ reductasa. La concentración de b₅ se encuentra inducida por efecto del fenobarbital y se incrementó significativamente a las 12 horas en ambos grupos y descendió paulatinamente hasta las 48 horas. La única diferencia entre ambos grupos fue la elevación inicial ocasionada por el fenobarbital que se mantuvo hasta las 48 horas.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	0,280 ± 0,03 (100)	0,445 ± 0,05 (159)*
12	0,720 ± 0,07 (257)*	0,873 ± 0,08 (312)*
24	0,490 ± 0,05 (175)*	0,686 ± 0,08 (245)*
48	0,218 ± 0,02 (78)	0,339 ± 0,04 (121)
72	0,266 ± 0,03 (95)	0,308 ± 0,03 (110)
96	0,201 ± 0,02 (72)	0,218 ± 0,02 (78)

Tabla 23.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración del citocromo b_5 en la fracción microsómica de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng/mg de proteína, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$).

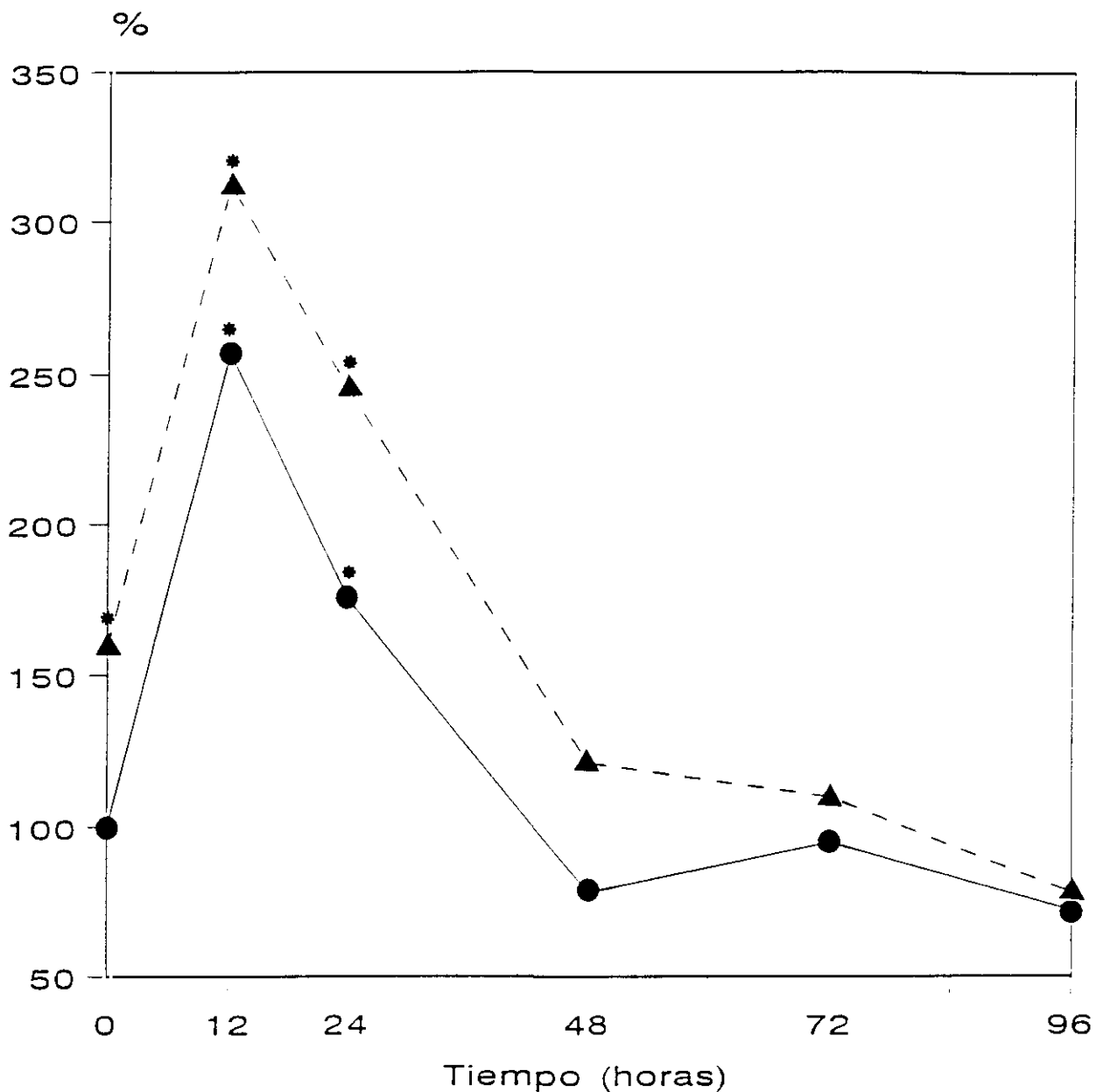


Figura 23.- Concentración del citocromo b_5 en la fracción microsómica de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La *t* de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en ng/mg de proteína se muestran en la Tabla 23.

●—● Cocaína. ▲ - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.7.3.- Actividad NADP-citocromo P-450 reductasa

En la Figura 24 y en la Tabla 24 se muestra la actividad NADP-citocromo P-450 reductasa, en la fracción microsómica en homogenados hepáticos en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

La citocromo P-450 NADPH reductasa forma parte de la cadena de transporte electrónico del sistema de óxido-reducción dependiente del citocromo P-450. Se trata de una flavoproteína encargada de transportar electrones desde el NADPH a través de sus coenzimas flavin mono nucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD). Se precisa que el par de electrones del NADDPH es captado por la proteína enzimática vía FAD y de ahí pasan al FMN.

Esta actividad se incrementó en ambos grupos a las 12 horas y disminuyó posteriormente por debajo del valor control. En el grupo que fueron los ratones pretratados con fenobarbital la diferencia inicial de la actividad fue significativamente menor (50 %, $p < 0,001$).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	0,310 ± 0,03 (100)	0,155 ± 0,02 (50)*
12	0,456 ± 0,05 (147)*	0,307 ± 0,03 (99)
24	0,325 ± 0,03 (105)	0,257 ± 0,03 (83)
48	0,236 ± 0,02 (76)	0,124 ± 0,02 (40)*
72	0,149 ± 0,02 (48)*	0,195 ± 0,02 (63)
96	0,217 ± 0,02 (70)	0,226 ± 0,02 (73)

Tabla 24.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la actividad de la citocromo P-450 reductasa dependiente de NADP en la fracción microsómica de homogenados hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a tiempos 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como ng/mg de proteína, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

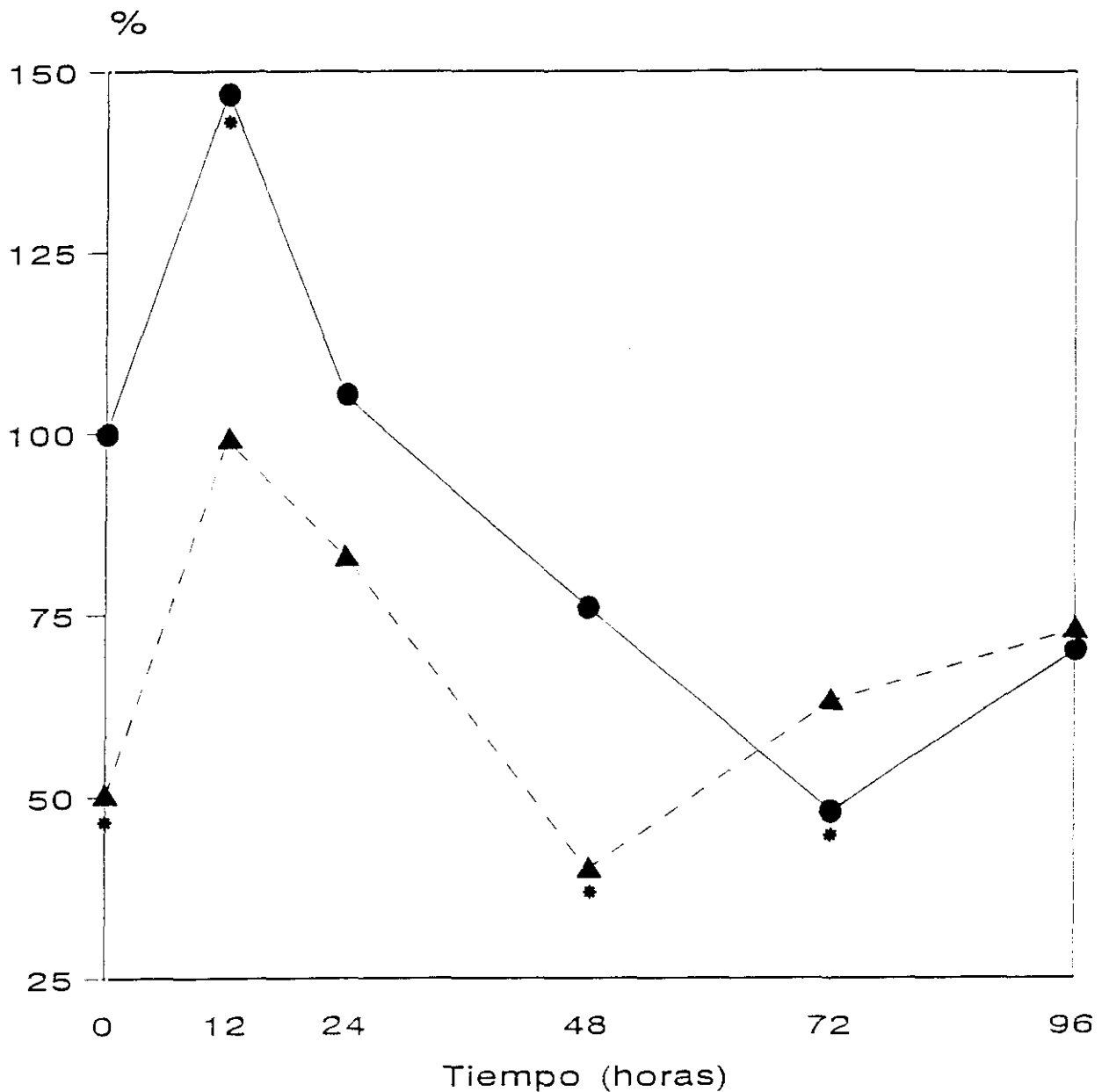


Figura 24.- Actividad de la citocromo P-450 reductasa NADP dependiente en la fracción microsómica de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en ng/min/mg de proteína y se muestran en la Tabla 24.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.8.- Otros parámetros relacionados con la disfunción hepática

También se han medido en la fracción citosólica, de homogenados hepáticos en distintos momentos después de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital, otros parámetros relacionados con la disfunción hepática como son: Glucógeno, y estados de óxido-reducción citosólicos NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺.

3.8.1.- Glucógeno

En la Figura 25 y en la Tabla 25 se muestra la concentración de glucógeno, en homogenados hepáticos, en distintos momentos después la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína.

Trás de la brusca caída en la concentración de glucógeno a las 12 horas en ambos lotes de ratones, tanto los tratados con cocaína (64 %) como los pretratados con fenobarbital (28 %). A lo largo de todo el período estudiado esta bajada se mantuvo constante. La única diferencia entre ambos grupos fue que, en el caso de los ratones pretratados con fenobarbital se inicia una recuperación en el período situado entre las 72 y 96 horas.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	3,19 ± 0,4 (100)	3,54 ± 0,4 (111)
12	2,06 ± 0,2 (64)	0,92 ± 0,01 (28)*
24	1,85 ± 0,2 (58)*	0,78 ± 0,01 (24)*
48	1,86 ± 0,2 (58)*	0,74 ± 0,009 (23)*
72	1,93 ± 0,2 (60)*	0,63 ± 0,007 (19)*
96	1,89 ± 0,2 (59)*	1,21 ± 0,01 (38)*

Tabla 25.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de glucógeno en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como g de glucógeno/100 g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

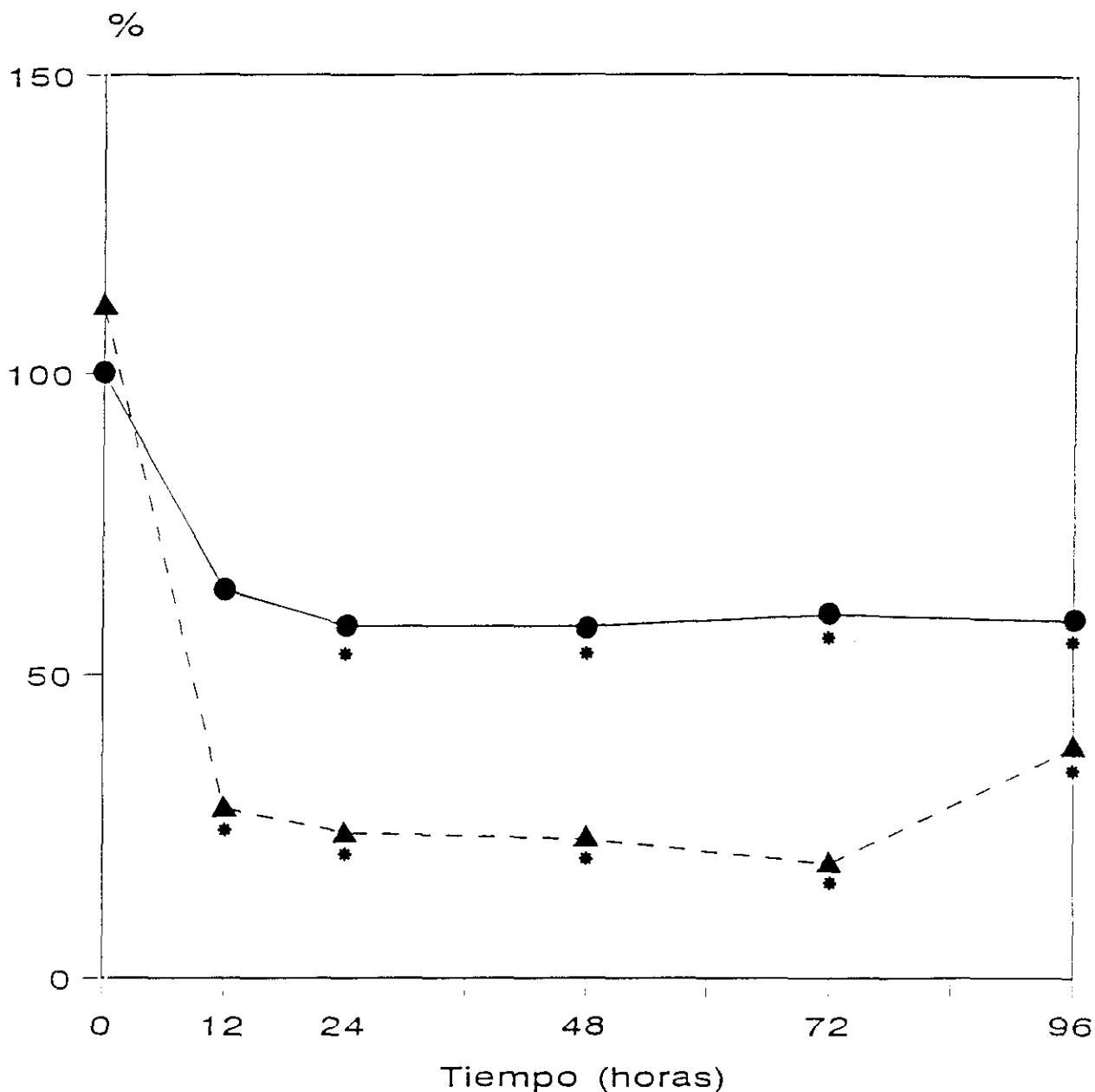


Figura 25.- Concentración de glucógeno en la fracción microsómica de hígado de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en g de glucosa/100 g de hígado se muestran en la Tabla 25.

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.8.2.- Estados de óxido-reducción citosólicos dependientes del NADP⁺ y del NAD⁺

Para determinar los estados redox citosólicos dependientes de NADP⁺ y de NAD⁺ se procedió a la determinación de las concentraciones de metabolitos de los sistemas enzimáticos representantes del citosol malato, lactato y piruvato. Estas concentraciones se determinan en extractos de hígado de ratón albino Swiss. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal) en ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

El estado redox NADPH/NADP⁺ relativo, como índice del estado de oxido-reducción citosólico dependiente del NADP⁺ se calculó por la relación entre las concentraciones hepáticas de malato/piruvato. El cociente lactato/piruvato es proporcional al cociente NADH/NAD⁺.

Por consiguiente, en la Tabla 26 y Figura 26 se muestra la concentración de piruvato. En la Tabla 27 y Figura 27 se muestra la concentración de malato. En la Tabla 28 y Figura 28 se muestra la concentración de lactato. En la Tabla 29 y Figura 29 se muestra la concentración del estado redox NADPH/NADP⁺. En la Figura 30 y en la Tabla 30 se muestra el estado redox NADH/NAD⁺.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	593 ± 60 (100)	355 ± 40 (60)*
12	433 ± 52 (73)	563 ± 60 (95)
24	219 ± 22 (37)*	604 ± 68 (102)
48	438 ± 47 (74)	604 ± 70 (102)
72	741 ± 80 (125)	593 ± 64 (100)
96	681 ± 80 (115)	694 ± 72 (117)

Tabla 26A.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de malato en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p<0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	1285 ± 130 (100)	925 ± 100 (72)
12	950 ± 100 (74)	771 ± 82 (60)*
24	1079 ± 115 (84)	719 ± 80 (56)*
48	1156 ± 120 (90)	809 ± 89 (63)*
72	1130 ± 124 (88)	745 ± 83 (58)*
96	1156 ± 111 (90)	796 ± 86 (62)*

Tabla 26B.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de lactato en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	130 ± 12 (100)	200 ± 18 (154)*
12	144 ± 14 (111)	280 ± 30 (216)*
24	179 ± 18 (138)	260 ± 30 (200)*
48	234 ± 25 (180)*	182 ± 20 (140)
72	300 ± 34 (231)*	139 ± 15 (107)
96	289 ± 30 (223)*	130 ± 15 (100)

Tabla 26C.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración de piruvato en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

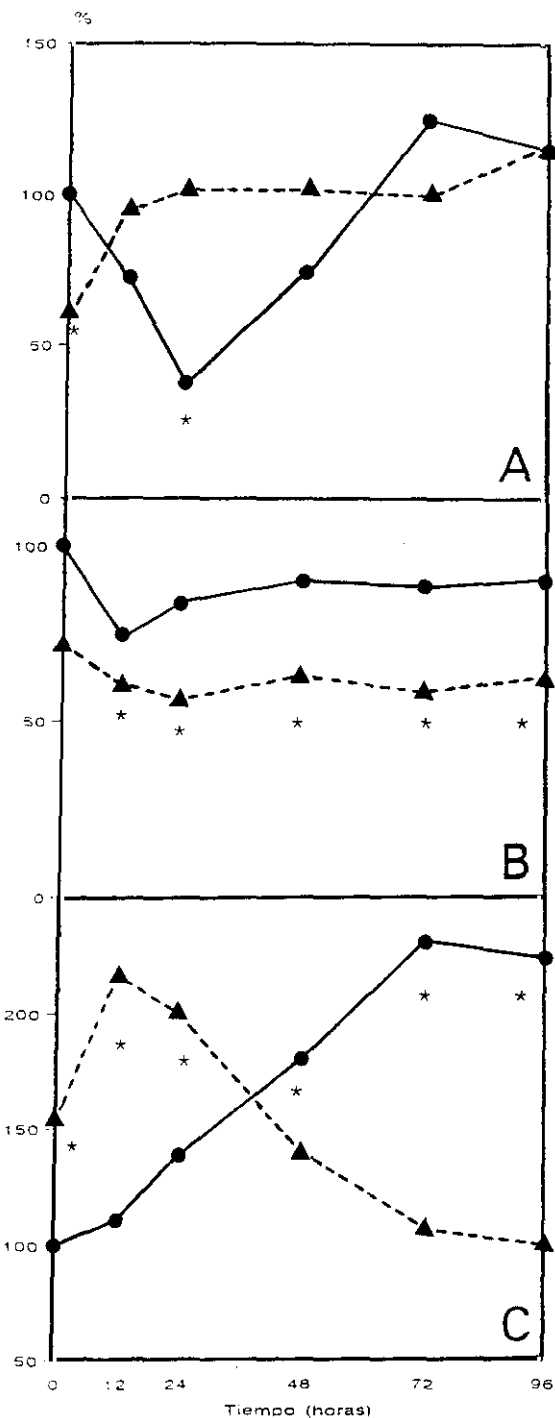


Figura 26.- Concentraciones de malato, lactato y piruvato en extractos hepáticos de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (* $p < 0,001$). Los valores absolutos expresados en nmol/g de hígado se muestran en las Tablas 26A a 26C.

A = Malato; B = Lactato; C = Piruvato

●—● Cocaína. ▲ - - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	4,56 ± 0,5 (100)	1,77 ± 0,2 (38) *
12	3,00 ± 0,4 (66)	2,01 ± 0,2 (44) *
24	1,24 ± 0,2 (27) *	2,32 ± 0,3 (51) *
48	1,87 ± 0,2 (41) *	3,32 ± 0,4 (73)
72	2,47 ± 0,3 (54) *	4,27 ± 0,5 (93)
96	2,35 ± 0,3 (51) *	5,33 ± 0,5 (117)

Tabla 27A.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre el estado redox NADPH/NADP⁺ en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados calculados son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	9,8 ± 1,2 (100)	4,6 ± 0,5 (47)*
12	6,6 ± 0,8 (67)	2,7 ± 0,3 (28)*
24	6,0 ± 0,7 (61)	2,7 ± 0,3 (28)*
48	4,9 ± 0,6 (50)*	4,4 ± 0,5 (45)*
72	3,8 ± 0,4 (39)*	5,4 ± 0,6 (55)*
96	4,0 ± 0,4 (41)*	6,1 ± 0,6 (62)

Tabla 27B.- Efecto de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones tratados y no tratados con fenobarbital sobre la concentración del estado redox NADH/NAD⁺ en extractos hepáticos. Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados, expresados como nmol/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001).

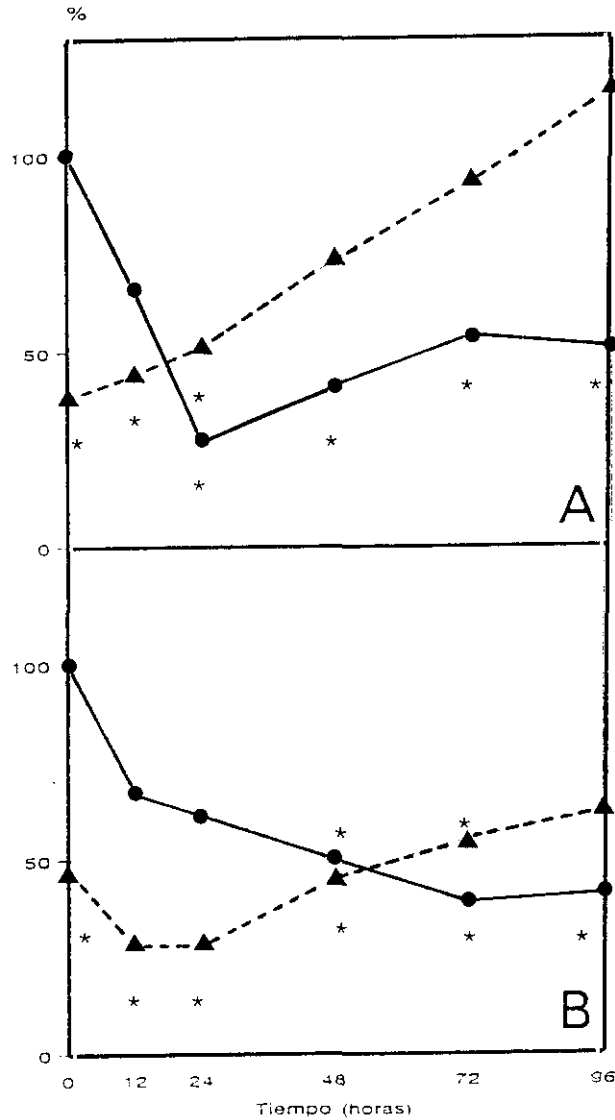


Figura 27.- Estados de óxido-reducción NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺ citosólicos en hígados de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa (*p < 0,001). Los valores absolutos expresados en nmol/g de hígado se muestran en las Tablas 27A y 27B.

A = NADPH/NADP⁺; B = NADH/NAD⁺

● — ● Cocaína. ▲ - - ▲ Fenobarbital + Cocaína.

3.9.- Proteínas de fracciones subcelulares de homogenados hepáticos

A partir de homogenados hepáticos obtenidos en Potter-Elvehjeim con pistilo de teflón, se separaron las fracciones subcelulares siguientes: mitocondrias (peroxisomas), entre 800 y 10.000 xg; microsomas (retículo endoplásmico) entre 10.000 y 105.000 xg y fracción soluble, el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 105.000 xg. Las fracciones microsómica y mitocondrial se lavaron dos veces para eliminar contaminaciones. La fracción soluble se dializó frente a tampón de extracción (sacarosa 0,25 M, Tris 0,2 M a pH 7,4 y DTT 5 mM) durante 1 hora a 4 °C.

La mayor parte de las actividades enzimáticas ensayadas en el presente trabajo, se han determinado en la fracción soluble de homogenados hepáticos. La variación de esta fracción, por tanto, por efecto de la cocaína a ratones tratados o no con fenobarbital, ha de influir en los resultados obtenidos. Las variaciones de esta fracción no son significativas y solo se aprecian una discreta disminución a las 12 horas.

La fracción microsómica (10.000 - 105.000 xg) representa la fracción relativa al retículo endoplásmico donde se ubica el sistema monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450. Esta fracción se induce por efecto del fenobarbital y por dosis sucesivas de cocaína (60 mg/Kg). Los valores encontrados demuestran esta inducción, ya que los elevados valores iniciales aportados por el fenobarbital y la cocaína *per se* hace subir la concentración de proteínas microsomales hasta alcanzar a las 24 horas los mismos valores que el fenobarbital.

La fracción mitocondrial (800 - 10.000 xg) incluye otros corpúsculos subcelulares como los peroxisomas. Esta fracción se ha utilizado para la determinación de la catalasa.

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	75 ± 5 (100)	81 ± 10 (108)
12	69 ± 7 (92)	65 ± 7 (86)
24	83 ± 10 (110)	72 ± 8 (96)
48	81 ± 9 (108)	78 ± 7 (104)
72	73 ± 9 (97)	81 ± 9 (108)
96	75 ± 8 (100)	79 ± 10 (105)

Tabla 28A.- Proteínas solubles de homogenado de hígado (centrifugado a 105.000 xg), de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados expresados como mg de proteínas/g de hígado, son media ± S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativo (*p<0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	12,7 ± 1,5 (100)	10,6 ± 1,2 (83)
12	8,7 ± 0,9 (68)	4,2 ± 0,5 (33)*
24	12,0 ± 1,5 (94)	9,3 ± 1,0 (73)
48	8,1 ± 0,9 (63)*	7,8 ± 0,8 (61)*
72	5,8 ± 0,6 (46)*	6,4 ± 0,7 (50)*
96	4,5 ± 0,5 (35)*	4,5 ± 0,5 (35)*

Tabla 28B.- Proteínas mitocondriales de homogenado de hígado (centrifugado a 800 - 10.000 xg), de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados expresados como mg de proteínas/g de hígado, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativo (*p < 0,001).

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA ADMINISTRACION DE COCAINA	COCAINA	FENOBARBITAL + COCAINA
0	14,0 ± 1,2 (100)	23,0 ± 3,0 (164) *
12	17,0 ± 2,0 (121)	22,0 ± 2,6 (157) *
24	21,8 ± 2,3 (156) *	21,8 ± 3,2 (156) *
48	18,0 ± 2,0 (129)	21,6 ± 3,1 (154) *
72	15,6 ± 1,8 (111)	17,0 ± 1,8 (121)
96	14,0 ± 1,5 (100)	16,0 ± 1,8 (114)

Tabla 28C.- Proteínas microsomales de homogenado de hígado (centrifugado a 10.000 - 105.000 xg), de ratones tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). Las muestras de hígado se obtuvieron a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección de cocaína. Los resultados expresados como mg de proteínas/g de hígado, son media \pm S.D. de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativo (*p < 0,001).

3.10.- Citometría de flujo

La técnica relativamente reciente de citometría de flujo permite la evaluación de multitud de parámetros celulares de una gran utilidad en estudios sobre la toxicidad de agentes químicos. El estudio de las variaciones en el DNA celular en poblaciones hepatocelulares se consideran análisis de gran precisión en determinaciones sobre la citotoxicidad y la genotoxicidad de xenobióticos.

3.10.1.- Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo en hepatocitos aislados de ratón

Muestras de hepatocitos aislados de ratones fetales y adultos, tratados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) y pretratados o no con fenobarbital, se obtuvieron a diferentes tiempos después de la administración de la cocaína (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas y 7 días), y se procesaron para analizar las poblaciones de hepatocitos en base a su contenido en DNA. De esta manera se ha establecido con precisión el porcentaje de células que se encuentran en una determinada fase del ciclo de división celular, para hacer un seguimiento en la secuencia de acontecimientos hepatocelulares ocasionados por la cocaína. Esta secuencia comprende la lesión hepática (muerte celular) y la regeneración post-necrótica.

En las Figuras 29 y 30, se muestra el contenido de DNA evaluado por la fluorescencia emitida a 623 nm por el complejo formado por el DNA y el yoduro de propidio en abscisas, frente al número de células, en ordenadas. La Figura 29 muestra el histograma de hepatocitos de fetos a término (19 días de gestación), donde aparece la distribución del DNA en las fases del ciclo de división celular; expresado en porcentajes: fase G₀-G₁ (64,3 %), fase S (28,9 %) y la fase G₂/M (6,9 %).

En la Figura 30, que se refiere a hepatocitos de ratón adulto, se observa en el control (0 horas) tres poblaciones correspondientes a diploides (2N), tetraploides (4N) y octoploides (8N). A las

12 horas de la administración de cocaína se observa un pico hipodiploide (13 %), correspondiente a células apoptóticas. A las 24 horas, el histograma de hepatocitos tiende a asemejarse al obtenido para los hepatocitos controles, si bien las poblaciones 4N y 8N tienden a incrementarse. A las 48 horas se aprecia un incremento en la población octoploide, la cual disminuye considerablemente a las 72 horas de la inyección de cocaína.

El tratamiento con fenobarbital (FB), produjo casi una disminución de las poblaciones tetraploide y octoploide. Comparando estas variaciones con el control se observa que el fenobarbital produce un incremento en la fase G0-G1 (59 % --> 79 %) y disminuciones en las fases tetraploide (39 % --> 21 %) y octoploide (5 % --> 3%). A las 12 horas de la administración de cocaína los hepatocitos presentan un pico hipoploide correspondiente a apoptosis, mientras que la población diploide se mantiene semejante al control presentándose significativamente disminuida la población tetraploide (39 % --> 21 %). A las 24 y 48 horas de la inyección, la población diploide se mantiene prácticamente igual al control mientras que la tetraploide está disminuida a las 24 horas recuperándose a las 48 horas. En ambos grupos aparece un tercer pico en la población octoploide. A las 72 horas aparece un pico hipodiploide, marcadamente significativo correspondiente a células apoptóticas y se encuentran las células tetraploides disminuídas con respecto al grupo control. A las 96 horas y 7 días de la inyección, el histograma muestra una aproximación al obtenido para los hepatocitos control, si bien las poblaciones tetraploide y octoploide permanece incrementada.

En la Tabla 29, se describen los valores obtenidos en las diferentes poblaciones de células (2N, 4N y 8N), así como el número de células apoptóticas existentes a diferentes tiempos transcurridos después de la administración de cocaína a ratones tratados y no tratados previamente con fenobarbital.

	APOPTOSIS	2N	4N	8N
FETAL	--	64	7	--
CONTROL 0	--	59	39	5,4
COCA 12H	13	57	27	2,0
COCA 24H	0,5	41	49	8,0
COCA 48H	1,0	35	42	18,0
COCA 72H	0,6	47	48	2,8
COCA 96H	0,4	38	53	7,0
COCA 7D	0,8	38	52	9,0
FENO 0	--	70	21	3
FCC 12H	31	61	5,5	1,5
FCC 24H	0,7	68	20	8,0
FCC 48H	0,5	43	39	14
FCC 72H	37	32	15	5
FCC 96H	0,3	46	37	14
FCC 7D	0,7	33	51	14

Tabla 29.- Determinación cuantitativa de la ploidia del DNA y caracterización de la apoptosis, según los histogramas de la Figura 29.

-2N = población hipodiploide (apoptosis)

2N = población diploide

4N = población tetraploide

8N = población octoploide

Los resultados se expresan en % y son media de dos determinaciones diferentes.

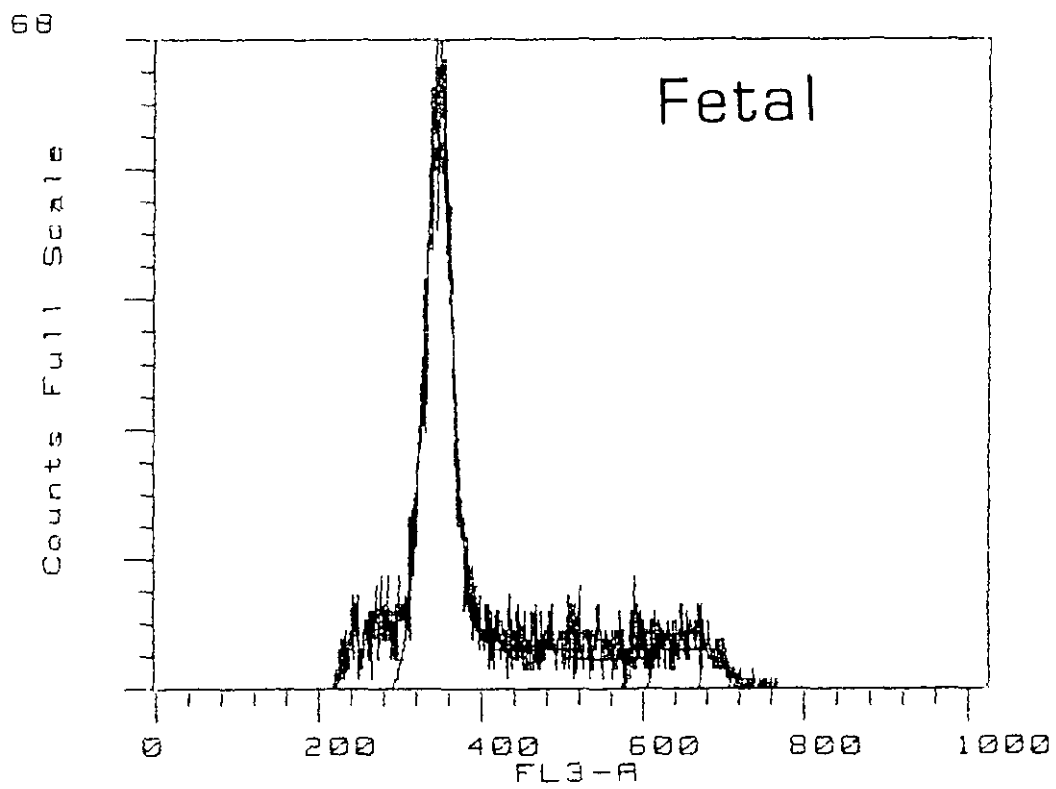


Figura 29.- Histograma de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos fetales a término (19 días de gestación).

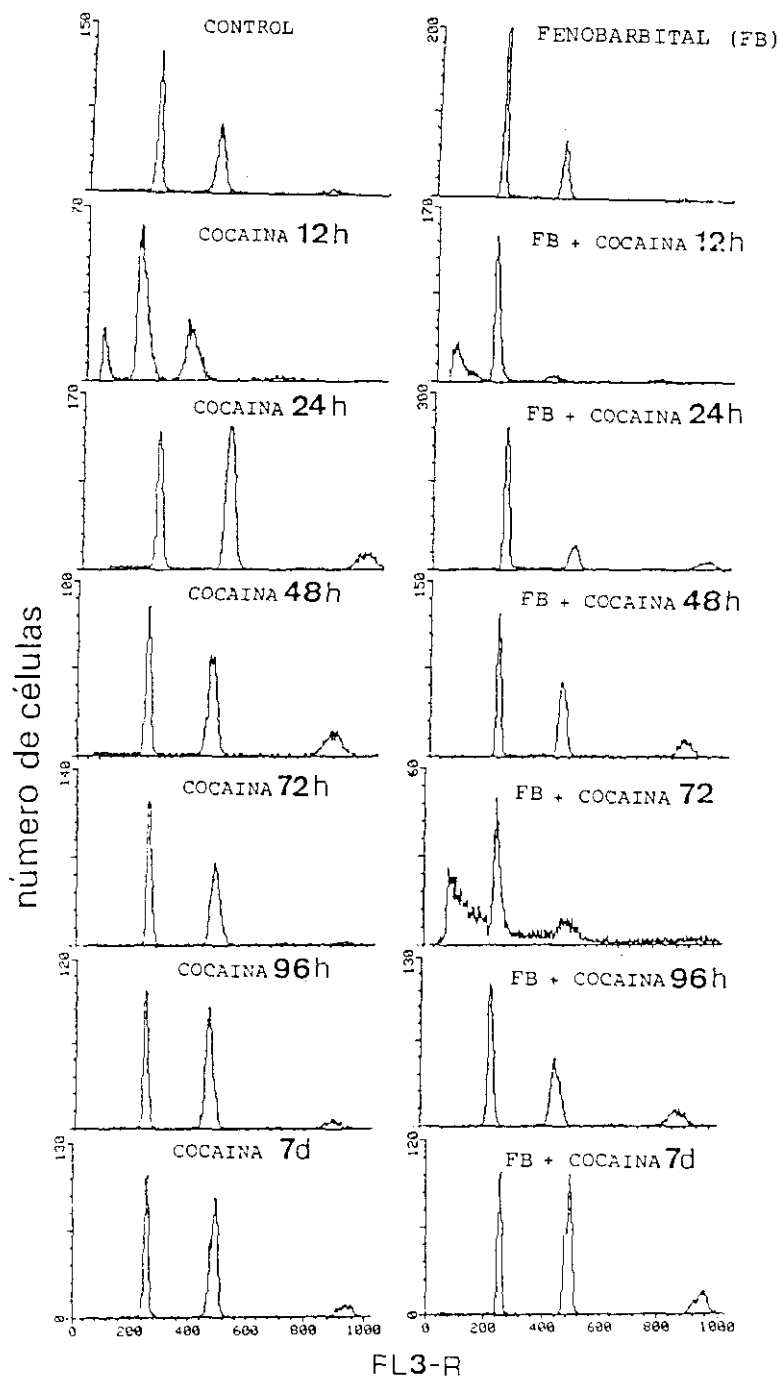


Figura 30.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratón adulto a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas y 7 días) de una inyección subletal de cocaína (60 mg/Kg) en ratones tratados y no tratados con fenobarbital.

	Población 1			Población 2		
	G0-G1	S	G2/M	G2	S2	G4/M
FETAL	64,3	28,9	6,9			
CONTROL	63,3	2	34,7	83,1	3,2	13,7
FENOBARBITAL	73,6	4	22,3	81,2	8,3	10,4

Tabla 30.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular.

Población 1: Fases G0/G1; S y G2/M.

Población 2: Fases G2; S2 y G4/M.

Las fases G0/G1 corresponden a la población diploide, la fase G2 población tetraploide, la G4 población octoploide, fase S población en síntesis de DNA, S1 población en síntesis de DNA desde G1 a G2 y S2 población en síntesis de DNA desde G2 a G4.

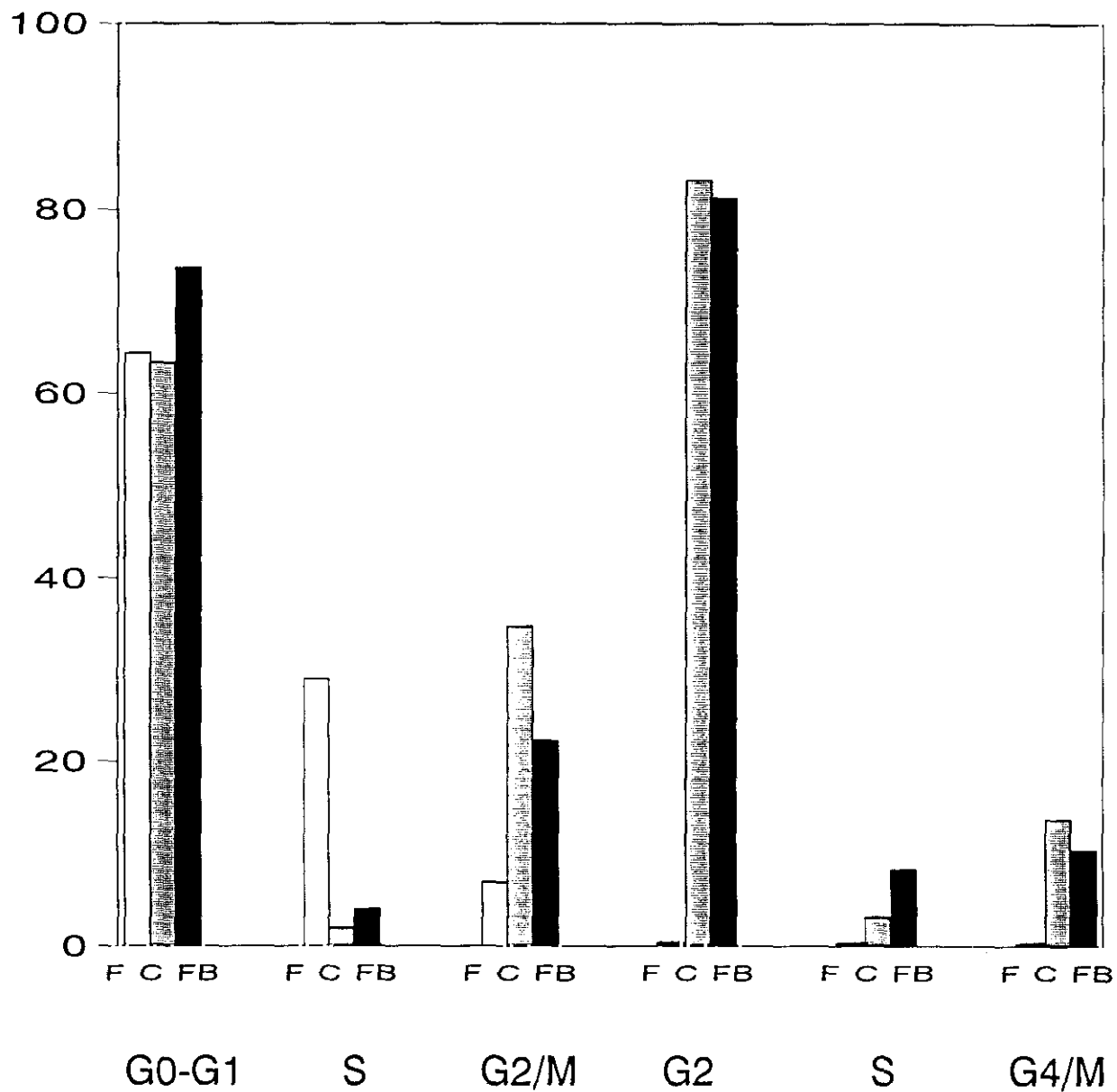


Figura 31.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo celular. Se establecen dos poblaciones (población 1: G0/G1, S, G2/M y población 2: G2, S y G4/M). Los valores numéricos se expresan en tanto % y se encuentran en la Tabla 30.

F = Fetal, C = Control, FB = Fenobarbital.

	G0/G1	S	G2/M
COCA 12H	72	5,0	23
COCA 24H	81	3,0	16
COCA 48H	58	2,4	39
COCA 72H	63	2,0	35
COCA 96H	52	1,5	46,5
COCA 7D	51	1,3	47,7
COCA 14D	49	1,0	40
FEN+COCA 12H	92	3,0	5
FEN+COCA 24H	85	5,0	10
FEN+COCA 48H	73	4,0	23
FEN+COCA 72H	65	22,0	13
FEN+COCA 96H	64	2,0	34
FEN+COCA 7D	46	0	54
FEN+COCA 14D	56	0	44

Tabla 31.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) en hepatocitos de ratones adultos inyectados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas, 7 y 14 días) tratados y no tratados con fenobarbital.

	G0/G1 (G2)	S (S2)	G2/M (G4/M)
COCA 12H	75	11	14
COCA 24H	83	2	15
COCA 48H	49	7	44
COCA 72H	87	6	7
COCA 96H	77	7	16
COCA 7D	71	6	23
COCA 14D	72	5	23
FEN+COCA 12H	43	50	7
FEN+COCA 24H	60	3	37
FEN+COCA 48H	64	5	31
FEN+COCA 72H	39	34	27
FEN+COCA 96H	48	9	43
FEN+COCA 7D	56	5	39
FEN+COCA 14D	41	3	56

Tabla 32.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo celular (G2, S2 y G4/M) en hepatocitos de ratones adultos inyectados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas, 7 y 14 días) tratados y no tratados con fenobarbital.

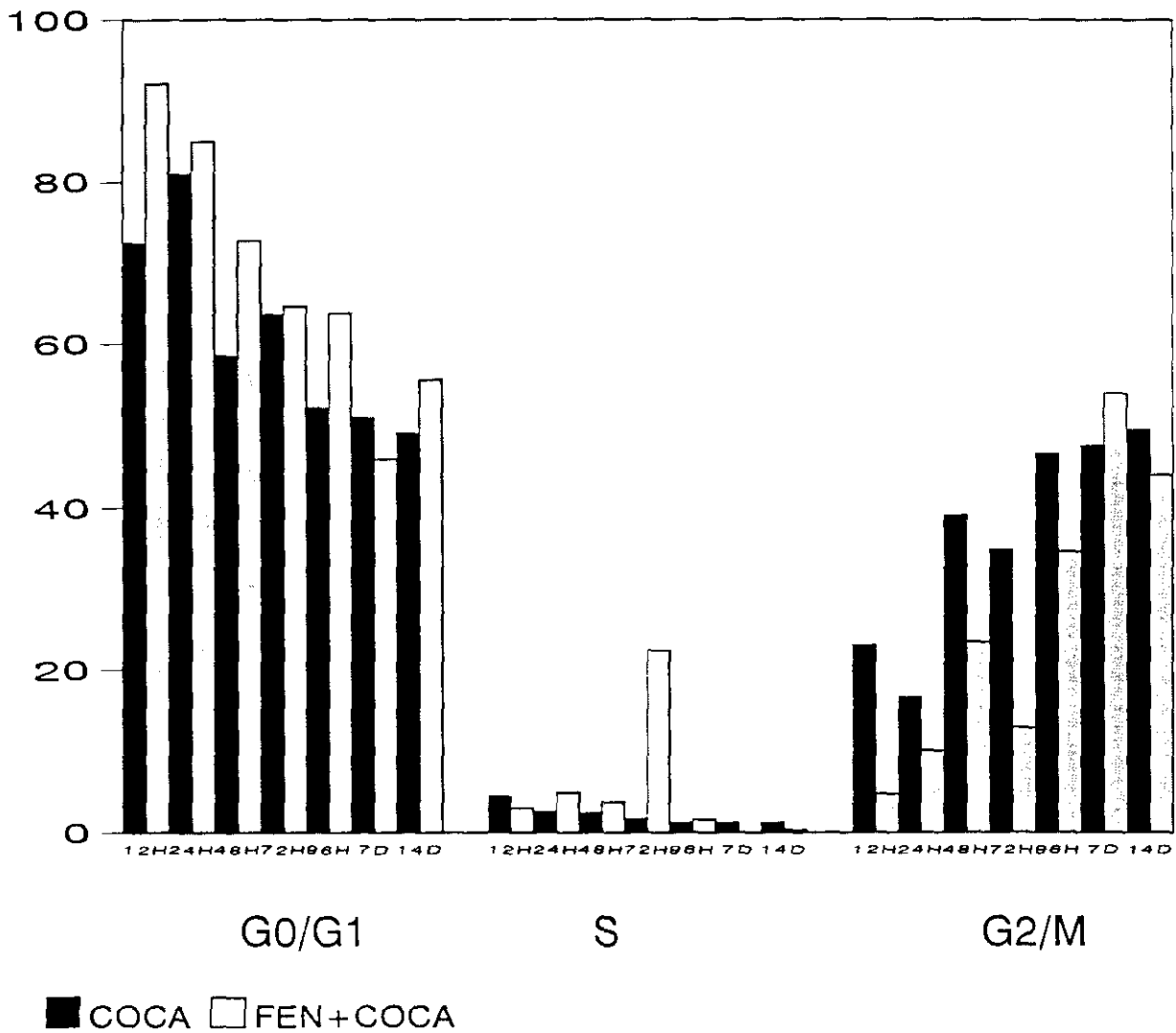


Figura 32.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular (G0/G1, S y G2/M) en hepatocitos de ratones adultos inyectados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas, 7 y 14 días) tratados y no tratados con fenobarbital. Los valores numéricos se encuentran recogidos en la Tabla 31.

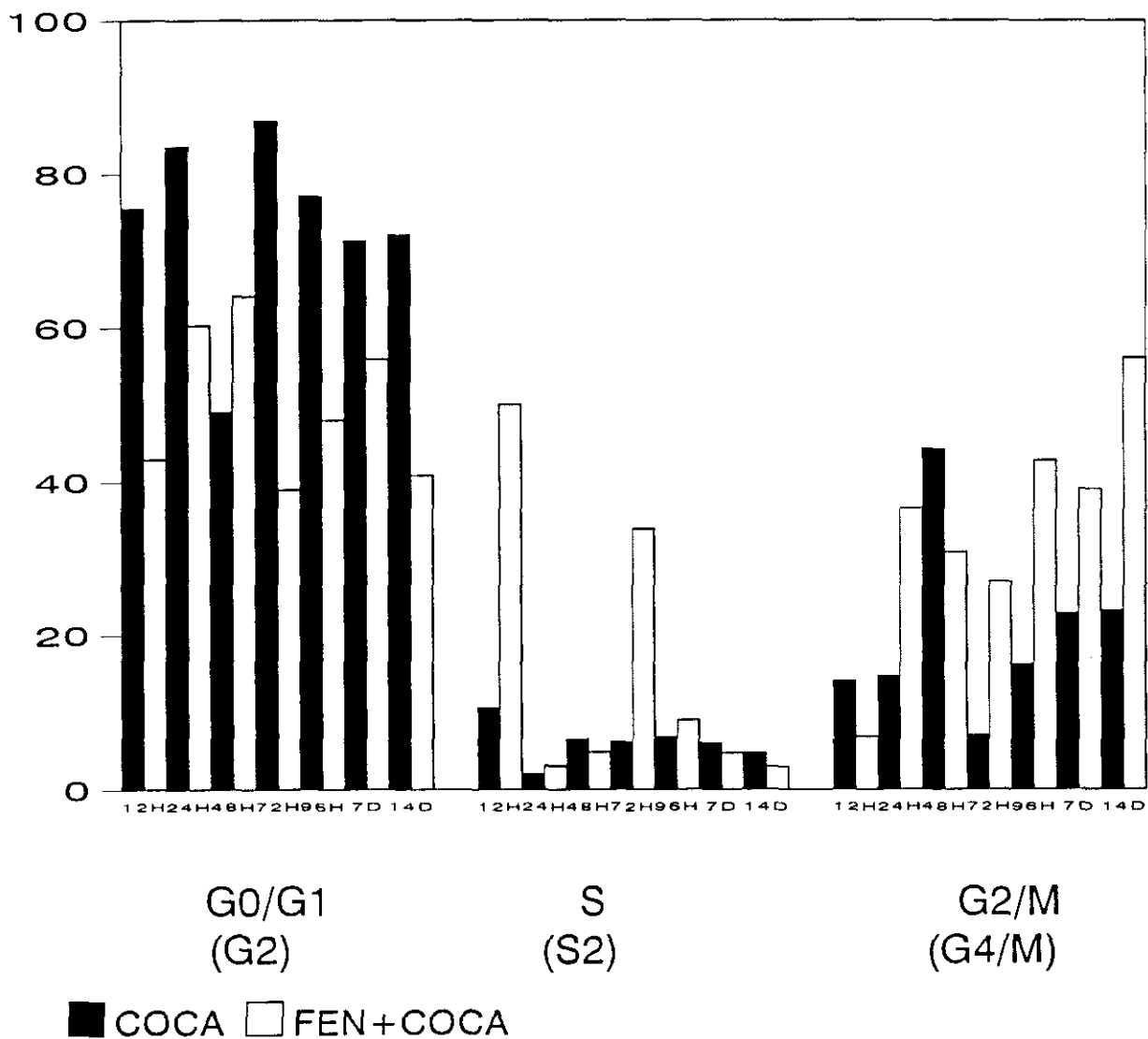


Figura 33.- Distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular (G2, S2 y G4/M) en hepatocitos de ratones adultos inyectados con una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a diferentes tiempos (0, 12, 24, 48, 72, 96 horas, 7 y 14 días) tratados y no tratados con fenobarbital. Los valores numéricos se encuentran recogidos en la Tabla 32.

3.11.- Morfología en preparaciones histológicas de hígado de ratón

La cocaína con y sin pretratamiento con fenobarbital, induce lesión hepática en ratones en relación al grupo control (Fotografía 1). Los animales tratados con una dosis de cocaína (60 mg/Kg) por vía i.p., sufren una necrosis coagulativa de la zona perivenosa. Dicha lesión comienza a desarrollarse a las 12 horas de la inyección (Fotografía 2), siendo a las 24 horas cuando alcanza su máxima intensidad (Fotografía 3). En este período las células necróticas son marcadamente eosinófilas, o fragmentados y forman una banda de necrosis perivenosa que ocupa aproximadamente el 30 % del parénquima. Los hepatocitos que están situados en los bordes de la lesión están pálidos, hinchados y muestran un citoplasma finamente granular (Fotografía 3b). Células de infiltrado inflamatorio agudo son observadas en las áreas de necrosis. A partir de las 48 horas y hasta las 96 horas, se aprecian numerosas células en mitosis, índice de regeneración hepática (Fotografía 4), existiendo diferencias entre las diversas zonas del acino, tal y como se pone de manifiesto en la Tabla 33. A los 14 días el parénquima hepático ha adquirido su morfología habitual (Fotografía 5), no observándose diferencias con el grupo control. En los ratones tratados con una dosis de cocaína (60 mg/Kg), previa inducción con fenobarbital sódico, durante cinco días consecutivos, administrado en el agua de bebida (1g/l), el patrón de necrosis hepática, varía con respecto a los ratones tratados únicamente con cocaína, ya que la lesión afecta a la zona periportal (zona 1), existiendo además una esteatosis microvacuolar más o menos difusa provocada por el tratamiento con fenobarbital (Fotografía 6). En la mayoría de los animales, los hepatocitos que rodean al terminal porta, están bien conservados, pero los inmediatamente adyacentes, muestran una necrosis coagulativa que envuelve del 30 al 50 % del parénquima. La necrosis es similar a la descrita en ratones tratados únicamente con cocaína (Fotografías 7 y 8), observándose también células hepáticas pálidas e hinchadas en los bordes de la lesión. La necrosis está totalmente establecida a las 12 horas (Fotografía 7), y se mantiene hasta las 48 horas, período a partir del cual comienza la proliferación celular (Fotografía 9), que se mantiene hasta las 96 horas. El patrón de regeneración muestra diferencias relevantes entre las distintas áreas del acino (Tabla 33). A los 14 días la morfología hepática vuelve a ser la habitual (Fotografía 10), al igual que ocurría en los ratones tratados únicamente con cocaína.

Fotografía 1.- Hígado control de un ratón Swiss macho. Hematoxilina-eosina.

(a) Panorámica. Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P)(x125).

(b) Detalle de un espacio perivenoso (V)(x 250).

Fotografía 2.- Necrosis perivenosa incipiente en un ratón Swiss macho, a las 12 horas de la administración de 60 mg/Kg, de clorhidrato de cocaína, por vía intraperitoneal. Hematoxilina-eosina.

(a) Panorámica. Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P). Mitosis (flecha) (x125).

(b) Detalle de la necrosis. Espacio perivenoso (V). (x250)

Fotografía 3.- Necrosis perivenosa en un ratón Swiss macho, a las 24 horas de la administración de una dosis única, de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína, por vía intraperitoneal. Hematoxilina-eosina.

(a) Panorámica. Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P). (x125).

(b) Detalle de la necrosis. Espacio perivenoso (V). (x250).

Fotografía 4.- Regeneración hepática. Ratón Swiss macho, a las 48 horas de la administración de una dosis única de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína, por vía intraperitoneal. Hematoxilina-eosina.

(a) Panorámica en la que se observan varios hepatocitos en mitosis (flecha). Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P). (x250).

(b) Detalle de un hepatocito central en mitosis (flecha). (x1250).

Fotografía 5.- Hígado sin alteraciones histológicas, en un ratón Swiss macho, a los 7 días de la administración de una dosis única de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína, por vía intraperitoneal. Hematoxilina-eosina.

(a) Panorámica. Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P).(x125).

(b) Detalle de un espacio perivenoso (V).(x250).

Fotografía 6.- Esteatosis microvacuolar en un ratón Swiss macho, al que se administró una solución de fenobarbital sódico (1g/l) en el agua de bebida, durante cinco días consecutivos.

- (a) Panorámica. Espacio perivenoso (V). Terminal porta (P).(x125).
- (b) Detalle de la esteatosis. (x500).

Fotografía 7.- Necrosis periportal y esteatosis microvacuolar difusa en un ratón Swiss macho a las 12 horas de la administración de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína por vía intraperitoneal, que previamente había recibido durante cinco días consecutivos una solución de 1g/l de fenobarbital sódico, en el agua de bebida. Hematoxilina-eosina.

- a) Panorámica. Terminal porta (P). Espacio perivenoso (V).(x125).
- b) Detalle de la necrosis y de la esteatosis. Terminal porta (P).(x250).

Fotografía 8.- Necrosis periportal en un ratón Swiss macho, a las 24 horas de la administración de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína por vía intraperitoneal, que previamente había recibido durante cinco días consecutivos, una solución de 1g/l de fenobarbital sódico, en el agua de bebida. Hematoxilina-eosina.

- a) Panorámica. Terminal porta (P). Espacio perivenoso (V).(x125).
- b) Detalle de la necrosis. Terminal porta (P).(x250).

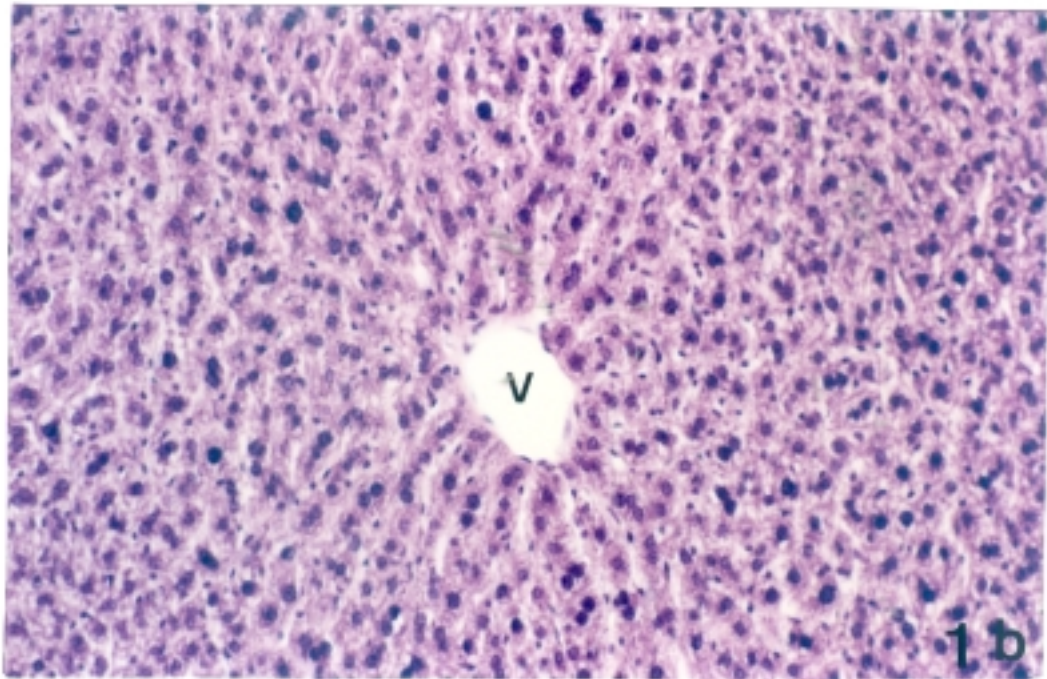
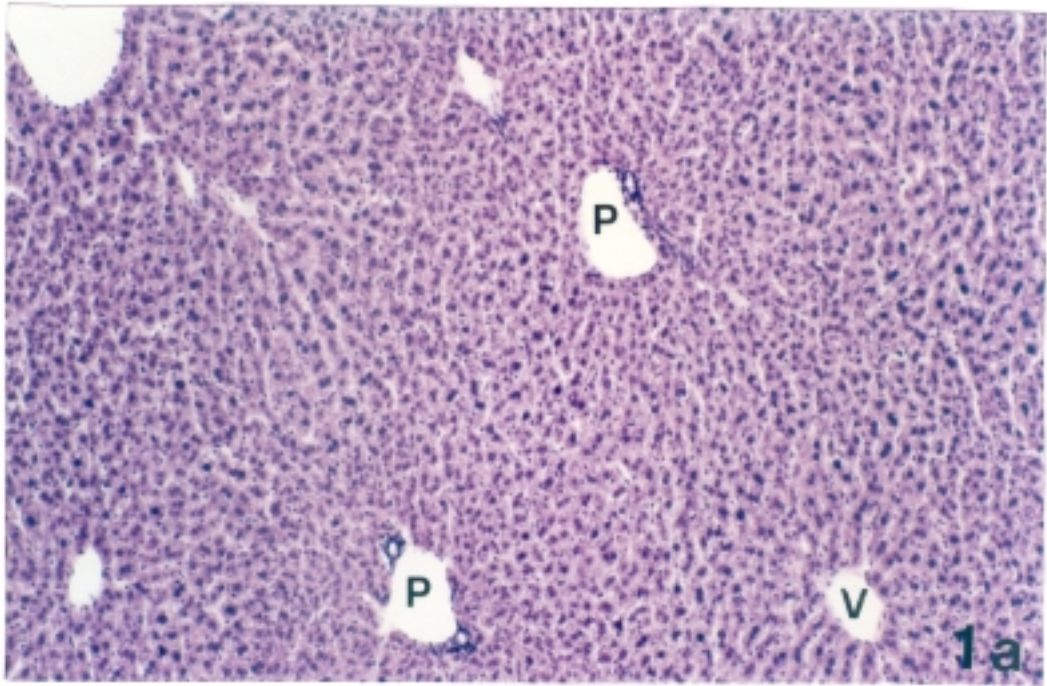
Fotografía 9.- Regeneración hepática. Ratón Swiss macho a las 48 horas de la administración de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína por vía intraperitoneal, que previamente había recibido durante cinco días consecutivos, una solución de 1g/l de fenobarbital sódico, en el agua de bebida. Hematoxilina-eosina.

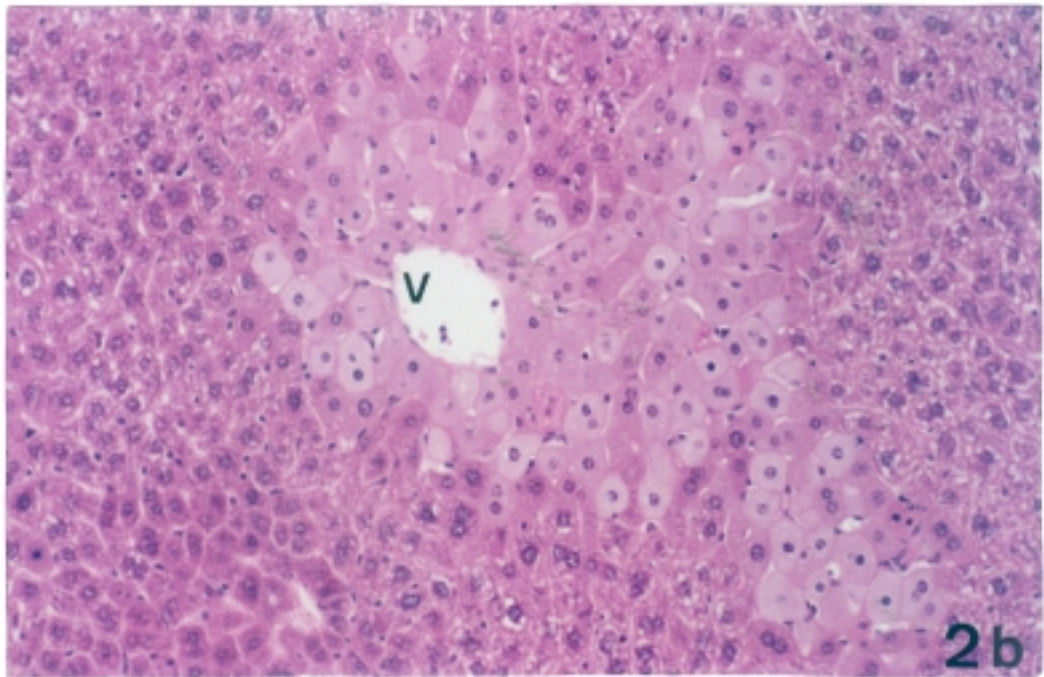
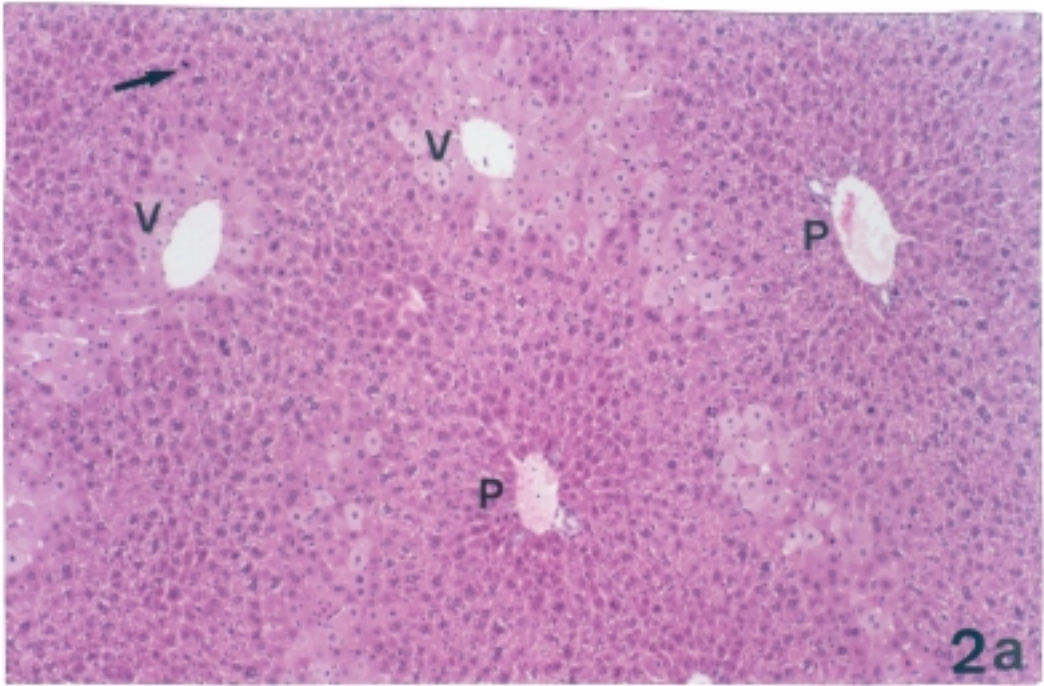
- a) Panorámica. Mitosis (flecha).(x250).
- b) Detalle de un hepatocito mediozonal en mitosis (flecha). (x1250).

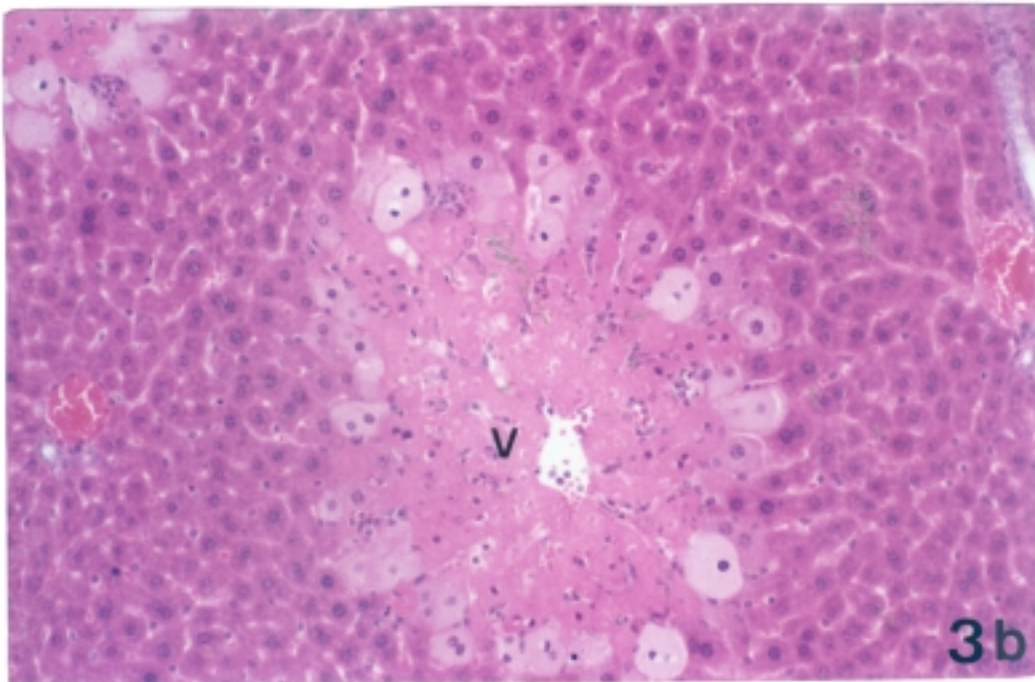
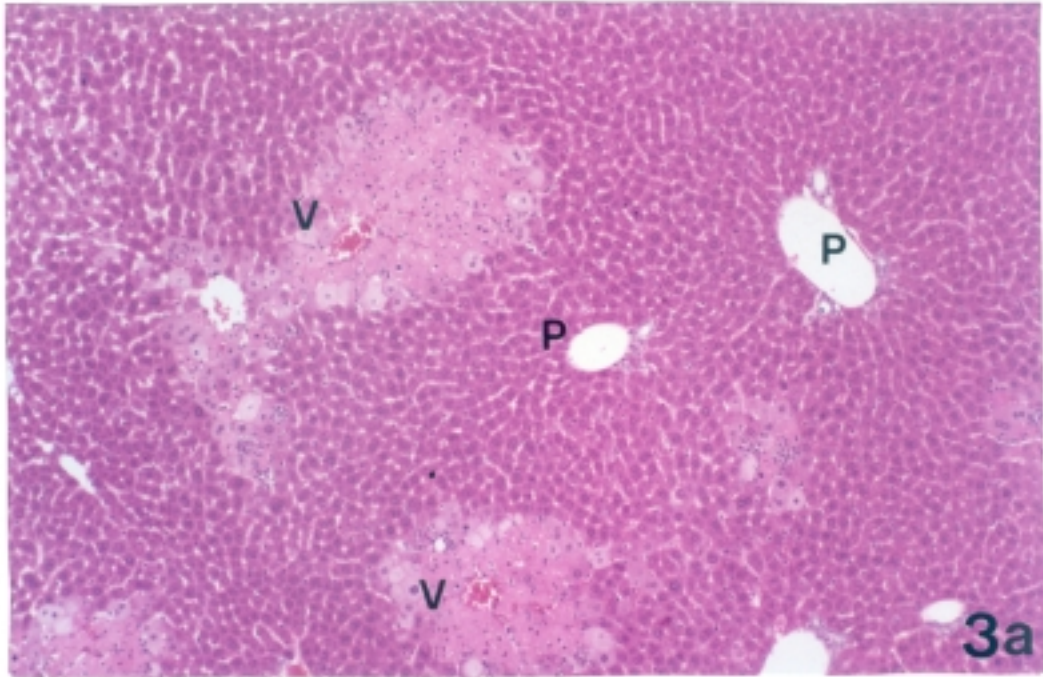
Fotografía 10.- Hígado sin alteraciones histológicas, en un ratón Swiss macho a los 14 días de la administración de 60 mg/Kg de clorhidrato de cocaína por vía intraperitoneal, que previamente había recibido durante cinco días consecutivos, una solución de 1g/l de fenobarbital sódico, en el agua de bebida. Hematoxilina-eosina.

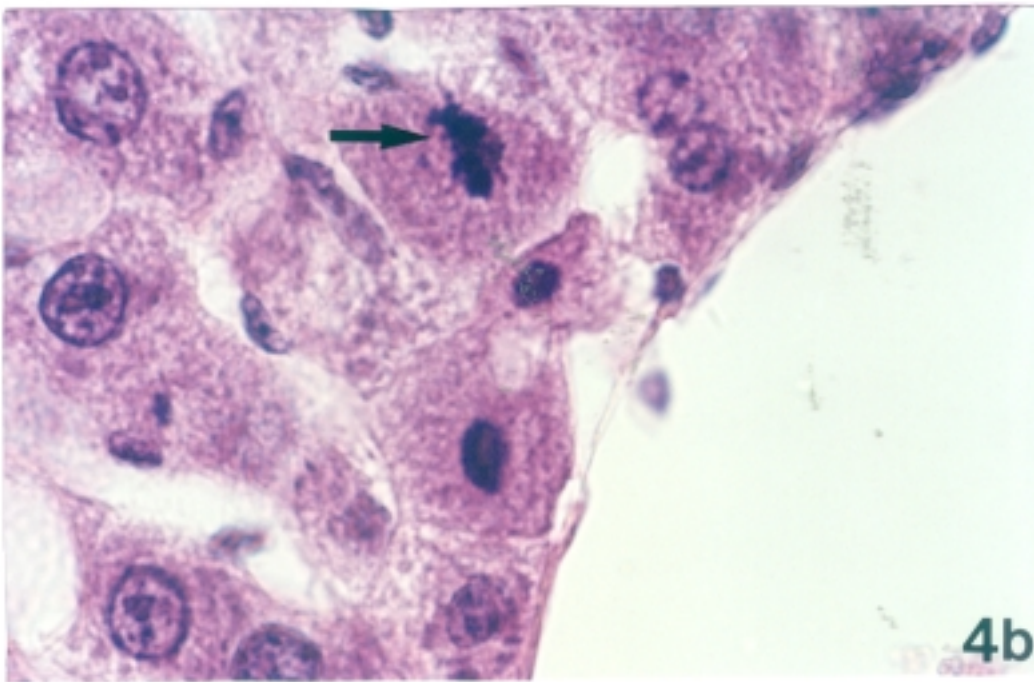
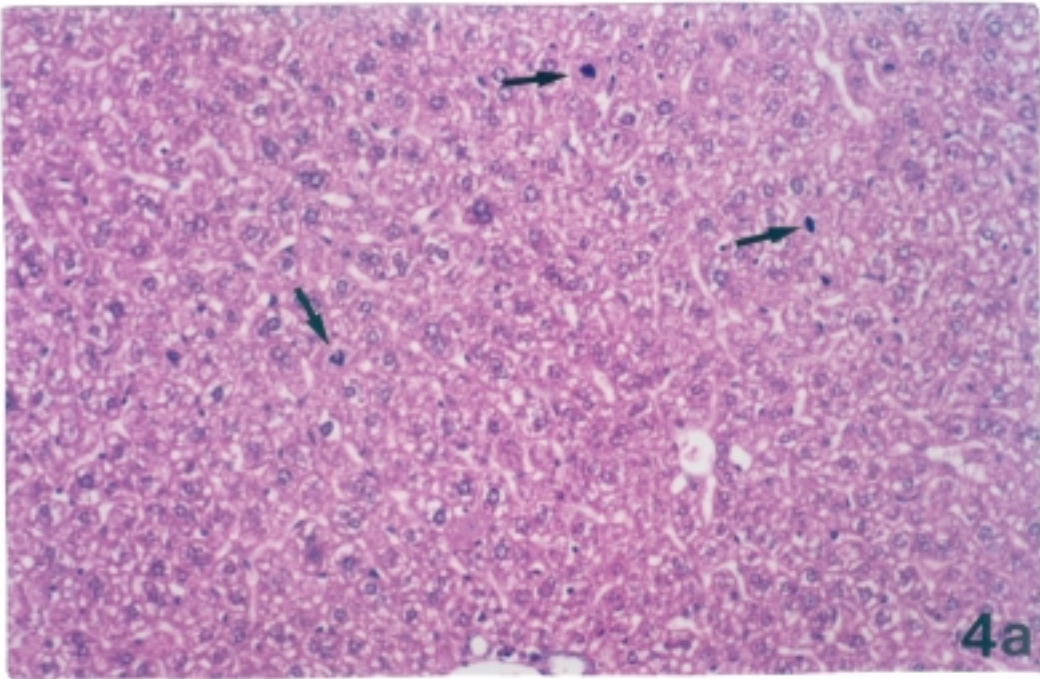
a) Panorámica. Terminal porta (P). Espacio perivenoso (V). (x125).

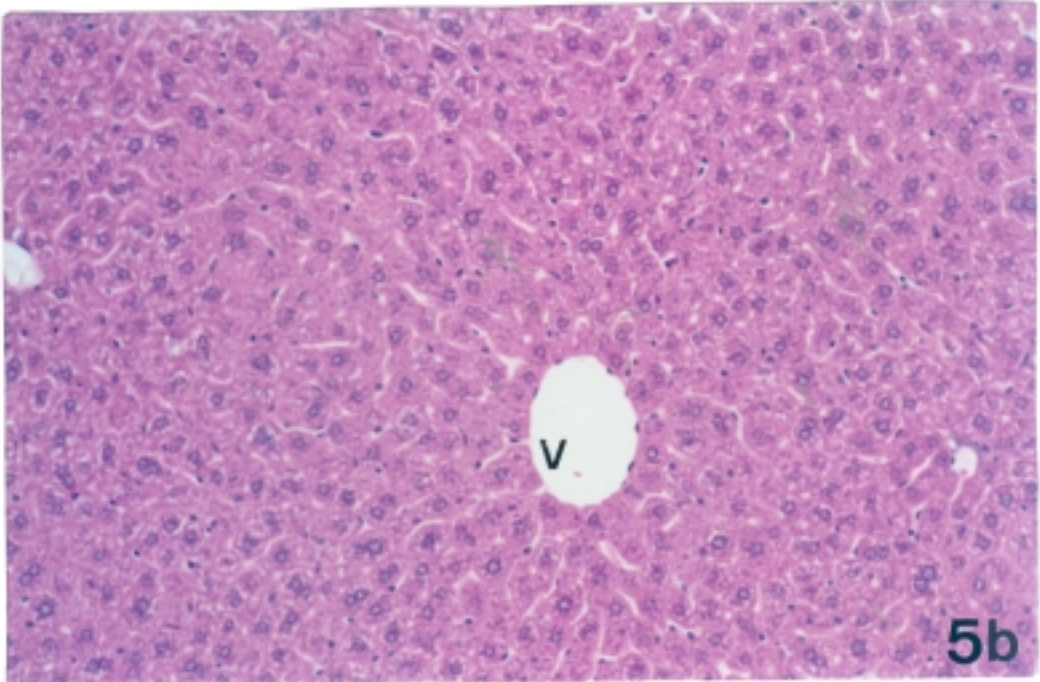
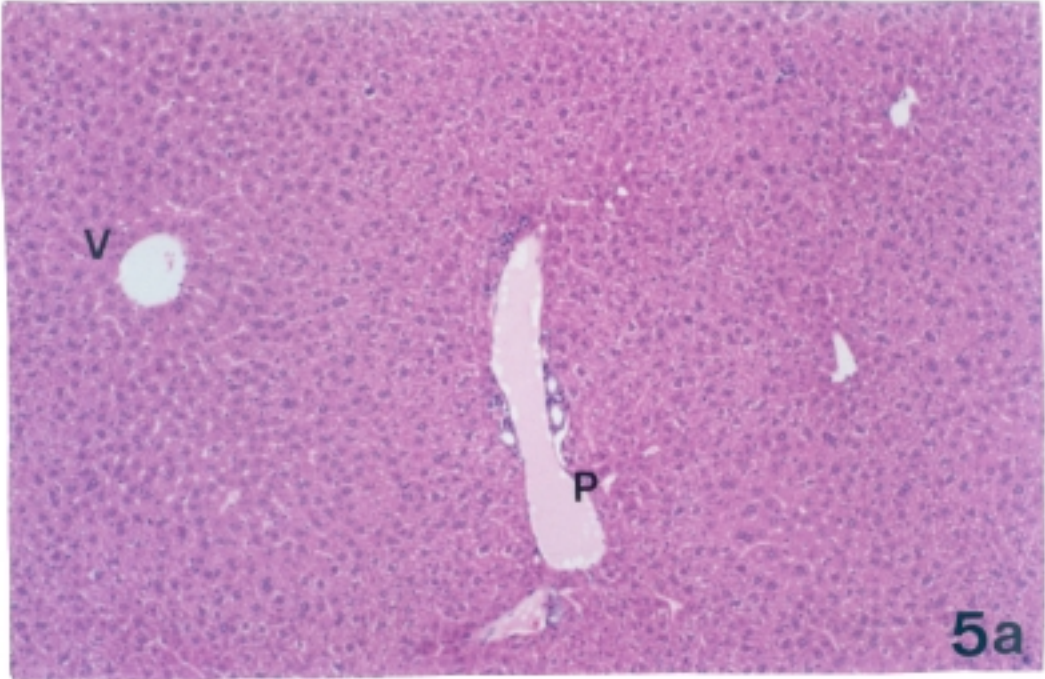
b) Detalle de un Terminal porta (P). (x250)

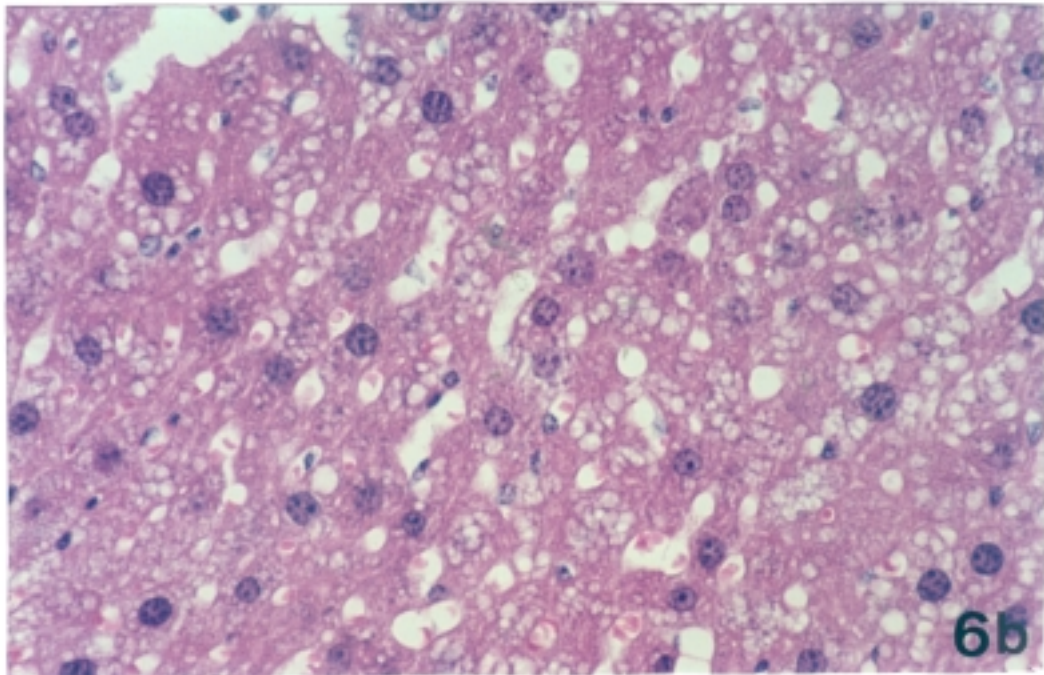
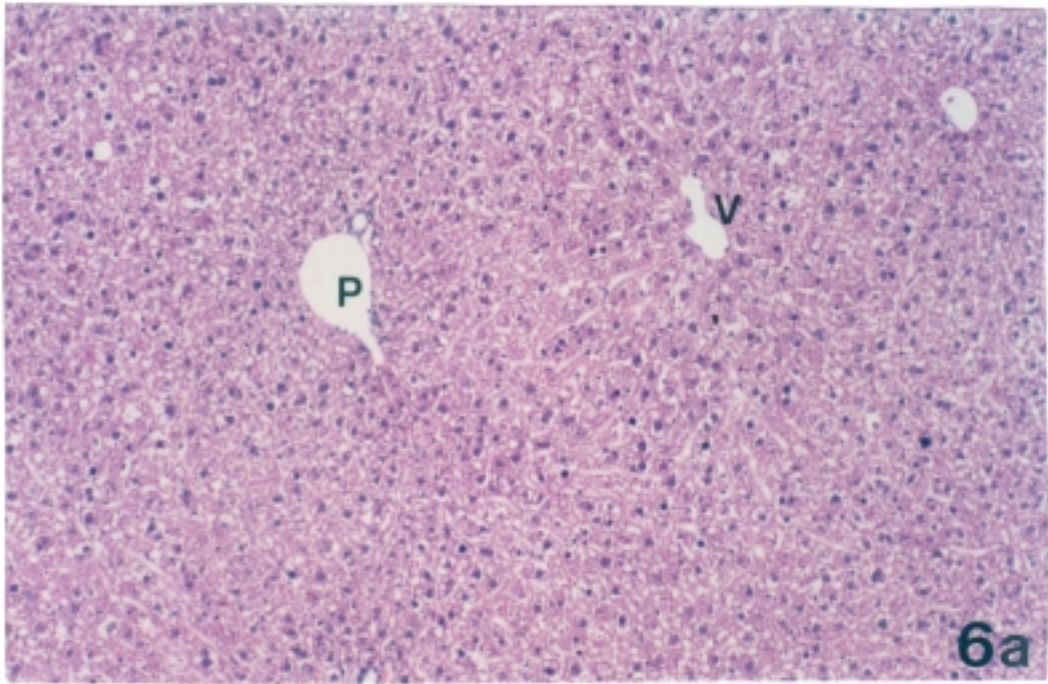


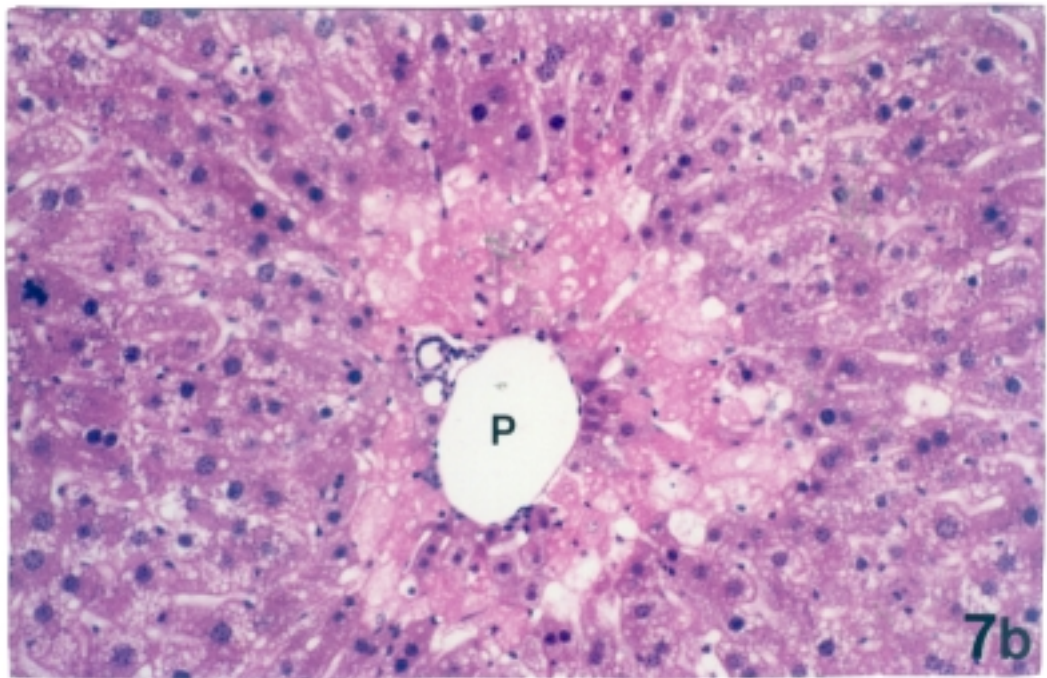
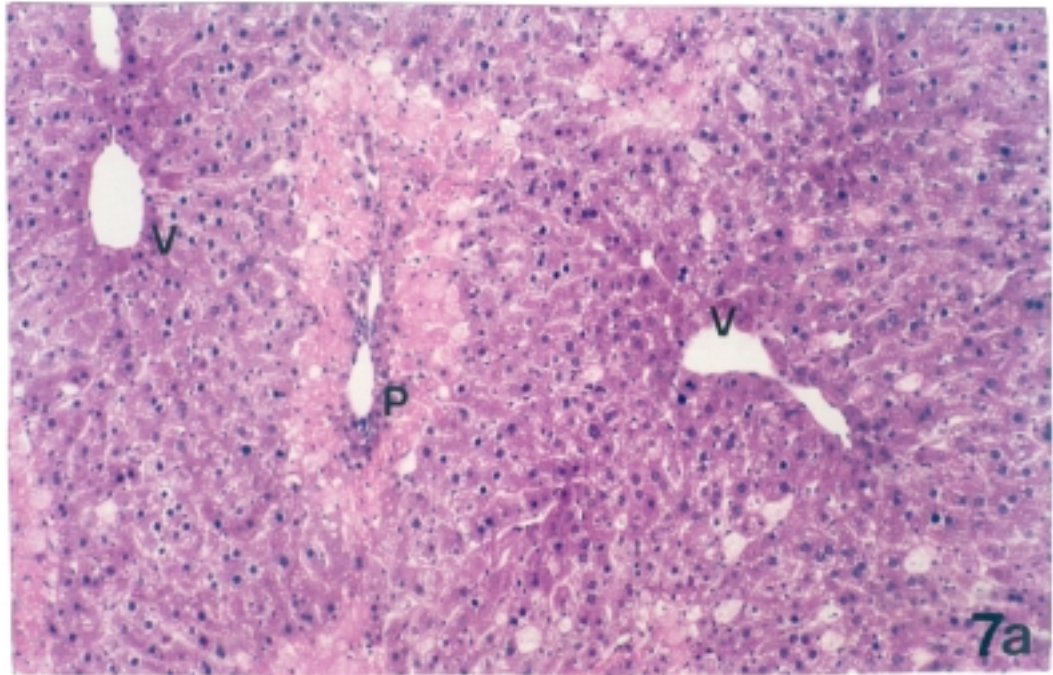


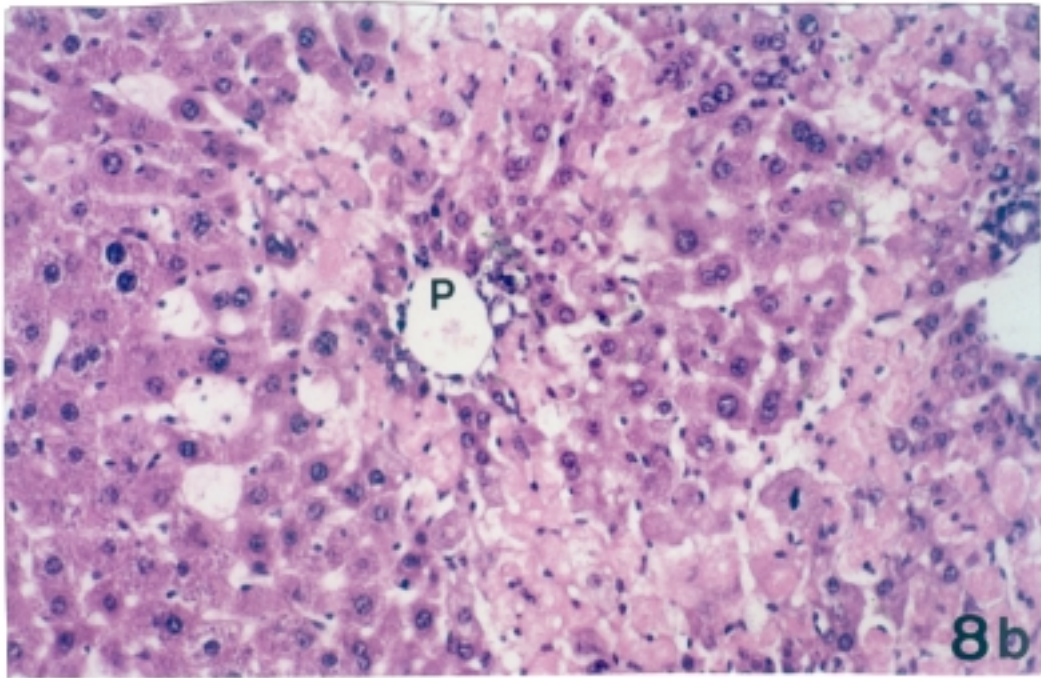
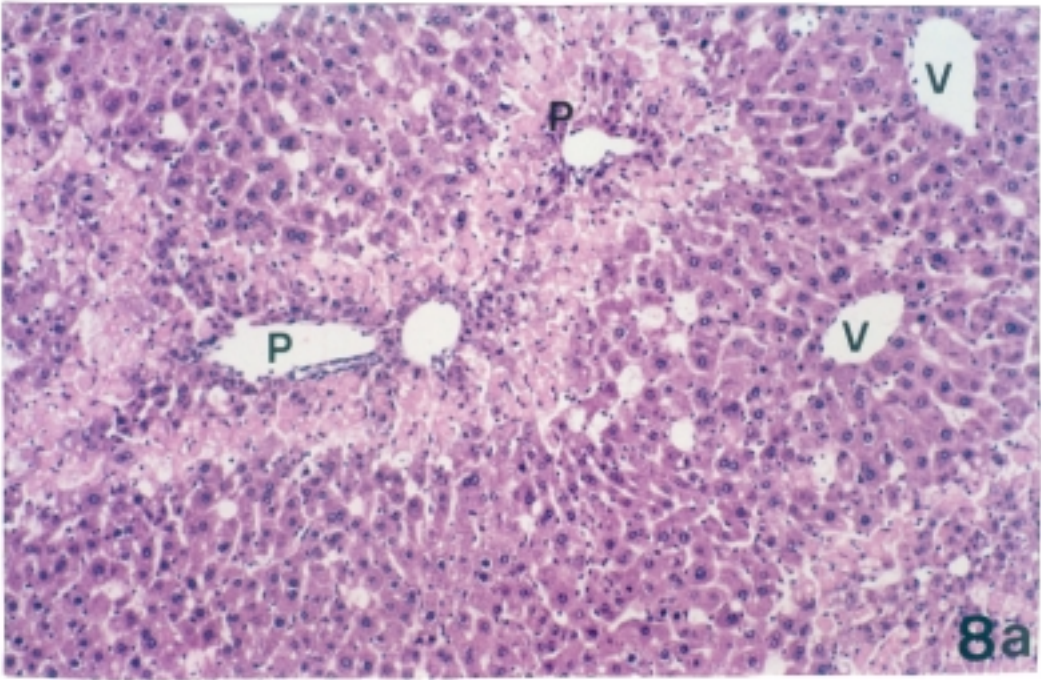


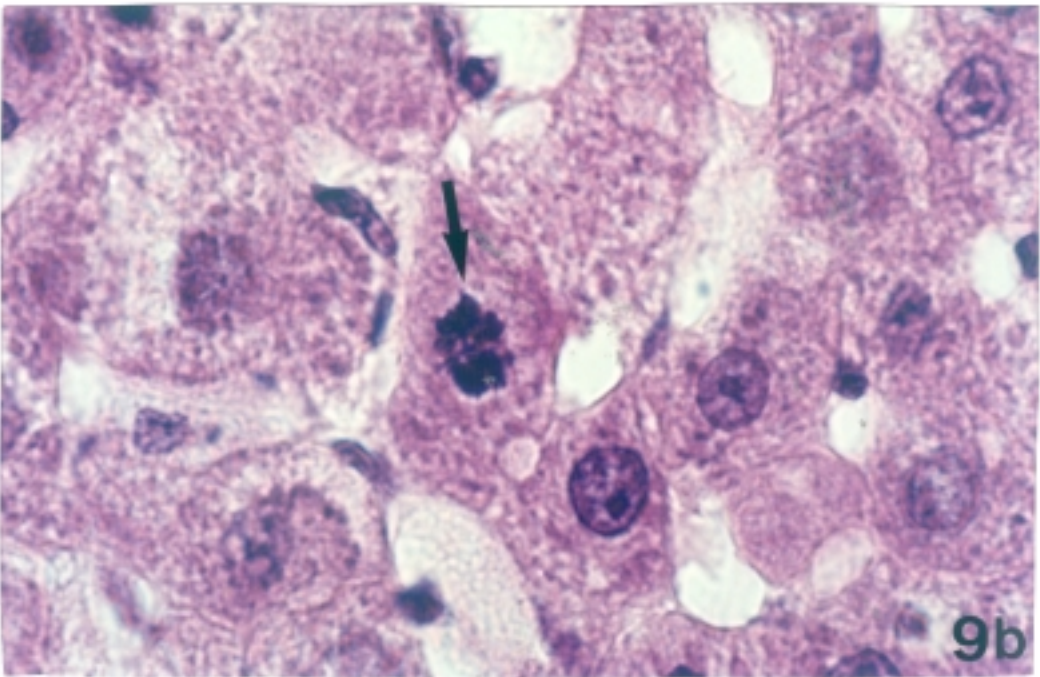
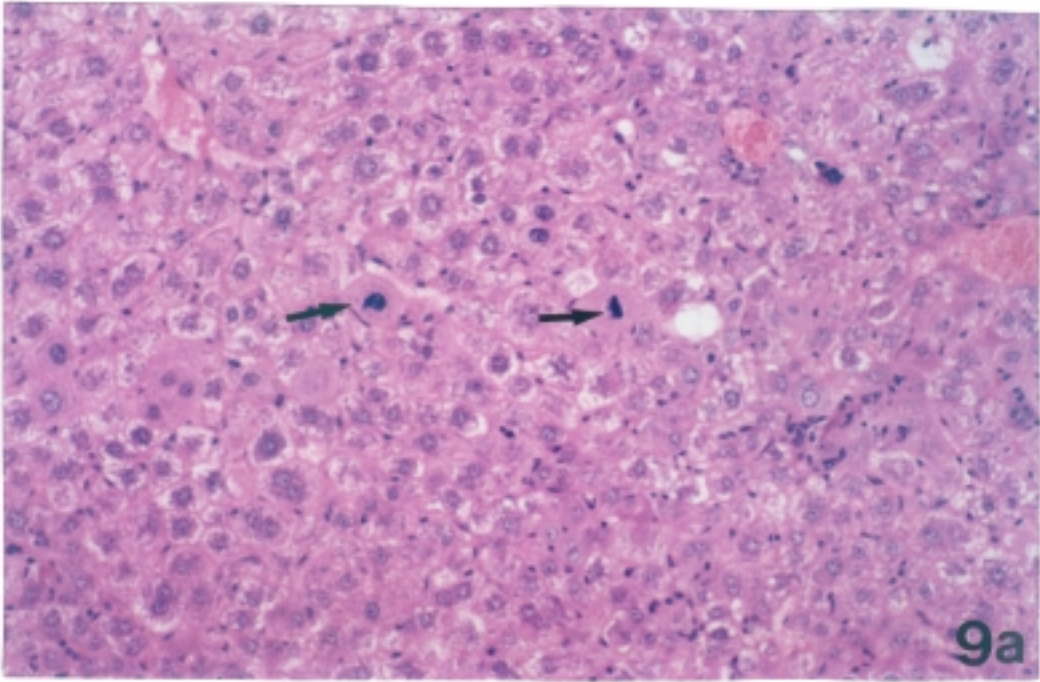


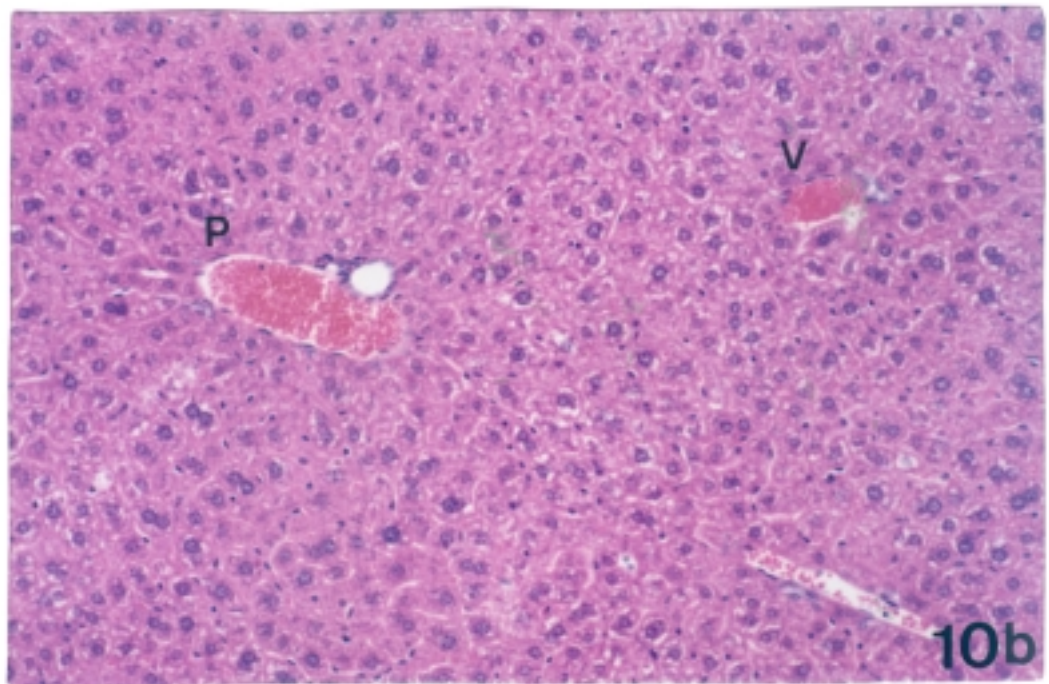
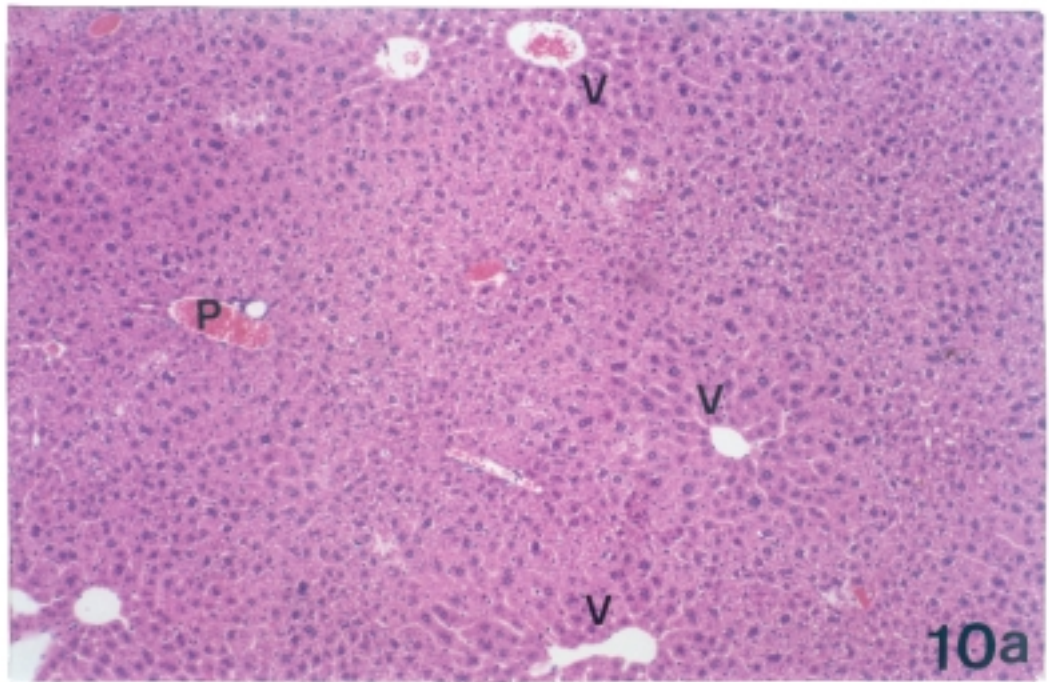












3.11.1.- Cálculo del índice mitótico

El cálculo del índice mitótico (IM), se basa en la relación existente entre el número de mitosis y el número de células (Simpson et al 1992). En el presente trabajo este índice se ha expresado, como número de mitosis por diez mil células

Para su realización, se han analizado los cortes de hígado de los animales de los grupos control, fenobarbital, cocaína y fenobarbital+ cocaína, examinando en cada una de ellos las tres zonas del acino hepático (zona periportal, zona mediozonal y zona perivenosa) por separado.

La estimación del número de células se hace, utilizando el objetivo de 40x, que permite el reconocimiento de las figuras mitóticas, siguiendo el criterio de Baak et al (1983 y 1985). El campo microscópico obtenido con dicho objetivo es dividido en dos partes por una línea que coincide con el diámetro del círculo, contando el número de núcleos celulares que son interceptados por dicha línea (n). La fórmula empleada para estimar el número de células por campo es la del área del círculo: $A = n r^2$, donde r (radio) = $n/2$.

Se han estudiado diez campos consecutivos en cada una de las zonas del acino hepático, para valorar el número de mitosis, y tres de ellos (1, 5 y 10), han sido utilizados para contar el número de células. La estimación del número total de células se realiza multiplicando la media obtenida en los tres campos, multiplicada por 10.

La razón existente entre el total de mitosis en los 10 campos y el total de células, presentes en esos mismos 10 campos, constituye el índice mitótico.

	PERIVENOSA			MEDIOZONAL			PERIPORTAL		
	Nº CEL	Nº MIT	IM	Nº CEL	Nº MIT	IM	Nº CEL	Nº MIT	IM
CONTROL 0	801	0	0	962	1	10	815	0	0
COCA 24H	815	1	12	1378	3	22	1259	0	0
COCA 48H	1261	8	73	1369	10	73	1376	4	20
COCA 72H	1259	5	40	1341	8	60	1244	3	24
COCA 96H	1319	5	38	1293	7	54	1278	3	23
COCA 7D	810	0	0	824	0	0	803	0	0
FENO 0	670	1	14	669	1	15	654	1	15
FCC 24H	1383	2	14	1160	3	26	759	2	26
FCC 48H	1383	5	36	1183	11	93	1076	9	84
FCC 72H	1330	5	38	1221	9	74	1163	6	52
FCC 96H	1317	4	30	1195	7	58	1221	5	41
FCC 7D	819	0	0	805	0	0	817	0	0

Tabla 33.- Relación del índice mitótico en las diferentes zonas del acino hepático: perivenosa. El índice mitótico está expresado como número de mitosis por diez mil células.

4.- DISCUSION

La cocaína es un alcaloide natural, que induce selectivamente la muerte celular en el interior del acino hepático, a través de la formación de metabolitos reactivos, que son los verdaderos responsables de su hepatotoxicidad (Roth et al 1992). Los xenobióticos lesionan preferentemente la región perivenosa del acino hepático, debido a que en esta región existe un desequilibrio, entre la velocidad de producción de metabolitos reactivos por el sistema microsómico del citocromo P-450, y la capacidad de destoxificación. El modelo experimental del presente trabajo, se ha seleccionado en base a la lesión perivenosa que produce la cocaína cuando se administra a ratones Swiss machos, y a la lesión periportal que produce la misma droga cuando se administra a estos mismos ratones tratados previamente con fenobarbital.

La alteración en la ubicación de la lesión hepática según el tratamiento, es un hecho poco frecuente del que se desconoce el mecanismo mediante el cual el fenobarbital sensibiliza a los hepatocitos de la región portal a los efectos de la cocaína.

El esquema alternativo de lesión hepática severa en los hepatocitos perivenosos o periportales, ofrece la posibilidad de establecer comparaciones en la respuesta hepática según que hayan sido lesionadas una u otra de las distintas poblaciones de hepatocitos que se encuentran en el acino.

En general, la secuencia de los acontecimientos que tienen lugar por efecto de los agentes hepatotóxicos es la siguiente:

**Tóxico =====> lesión hepática (perivenosa o periportal) =====>
muerte celular (apoptosis y/o necrosis) =====> regeneración hepatocelular
=====> restauración de la funcionalidad**

En el caso de la cocaína esta secuencia se produce por la formación de norcocaína nitróxido·, el único radical libre hasta ahora conocido, producto del metabolismo oxidativo de esta droga.

Para hacer un seguimiento de estos acontecimientos, se dispusieron dos grupos de ratones. Ambos grupos recibieron sendas dosis subletales de cocaína, pero uno de ellos fue tratado previamente con fenobarbital con objeto de inducir en él, el sistema hepático microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450, y con ello incrementar la toxicidad de la cocaína. Este modelo se asemeja a lo que puede ocurrir en humanos alcohólicos que ingieren cocaína.

4.1.- Parámetros bioquímicos y morfológicos de lesión hepática

Para establecer un diagnóstico de la lesión hepática inducida por cocaína se han evaluado en suero de ratones, las actividades enzimáticas marcadoras de lesión hepática. Las muestras de suero se obtuvieron a distintos tiempos comprendidos entre las 0 y 96 horas a partir de la administración de esta droga. La elevación de estas actividades unida al estudio histopatológico en cortes de hígado, nos ha permitido diagnosticar un cuadro de necrosis periportal severa en hígado, cuando la cocaína fue administrada a ratones pretratados con fenobarbital, y un cuadro de necrosis perivenosa cuando la cocaína se administró a ratones no tratados. Estudios previos de otros autores, sobre la hepatotoxicidad de la cocaína, han descrito una necrosis mediozonal que cambia a necrosis periportal en ratones DBA/2Ha pretratados con fenobarbital (Kloss et al 1982a). En nuestros experimentos con ratones Swiss se ha observado con gran claridad el cambio en la diferente ubicación intraacinar de la necrosis, de perivenosa a periportal por efecto del fenobarbital.

La necrosis hepática, tanto periportal como perivenosa inducida por cocaína produjo una elevación masiva de las aspartato y alanina aminotransferasas y de la isocitrato deshidrogenasa NADP^+ en suero. En el caso de suero de ratones pretratados con fenobarbital, el máximo de actividad se registró a las 12 horas y fue aproximadamente dos veces superior que en el grupo de ratones no tratados. En este último caso el pico de actividades enzimáticas séricas se registró a las 24 horas.

Otra diferencia entre el grupo no tratado y el pretratado con fenobarbital, es que en este último apareció un segundo pico de actividad en estas enzimas séricas a las 72 horas de la

administración de la cocaína. Esta segunda salida de los enzimas hepáticos al suero coincide con la aparición de un segundo pico de células apoptóticas, puesto de manifiesto en hepatocitos aislados, por citometría de flujo.

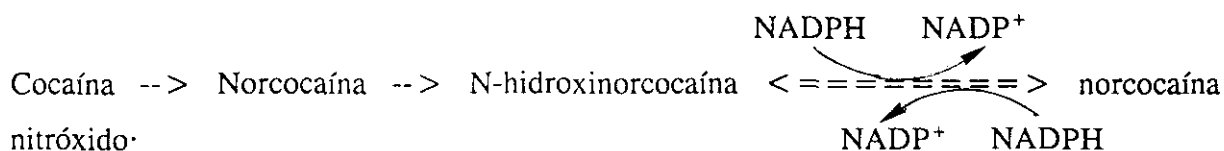
La actividad de la gamma-glutamyl transferasa en suero se elevó en ambos grupos, con la única diferencia que esta elevación fue más temprana en ratones pretratados con fenobarbital. Al contrario que las actividades séricas mencionadas anteriormente, la actividad de la GGT permaneció elevada a las 96 horas, lo cual indica, que el hígado se encuentra todavía lesionado, aunque haya remitido la necrosis. La GGT es un enzima extracelular cuya actividad sérica se eleva en casos de enfermedad hepatobiliar, intoxicación etílica o estado preneoplásico (Cascales et al 1991). Es el único enzima conocido que cataliza la hidrólisis del enlace glutamilo del glutatión, y con ello el primer paso en la degradación de este tripéptido. Su nivel hepático es muy bajo, en nuestro caso la elevada actividad de este enzima puede, junto con la elevada actividad de la glutatión-S-transferasa, que luego se discutirá, ser la causa de la depleción del glutatión que ocurre por efecto de la administración de la cocaína.

Todos estos resultados se refuerzan con los obtenidos por observación al microscopio óptico de cortes de hígado, donde además, se ha podido delimitar con claridad la zona del acino hepático que sufrió el proceso necrótico. Los puntos de máxima necrosis, tanto periportal como perivenosa, coinciden con los picos de máxima actividad de los enzimas séricos. Morfológicamente no ha podido cuantificarse exactamente, la intensidad de la necrosis inducida por cocaína, pero las actividades enzimáticas séricas, demuestran que la necrosis periportal originada por pretratamiento con fenobarbital, fue más intensa que la producida sin tratamiento previo.

4.2.- Sistemas citosólicos generadores de NADPH

Existen evidencias contrastadas que demuestran, que la biotransformación oxidativa de la cocaína en hígado juega un papel fundamental en su hepatotoxicidad. El metabolismo oxidativo de la cocaína, a través del sistema microsómico monooxigenasa de función mixta,

dependiente del citocromo P-450, comprende una secuencia de reacciones que se inicia con la N-desmetilación de la cocaína a norcocaína (Misra et al 1976, Inaba et al 1978), continua con la N-hidroxilación a N-hidroxinorcocaína, mediada por el citocromo P-450 (Kloss et al 1982b; Shuster et al 1983); un proceso oxidativo posterior con un solo electrón, también mediado por el citocromo P-450, transforma la N-hidroxinorcocaína en norcocaína nitróxido·:



El intercambio entre la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido· se verifica mediante un ciclo fútil, que consume NADPH an ambos sentidos y que genera el anión superóxido en el paso norcocaína nitróxido a N-hidroxinorcocaína.

El protagonismo que juegan los equivalentes reductores NADPH en las reacciones de destoxicación microsómicas, unido al preponderante papel de estos equivalentes en el metabolismo específico de la cocaína, nos han llevado a estudiar los sistemas generadores de NADPH en el citosol del hepatocito y sus alteraciones por efecto de la administración de cocaína. Se ha determinado la actividad de los dos enzimas del eslabón oxidativo del ciclo de las pentosas fosfato, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, y también la del enzima málico y la de la isocitrato deshidrogenasa. Todos estos enzimas del metabolismo intermediario hepático, se encuentran involucrados en la encrucijada entre carbohidratos y lípidos, en la biosíntesis de ácidos nucleicos y en procesos de biotransformación de xenobióticos. Las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato se encuentran reguladas por el estado redox citosólico NADP^+ y la velocidad de flujo de este ciclo se debe a la velocidad de aquellos procesos que utilizan NADPH (Veech et al 1969). La significativa disminución de la actividad G6PDH por efecto de la cocaína en el período comprendido entre las 12 y las 48 horas de su administración, que coincide con la disminución del cociente $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, puede ser una de las causas, que junto con la depleción del glutathion, explique la hepatotoxicidad de la cocaína. Sin embargo, las actividades de la 6PGDH y de la ICDH se elevaron discretamente, mientras que el enzima

málico no experimentó variaciones. En todos los casos las actividades fueron más elevadas que en el grupo pretratado con fenobarbital.

Para completar este capítulo relacionado de enzimas citosólicos dependientes del NADPH se ha determinado el estado redox citosólico NADP^+ y NAD^+ para cuantificar el nivel de los equivalentes reductores en el citosol del hepatocito. Se observa que el tratamiento con fenobarbital disminuyó significativamente la tasa de equivalentes reductores NADPH en citosol y que el efecto de la cocaína sobre estos bajos niveles fue la de inducir su progresiva elevación. Esto se explica por la mayor actividad de los enzimas generadores de estos equivalentes. La cocaína por sí misma agotó inicialmente los equivalentes reductores NADPH que llegaron a un mínimo a las 24 horas. El estado redox citosólico NADH disminuyó en ambos casos, pero una parte de esta disminución al inicio del tratamiento se debió al fenobarbital. De todos estos resultados puede deducirse que, el metabolismo hepático de la cocaína altera los sistemas citosólicos dependientes del NADP^+ y que estas alteraciones son más acusadas cuando la cocaína se administró a animales pretratados con fenobarbital.

4.3.- Sistemas relacionados con el metabolismo del glutatión y el metabolismo peroxidativo.

Se ha observado que la administración de cocaína se acompaña por una depresión en el contenido hepático de glutatión reducido. Esta disminución llegó a alcanzar en nuestros experimentos hasta un 50 % y de acuerdo con Donnelly et al (1988) la depleción del GSH es un hecho que precede a cualquier fenómeno citotóxico, ya que los cambios en el cociente GSH/GSSG juegan un papel integral en los fenómenos que conllevan a la muerte celular inducida por cocaína.

Las alteraciones inducidas por administración de cocaína referentes a la concentración de GSH, así como al cociente GSH/GSSG provocaron descensos en ambos parámetros. El GSH disminuyó en ambos grupos, en el no tratado y en el pretratado con fenobarbital, pero mientras que la disminución provocada por la cocaína fue sólo de un 20 %, la de esta droga unida al fenobarbital resultó ser mucho mayor, alcanzando al 50 %. Sin embargo, el cociente

GSH/GSSG resultó con el mismo grado de disminución en las dos condiciones, debido a que la cocaína *per se* originó elevaciones en el glutatión oxidado (GSSG), que no se registraron en el lote pretratado con fenobarbital.

El glutatión es un tripéptido ampliamente distribuido en células de mamíferos y su concentración hepática se encuentra en el rango milimolar (5 - 10 mM). Este tripéptido contribuye a la destoxificación celular de xenobióticos endógenos (peróxido de hidrógeno, lípidos peroxidados, etc) y exógenos, a través de la acción de la glutatión peroxidasa y la glutatión-S-transferasa. La glutatión peroxidasa y la catalasa actúan eliminando el peróxido de hidrógeno y evitando, con ello su utilización en la formación de radicales hidroxilo, a través de una vía en la que se encuentran involucrados los sistemas generadores del anión superóxido. El glutatión y los enzimas con él relacionados modulan la síntesis de los radicales de oxígeno.

Está bien demostrado el papel crítico del GSH en una gran variedad de reacciones de destoxificación frente a especies activas de oxígeno producidas durante el metabolismo de xenobióticos y su intervención en la formación de conjugados con metabolitos electrofílicos. Existe un gran número de evidencias que indican que la producción de radicales libres es la causa principal del estrés oxidativo, que va a dar lugar a la pérdida de GSH. En nuestros experimentos hemos encontrado incrementos significativos en la concentración intracelular de GSSG. La formación de GSSG, por efecto de la cocaína, indica que en estas condiciones experimentales la producción de mezcla de disulfuros pueda ser la causa de la pérdida de GSH, ya que la acumulación de GSSG es, al parecer, esencial para la formación de mezcla de disulfuros durante el estrés oxidativo (Dimonte et al 1984; Jewel et al 1986). Los incrementos significativos en la formación de GSSG por efecto de la cocaína, pueden explicarse por una mayor actividad de la glutatión peroxidasa en la región periportal que es la no afectada por la cocaína. La liberación de GSSG a través de la membrana plasmática de los hepatocitos es un mecanismo fisiológico involucrado en el mantenimiento del equilibrio del GSH entre los órganos (Sies 1983), que puede resultar también afectado por efecto de la cocaína.

Hemos insistido en que el glutatión reducido GSH ejerce un papel crucial en la protección celular frente al ataque de xenobióticos y al estrés oxidativo. Aunque no está del todo claro, parece ser que los hepatocitos periportales contienen doble cantidad de glutatión que los perivenosos, pero más importante que la concentración intraacinar de glutatión es la distribución de las vías de detoxificación. Kera et al (1987) han estudiado la distribución de los enzimas acoplados al glutatión en hepatocitos aislados de la región periportal o la perivenosa, por medio de perfusión del hígado con digitonina-colagenasa. Según estos autores la actividad de la glutatión-S-transferasa citosólica es mayor en las células que rodean al terminal venoso, mientras que la actividad de la glutatión reductasa citosólica aparece uniformemente distribuída en el acino hepático. Por el contrario, la actividad de la glutatión peroxidasa, dependiente del selenio, como también de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es mucho menor en las células perivenosas que en las periportales. La actividad relativamente menor de estas dos enzimas en la región perivenosa puede explicar, en parte, la susceptibilidad de esta región a la agresión química (Kera et al 1987).

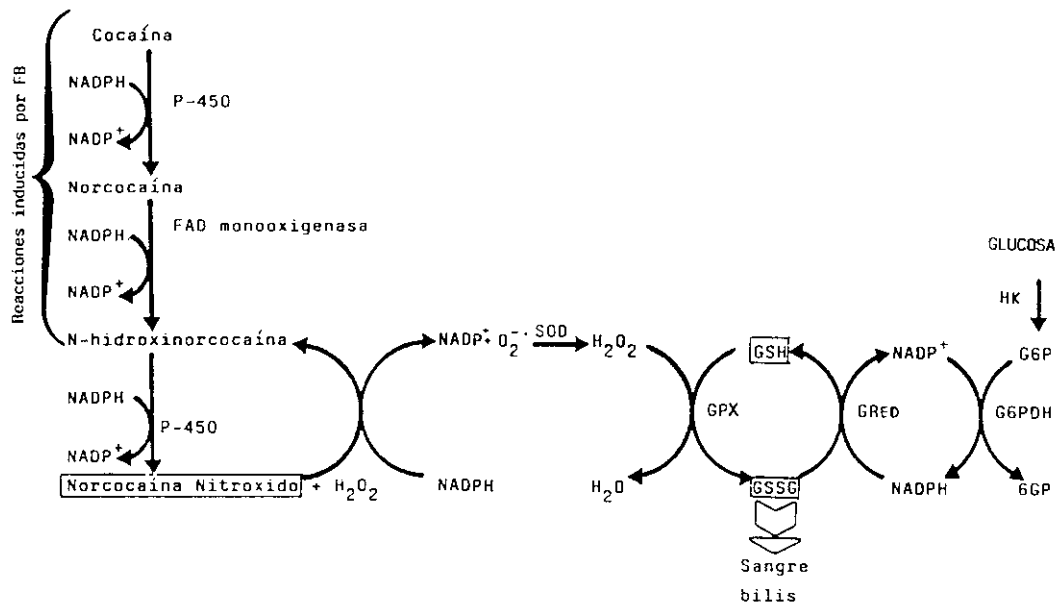
La peroxidación lipídica es un proceso en el cual el oxígeno molecular se incorpora en los lípidos no saturados para formar hidroperóxidos lipídicos. La degradación de estos lipohidroperóxidos eleva la concentración intracelular de malondialdehído, el cual fué determinado en el presente trabajo, para poseer un índice de la peroxidación lipídica en el doble modelo experimental inducido por cocaína.

El malondialdehído se calculó en extracto hepático y su concentración fue elevada en ambos casos. La cocaína produjo una elevación de casi el 50 % a las 24 horas de la intoxicación, pero cuando se administró a ratones pretratados con fenobarbital, la elevación inicial producida por el fenobarbital, de un 100% siguió ascendiendo por efecto de la cocaína llegando a las 12 h a valores cercanos a un 300% de subida. A partir de este momento la concentración de malondialdehído descendió en ambos casos hacia la normalidad.

En nuestros resultados, la glutatión peroxidasa dependiente del selenio, mostró valores muy cercanos a la normalidad en extractos solubles de hígado de ratón por efecto de la cocaína, mientras que cuando la cocaína se administró a ratones pretratados con fenobarbital esta

actividad enzimática descendió significativamente más de un 50% mostrando alteraciones paralelas a las encontradas para la concentración de glutatión reducido. Sin embargo, la glutatión-S-transferasa de la fracción soluble se elevó en los dos casos, pero en ratones pretratados con fenobarbital esta elevación fué mayor, por partir de actividades iniciales muy elevadas. La glutatión-S-transferasa es el enzima que cataliza la adición nucleofílica del grupo tiol del glutatión a aceptores nucleofílicos (Picket y Lu 1989). La elevación de esta actividad enzimática por efecto de la cocaína con o sin fenobarbital puede explicar la depleción del glutatión.

Hemos podido observar grandes diferencias entre los dos grupos, el pretratado y el no tratado con fenobarbital, en lo que se refiere al metabolismo relacionado con el glutatión y con el estado de oxido-reducción celular. De acuerdo con Rauckman et al (1981), la glutatión peroxidasa apenas interviene en el proceso de reducción de la norcocaína nitróxido·, y sobre estas bases ellos sugieren que la pérdida de glutatión inducida por la cocaína se debe más bien a la depleción de equivalentes reductores NADPH y al incremento en GSSG. En nuestros resultados hemos observado que la disminución del GSH por efecto de la cocaína, estuvo acompañada por un aumento del GSSG por efecto de la glutatión peroxidasa. Sin embargo, la cocaína, en el grupo pretratado con fenobarbital, produjo una mayor disminución del GSH, que no estuvo acompañada por incrementos en el GSSG, probablemente debido a la baja actividad de la glutatión peroxidasa. Es probable, que la depleción del glutatión en este caso se deba al agotamiento de NADPH y a la actividad elevada de la glutatión-S-transferasa. Es posible también, que el ciclo fútil entre la N-hidroxinorcocaína < === > norcocaína nitróxido·, que consume NADPH en ambos sentidos, sea el mecanismo causante de la utilización masiva del NADPH. Como el NADPH es el cofactor necesario para la conversión del GSSG en GSH, vía glutatión reductasa, una depleción de NADPH ha de ocasionar un incremento en el GSSG que tiene que ser activamente excretado del hepatocito para mantener un cociente GSH/GSSG dentro de la normalidad. La disminución del NADPH por debajo de un nivel crítico compromete la capacidad de la célula para que permanezca el equilibrio redox del glutatión.



Esquema que relaciona el metabolismo oxidativo de la cocaína con el estado de oxidación-reducción

Otro enzima directamente relacionado con la peroxidación es la catalasa. Su actividad disminuyó notoriamente por efecto de la administración de cocaína y aún más por efecto de la cocaína + fenobarbital. En este último caso los valores iniciales (debidos sólo al fenobarbital) fueron muy bajos. La superóxido dismutasa fue evaluada en base a la posible formación del anión superóxido en la reducción de la norcocaína nitróxido \cdot . Las variaciones en esta actividad fueron muy débiles y poco significativas.

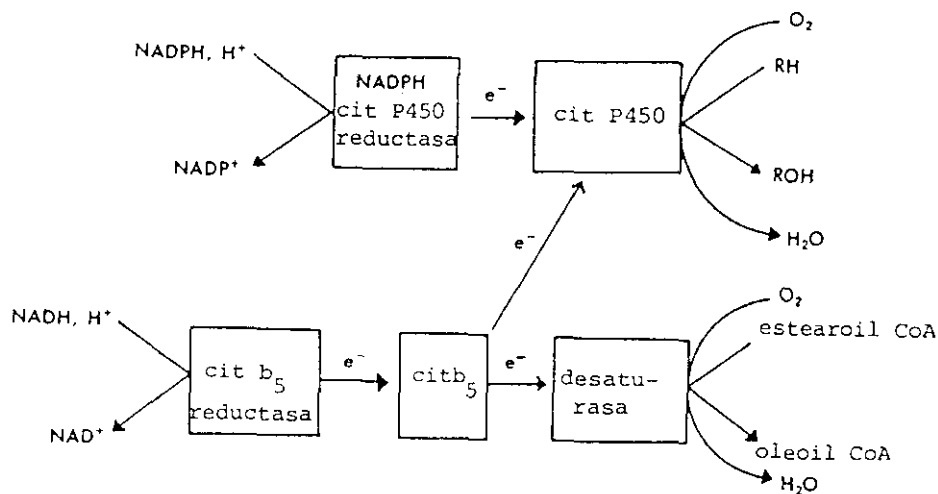
4.4.- Sistemas microsómicos dependientes del citocromo P-450

El sistema enzimático de óxido-reducción más importante del hígado es el que depende del citocromo P-450. Este sistema se compone de una cadena de transporte electrónico que se asocia a la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico (Martín-Sanz y Cascales 1990).

Quizá la inducción del sistema microsómico dependiente del citocromo P-450 por el fenobarbital y con ello de las actividades de otros enzimas, como la glutatión reductasa y la citocromo P-450 NADPH reductasa, que consumen NADPH, haya influido sobre las

actividades de los enzimas que generan NADPH necesario para su funcionamiento. Analizando los resultados de la actividad de la glutation reductasa, observamos que existe un paralelismo entre la actividad de este enzima y la de los que generan NADPH. El fenobarbital, por sí mismo, produjo una elevación significativa de esta actividad enzimática, mientras que las elevaciones originadas por la cocaína sin pretratamiento, fueron poco significativas.

La citocromo P-450 NADPH reductasa es una flavoenzima que forma parte de la cadena de transporte electrónico en el sistema microsómico de oxidación, dependiente del citocromo P-450. Este enzima transporta electrones desde el NADPH al citocromo P-450.



En nuestras condiciones experimentales, la citocromo P-450 reductasa se encuentra disminuída inicialmente por efecto del fenobarbital (50 %, p<0,001). Por efecto de la cocaína esta actividad se elevó, con máximos a las 12 h (147 %, p<0,001). Por otro lado, el citocromo b₅, hemoproteína de pequeño tamaño, que actúa transportando electrones, experimentó unas variaciones relativas a una mayor actividad inicial por efecto del fenobarbital (159 %, p<0,001) y a unos máximos en los dos grupos a las 12 h de la administración de cocaína (257 %, p <0,001 y 312 %, p<0,001, respectivamente).

El citocromo P-450 también experimentó una notable caída, siendo esta más acusada en ratones pretratados con fenobarbital, debido a que el fenobarbital al inducir este sistema, los niveles iniciales microsómicos en el grupo pretratado, fueron muy elevados. Así, en hígado tratado sólo con cocaína la concentración microsómica de citocromo P-450 disminuyó notablemente a las 24 horas y mostró una recuperación a partir de este momento. En caso de cocaína administrada a ratones con fenobarbital, aunque los valores iniciales fueron casi 4 veces superiores al valor control, experimentaron una notable caída con tasas del 50 % a las 48 horas del tratamiento con cocaína. Es un hecho conocido que el tratamiento con fenobarbital eleva notablemente los niveles enzimáticos del sistema citocromo P-450 por inducción del mRNA P-450IIB1/2 (Adesnik et al 1981). Se sabe también, que el mecanismo responsable de esta inducción es un incremento en la transcripción de los genes P450Iib1 y P450IIB2 (Atchison y Adesnik 1983). El citocromo P-450 microsómico hepático es un sistema enzimático implicado en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos y exógenos como prostaglandinas, hormonas esteroideas, fármacos y carcinógenos (Guengerich 1990).

Existe cada vez una mayor certeza, acerca de que la expresión de muchas proteínas de los hepatocitos difiere dependiendo de su localización en el interior del acino (Jungermann y Katz 1982). Miembros de la superfamilia genética del citocromo P-450 aparecen no homogéneamente distribuidos y se inducen preferentemente en la región perivenosa. Se desconocen los mecanismos responsables de estas diferencias, tanto del citocromo P-450 constitutivo como del inducido. Por ello, los estudios sobre heterogeneidad acinar (Jungermann y Katz 1982) aceptan que la biotransformación de las sustancias tóxicas a través del citocromo P-450, es una función preferente de los hepatocitos perivenosos que se encuentran sometidos a un riesgo potencial mayor porque se encuentran menos protegidos.

4.5.- Otros parámetros relacionados con el metabolismo glucolítico y energético

La concentración de ATP, determinada en extractos hepáticos mostró un notable descenso a las 12 y 24 horas de la administración de cocaína en ambos grupos de ratones, no tratados y pretratados con fenobarbital. Por efecto de la cocaína este descenso fue superior al 40 %

manteniéndose esta baja concentración hasta las 48 horas y elevándose hacia la normalidad en el período comprendido entre las 72 y 96 horas. Por efecto del fenobarbital la concentración inicial de ATP fue menor que en el control y la administración de cocaína la hizo descender aún más, llegando a las doce horas a un mínimo inferior al 30 % del valor normal. A partir de las 24 horas se inició una débil recuperación hacia la normalidad que se consiguió a las 96 h.

En los procesos de hepatotoxicidad estudiados con anterioridad por nuestro grupo (Cascales et al 1992; Díez-Fernández, 1992a), pudimos observar que el glucógeno hepático desciende y se incrementan las actividades de los enzimas clave de su degradación, como la glucógeno fosforilasa a. En el presente estudio el glucógeno descendió a un 60 % del valor control, por efecto de la cocaína y a un 20 % cuando la cocaína se administró después que el fenobarbital. Sin embargo, el tratamiento previo con fenobarbital no alteró los niveles iniciales de glucógeno.

Las actividades enzimáticas responsables de la formación de glucosa-6-fosfato se encuentran involucradas en la ruta degradativa del glucógeno (glucogenolisis), mecanismo que se encuentra notablemente activado en casos de hepatotoxicidad. La desaparición del glucógeno en casos de lesión hepática es un hecho conocido (Cascales et al 1992). Por otro lado, la desviación del catabolismo de la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato, por efecto de hepatotóxicos, ha sido también descrita con anterioridad (Cerdán et al 1981), por tanto, en el presente modelo era interesante investigar el comportamiento de las hexoquinasas, enzimas que fosforilan la glucosa en posición 6 y de cuya actividad depende la velocidad de degradación de la glucosa. La determinación de esta actividad frente a glucosa 1 M, glucosa 1 mM y fructosa 33 mM nos proporcionó resultados contradictorios; la glucoquinasa (glucosa 1 M) que disminuye por efecto de la cocaína, se mantiene con valores cercanos a la normalidad cuando la cocaína se administró a ratones pretratados con fenobarbital. En presencia de glucosa 1 mM la actividad ascendió significativamente por efecto de la cocaína y algo menos en ratones pretratados con fenobarbital. La hexoquinasa en presencia de fructosa 33 mM experimentó débiles variaciones por efecto de la cocaína y descendió en el grupo pretratado con fenobarbital.

	cocaína	FB + cocaína
glucoquinasa (glucosa 1)	(-)	(=)
hexoquinasa (glucosa 1 mM)	(+++)	(+)
hexoquinasa (fructosa 33 mM)	(=)	(-)

La razón de estas variaciones puede estar en el cambio en la localización intraacinar de la necrosis. Este cambio, que parece ser común a humanos y ratones, se debe a circunstancias que elevan la biotransformación oxidativa de la cocaína. La regio-especificidad necrogénica de la cocaína ha de ser consecuencia de un desequilibrio entre los enzimas responsables de la activación metabólica de la droga y los enzimas encargados de la destoxificación de tales sustancias activadas.

4.6.- Regeneración hepática post-necrótica inducida por cocaína

Es un hecho bien documentado la capacidad del hígado de los mamíferos para regenerarse en respuesta a la pérdida parcial de sus propias células (Michalopoulos 1990; Mehendale 1991). El hígado en regeneración proporciona un modelo sincronizado de proliferación celular. La respuesta regenerativa que se desencadena inmediatamente después de la necrosis ha sido uno de los objetivos de nuestras investigaciones en este doble modelo de necrosis. La regioselectividad de la necrosis tiene que influir necesariamente en el proceso de regeneración hepatocelular. Se sabe que es la región periportal la que se encuentra más capacitada para iniciar el proceso proliferativo (Jungerman y Katz 1982). Por ello, en caso de necrosis perivenosa, la más común entre las originadas por xenobióticos (tioacetamida), el proceso regenerativo se efectúa mediante una desdiferenciación de los hepatocitos adultos que adquieren características típicas de hepatocitos fetales (Cascales et al 1992; Díez-Fernández et al 1992b y 1993b).

A pesar de que las células progenitoras *in vivo* se localizan en el área periportal, la zona más

oxigenada del acino, en las fotografías obtenidas por microscopía óptica se observaron mitosis tanto en la zona perivenosa como en la periportal, y en ambos casos, la mayor parte de ellas aparecieron en la región mediozonal del acino.

En cortes de hígado obtenidos en períodos entre 0 y 7 días se calculó el índice mitótico (IM) mediante el conteo de mitosis en distintos campos, por número de células. Este índice fue calculado, en el presente trabajo, como número de mitosis por 10.000 células. En el caso de cortes de hígado procedentes de ratones tratados sólo con cocaína, en los que se diagnosticó el proceso necrótico perivenoso, el índice mitótico fue dos veces superior en la zona perivenosa comparada con la periportal, mientras que en los cortes de hígado obtenidos de ratones tratados con cocaína y fenobarbital el mayor índice mitótico se registro en la región mediozonal seguido muy de cerca de la periportal y ambas fueron más de dos veces superior a la perivenosa. En ambos grupos el pico de mitosis fue en la muestra tomada a las 48 horas.

		(IM) mitosis/10000 células		
		perivenoso-----	mediozonal-----	periportal
cocaína	48 h	73	73	29
FB + cocaína	48 h	36	93	84

En la unidad microcirculatoria del hígado, el suministro sanguíneo se origina desde los terminales portales y el drenaje se verifica a través del terminal venoso. Las células de la región mediozonal, se adaptan de acuerdo con los suministros que le llegan en el lugar intermedio entre la región perivenosa y la periportal. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la heterogeneidad acinar influye de manera notable en el proceso regenerativo post-necrótico inducido por cocaína. Aunque los valores numéricos del índice mitótico son algo superiores en el grupo tratado con fenobarbital, esa diferencia no concuerda con las diferencias observadas en las actividades de los enzimas séricos marcadores de la

necrosis. Si hacemos una comparación de las sumas de los índices mitóticos en las tres áreas del acino, en hígado no tratado y pretratado con fenobarbital, nos encontramos que existe una diferencia entre ambos que se mantiene constante y que coincide con la proliferación celular inicial aportada por el pretratamiento con fenobarbital.

4.7.- Caracterización de la ploidía y distribución del DNA genómico en las distintas fases del ciclo de división celular

Con el objeto de caracterizar el proceso secuencial de: muerte celular (apoptosis y necrosis) y regeneración hepatocelular, se han aislado hepatocitos después de la administración de una dosis subletal de cocaína a ratones tratados o no tratados previamente con fenobarbital.

El término apoptosis o muerte celular programada se utiliza para describir la forma característica de muerte celular desencadenada por diversos estímulos ambientales (Darzynkiewicz et al 1992). Durante este proceso tienen lugar una serie de acontecimientos, entre ellos, el más importante es la activación de una endonucleasa con afinidad por las regiones internucleosomales del DNA, que va unida a cambios morfológicos específicos en el núcleo y en el citoplasma. El interés por estos mecanismos emana de su papel clave en el desarrollo de órganos y tejidos durante la embriogénesis, la regulación de la respuesta inmune y en la muerte natural de células diferenciadas al final de su período vital.

En contraste con la apoptosis, la necrosis es una manera inespecífica de muerte celular causada, a menudo, por concentraciones excesivamente elevadas de agentes tóxicos. La necrosis puede considerarse como un colapso metabólico cuando las células no pueden mantener su homeostasis iónica. La necrosis producida por intoxicaciones se caracteriza por una hinchazón de las mitocondrias y pérdida inmediata de la integridad de la membrana plasmática.

Como marcador de células apoptóticas por citometría de flujo se ha propuesto una disminución del marcaje del DNA con diferentes fluorocromos. Telford et al (1992) han comparado la capacidad de diversos fluorocromos para teñir el DNA de las células

apoptóticas y han observado que en estas células esta capacidad está disminuida.

Nuestro interés por estudiar el DNA en este doble modelo experimental inducido por cocaína se debe a las razones siguientes: En primer lugar nos ha interesado determinar la presencia de células aneuploides (hipodiploidia) y en segundo lugar hemos querido investigar el porcentaje de células en cada fase del ciclo de división celular con el objeto de evaluar la velocidad de proliferación en el proceso de regeneración post-necrótico.

Ya hemos visto que la unidad microcirculatoria del hígado, consiste en hepatocitos que son heterogéneos desde el punto de vista bioquímico y funcional (Rappaport 1976). Como los hepatocitos presentan también una heterogeneidad en el contenido en DNA, nos interesó determinar el porcentaje de la ploidía, paso a paso, durante el proceso de muerte celular y regeneración inducidas por cocaína. La heterogeneidad de la ploidía ha sido estudiada recientemente por nuestro grupo (Díez-Fernández et al 1992a y 1993b) en un modelo de necrosis y regeneración inducidas por el hepatotóxico tioacetamida. Sin embargo, se necesita profundizar más en estas investigaciones mediante la determinación de cinéticas celulares para hacer un seguimiento de la progresión del ciclo celular, durante los procesos de regeneración hepatocelular y restauración de la funcionalidad hepática.

Los dos acontecimientos más importantes en las células eucariontes son, la replicación de los cromosomas, que ocurre en la fase S (síntesis del DNA) y la segregación cromosómica que ocurre en la fase M (mitosis). La regeneración hepatocelular en respuesta a la lesión hepática inducida por xenobióticos es un interesante fenómeno, escasamente estudiado hasta la fecha, de gran repercusión a nivel farmacológico y clínico. Este proceso representa el mecanismo de defensa hepatocelular más importante frente al ataque tóxico (Mehendale 1991).

Recientes estudios de nuestro grupo han demostrado (Díez-Fernández 1993b) alteraciones notables en la ploidía del DNA durante la regeneración hepática post-necrótica inducida por tioacetamida en comparación con la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial. Mientras que las poblaciones poliploides (tetraploide y octoploide) casi desaparecen en hepatocitos regenerantes post-necróticos, en células hepáticas post-hepatectomía parcial la

poliploidia se mantiene (De Juan et al 1992).

La citometría de flujo ofrece grandes ventajas para estudiar la hepatotoxicidad de los xenobióticos en células intactas. Especialmente en el caso de los hepatocitos cuya heterogeneidad está bien establecida, las técnicas de citometría de flujo permiten determinar célula a célula, la capacidad de respuesta frente a sustancias hepatotóxicas. La aplicación de la citometría de flujo a este modelo experimental no ha sido nunca abordada y es posible que esta técnica, de reciente aplicación a la toxicología, pueda aportar nuevos datos de utilidad a un problema social de gran magnitud.

En los resultados obtenidos por citometría de flujo hay dos hechos que destacar: La aparición de una población hipodiploide característica de células apoptóticas y las variaciones de la ploidia producidas por el tratamiento con fenobarbital y/o cocaína.

La población hipodiploide proporcionó a las 12 horas los resultados siguientes:

13 % en hepatocitos de ratón tratado con cocaína

31 % en hepatocitos de ratón pretratado con fenobarbital + cocaína

Otro pico hipodiploide apareció a las 72 horas en el grupo pretratado con fenobarbital:

0,6 % en hepatocitos de ratón tratado con cocaína

37 % en hepatocitos de ratón pretratado con fenobarbital + cocaína

Los picos de hepatocitos hipodiploides (apoptóticos) coinciden con las elevaciones de las aminotransferasas séricas indicativas de muerte celular. A nivel histológico se ha observado a las 72 h (fotografías no incluidas en la presente memoria) unas estructuras raras diseminadas de manera irregular que alteran la arquitectura hepática a modo de conglomerados de células inflamatorias crónicas en los que pueden estar incluidos linfocitos, macrófagos y células multinucleadas, con tendencia a la formación de granulomas.

La caracterización de apoptosis *in vivo* no ha sido descrita hasta el momento y su estudio se considera de un gran interés, ya que la cocaína nunca ha sido considerada como agente apoptogénico y sí como agente necrogénico.

La ploidía registró variaciones a lo largo del tiempo que duró la experimentación. Estas variaciones suponen disminuciones o elevaciones de las poblaciones diploide, tetraploide y octoploide, en el período comprendido entre 0 y 7 días:

a) la población diploide (G1) disminuye:

59 % -----> 36 % en hepatocitos de ratón tratado con cocaína

70 % -----> 33 % en hepatocitos de ratón tratado con FEN + cocaína

b) la población tetraploide (G2) aumenta:

32 % -----> 52 % en hepatocitos de ratón tratado con cocaína

21 % -----> 51 % en hepatocitos de ratón tratado con FEN + cocaína

c) La población octoploide (G4) aumenta:

5,4 % ----> 9 % en hepatocitos de ratón tratado con cocaína

3,0 % ----> 14 % en hepatocitos de ratón tratado con FEN + cocaína

Los hepatocitos normales presentan una estabilidad en cuanto a su contenido en DNA y organización cromosómica. Sin embargo, los hepatocitos en estado proliferativo (fetales o regenerantes) se encuentran inmersos en el proceso de reproducción a través del ciclo de división celular que incluye la síntesis programada del DNA para duplicar el DNA genómico de la célula, antes de su división. Las células regenerantes, por tanto, poseen un contenido más elevado en DNA que las quiescentes y este contenido puede variar en cada ciclo de acuerdo con la progresión en la síntesis del DNA. Las variaciones en la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular han mostrado que el esperado

incremento de la fase de síntesis de DNA no ocurre inmediatamente, como con otras sustancias hepatotóxicas (Diez-Fernández 1993b). Sólo en los animales pretratados con fenobarbital pudieron observarse incrementos significativos desde la población diploide a la tetraploide y desde la población tetraploide a la octoploide. En el otro grupo de animales, los tratados sólo con cocaína, la población en la fase S experimentó incrementos menos marcados. La cocaína, como muchas otras hepatotoxinas exhibe una regio-especificidad en la lesión hepática que produce, y además la lesión causada por la cocaína puede cambiar su localización intraacinar mediante el pretratamiento de inductores del SMO.

Es mucho lo que se necesita investigar acerca de los mecanismos causantes de dichas lesiones en las que se encuentre involucrada la expresión de enzimas constitutivos o inducidos, que sean los responsables del desequilibrio regional en los mecanismos de activación metabólica y detoxificación.

5.- CONCLUSIONES

1.- Se ha conseguido un modelo experimental de lesión hepática inducida por cocaína en ratones Swiss machos. La necrosis perivenosa inducida por la cocaína experimentó un cambio intraacinar a necrosis periportal, en caso de tratamiento previo con fenobarbital. El proceso necrótico y su ubicación se han caracterizado por elevación de enzimas en suero y por estudio morfológico de cortes de hígado. El incremento de las actividades séricas de ASPT, ALAT e ICDH, fue más intenso en el caso de pretratamiento con fenobarbital.

2.- Las alteraciones en las actividades enzimáticas generadoras, así como en el estado redox NADP^+ demuestran que este par de oxido-reducción se encuentra implicado en el metabolismo oxidativo de la cocaína, posiblemente a través del ciclo fútil entre la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido. El metabolismo hepático de la cocaína altera los sistemas citosólicos dependientes del NADP^+ y disminuye los equivalentes reductores NADP^+ y NAD^+ , siendo estas alteraciones más acusadas en animales pretratados con fenobarbital.

3.- Las bajas concentraciones de GSH, ATP, citocromo P-450 y glucógeno, fueron índices de la lesión hepática inducida por la cocaína. Este descenso fue más notorio en ratones pretratados con fenobarbital. La pérdida en citocromo P-450 se interpreta como una disminución de las actividades de los sistemas microsómicos metabolizadores de drogas y como una prolongada duración de su actividad en caso de pretratamiento con fenobarbital.

4.- El incremento en la concentración de malondialdehído, unido a la disminución del cociente GSH/GSSG son un índice de la formación de peróxidos. Estos peróxidos, debido a las actividades muy bajas de la catalasa y la glutatión peroxidasa, pueden influir directamente en el proceso de muerte celular.

5.- La heterogeneidad acinar influye de manera decisiva en la regeneración hepática post-necrótica. El índice mitótico (IM), presentó un máximo las 48 horas de la administración de cocaína. La proliferación celular inducida por cocaína fue más intensa en las zonas

perivenosa y mediozonal, mientras que la regeneración hepatocelular por fenobarbital + cocaína se desarrollo más en las zonas periportal y mediozonal del acino hepático.

6.- Por citometría de flujo han podido caracterizarse, en hepatocitos aislados, picos hiploides debidos a apoptosis. A las 12 h estos picos aparecieron en ambos grupos, no tratado y pretratado con fenobarbital. El porcentaje de DNA en estos picos fue el 13 % y 31 % para uno y otro grupo, respectivamente. A las 72 h apareció otro pico de apoptosis (37 %), sólo en el grupo pretratado con fenobarbital. Estos picos hipodiploides coinciden con incrementos significativos en las aminotransferasas plasmáticas e isocitrato deshidrogenasa.

7.- Los picos hipodiploides, indicativos de apoptosis, estuvieron precedidos por notables descensos en las poblaciones tetraploides y octoploides. El descenso puede ser debido a un incremento en la mitosis o a que el proceso de muerte celular afecte en mayor proporción a las poblaciones poliploides.

8.- La disminución de la fracción tetraploide hasta valores similares a los fetales estuvo precedida por incrementos de la síntesis del DNA. Este fenómeno ocurrió en ambos grupos, pero fue más notorio en el pretratado con fenobarbital.

6.- BIBLIOGRAFIA

- Adenisk M., Bar-Nun, S., Maschio, F., Zunich, M., Lippman, A. y Bard, E. Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J Biol Chem*, **256**, 10340-10345 (1981).
- Aebi H. Peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa (EC 1.11.1.6.), en: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp 273-282, Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Atchison, M. y Adenisk, M.A. Acytochrome P-450 multigene family. *J Biol Chem*, **258**, 11285-11295 (1983).
- Ayrton A.D., Ioannides C. y Parke D.V. Induction of the cytochrome P450 I and IV families and peroxisomal proliferation in the liver of rats treated with Benoxapofen. Possible implications in its hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **42**, 109-115 (1991).
- Baak J.P.A. y Oort J. *Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology*. New York. Sringer-Verlag (1983).
- Baak J.P.A., Van Dop H., Kurver P.H.J. et al. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, **56**, 374-382 (1985).
- Bagglioni M., Hirsch J.G. y Duve C. *J Cell Biol*, **45**, 586 (1970).
- Balster R.L. Pharmacological effects of cocaine relevant its abuse. *NIDA Res Monograf.*, **88**, 1-13 (1988).
- Barnett G., Hawks R. y Resnick R. Cocaine pharmacokinetics in humans. *J Etnopharmacol*, **3**, 356-366 (1981).
- Barrio G., Sánchez J. y de la Fuente L. Cocaína en España 1984-1989. Indicadores de oferta y consumo. *Comunidad y drogas*, **15**, 9-36 (1990).
- Bars R.G. y Elcombe C.R. Dose-dependent acinar induction of cytochromes P-450 in rat liver. *Biochem J*, **277**, 577-580 (1991).
- Bartolome J.B., Birgie R.B., Sparks K., Cohen S.D. y Khairallah E.A. Inmunochemical analysis of acetaminophen covalent binding to proteins. *Biochem Pharmacol*, **37**, 4763-4774 (1988).
- Bellomo G., Jewell S.A., Thor H. y Orrenius S. Regulation of intracellular calcium compartimentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 6842-6846 (1982).

- Benuck M., Reith M.E.A., Sershen H., Wiener H.L. y Lajtha A. Oxidative metabolism of cocaine. Comparison of brain and liver (42822). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **190**, 7-13 (1989).
- Bergmeyer H.U., Grabl M. y Walter H.E. Reagents for enzymatic analysis. Enzymes. Hexokinase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn. Vol II, pp. 222-223. Verlag Chemie. Weinheim (1984).
- Boobis A.R., Fawthrop D.J. y Davies D.S. Mechanisms of cell death, *TIPS*, **10**, 275-280 (1989).
- Bouis P. y Boelsterli U.A. Modulation of cocaine metabolism in primary rat hepatocyte cultures: Effects on irreversible binding and protein biosynthesis. *Toxicol Applied Pharmacol*, **104**, 429-439 (1990).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254 (1976).
- Bucher N.L.D., Patel U. y Cohen S. Hormonal Factors and liver growth. *Adv Enzyme Reg*, **16**, 205-213 (1978).
- Bucher N.L.D. Thirty years of liver regeneration: a distillate. *Cold Spring Harbor Conf Cell Prolif*, **9**, 15-26 (1982).
- Bursch W., Oberhammer F. y Schulte-Hermann. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *TIPS*, **13**, 245-251 (1992).
- Camplejohn R.S. Flow cytometry in clinical pathology. En: *Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach*. (ed. C.S. Herrington y O'D. McGee). Oxford University Press, Vol.I, pp. 239-258 (1992).
- Carrol N.V., Longley R.W. y Roe J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by the use of anthrone reagent. *J Biol Chem* **220**, 583-593 (1956).
- Cascales Angosto M. Hepatopatías experimentales, estudio del metabolismo. En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en disfunciones hepáticas*. M. Cascales y F. Ferrandiz. CSIC. pp 9-26 (1987).
- Cascales M. y Martín-Sanz P. Regeneración hepática. En: *Hepatología. Nuevas tendencias*. Vol. 13 CSIC, pp 129-146. Madrid (1990).
- Cascales M., Martín-Sanz P., Craciunescu D.G., Mayo I, Aguilar A., Robles-Chillida E.M. y Cascales C. Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effects of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis*, **12**, 233-240 (1991).

- Cascales M., Martín Sanz P., Alvarez A., Sánchez-Pérez M., Díez Fernández C. y Bosca L. Isoenzymes of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis. *Hepatology*, **16**, 232-240 (1992).
- Cerdán, S., Cascales, M. y Santos Ruiz, A. Effect of thioacetamide on the pentose phosphate pathway and other NADP-linked enzymes of rat liver cytosol. Chronology of perturbations and metabolic significance. *Mol Pharmacol*, **19**, 451-455 (1981).
- Chien, K.R., Abrams, R.G., Pfau, R.G. y Farber, J.L. *Am J Pathol*, **88**, 539-558 (1977).
- Cholerton S., Daly A.K. y Idle R. The role of individual human cytochromes P-450 in drug metabolism and clinical response. *TIPS*, **13**, 434-439 (1992).
- Cocores J.A., Dackis C.A. y Gold M.S. Sexual dysfunction secondary to cocaine abuse in two patients. *J Clin Psychiatry*, **47**, 384-387 (1986).
- Connors S., Rankin D.R., Gandolfi A.J., Krumdieck C.L., Koep L.J. y Brendel K. Cocaine hepatotoxicity in cultured liver slices: a species comparison. *Toxicology*, **61**, 171-183 (1990).
- Copeland A.R. The microscopic pathology of the liver in fatal cocaine intoxication. *J Foren Scien Soc*, **29**, 185-189 (1989).
- Cregler L.L. y Mark H. Medical complications of cocaine abuse. *New England J Med*, **315** (23), 1495-1500 (1986).
- Dallas C.E. y Evans D.L. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature*, **345**, 557-558 (1990).
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., del Pino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P. y Traganos, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, **13**, 795-808 (1992).
- De Juan, C., Benito, M., Alvarez, A. y Fabregat, I. Differential proliferative response of cultured fetal and regenerating hepatocytes to growth factors and hormones. *Exp Cell Res*, **202**, 495-500 (1992).
- Del Maestro R.F., McDonald W. y Anderson R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in experimental and human brain tumours. En: *Oxy radicals and their scavenger systems*, vol.2 (ed. R. Greenwald y G. Cohen), Elsevier. New York (1983).
- Deutsch J. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. D-Glucose-6-phosphate: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49, en: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H. U. Bergmeyer) 3rd edn, Vol III, pp. 190-197. Verlag Chemie, Weinheim (1987).

- Díez-Fernández C. Estudio bioquímico y estructural del modelo experimental de regeneración hepática postnecrótica inducida por tioacetamida. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense. Madrid (1992a).
- Díez-Fernández C., Alvarez, A., Cascales, M. Postnecrotic liver regeneration: Flow cytometric analysis of physical properties and DNA content. *An Real Acad Farm*, **58**, 317-325 (1992b)
- Díez-Fernández C., Boscá L. y Cascales M. Regeneración post-necrótica en hígado inducida por hepatotóxicos. En: *Mecanismos de Hepatotoxicidad* (M. Cascales). Instituto España. Espasa-Calpe. Madrid (1993a).
- Díez-Fernández C., Boscá L., Fernández-Simón L., Alvarez A. y Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology*. (En prensa)(1993b).
- Dimonte D., Ross D., Bellomo G., Eklow L. y Orrenius S. Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch Biochem Biophys*, **235**, 334-342 (1984).
- Dollberg S., Armon Y., Gur I., Litt R. y Gale R. Hyponatremia in a neonate of a cocaine abusing mother. *Clin Toxicol*, **27** (4 y 5), 287-292 (1989).
- Donnelly D.A., Boyer C.S., Petersen D.R. y Ross D. Cocaine induced biochemical changes and cytotoxicity in hepatocytes isolated from both mice and rats. *Chem Biol Interact*, **67**, 95-104 (1988).
- Dougherty R.J. Status of cocaine abuse 1984. *J Subst Abuse Treat*, **1**, 157-161 (1984).
- Dunwiddie T.V. Mechanisms of cocaine abuse and toxicity: An overview. *NIDA, Res Monograf*, **88**, 337-353 (1988).
- Enat R., Jefferson D.M., Ruiz-Opazo N., Gatmaitan Z., Leinwand A. y Reid L.M. Hepatocyte proliferation "in vitro": its dependence of the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracelular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 1411-1415 (1984).
- Englert L., Estevez V.S. y Ho B.T. Demethylation in rats treated chronically with cocaine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **13**. 555-558 (1976).
- Evans M.A. y Harbison R.D. Cocaine induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **45**, 739-745 (1978).
- Evans M.A. Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. *J Pharmacol Exp Ther*, **224** (1), 73-79, (1983).

- Evans M.J., Shami S.G. y Wells J.R. Quantitative techniques for morphological evaluation. En: *Handbook of Toxicologic Pathology* (ed. Wanda M. Haschek y Colin G. Rousseaux. Academic Press, Inc., pp 37-48, (1991).
- Fausto N. Hepatic Regeneration, en: *Hepatology. A textbook of liver disease*, 2nd ed., (ed. D. Zakim y T.D. Boyer). Philadelphia: WB Saunders Co., pp. 49-65 (1990).
- Fischer W., Ick M. y Katz N. Reciprocal distribution of hexokinase and glucokinase in periportal and perivenous rat liver tissue. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, **363**, 375-380 (1982).
- Fischman M.W. y Schuster Ch.R. Cocaine self-administration in humans. *Fed Proc*, **41** (2), 241-246 (1982).
- Foltz R.L., Fentiman A.F. y Foltz R.B. GC/MS Assays for abused drugs in body fluids. En: *NIDA Res Monograph*, **32**, 90-109, ed. Advisory Board (1980).
- Freeman R.W. y Harbison R.D. The role of benzoyl-methylecgonine in Cocaine-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, **218**, No. 2, 558-567 (1981a).
- Freeman R.W. y Harbison R.D. Hepatic periportal necrosis induced by chronic administration of cocaine. *Biochem Pharmacol*, **30** (7), 777-783 (1981b).
- Galloway M.P. Neurochemical interactions of cocaine with dopaminergic system. *TIPS*, **9**, 451-454 (1988).
- García del Moral R., O'Valle F. y Masseroli M. Técnicas de análisis de imágenes en morfología microscópica. En: *Laboratorio de anatomía patológica*. Interamericana. McGraw-Hill, pp. 405-425 (1993).
- Garfia A., Valverde J.L., Borondo J.C., Candenias I. y Lucena J. Vascular lesions in intestinal ischemia induced by cocaine-alcohol abuse: report of a fatal case due to overdose. *J Foren Scien*, **35**, No.3, 740-745 (1990).
- Garhart C.A., Anwer S.M. y Shuster I. Cocaine induced changes in perfusion pressure and bile flow in perfused rat livers. *Biochem Pharmacol*, **38** (13), 2139-2145 (1989).
- Garza R. y Johnson Ch.E. The discriminative stimulus properties of cocaine and d-amphetamine: The effects of three routes of administration. *Pharmacol Biochem Behavior*, **24**, 765-768 (1986).
- Gawehn K. D-(-)-Lactate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.), Vol VI, pp 588-592. Verlag Chemie, Weinheim (1985).
- Gawin F.H. y Kleber H.D. Cocaine abuse treatment. *Arch Gen Psychiatry*, **41**, 903-909 (1984).

- Gawin F.H. Chronic neuropharmacology of cocaine: Progress in pharmacotherapy. *J Clin Psychiatry*, **49**, suppl., 11-16 (1988).
- Gibson D.M., Lyons R.T., Scott D.F. et al. Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Adv Enz Regul*, **10**, 187-204 (1972).
- Gold M.S. y Verebey K. The psychopharmacology of cocaine. *Psychiatric Ann*, **14:10**, 714-723 (1984).
- Goldberg D.M. y Ellis G. Isocitrate Dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, **Vol III**, pp 183-189. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Goldberg D.M. y Spooner R.J. Glutation Reductase. NAD(P)H: oxidiced glutathione oxidoreductase, EC 1.6.4.2. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, **Vol III**, pp 258-265. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- González F. J. Human cytochromes P450: problems and prospects. *TIPS*, **13**, 346-352 (1992).
- Gottfried M.R., Kloss M.W., Graham D., Rauckman E.J. y Rosen G.M. Ultraestructure of experimental cocaine hepatotoxicity. *Hepatology*, **6 (2)**, 299-304 (1986).
- Gradham A.H. Cardiac effects of cocaine: A review. *Yale J Biol Med*, **61**, 137-147 (1988).
- Guder W.G., Schmidt U. Liver cell heterogeneity; the distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpiruvate carboxykinase (GTP) in the lobule of fed and starved rats. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, **357**, 1793-1800 (1976).
- Guengerich F.P. Polymorphism of cytochrome P-450 in humans. *TIPS*, **10**, 107-109 (1989).
- Guengerich F.P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **25**, 97-153 (1990).
- Habig W.H., Pabst M.J. y Jakoby W.B. Glutathione S-Transferase. *J Biol Chem*, **249**, 7130-7139 (1974).
- Hissin P.J. y Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, **74**, 214-226 (1976).
- Holtzman J.L. The role of the stimulation of NADPH-cytochrome P-450 reductasa activity in hepatic microsomal mixed function oxidase activity. *Pharmacol Ther*, **4**, 601-627 (1979).
- Horder M. y Rej R. Alanine aminotransferase. L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2. Routine U.V. method. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, **Vol III**, pp 444-456. Verlag Chemie, Weinheim (1984).

- Hue L., Bontemps F. y Hers H.G. The effect of glucose and of potassium on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and glycogen synthetase in isolated rat liver preparation. *Biochem J*, **152**, 105-114 (1975).
- Hue L., Feliú J.E. y Hers H.G. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. *Biochem J*, **239**, 135-139 (1978).
- Hunt D.E., Lipton D.S., Goldsmith D. y Strug D. Street pharmacology: uses of cocaine and heroin in the treatment of addiction. *Drug Alcohol Depen*, **13**, 375-387 (1984).
- Inaba T., Stewart D.J. y Kallow W. Metabolism of cocaine in man. *Clin Pharmacol Ther*, **23**, 547-552 (1978).
- James R.C., Schiefer M.A., Roberts S.M. y Harbison R.D. Antagonism of cocaine-induced hepatotoxicity by the alpha-adrenergic antagonists phentolamine and yohimbine. *The J Pharmacol Exp Ther*, **246** (2) (1987).
- Javaid J.I., Musa M.N., Fischman M., Schuster C.R. y Davis J.M. Kinetics of cocaine in humans after intravenous and intranasal administration. *Biopharm Drug dispos*, **4**, 9-18 (1983).
- Jeffery E. H. Biochemical basis of toxicity. En: *Handbook of Toxicologic Pathology*, ed. Wanda M. Haschek y Colin G. Rousseaux. Academic Press, Inc., pp 49-70, (1991).
- Ji S., Lemasters J.J., Thurman R.G. A fluorimetric method to measure sublobular rates of mixed function oxidation in the hemoglobin-free perfused rat liver. *Mol Pharmacol*, **19**, 513-516 (1981).
- Jirtie R.L. y Michalopoulos G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res*, **42**, 3000-3004 (1982).
- Jewel S.A., Dimonte, D., Richelmi, P., Bellomo, G. y Orrenius, S. Butylhydroperoxide induced toxicity in isolated hepatocytes: Contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *J Biochem Toxicol*, **1**, 13-22 (1986).
- Jover R., Ponsoda X., Castell J.V. y Gómez-Lechón M.J. Hepatotoxicity of opiates and cocaine on different hepatic cellular systems. *Alter Lab Anim*, **17** (3), 240-245 (1990).
- Jungermann K. y Sasse D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem Sci*, **3**, 198-202 (1978).
- Jungermann K. y Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*, **2** (3), 385-395 (1982).

- Kanel G.C., Cassidy W., Shuster L. y Reynolds T.B. Cocaine-induced liver cell injury: Comparison of morphological features in man and in experimental models. *Hepatology*, **11**, 646-651 (1990).
- Karch S.B. y Billingham M.E. The pathology and etiology of cocaine-induced heart disease. *Arch Pathol Lab Med*, **112**, 225-230 (1988).
- Katz N., Teutsch H.F., Jungermann K., et al. Heterogeneous reciprocal localisation of fructose-1,6-bisphosphatase and glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS Lett*, **83**, 272-276 (1977).
- Kera Y., Sippel H.W., Penttila K.E. y Lindros K.O. Acinar distribution of glutathione-dependent detoxifying enzymes. Low glutathione peroxidase activity in perivenous hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **36**, 2003-2006 (1987).
- Khantzian E.J. The self-medication hypothesis of addictive disorders: Focus on heroin and cocaine dependence. *Am J Psychiatry*, **142**, 1259-1264 (1985).
- Kloss M.W., Rosen G.M. y Rauckman E.J. Acute cocaine-induced hepatotoxicity in DBA/2Ha male mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **65**, 75-83 (1982a).
- Kloss M.W., Cavagnaro J., Rosen G.M. y Rauckman E.J. Involvement of FAD-containing monooxygenase in cocaine induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **64**, 88-93 (1982b).
- Kloss M.W., Rosen G.M. y Rauckman E.J. Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review. *Biochem Pharmacol*, **33** (2), 169-173 (1984).
- Korolkovas A. y Burckhalter J.H. Anestésicos locales. En: *Compendio esencial de Química Farmacéutica* (ed. Reverté, S.A.), pp 368-386. Barcelona (1978).
- Koss G., Losekam M., Schüler E. y Schreiber I. The hepatic Glutathione content and Glutathione S-transferase activity in de pike(*Esox lucius L.*) and rat. *Comp Biochem Physiol*, **99B** (2), 257-258 (1991).
- Krebs H.A., Cornell N.E., Lund P. y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism* (eds F. Lundsquist y N. Tygstrup) Copenhagen, Munksgaard, pp 726-750 (1974).
- Kyle M.E. y Farber J.L. Biochemical mechanism of toxic cell injury. En: *Handbook of Toxicologic Pathology*, ed. Wanda M. Haschek y Colin G. Rousseaux. Academic Press, Inc., pp 71-89, (1991).
- Lamprecht W. y Heins F. Pyruvate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.), Vol VI, pp 570-577. Verlag Chemie, Weinheim (1985).

- Laposata E.A. y Mayo G.L. A review of pulmonary pathology and mechanisms associated with inhalation of freebase cocaine ("crack"). *Amer J Forenc Med Pathol*, **14** (1), 1-9, (1993).
- Lauterbug B.H. y Smith C.V. Stimulation of hepatic efflux and turnover of glutathione by methionone in the rat. *Eur J Clin Invest*, **16**, 494-499 (1986).
- Lauterburg B.H. Early disturbance of calcium translocation across the plasma membrane in toxic liver injury. *Hepatology*, **7**, 1179-1183 (1987).
- Leibman D., Smolen A. y Smolen T.N. Strain, sex and developmental profiles of cocaine metabolizing enzymes in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **37**, 161-165 (1990).
- Lemasters J.J., Digiuseppi J., Nieminen A.L. y Herman B. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*, **325**, 78-81 (1987).
- Magdelenat, H. Needle aspiration biopsy and flow cytometry. En: *Flow Cytometry*. Ed. P. Vielh. T.S. Kline. New York (1991).
- Mannervik B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. *Adv Enzymol*, **57**, 357-417 (1985).
- Martín Sanz, P., Cascales, M. y Boscá, L. Glucagon induced changes in fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase in cultured rat foetal hepatocytes. *Biochem J*, **257**, 795-799 (1989).
- Martín Sanz P. y Cascales M. Metabolismo de Fármacos en hígado y sus alteraciones. *Hepatología. Nuevas tendencias*. CSIC. 83-106 (1990).
- Matsumoto T., Komori R., Magara T. et al. A study on the normal structure of the human liver, with special reference to its angioarchitecture. *Jikeikai Med J*, **26**, 1-40 (1979).
- McConkey D.J., Hartzell P., Amador-Pérez J.F., Orrenius S. y Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thimocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol*. **143**, 1801-1806 (1989).
- Mehendale H.M. Role of hepatocellular regeneration and hepatolobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem Pharmacol*. **42**, 1155-1162 (1991).
- Mello N.K., Mendelson J.H., Drieze J. y Kelly M. Acute effects of cocaine on prolactin and gonadotropins in female rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* (1990).
- Mendelson J.H., Teoh S.K., Lange U., Mello N.K., Weiss R. y Skupny A.S.T. Hyperprolactinemia during cocaine withdrawal. En: *Problems of Drug Dependence*. Harris, L. ed. NIDA Research Monograf, No. **81**. 67-73, Washington, D.C. (1988)

- Mesland D.A.M., Loos G. y Spiele H. *Exp Cell Res*, **135**, 431-435 (1981).
- Michalopoulos G.K., Houk K.A. y Dolan M.L. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.*, **44**, 4414-4419 (1984).
- Michalopoulos G.K. Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J*, **4**, 176-187 (1990).
- Misra A.L., Patel M.N., Alluri V.R., Mulé S.J. y Nayak P.K. Disposition and metabolism of (³H) cocaine in acutely and chronically-treated dogs. *Xenobiotica*, **6**, 537-543 (1976).
- Möllering H. L-(-)-Malate. Determination with malate dehydrogenase and aspartate aminotransferasa, En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.), **Vol VII**, pp 39-47. Verlag Chemie, Weinheim (1985).
- Morrison G., Brock F.E. Quantitative measurement of alcohol dehydrogenase in the lobule of normal livers. *J Lab Clin Med*, **70**, 116-120 (1967).
- Nakamura T., Nawa K. y Ichiara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **122**, 1450-1459 (1984).
- Nicotera P., Moore M., Mirabelli F., Bellomo G. y Orrenius S. Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca₂⁺ ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Lett*, **181**, 149-153 (1985).
- Nicotera P., Bellomo G. y Orrenius S. The role of Ca²⁺ in cell killing. *Chem Res Toxicol* **3**, 484-494 (1990).
- Niehaus W.G., Samuelsson Jr. y Wills E.D. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem J* **113**, 315-341 (1969).
- Novicoff A.B. Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat (staining reactions). *J Histochem Cytochem*, **7**, 240-244 (1959).
- Omura T. y Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, **239**, 2370-2377 (1964).
- Orrenius S. y Bellomo G. En: *Calcium and Cell Function* (ed. Chung W.Y.) pp 186-208. Acad. Press. Orlando Florida (1986).
- Orrenius S. y Nicotera P. On the role of calcium in chemical toxicity. *Arch Toxicol Suppl*. **11**, 11-19 (1987).

- Outlaw W.H. y Springer S.A. Malic Enzyme. L-Malate: NAD⁺ oxidoreductase (decarboxylating), E.C. 1.1.1.39. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp 176-182. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Perino LL.E., Warren G.H. y Levine J.S. Cocaine-induced hepatotoxicity in humans. *Gastroenterology*, **93**, 176-180 (1987).
- Pessayre D. Mécanismes des hépatites médicamenteuses. *Med Sci*, **2**, 373-379 (1987).
- Peterson F.J., Knodell R.G., Lindemann N.J. y Steele N.M. Prevention of acetaminophen and cocaine hepatotoxicity in mice by cimetidine treatment. *Gastroenterology*, **85**, 122-129 (1983).
- Picket C.B. y Lu A.Y.H. Glutathione-S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Annu Rev Biochem*, **58**, 743-764 (1989).
- Popp J.A. y Cattley R.C. Hepatobiliary System. En: *Handbook of Toxicologic Pathology*, ed. Wanda M. Haschek y Colin G. Rousseaux. Academic Press, Inc., pp 279-314, (1991).
- Porter T.D. y Coon M.J. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, **266** (21), 13469-13472 (1991).
- Powell C.J., Connolly A.K. y Charles S.J. Shifting necrosis: butylated hydroxytoluene (BHT) and phenobarbital move cocaine-induced hepatic necrosis across the lobule. *Toxicol Letters*, **55**, 171-178 (1991).
- Powers J.F., Abroy J. y Shurster L. Hepatic morphological and biochemical change induced by subacute cocaine administration in mice. *Toxicol Pathol*, **20**, 61-70 (1992).
- Rajpert-De Meyts E., Shi M., Chang M., Robison T.W., Groffen J., Heisterkamp N. y Forman H.J. *Toxicol Appl Pharmacol*, **114**, 56-62 (1992).
- Rappaport A.M. Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur. *Klin Wschr*, **38**, 561-577 (1960).
- Rappaport A.M. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr pathol*, **157**, 215-243 (1976).
- Rapoza D. y Woolverton W.L. Attenuation of the effects on milk consumption in rats by dopamine antagonists. *Pharmacol Biochem Behav.* **40** (1), 133-137 (1991).
- Rauckman E.J., Rosen G.M. y Cavagnaro J. Norcocaine Nitroxide. A potential hepatotoxic metabolite of cocaine. *Mol Pharmacol*, **21**, 458-463 (1981).

- Rej R. y Horder M. Aspartate aminotransferase. L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1. Routine U.V. method. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp 416-424. Verlag Chemie, Weinheim (1984).
- Rieder H. NADP-dependent dehydrogenases in rat liver parenchyma III. *Histochem*, **72**, 579-615 (1981).
- Roberts S.M., Pounds J.G. y James R.C. Cocaine toxicity in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Letter*, **50**, 283-288 (1990).
- Roe D.A., Little B.B., Bawdon R.E. y Gilstrap III L.C. Metabolism of cocaine by human placentas: Implications for fetal exposure. *Amer J Obstet Gynecol*, **163**, N°3, 715-718 (1990).
- Roth L., Harbison R.D., James R.C., Tobin T. y Roberts S.M. Cocaine hepatotoxicity: Influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology*, **15**, 934-940 (1992).
- Rubin R.B. y Neugarten J. Medical complications of cocaine: Changes in pattern of use and spectrum of complications. *Clin Toxicol*, **30** (1), 1-12 (1992).
- Sandberg A.A. The chromosomes and the cell cycle. En: *Diagnostic Cytology*, L.G.Koss, J.B. Lippincott Company Philadelphia, 4ª ed., Vol. 1, 154-179 (1992).
- Sandgren E.P., Palmiter R.D., Heckel J.L., Daugherty C.C., Brinster R.L. y Degen J.L. Complete Hepatic Regeneration after Somatic Delecion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell*, **66**, 245-256 (1991).
- Sasse D., Katz N. y Jungermann K. Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and isolated hepatocytes. *FEBS Lett.*, **57**, 83-88 (1975).
- Schenkman J.B. The effect of temperature and substrates on component reactions of the hepatic microsomal mixed function. *Mol Pharmacol.*, **8**, 178-188 (1972).
- Scheuer P.J. The normal liver. En: *Liver Biopsy Interpretation*. Bailliere Tindall. London, 3ª ed., 15-26 (1980).
- Sell S. Is there a liver stem cell?. *Cancer Res*, **50**, 3811-3815 (1991).
- Shuster L., Quimby F., Bates A. y Thompson M.L. Liver damage from cocaine in mice. *Life Sciences*, **20**, 1035-1042 (1977).
- Shuster L., Casey E. y Welankiwar S.S. Metabolism of cocaine and norcocaine to N-hydroxynorcocaine. *Biochem Pharmacol*, **32**, 3045-3052 (1983).

- Sies H., Akerboom T.P.M. y Tager J.M. Mitochondrial and cytosolic NADPH systems and isocitrate dehydrogenase indicator metabolites during ureogenesis from ammonia in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, **72**, 301-307 (1977).
- Sies H. En: *Glutathione storage, transport and turnover in mammals*, pp 63-88, Japan Sci. Press, Tokio/VNU Science Press, Utrech (1983).
- Silva M.O., Roth D., Reddy K.R., Fernández J.A., Albores-Saavedra J. y Schiff E.R. Hepatic dysfunction accompanying acute cocaine intoxication. *J Hepatol*, **12**, 312-315, (1991).
- Simpson J.F., Dutt P.L. y Page D.L. Expression of Mitoses per Thousand Cells and Cell Density in Breast Carcinomas. *Hum Pathol*, **26**, 608-611 (1992).
- Singhal P.C., Rubin R.B., Peters A., Santiago A. y Nengarten J. Rhabdomyolysis and acute renal failure associated with cocaine abuse. *Clin Toxicol*, **28** (3), 321-330 (1990).
- Smith A.C., Freeman R.W. y Harbison R.D. Ethanol enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **30**, 453-458 (1981).
- Smolen T.N. y Smolen A. Developmental expression of cocaine hepatotoxicity in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav*, **36**, 333-338 (1990).
- Stewart D.J., Inaba T. y Kallow W. N-demethylation of cocaine in the rat and isolated rat hepatocytes: Comparison with aminopyrene demethylation. *J Pharmacol Exp Ther*, **207**, 171-177 (1978).
- Stewart D.J., Inaba T., Lucassen M. y Kallow W. Cocaine metabolism: Cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharmacol Ther*, **25** (4), 464-468 (1979).
- Tabasco-Minguillan J., Novick D.M. y Kreek M.J. Liver function tests in non-parenteral cocaine users. *Drug Alcohol Dependence*, **26**, 169-174 (1990).
- Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **13**, 137-143 (1992)
- Tena Nuñez G. Efecto de las drogas de abuso sobre el hígado. En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en disfunciones hepáticas*. M. Cascales y F. Ferrandiz, pp 281-296, CSIC. Madrid (1987).
- Teoh S.K., Mendelson J.H., Mello N.K., Weiss R., McElroy S. y McAfee B. Hyperprolactinemia and risk for relapse of cocaine abuse. *Biol Psychiatry*, **28**, 824-828 (1990).

- Teutsch H.F. Quantitative determination of G6P'ase activity in histochemical defined zones of liver acinus. *Histochemistry*, **588**, 281-288 (1978).
- Thompson M.L., Shuster L. y Shaw K. Cocaine induced hepatic -necrosis in mice. *Biochem Pharmacol*, **28**, 2389-2395 (1979).
- Thompson M.L., Shuster L., Casey E. y Kanel G.C. Sex and strain differences in response to cocaine. *Biochem Pharmacol*, **33** (8), 1299-1307 (1984).
- Trautschold I., Lampretch W. y Schweitzer G. ATP UV method with glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) , Vol VII, pp 346-357. Verlag Chemie, Weinheim (1985).
- Veech R.L., Egelston L.V. y Krebs H.A. The redox state of the nicotinamide adenin dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem J*, **115**, 609-619 (1969).
- Vindelov L.L., Christensen I.J. y Nissen N.I. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometrc. *Cytometry*, **3**, 323-327 (1983).
- Vos R.M.E. y Bladeren P.J.P. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interactions*, **75**, 241-265 (1990).
- Wahlefeld A.W. y Bergmeyer H.U. Gamma-Glutamyltransferase (gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2. En: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp 349-356. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Wanless I.R., Dore S., Gopinath N., Tan J., Cameron R., Heathcote E.J., Blendis L.M. y Levy G. Histopathology of cocaine hepatotoxicity. *Gastroenterology*, **98**, 497-501 (1990).
- Wanson J., Drochmans P., May C. et al. Isolation of centrilobular and perilobular hepatocytes after phenobarbital treatment. *J Cell Biol*, **66**, 23-41 (1975).
- Welsh F.A. Changes in distribution of enzymes within the liver lobule during adaptative increases. *J Histochem Cytochem*, **20**, 107-111 (1972).
- Werner G. Untersuchungen zum stoffvechsell von Tropanalkaloiden ben einigen salugetieren. *Planta Med*, **9**, 293-316 (1961).
- Werner R. Funciones del hígado. En: *Fundamentos de Bioquímica moderna* (ed. Acribia, S.A.), pp 289-302. Barcelona (1988).
- Wiener H.L. y Reith M.E. Differential effects of daily administration of cocaine on hepatic and cerebral glutathione in mice. *Biochem Pharmacol*, **40**, N°8, 1763-1768 (1990).

- Wiggins R.C. y Ruiz B. Development under the influence of cocaine.I. A comparison of the effects of daily cocaine treatment and resultant undernutrition on pregnancy and early growth in a large population of rats. *Metab Brain Dis*, **5**, No 2, 85-99 (1990).
- Wimmer M. y Pette D. Microphotometric studies on intraacinar enzyme distribution in rat liver. *Histochemistry*, **64**, 23-33 (1979).
- Winsauer P.J. y Thompson D.M. Cocaine self-administration in pigeons. *Pharmacol Biochem Behav*, **40**, 41-52 (1991).
- Witte C.L. y Witte M.H. Hepatic circulation. En: *The liver normal and abnormal* (part A) (ed F.F. Becker), Marcel Dekker, Inc., New York, pp 11-54 (1974).
- Zhang J.Y. y Foltz R.L. Cocaine metabolism in man:Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine. *J Anal Toxicol*, **14**, 201-205 (1990).

ERRATAS OBSERVADAS

- Página 150 línea 11 debe ser Tabla 26A, Figura 26A y malato en lugar de piruvato.
- línea 12 debe ser Tabla 26B, Figura 26B, lactato en lugar de malato, Tabla 26C y Figura 26C.
- línea 13 debe ser piruvato, en lugar de lactato, Tabla 27A y Figura 27A.
- línea 14 debe ser Figura 27B y Tabla 27B.
- Página 163 línea 23 debe decir **diploides y tetraploides**, en lugar de diploidos y tetraploidos.
- Página 165 línea 2 tercer recuadro debe ser 32 en vez de 39.
- Página 174 línea 12 donde pone 14 días debe poner 7 días.
- línea 27 donde pone 14 días debe poner 7 días.
- Página 177 línea 1 donde pone 14 debe poner 7.
- Página 210 línea 3 donde pone **hiploides** debe poner **hipodiploides**.
- línea 14 debe decir **descensos** en vez de incrementos.