

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

**HEPATOTOXICIDAD Y SENESCENCIA.
PARAMETROS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES
RELACIONADOS CON EL ESTRES OXIDATIVO EN
HEPATOCITOS DE RATA**

Memoria de tesis para optar al grado de doctor presentada por
NURIA SANZ MENENDEZ

Directora de la Tesis:
Dra. María Cascales Angosto

Madrid, 1996

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación **BIOQUIMICA FARMACOLOGICA** del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM) de la Facultad de Farmacia, en el Centro de Citometría de Flujo de la Universidad Complutense de Madrid y en el Instituto Nacional de Toxicología, desde Octubre de 1992 bajo la dirección de la Dra. **MARIA CASCALES ANGOSTO**, Investigadora Científica del CSIC. Ha sido financiado por los Laboratorios Sandoz Pharma AG Basilea, el Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 95/0032-01 y una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense de Madrid.

CSIC

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universidad Complutense

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA (C. MIXTO C.S.I.C. - U.C.M.)
FACULTAD DE FARMACIA - 28040 MADRID

Telephone 34-1-5436262

FAX 34-1-5438649

E-mail: cascales@eucmax.sim.ucm.es

María Cascales Angosto, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Directora del Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM).

CERTIFICA: Que **Nuria Sanz Menéndez**, licenciada en Farmacia, ha realizado en el Departamento de Bioquímica Farmacológica y Toxicológica del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM) de la Facultad de Farmacia, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado: *Hepatotoxicidad y senescencia. Parámetros estructurales y funcionales relacionados con el estrés oxidativo en hepatocitos de rata*, cuya Memoria presenta para optar al grado de DOCTOR EN FARMACIA.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Madrid a 25 de Noviembre de mil novecientos noventa y seis.

María Cascales

*A mi familia,
con inmenso cariño*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud de manera especial a la Directora de esta Tesis, la Doctora María Cascales Angosto que, desde el principio, me brindó su constante apoyo y amistad. Siempre le estaré agradecida por haberme iniciado en los caminos de la investigación y llevado su preocupación por mí más allá de lo que correspondía a sus funciones académicas.

Quisiera dar las gracias al Doctor Manuel Ruiz Amil, director del Departamento y tutor de esta tesis, y a la Doctora Evangelina Palacios, directora del Instituto, por la acogida que me brindaron en este Centro Mixto y por tanto la oportunidad de llevar adelante este trabajo.

Hago extensiva mi gratitud a los Doctores Lourdes Fernández Simón y Alberto Alvarez, por su contribución en los estudios histopatológicos y citométricos. Reciban mi reconocimiento mis compañeros y amigos Marta, Sonso, Fran, Fede, Asun y David por facilitarme el trabajo diario y honrarme con su amistad. Desde estas páginas me gustaría expresar la inmensa suerte que he tenido al poder contar con ellos.

Quiero agradecer muy especialmente a Mina el haber sido mi compañera incansable de tantas horas de trabajo, así como a Lola por haberme prestado su ayuda siempre que lo he necesitado.

Querría asimismo expresar mi gratitud a Manolo, Angel y a todo el personal que ha estado y sigue estando en el Instituto de Bioquímica, por la colaboración prestada y por hacer parte de mi trabajo más fácil.

Por último, a mi familia y a todas las personas con las que he compartido este tiempo, muchísimas gracias por haberme apoyado fuera del trabajo y haberme animado a seguir adelante. Sin vosotros no habría podido llegar hasta aquí.

As punishment for stealing fire and giving it to humans, the Greek god Zeus banished Prometheus to be chained to a rock on Mt. Caucasus. As part of his punishment, a bird of prey would peck out his liver daily, and every night his liver would regenerate.

ABREVIATURAS

CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.

[α -³²P]dCTP = α desoxicitidina 5' trifosfato marcada con un isótopo radiactivo del fósforo.

DMA = N,N-dimetilanilina.

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO = Dimetil sulfóxido.

DPEC = Dietil pirocarbonato.

DTNB = Acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.

DTPA = Dietilen-triamino pentacético.

DTT = Ditiotreitól.

EDTA = Acido etilen-diamino-tetracético.

FAD = Flavin adenin dinucleótido.

FCS = Suero fetal bovino.

GSH = Glutation reducido.

GSSG = Glutation oxidado.

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

MOPS = Acido morfolino-propano-sulfónico.

NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADP⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido fosforilado.

NEM = N-etilmaleimida.

NO = Oxido nítrico.

PDBu = β -forbol-12, 13-dibutirato.

PBS = Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline).

SDS = Dodecil sulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate).

TAM = Tioacetamida.

TCA = Acido tricloroacético.

TBA = Acido tiobarbitúrico.

TRIS = Tris(hidroximetil)-aminometano.

t-BOOH = *terc*butil hidroperóxido.

ENZIMAS

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

CAT = Catalasa (Hidrógeno-peróxido oxidoreductasa), EC 1.11.1.6.

FAD monooxigenasa = N,N-dimetil anilina N-oxidante, EC 1.14.13.8

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

GGT = γ -glutamyl transferasa (γ -glutamyl-péptido: aminoácido gamma-glutamyl transferasa), EC 2.3.2.2.

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.

SOD = Superóxido dismutasa, EC 1.15.1.1.

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

Citocromo b₅ reductasa NADH, EC 1.6.2.2.

Citocromo P-450 reductasa NADPH, EC 1.6.2.4.

INDICE

Página

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- El hígado: arquitectura y distribución heterogénea de enzimas en el parénquima hepático	4
1.2.- Edad y senescencia	10
1.3.- Evolución del daño y muerte celular. Apoptosis <i>versus</i> necrosis	16
1.4.- Mecanismos de defensa hepatocelulares frente a la agresión tóxica	22
1.4.1.- Sistemas microsómicos de detoxificación	23
1.4.2.- El glutatión como sistema antioxidante endógeno	25
1.5.- Regeneración hepática post-necrótica	27
1.5.1.- Renovación celular hepática	30
1.5.2.- Ciclo de división celular: análisis de la ploidía y distribución de DNA por citometría de flujo	34
1.5.3.- Factores y mecanismos que controlan el crecimiento hepático	37
1.5.3.1.- Reguladores de la proliferación celular. Niveles de óxido nítrico	37
1.5.3.2.- Genes tempranos inmediatos	43
1.6.- Hepatotoxicidad de la tioacetamida	46
1.6.1.- Alteraciones morfológicas y variaciones en el ciclo celular	46
1.6.2.- Alteraciones funcionales y bioquímicas	48
1.7.- Objetivos del trabajo	51
2.- MATERIAL Y METODOS	53
2.1.- Aparatos	53
2.2.- Productos	54
2.3.- Animales	55
2.4.- Tratamiento con tioacetamida	55
2.5.- Obtención de suero	56

2.6.- Obtención y fijación de muestras para la preparación de cortes de tejido	56
2.6.1.- Cálculo del índice mitótico	56
2.7.- Aislamiento y cultivo celular: hepatocitos, macrófagos y fibroblastos NIH 3T3	56
2.7.1.- Obtención de hepatocitos	57
2.7.2.- Preparación y cultivo de macrófagos	58
2.7.3.- Condiciones de cultivo de fibroblastos NIH 3T3, adición de sueros y determinación de la incorporación de timidina tritiada	59
2.8.- Preparación de fracciones subcelulares	59
2.9.- Determinación de actividades enzimáticas	60
2.9.1.- En suero	60
2.9.1.1.- Aspartato aminotransferasa (ASPT)	60
2.9.1.2.- γ -glutamil transferasa (GGT)	61
2.9.2.- En hepatocitos aislados	61
2.9.2.1.- FAD monooxigenasa	61
2.9.2.2.- Citocromo P-450 reductasa NADPH	62
2.9.2.3.- Citocromo b_5 reductasa NADH	62
2.9.2.4.- Glutation S-transferasa (GST)	63
2.9.2.5.- Superóxido dismutasa (SOD)	63
2.9.2.6.- Catalasa (CAT)	64
2.9.2.7.- Glutation peroxidasa (GP_x)	65
2.9.2.8.- Glutation reductasa (GR)	65
2.9.2.9.- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)	66
2.10.- Determinación de la concentración de metabolitos	67
2.10.1.- Citocromo P-450	67
2.10.2.- Citocromo b_5	67
2.10.3.- Glutation reducido (GSH), glutacion oxidado (GSSG) y GSH/GSSG	68
2.10.4.- Grupos tiólicos de las proteínas	68
2.10.5.- Malondialdehído	69
2.10.6.- Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	69
2.10.7.- Oxido nítrico (NO)	69
2.11.- Determinación de proteínas	70

2.12.- Preparación de plásmidos. Obtención de insertos	70
2.13.- Determinación de transcritos de ciertas enzimas	72
2.13.1.- Aislamiento de RNA de muestras de hepatocitos	72
2.13.2.- Hibridación con las sondas específicas	73
2.14.- Análisis por citometría de flujo del contenido y distribución del DNA genómico en poblaciones de hepatocitos	75
2.15.- Métodos estadísticos	76
3.- RESULTADOS	77
3.1.- Evolución dependiente de la edad de la lesión hepática inducida por el hepatotóxico	77
3.1.1.- Alteraciones en las actividades séricas de la aspartato aminotransferasa y la γ -glutamyl transferasa	77
3.1.2.- Estudio histopatológico de hígado de ratas de diferentes edades intoxicadas con tioacetamida	81
3.2.- Variaciones dependientes de la edad en los sistemas hepáticos de defensa antioxidante frente a un proceso de hepatotoxicidad	88
3.2.1.- Sistema microsómico monooxigenasa de función mixta	88
3.2.1.1.- Modificaciones en la actividad de la FAD monooxigenasa	89
3.2.1.2.- Citocromo P-450, citocromo b_5 y actividades relacionadas	91
3.2.2.- Estrés oxidativo: metabolitos y actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo redox GSH/GSSG	95
3.2.2.1.- Glutation reducido, estado redox GSH/GSSG	96
3.2.2.2.- Niveles de grupos tiólicos proteicos	98
3.2.2.3.- Concentración de malondialdehído	98
3.2.2.4.- Actividad de la glutathion S-transferasa	101
3.2.2.5.- Superóxido dismutasa	103
3.2.2.6.- Catalasa	107
3.2.2.7.- Glutation peroxidasa	110
3.2.2.8.- Glutation reductasa	113
3.2.2.9.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	115

3.3.- Modificaciones en la regeneración hepática post-necrótica inducidas con la edad tras la administración de tioacetamida	117
3.3.1.- Estudio de las poblaciones de hepatocitos implicadas en el proceso de síntesis del DNA mediante citometría de flujo	117
3.3.2.- Índice mitótico	132
3.3.3.- Factores comprometidos en la regeneración	134
3.3.3.1.- Efecto mitogénico del suero de ratas intoxicadas sobre cultivos de fibroblastos NIH 3T3	134
3.3.3.2.- Producción de NO en macrófagos inducida por suero de animales tratados	136
3.3.3.3.- Niveles de TNF- α en suero de ratas de diferentes edades despues de la intoxicación	138
4.- DISCUSION	140
4.1.- Caracterización de la necrosis y regeneración hepatocelular producida a lo largo de la edad	141
4.2.- Metabolismo hepático del glutation y enzimas relacionados	144
4.3.- Proceso de regeneración hepática y restauración funcional.	149
5.- CONCLUSIONES	157
6.- BIBLIOGRAFIA	159

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Los seres vivos, a lo largo de la vida, sufren multitud de cambios metabólicos y funcionales que van a influir en su respuesta ante distintos estímulos. La capacidad de respuesta frente a la agresión tóxica es mayor en el hígado que en cualquier otro órgano debido a su misión clave como vía primaria de detoxificación; sin embargo, esta propiedad le puede acarrear su propia lesión, al generarse metabolitos, en ocasiones más tóxicos que la sustancia de partida (Berry *et al*, 1992; Boelsterli, 1993). Durante el desarrollo y el envejecimiento, las modificaciones que ocurren en los seres vivos tanto en los mecanismos hepáticos de biotransformación y eliminación de agentes tóxicos como en los relativos a la lesión hepatocelular y posterior reparación, han de influir en la toxicidad de dichos agentes. El estudio de las variaciones producidas en la lesión hepática y en el proceso de regeneración hepatocelular, según la edad del animal, es el objetivo de este trabajo.

Las especies reactivas de oxígeno derivadas del oxígeno molecular, que se forman de manera espontánea durante la respiración mitocondrial, se consideran hoy parte importante en el proceso del envejecimiento. A su vez, los radicales libres, incluyendo las especies reactivas de oxígeno, se producen en las células durante procesos patológicos producidos por agentes tóxicos. Este es el caso del proceso de biotransformación de xenobióticos por el sistema microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450, donde se generan, por una parte intermediarios reactivos derivados del xenobiótico, y por otra, especies activas de oxígeno, H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ derivadas por reducción del oxígeno molecular. H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ pueden a su vez reaccionar en presencia de metales (reacción de Fenton) y dar lugar a especies de oxígeno más tóxicas como $\cdot OH$ y oxígeno singlete (Aust *et al*, 1993). El desequilibrio metabólico que producen en el hígado estos agentes, puede jugar un papel importante en las modificaciones de los mecanismos de respuesta frente a la agresión tóxica en edades avanzadas.

Las células han desarrollado mecanismos de defensa frente a la generación de estos radicales, pero en casos de intoxicación masiva o continuada estos sistemas defensivos celulares pueden ser superados, lo que condiciona la situación de **estrés oxidativo** (Sies, 1985; Halliwell, 1987; Emerit, 1994; Mochida *et al*, 1992). En circunstancias extremas, la agresión oxidativa inducida por xenobióticos puede llegar a ocasionar la muerte celular (Nicotera *et al*, 1992), que va precedida por una pérdida de equivalentes de glutatión (Reed, 1990), una marcada oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas (Kyle *et al*, 1989), peroxidación de los lípidos de la membrana (Minotti y Aust, 1992) y elevación del calcio citoplasmático (Duthie y Arthur, 1993). En condiciones de prolongada exposición a dosis bajas de xenobióticos, no inmediatamente citotóxicas, se pueden causar modificaciones genómicas, lesión y rotura en las cadenas del DNA (Birnboim, 1982).

Por ello, en el presente trabajo se ha estudiado en ratas, en un rango que fluctua desde los 2 meses hasta los 2 años y medio de edad, la hepatotoxicidad de una dosis subletal de tioacetamida. La elección de este xenobiótico se debe al amplio conocimiento que tenemos de la necrosis hepatocelular y el posterior proceso regenerativo, evidenciado en ratas jóvenes de 2 meses de edad (Cascales *et al*, 1992a; Díez Fernández, 1992; Díez Fernández *et al*, 1993; Díez-Fernández *et al*, 1996a; Díez-Fernández *et al*, 1996b). La lesión se asocia con una serie de alteraciones hepáticas debidas a la formación de metabolitos reactivos derivados de este agente hepatotóxico, como es la tioacetamida S-óxido (Chieli y Mavalidi, 1984). Además la formación masiva de estas especies químicas reactivas trae consigo una situación de estrés oxidativo con todas las características descritas anteriormente (Nicotera *et al*, 1985; Orrenius *et al*, 1988; Vos y Bladeren, 1990).

El efecto del **envejecimiento** sobre los sistemas involucrados en la defensa hepatocelular frente al estrés oxidativo originado por la hepatotoxicidad de agentes químicos, presenta en la actualidad un gran interés farmacológico y clínico. Es un hecho reconocido que la población senescente, en progresivo incremento en nuestra sociedad, requiere cada vez

mayor atención debido a que exhibe mayor incidencia de reacciones adversas por efecto de los fármacos. En la mayoría de los casos estas reacciones adversas son inesperadas debido al desconocimiento que aún existe acerca del efecto de la edad sobre los mecanismos de biotransformación que afectan a la vida media de los medicamentos, influyendo sobre su toxicidad o sobre su acción farmacológica.

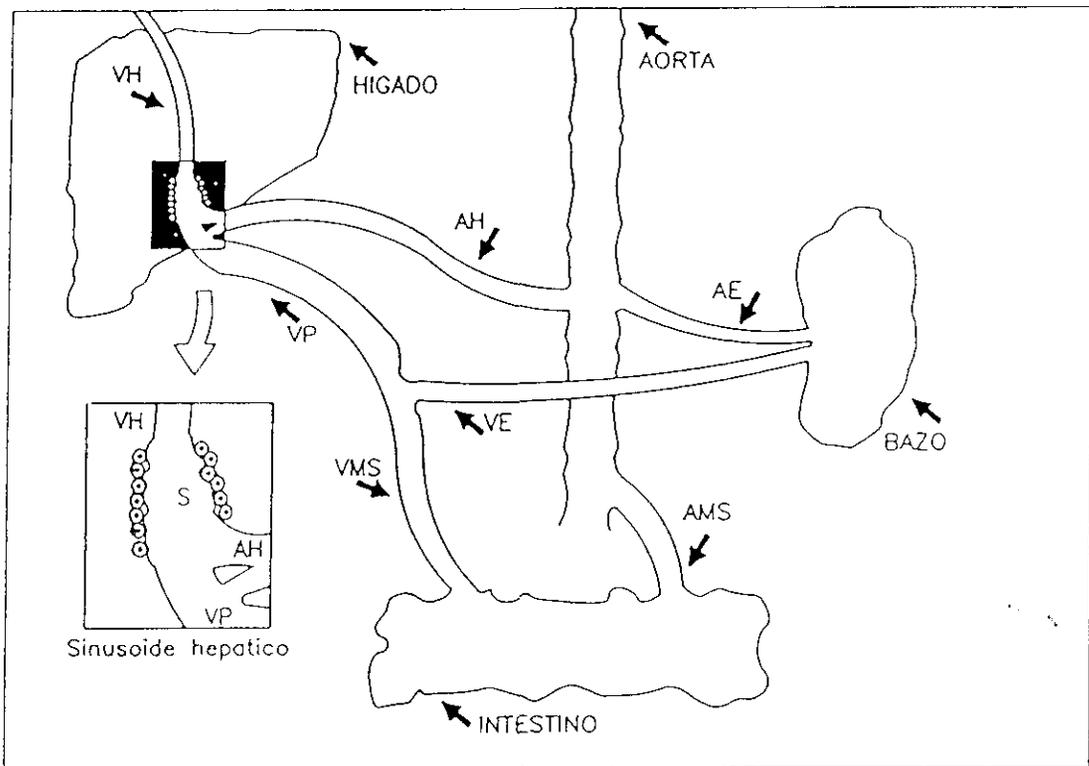
El estudio de la interacción de fármacos sobre el hígado senescente presenta otro aspecto importante, ya que las personas de edad al estar sometidas a mayor cantidad de sustancias medicamentosas, presentan un mayor riesgo de sufrir alteraciones patológicas severas. Estas alteraciones pueden derivar del efecto de la propia edad sobre la vida media de los medicamentos, cuyas dosis pueden convertirse en letales en el caso que el proceso de biotransformación sea más lento, o pueden no ejercer su efecto terapéutico si su biotransformación es más rápida, caso en el que uno de ellos tenga la capacidad de inducir la biotransformación de los otros. En este caso, la inducción del sistema monooxigenasa (P-450) puede generar un exceso de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que incrementa la toxicidad de los fármacos administrados. Por todo ello, el estudio de los efectos de la edad sobre los mecanismos de hepatotoxicidad ha de proporcionar un mayor conocimiento que permita el diseño de pautas terapéuticas específicas de la edad.

1.1.- El hígado: arquitectura y distribución heterogénea de enzimas en el parénquima hepático

El conocimiento de la anatomía y fisiología hepáticas es absolutamente indispensable para interpretar cualquier investigación que tenga como base el hígado o sus células. En la rata adulta 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. El hígado recibe un doble aporte de sangre, la arterial con elevada presión, a través de la arteria hepática (AH) y la venosa con menor presión, a través de la vena porta (VP), que procede del drenaje venoso esplénico. La arteria hepática aporta oxígeno mientras que, la vena porta transfiere las sustancias nutritivas absorbidas por el tracto gastrointestinal, para su metabolización y eliminación. El eflujo de la sangre se verifica a través de una vena común, la vena hepática (VH). La circulación y la excreción biliar están compartimentalizadas para facilitar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. La arteria hepática (AH) asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramales gástrico y gastroduodenal, siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo (VMS) y del bazo (VE). 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 confluyen en el sinusoides (S), capilar recubierto por un endotelio que posee poros o fenestras a través de los cuales circula el plasma sanguíneo, y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior. 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. En algunas especies, las paredes de las venas hepáticas poseen esfínteres musculares potentes, pero en los humanos las paredes de estos canales vasculares son muy finas (Jones, 1990).

El hígado está formado por siete clases de células, que se clasifican en parenquimatosas (hepatocitos) y no parenquimatosas (ductulares, conjuntivas y sinusoidales).

Las células sinusoidales se dividen a su vez en: endoteliales, Kupffer, células Pit y perisinusoidales también llamadas lipocitos, células Ito o "fat storing cells".

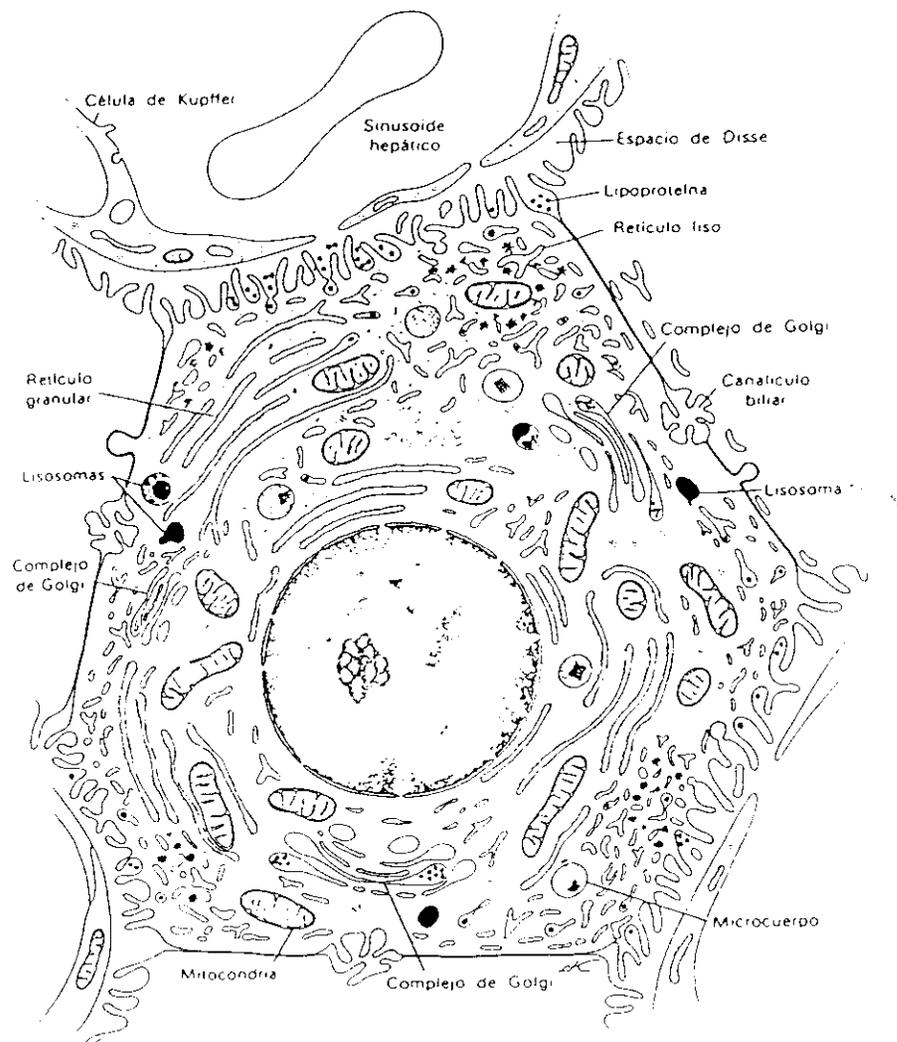


ESQUEMA DE LA CIRCULACION HEPATOESPLENICA

S: sinusoides, AE:arteria esplénica, AH: arteria hepática, AMS: arteria mesentérica superior, VE: vena esplénica, VE: vena hepática, VMS: vena mesentérica superior

La célula del parénquima hepático es el hepatocito, que constituye aproximadamente, el 60 % del total de las células del hígado y el 80% del volumen hepático. Los hepatocitos están orientados en cordones, compuestos por una fila simple de células (Desmet, 1992), excepto en neonatos y niños hasta la edad de 4-5 años que tienen dos filas, separadas del sinusoides vascular por el llamado "espacio de Disse", el cual constituye un micro-ambiente

intersticial donde se localizan las células Ito y fibras de colágeno tipo I y III (Geerts *et al*, 1990). El canaliculo está localizado en el polo opuesto al sinusoides. Los hepatocitos son células poliédricas, con núcleo central redondeado y abundante citoplasma. Su membrana plasmática tiene tres dominios morfológica y funcionalmente distintos: perisinusoidal, intercelular y pericanalicular.



ESTRUCTURA DEL HEPATOCITO Y LAS RELACIONES CON SU ENTORNO
(Fawcett, 1987)

Perisinusoidal: Constituye el 37% de la superficie celular. Posee estructura de microvellosidad con el objeto de aumentar la superficie de contacto con el espacio de Disse; lo cual unido a su elasticidad y al contenido en componentes matriciales de dicho espacio, facilita el intercambio con el flujo sanguíneo. Esta zona de la membrana tiene menor contenido en colesterol y mayor fluidez que el resto de los dominios y en ella se ubica la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Sellinger *et al*, 1990), del cotransporte $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, de la proteína ligada a la bilirrubina y a los ácidos grasos, así como, del transportador acoplado de Na^+ para la liberación de sales biliares.

Intercelular: Ocupa el 50% de la membrana plasmática. Es una región especializada en la comunicación y adhesión intercelular, que interviene activamente en la secreción biliar, ya que al estar localizada a ambos lados del canalículo constituye una barrera canalículo-sinusoidal. Se considera una "barrera bio-electrolítica" al ser permeable selectivamente a distintos cationes, hecho a su vez controlado por hormonas y xenobióticos.

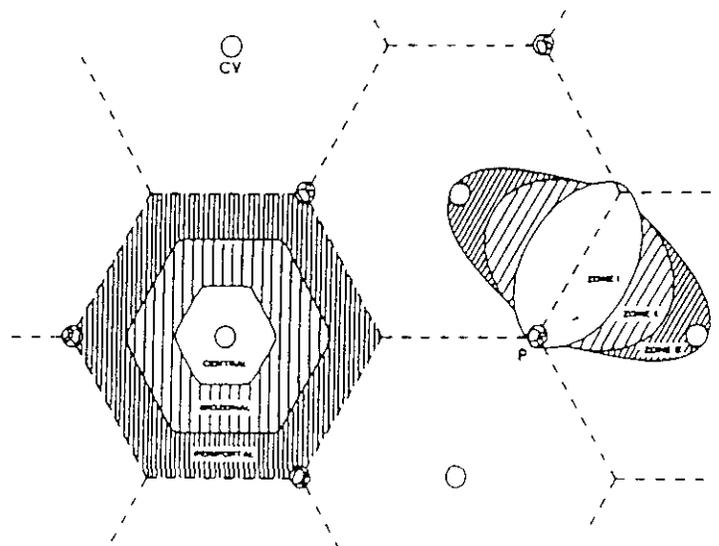
Pericanalicular: Engloba el 13 % restante de la superficie plasmática. Este dominio tiene sus propias características morfológicas y funciones especializadas. La pared del canalículo biliar está formada por una estría (hemicanalículo) en un lateral de la membrana plasmática de dos hepatocitos adyacentes. El elevado contenido en colesterol de este dominio explica su bajo grado de fluidez, lo cual influye en la actividad de las glicoproteínas integrales de la membrana con funciones enzimáticas. Aquí se localiza la proteína transportadora de sales biliares del canalículo y los sitios de reabsorción del glutamato y de la glicocola. Entre sus contenidos enzimáticos destacamos la 5' nucleotidasa, la γ -glutamyl-transferasa, la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa.

Esta polaridad secretora de las células parenquimáticas, que hace funcionar al hígado simultáneamente como glándula exocrina y metabólica, requiere una perfecta organización del sistema intracelular para encaminar así los productos generados hacia los distintos destinos (Desmet, 1990).

Se encuentra aún en debate el concepto de una 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" se caracteriza por una zona de flujo de sangre directamente del tracto portal que forma zonas de equipotencial hemodinámico. El acino, 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 por 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 (Scheuer, 1980). Por todo ello, anatómicamente, los hepatocitos están distribuidos en tres áreas, definidas por su proximidad a los terminales circulatorios: periportal, mediozonal y perivenosa; mientras que funcionalmente se considera que los hepatocitos residen en acinos, compuestos por tres zonas metabólicas:

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

Zonas 2 y 3: Menor proximidad al aporte vascular.



ORGANIZACION DEL PARENQUIMA SEGUN LOS CONCEPTOS DE LOBULO Y ACINO
(CV) vena central, (P) espacio porta, (Popp y Cattley, 1991)

Como la calidad y composición de la sangre cambia a su paso por el sinusoides, 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 funciones diferentes. Así, morfológicamente los hepatocitos perivenosos, tienden a ser de mayor tamaño que los periportales, poseen el retículo endoplásmico liso más desarrollado y cuentan con una menor cantidad de lípidos citoplasmáticos (Popp y Cattley, 1991).

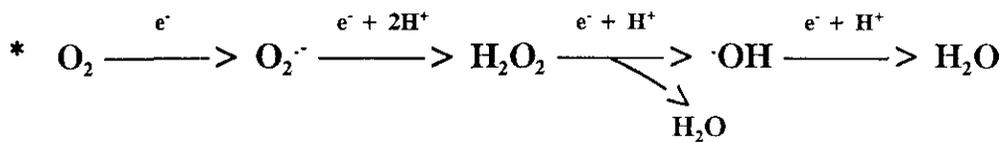
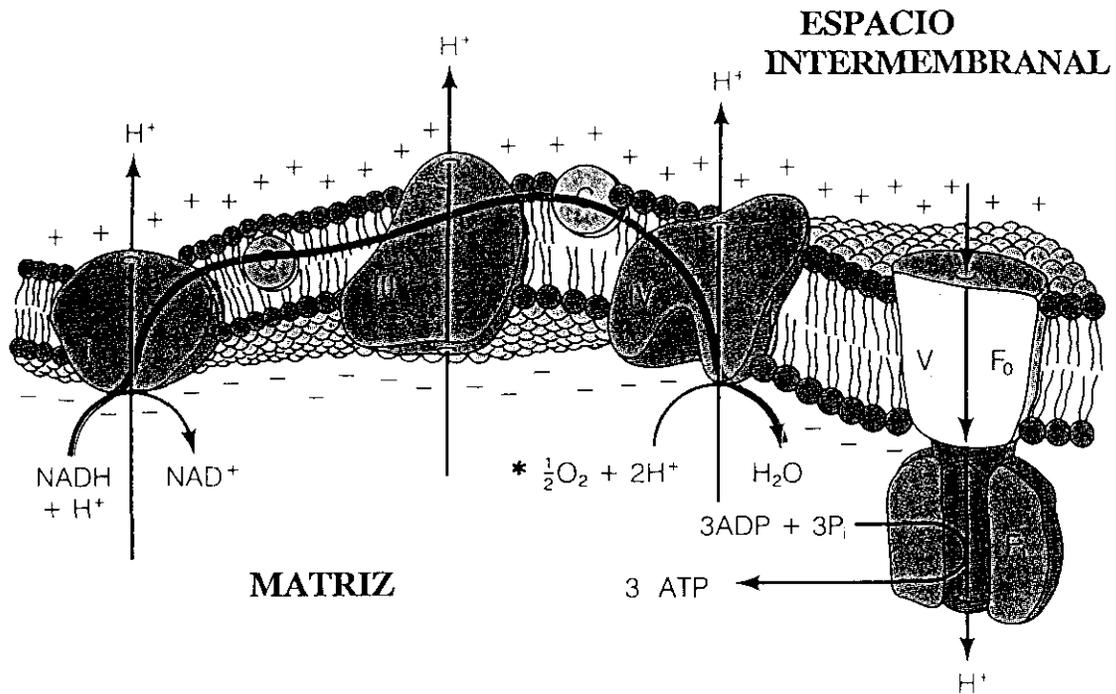
A nivel del *metabolismo energético oxidativo*, el catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos a acetil CoA es posible sólo en presencia de oxígeno; por tanto, los hepatocitos periportales se encuentran equipados preferentemente con alanina aminotransferasa, tirosina aminotransferasa y β -hidroxibutiril CoA deshidrogenasa. El catabolismo inicial de la glucosa (en su parte glucolítica), como también la lipogénesis, son procesos exergónicos posibles en ausencia de oxígeno; por ello, las células perivenosas son las que poseen predominantemente los enzimas clave de la glucólisis: la glucoquinasa, la piruvato quinasa y enzimas generadores de NADPH, todos ellos implicados en la síntesis de ácidos grasos. Un proceso que depende del NADPH, como la ureogénesis a partir de aminoácidos, mecanismo general de detoxificación se localiza también en la zona perivenosa. Todos los hepatocitos catalizan la oxidación final a CO_2 , pero las células periportales al recibir más oxígeno, parecen tener mayor capacidad para el metabolismo oxidativo ya que, su volumen mitocondrial es más elevado así como las actividades de los enzimas del ciclo tricarboxílico y de la cadena respiratoria. La gluconeogénesis es un proceso endergónico que ha de acoplarse al catabolismo oxidativo, de aquí su localización predominante en las células de la región periportal, con la presencia de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, la glucosa-6-fosfatasa y la lactato deshidrogenasa. El metabolismo del glucógeno parece estar distribuido heterogéneamente dentro del parénquima hepático ya que, todos los hepatocitos pueden sintetizar y degradar glucógeno, pero el tiempo y la velocidad de estos procesos son diferentes en células periportales y perivenosas (Jungermann y Katz, 1982).

Respecto a la *biotransformación* de xenobióticos, el hígado es el principal órgano encargado de esta misión. 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 predomina en la región perivenosa y puede inducirse en esta zona por una serie de sustancias (Waxman y Azaroff, 1992). Por ello, no sólo los enzimas generadores de NADPH, sino también los enzimas consumidores de NADPH como la citocromo P-450 NADPH reductasa y la glutatión reductasa predominan en las inmediaciones del terminal venoso. Sin embargo, la glutatión peroxidasa y el glutatión en su forma reducida predominan en la región periportal (Kera *et al*, 1987). Puede, por tanto, concluirse que los hepatocitos perivenosos muestran una susceptibilidad incrementada frente a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos ya que, no sólo llevan a cabo la biotransformación de los xenobióticos sino que además se encuentran dotados con un menor equipo protector (Katz y Jungermann, 1993).

1.2.- Edad y senescencia

La edad es un proceso complejo que implica cambios a nivel morfológico y bioquímico tanto en células aisladas como en órgano entero. Entre las diferentes teorías sobre la edad, la que más interés ha despertado ha sido la que responsabiliza a los radicales libres de oxígeno del daño generado en el proceso del envejecimiento (Harmon, 1992). Se define como radical libre a una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo.

El principal productor de radicales de oxígeno en los organismos aerobios es la mitocondria (Lezza *et al*, 1994), ya que bajo circunstancias fisiológicas normales, utiliza aproximadamente el 98% del O₂ celular a nivel del citocromo a₃, citocromo del estado 4 de la cadena de transporte de electrones de la respiración mitocondrial. Un pequeño porcentaje (del 1 al 4%) del O₂ incorporado por la mitocondria, genera especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido (O₂^{•-}) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).



PRODUCCION DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO EN LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL

No obstante, no sólo es la mitocondria la responsable de la generación de estas especies ya que también se producen en otros orgánulos celulares como son los peroxisomas, donde la aminoácido oxidasa, la acil-CoA oxidasa y la urato oxidasa generan H_2O_2 , o los microsomas, donde el citocromo P-450 cataliza reacciones de monooxigenación con producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno por mecanismos dependientes de NADPH. Tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno no poseen una elevada reactividad frente a las macromoléculas, sin embargo, en presencia de ciertos complejos de metales de transición como el hierro o el cobre pueden reaccionar entre si, reacción de Fenton o Harber-Weiss, y dar lugar al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) de alta reactividad (Zimmerman *et al*, 1990).

La generación continua de estas sustancias prooxidantes se controla por la existencia de mecanismos celulares de defensa llamados antioxidantes, reductores o secuestrantes que, se encuentran compartimentalizados de forma estratégica en los diferentes orgánulos subcelulares. La superóxido dismutasa dependiente de Mn, la glutatión peroxidasa dependiente de Se y la glutatión reductasa se ubican en la mitocondria, donde se produce la mayor parte de los radicales de oxígeno; mientras que, la superóxido dismutasa dependiente de Cu-Zn, la catalasa, la glutatión peroxidasa independiente de Se y la glutatión reductasa se localizan en el citosol (Yu, 1994).

Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos, la vitamina E o α -tocoferol reacciona con los radicales libres de oxígeno y facilita, conjuntamente con la glutatión peroxidasa, el bloqueo de la peroxidación lipídica (Amimoto *et al*, 1995). La melatonina es una hormona producida principalmente en la glándula pineal y a cuyas actividades como controladora de la madurez sexual, de la respuesta inmune y reguladora de la temperatura corporal hay que añadir su misión como antioxidante liposoluble más eficaz que la propia vitamina E o el glutatión frente al radical hidroxilo (Tang *et al*, 1993; Pieri *et al*, 1995); además, actúa como moduladora de los enzimas generadores de radicales libres dependientes del citocromo P-450 y óxido nítrico sintasa y como estimuladora de la actividad de la glutatión peroxidasa (Barlow-Walden *et al*, 1996). Sin embargo, el glutatión reducido (GSH) es el sistema antioxidante más importante del citosol ya que es el tiol de bajo peso molecular más abundante, capaz de reaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno y productos de la peroxidación o bien conjugarse con los metabolitos reactivos (Redd, 1990). Para mantener la integridad celular, los sistemas de defensa actúan concertadamente con los mecanismos responsables de la reparación del proceso oxidativo de las macromoléculas. La concentración de GSH, el estado redox GSH/GSSG y los niveles tiólicos influyen en el DNA bien modulando su síntesis (Suthanthiran *et al*, 1990) o bien protegiéndole del daño oxidativo (Bellomo *et al*, 1992); además se ha descrito que existe una relación entre la división celular y el contenido en grupos tiólicos de origen proteico y no proteico (Principe *et al*, 1989).

Si los mecanismos de defensa antioxidantes son insuficientes para contrarrestar la excesiva producción de especies reactivas, tienen lugar una serie de alteraciones celulares que

desembocan en una situación de estrés oxidativo, la cual puede llegar a afectar de manera irreversible la viabilidad celular y la funcionalidad del órgano (Shigenaga *et al*, 1994). Bien conocida es la lesión oxidativa producida sobre el DNA, no por el O_2^- o el H_2O_2 , sino por el $\cdot OH$ (Breen y Murphy, 1995). Del mismo modo, se originan lesiones a nivel de los lípidos de membrana, que alteran su fluidez, estructura y función (Slater, 1984). Menos conocidos son los efectos y consecuencias de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, las cuales dan lugar a peróxidos proteicos que consumen antioxidantes y moléculas de unión a proteínas que reducen metales de transición (Simpson *et al*, 1992). Además, con la edad se producen cambios conformacionales en los enzimas debido a errores en la traducción y la conformación de las proteínas a nivel de racemización de aminoácidos, desaminación, glicosilación, oxidación, etc. (Stadtman, 1992).

Si la producción de radicales libres es el factor clave que relaciona el daño oxidativo con el envejecimiento, es de esperar que éste se refleje directamente y en primera instancia a nivel de las propias mitocondrias. Existen varias características de las mismas que nos inducen a pensar en su contribución al envejecimiento ya que, en ellas no sólo se consume el 98% del oxígeno sino que también el DNA mitocondrial está tan empaquetado que todo él codifica y al carecer de histonas y poliaminas que puedan protegerlo, su reparación es mínima si se compara con la del DNA nuclear. Además, las membranas mitocondriales al ser ricas en ácidos grasos altamente insaturados son muy susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (Barja, 1996). De hecho, las especies más longevas como son algunos pájaros o incluso el hombre han demostrado tener una menor proporción de ácidos grasos insaturados de 4 o más dobles enlaces por sustitución de araquidónico por linoleico, lo cual influye en la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones y con ello en la disminución de la producción de radicales libres (Pamplona *et al*, 1996). Con la edad se incrementan los niveles del mutágeno 8-desoxiguanidina, disminuyen los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, se producen transcripciones anómalas, descenden el complejo I y IV de la cadena de transporte electrónico, únicos complejos codificados por el DNA mitocondrial a diferencia de los II y III codificados por el DNA nuclear, y se produce una pérdida de la producción energética con el consiguiente incremento en los niveles de oxidantes al reaccionar los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas con grupos amino libres (Shigenaga *et al*, 1994; Richter, 1995;

Gadaleta, 1995; Ames *et al*, 1995; De la Asunción *et al*, 1996).

La solución ideal para evitar el envejecimiento todavía no se ha encontrado, aunque está bien establecido que la restricción de la dieta incrementa la longevidad de los animales en un 43% al conseguir un mantenimiento de la protección antioxidante y prevenir así el daño celular degenerativo. De este modo se produce un aumento en las actividades de la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión S-transferasa y glutatión reductasa y una disminución en la producción de O_2^- , H_2O_2 y del estado 4 de la respiración mitocondrial (Yu, 1993; Sohal *et al*, 1994). También se ha abierto una nueva vía de estudio con la revelación de la capacidad antioxidante de la melatonina, ya que con ella, existe una posibilidad de regulación hormonal del estrés oxidativo (Yu, 1995).

En hígado de rata, el crecimiento durante el desarrollo normal se caracteriza por una progresiva poliploidización que va unida a una disminución de la fracción de hepatocitos diploides (2N) (Gerlynk *et al*, 1993). Los hepatocitos fetales de rata y los obtenidos durante las 3 primeras semanas de vida son en su mayor parte mononucleares diploides y así se mantienen durante los 3 primeros meses de vida; a partir de este punto, comienza el proceso de poliploidización con la aparición sucesiva de células tetraploides y octoploides, siendo el 50-70% de los hepatocitos adultos, mononucleares tetraploides (Saeter *et al*, 1988; Tamura *et al*, 1992). A partir de este momento la progresión de la poliploidía va haciéndose más acusada. El incremento en la ploidía se puede reconocer por microscopía óptica, como un aumento en el tamaño del núcleo. La evaluación de las poblaciones celulares de acuerdo con la ploidía es relativamente complicada, debido a la existencia de cinco fenotipos diferentes de hepatocitos: diploides mononucleados (2N) con un núcleo diploide; tetraploides binucleados (2x2N), que contienen dos núcleos diploides; tetraploides mononucleados (4N) con un núcleo tetraploide; octoploides binucleados (2x4N) con dos núcleos tetraploides; y octoploides mononucleados (8N) con un solo núcleo octoploide. Poco se sabe aún acerca de la significación fisiológica de la dependencia entre ploidía y edad, aunque se cree que la poliploidía refleja una mayor diferenciación y una necesidad de cantidades más elevadas de genes para satisfacer el papel multifuncional metabólico de los hepatocitos.

El hecho de que al menos una parte de los hepatocitos diploides pueda considerarse como población de células precursoras a partir de las cuales se desarrollan hepatocitos poliploides más diferenciados, indica el interés en la distribución del DNA en las poblaciones que surgen durante los estadios de regeneración hepática y hepatocarcinogénesis. Cualquier tratamiento que prevenga o disminuya la poliploidización (o diferenciación) y cause una expansión de la población de hepatocitos diploides, que es lo que ocurre en la proliferación hepatocelular postnecrótica, puede considerarse que eleva el riesgo de cáncer. Este riesgo sobreviene porque las células 2N se encuentran menos protegidas que las 4N y 8N frente a las posibles consecuencias oncogénicas de las lesiones hepáticas. Se ha sugerido, que la poliploidía se encuentra asociada con una disminución del crecimiento celular. Sin embargo, otros estudios indican que las células mononucleares de todas las ploidías proliferan a velocidades similares durante la regeneración hepática. Por tanto, parece ser que las variaciones en la velocidad de crecimiento se deben a la existencia de diferentes programas (regeneración *versus* desarrollo) más que a las diferencias intrínsecas en la capacidad de proliferación de las poblaciones con diferentes ploidías. El cambio en la ploidía, 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 citoquinesis amitótica (Popp y Cattley, 1991).

Existe un interés, cada vez mayor, por el estudio de los *efectos edad* sobre la toxicidad de los xenobióticos, ya que la frecuencia de estas lesiones hepáticas puede variar considerablemente con el paso del tiempo. La respuesta tóxica a muchos agentes químicos depende de su biotransformación a metabolitos reactivos (tioacetamida, acetaminofeno, paracetamol, etc) o no reactivos (fenobarbital, morfina, etc). En el envejecimiento parece ser que se incrementa la sensibilidad al efecto hepatotóxico de los xenobióticos (Schmucker, 1985; Bezzoujen, 1984). Se sabe que la edad afecta a los enzimas microsómicos que dependen del citocromo P-450 (Rikans, 1989), pero mientras unos autores describen que el sistema microsómico oxidasa de función mixta disminuye por efecto de la edad (Schmucker y Wang, 1981), otros describen el efecto contrario (Maloney *et al*, 1986). La disponibilidad del glutatión para la formación de conjugados disminuye con la edad, lo cual eleva la

hepatotoxicidad de fármacos que dependen del glutatión para su detoxificación (Spearman y Leibman, 1984). Otros estudios han descrito que la expresión génica de la SOD y la catalasa, los enzimas directamente encargados de eliminar el H₂O₂ y el radical superóxido, va siendo menor a medida que transcurre la edad, mientras que la glutatión peroxidasa se incrementa en el mismo rango (Liu y Mori, 1993; De Quiroga *et al*, 1990). Son muchos los parámetros hepáticos que sufren fluctuaciones por efecto de la edad, y especialmente interesantes son aquellos relacionados con el metabolismo de hepatotóxicos, como se demuestra en el presente trabajo.

1.3.- Evolución del daño y muerte celular. Apoptosis *versus* necrosis

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la muerte celular surge como consecuencia de procesos patológicos, ahora se sabe que la muerte de algunas células supone un fenómeno fisiológico necesario para el desarrollo normal y la renovación celular. El estudio de la morfología de las células que mueren, ha revelado dos modelos diferentes de muerte celular denominados necrosis y apoptosis (Wyllie, 1981).

La *necrosis* tiene lugar, generalmente, en condiciones patológicas. Las células que sufren necrosis se hinchan y muestran una disrupción de las membranas externas e internas, con prominencias en la membrana plasmática. Puede observarse una fase preneocrótica en la que el retículo endoplásmico se dilata y las mitocondrias aparecen también hinchadas. Las alteraciones necróticas irreversibles se manifiestan, a menudo, por expansiones en el volumen de las mitocondrias que van acompañadas por disrupción de la estructura mitocondrial, la disolución de orgánulos y la ruptura de la membrana plasmática (McConkey y Orrenius, 1991). 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, y se pueden clasificar en tres grupos en función de la zona del acino dañada.

La necrosis perivenosa es con mucho la más frecuente, en animales expuestos de forma aguda a agentes hepatotóxicos, y tiene lugar en el área central del lobulillo hepático, donde los hepatocitos necrosados aparecen rodeando la terminación de la vena central. Por

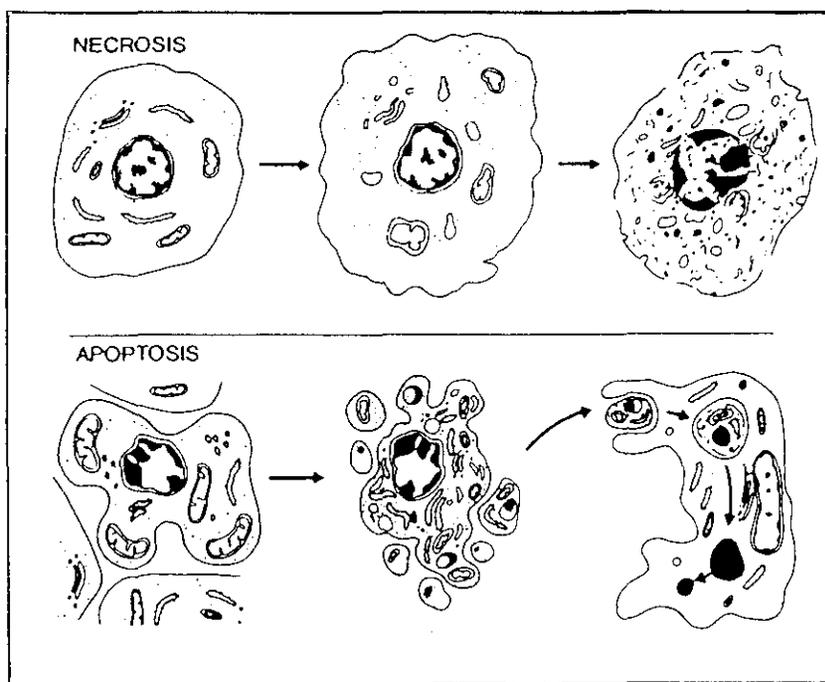
su distribución morfológica la necrosis perivenosa se denomina también centrolobular, central o de la zona 3 del acino, haciendo referencia a la zona metabólica. La intensidad de la zona necrosada depende de muchos factores entre los que cabe destacar la composición química del agente tóxico, la dosis y frecuencia de la administración, la interacción con otras sustancias, etc. La necrosis, se presenta generalmente como una lesión coagulativa que puede limitarse a una simple fila de hepatocitos alrededor de la vena central, o extenderse a través del lóbulo. Las células presentan frecuentemente una apariencia homogénea opaca, por la pérdida de partículas de glucógeno. Las mitocondrias aparecen hinchadas. Eventualmente las células se vacuolizan y puede haber una calcificación. El núcleo de la célula muerta aparece contraído y basófilo, picnótico, con acúmulos de cromatina; se puede romper en pequeños fragmentos diseminándose por el citoplasma (carioresis) o disolverse y desaparecer progresivamente (cariolisis). El tejido necrosado va normalmente unido a un proceso inflamatorio. La necrosis perivenosa comienza a repararse a las 24 horas de su inicio y sólo queda una fibrosis mínima, en la zona de necrosis, en caso de que se dañen las células sinusoidales.

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 sólo a dos o tres filas de células de la región media del lóbulo.

En la necrosis periportal, menos frecuente que la perivenosa, los hepatocitos necrosados rodean al terminal porta. Su localización se trata de explicar, teniendo en cuenta, que el área periportal es la primera que 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* es una forma especial de muerte individual que se ha descrito como suicidio celular (Bursch *et al*, 1992). Al contrario que en la necrosis, no hay liberación del contenido intracelular y no se presentan células propias de procesos inflamatorios, como neutrófilos y macrófagos. Los orgánulos citoplasmáticos de las células apoptóticas se hacen

más compactos, aunque las mitocondrias, en apariencia, continúan intactas. A veces, aparecen protuberancias en la membrana nuclear. Existe una condensación característica de la cromatina, la cual se ha relacionado con la actividad de nucleasas endógenas dependientes del calcio. En sus primeras fases, las células apoptóticas se contraen y pierden el contacto con las células adyacentes. Sufren condensación del citoplasma, pérdida de las estructuras especializadas de superficie, condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y formación de protuberancias en la superficie celular. A continuación, las protuberancias de la superficie celular se separan en múltiples cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos nucleares y orgánulos intactos y que se caracterizan histológicamente por su estructura eosinofílica, con cromatina densa y a veces fragmentada. Algunos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células residentes hepáticas o por fagocitos. En el hígado, la apoptosis se presenta con una frecuencia muy baja (1 por cada 10^5 células) y se restringe en principio al área perivenosa, representando la pérdida fisiológica de los hepatocitos senescentes. Aparece incrementada en hígado que ha sufrido una hiperplasia inducida por mitógenos que regresa a su tamaño normal tras haber eliminado el mitógeno (Cascales *et al*, 1990a).



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 originada por xenobióticos conduce a menudo a la muerte celular por necrosis en caso de fallar los sistemas endógenos necesarios para mantener el equilibrio homeostático celular, o por apoptosis en caso de iniciarse el proceso activo apoptogénico. Hasta la fecha, los intentos para la identificación de las reacciones celulares que tienen lugar en caso de intoxicación celular, se han encontrado entorpecidos 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 tal pérdida.

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. 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 ruptura de estas protuberancias con la consiguiente pérdida del contenido celular (Lemasters *et al*, 1987). 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. Sin embargo, no se sabe con certeza, cuales son las reacciones que, una vez iniciadas por tal perturbación, propagan la lesión. Parece que podrían encontrarse involucrados en este proceso fenómenos tales como la disrupción del citoesqueleto, la activación de enzimas degradativos, como las proteasas y la fosfolipasa A2 y la estimulación de la endonucleasa y la poli-(ADP-ribosa) polimerasa. 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:

Muchos compuestos muestran su toxicidad a través de metabolitos reactivos, o como

resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno. 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 en esta zona del acino. La región periportal, con alto contenido en oxígeno, contiene asimismo 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 hepatotóxica directa de los agentes que penetran en el hígado por la vena porta y son agresivos sin ser bioactivados.

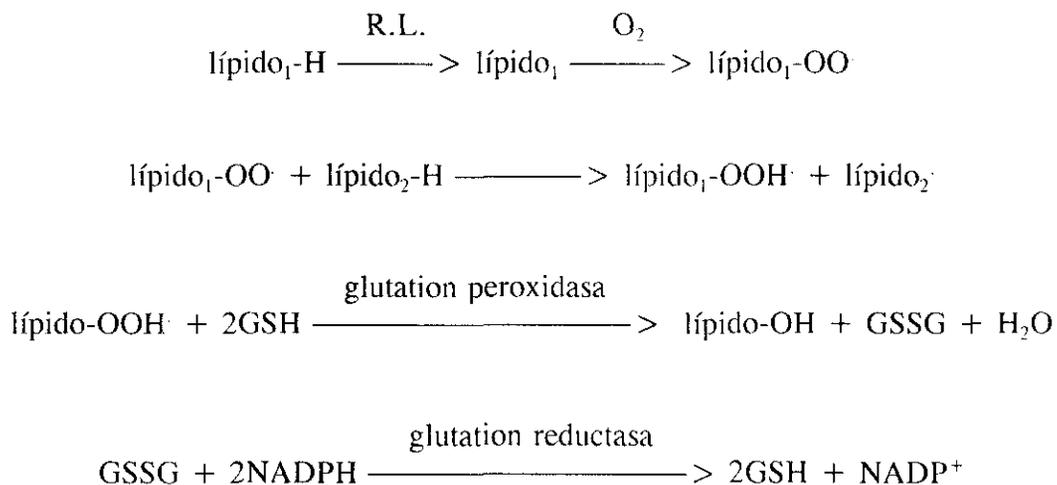
El ritmo mediante el cual el citocromo P-450 se une a los diferentes sustratos que han de ser biotransformados, puede elevarse mediante la administración de agentes inductores del sistema microsómico monooxigenasa (Ayrton *et al*, 1991), entre los que se encuentra el fenobarbital (Bars y Elcombe, 1991). 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. De esta manera se induce la expresión genética de al menos dos isoenzimas dependientes del citocromo P-450, la epóxido hidrolasa y la glucuronil transferasa.

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

Los compuestos tóxicos intermediarios son capaces de reaccionar con los constituyentes celulares hepáticos, entre los que hemos de destacar los grupos tiólicos proteicos, lo que puede conllevar a la muerte celular (Pessayre, 1987). Los metabolitos reactivos electrofílicos reaccionan con el grupo tiol, nucleófilo, del glutatión 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.

Por otro lado, los radicales libres (RL) 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 lipoperóxido 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

(lípidio-OH) con la oxidación concomitante del GSH 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 una situación de estrés oxidativo, se produce GSSG a una mayor velocidad, lo cual altera el equilibrio del par GSH/GSSG. El GSSG formado en exceso tiene que salir del hepatocito. La extrusión del GSSG origina consecuentemente un descenso en la concentración de GSH hepático. La disminución del cociente GSH/GSSG va acompañado de una oxidación de los grupos -SH₂ de las proteínas (Díez-Fernández *et al*, 1996a).

c) Elevación del calcio citosólico:

Todas estas alteraciones, de no solventarse a tiempo, van a traer como consecuencia la muerte celular por incremento del calcio citosólico, ya que la membrana plasmática alterada por peroxidación lipídica o fijación covalente dejará 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. La oxidación de los tioles proteicos disminuye la actividad de las ATPasas dependientes del calcio del retículo endoplásmico y de la membrana, 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 (Nicotera *et al*, 1990; Bennett y Williams, 1992). El resultado es un aumento importante y prolongado del calcio en el espacio citoplásmico del hepatocito, que finaliza con la muerte celular. Los efectos citotóxicos inducidos por el incremento del calcio intracelular originan alteraciones en el citoesqueleto que se asocian con la aparición de prominencias en la membrana plasmática (Jewell *et al*, 1982), la activación de las fosfolipasas dependientes de calcio que lesionan la membrana y la activación de proteasas neutras, también dependientes del calcio (Nicotera *et al*, 1986).

1.4.- Mecanismos de defensa hepatocelulares frente a la agresión tóxica

Una de las características de los organismos vivos es su capacidad para superar las lesiones producidas por agentes físicos o químicos y para ello cuentan con una serie de mecanismos de defensa que, a grandes rasgos, pueden clasificarse en dos categorías: la primera categoría, comprende todos aquellos procesos de los que se vale la célula para prevenir la lesión después del ataque nocivo: la segunda, engloba los mecanismos de respuesta 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.

La biotransformación de las sustancias tóxicas se realiza mayoritariamente en el hígado donde tienen su sede las reacciones de óxido-reducción, hidrólisis y conjugación. Estos procesos se agrupan en las fases siguientes:

Fase I: constituida por reacciones donde intervienen las oxidoreductasas e hidrolasas,

encargadas de incrementar la polaridad de la molécula para facilitar su excreción, aún con el riesgo de generar metabolitos tóxicos.

Fase II: la constituyen reacciones de conjugación con glucurónido, sulfato o glutatión. Aunque la reacción entre el glutatión y los grupos electrófilos puede ocurrir de manera no enzimática, la conjugación se realiza mediante la acción de un grupo de enzimas, conocido como glutatión S-transferasas, presentes en citosol (Koss *et al*, 1991). En las reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas, el átomo de azufre del GSH proporciona los electrones para el ataque del sustrato electrofílico. El conjugado así formado sale de la célula y se hidroliza eliminando el residuo glutamilo y glicocola y se excreta como mercapturato, derivado acetilado del conjugado de cisteína. La γ -glutamil transferasa, 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).

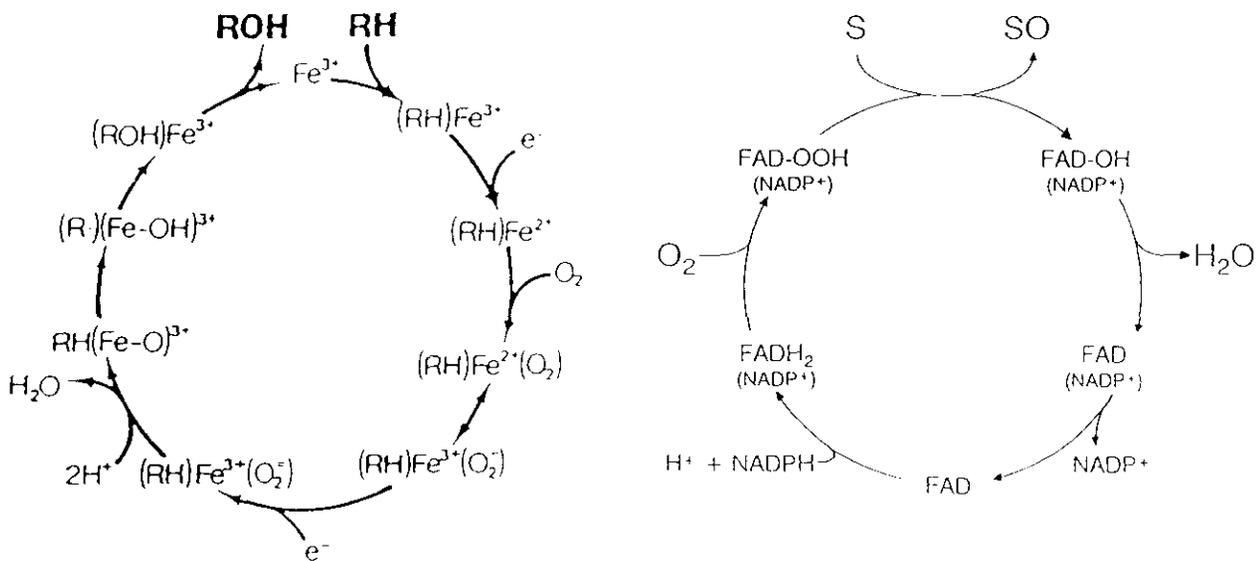
Fase III: de eliminación mediante una bomba GS-X dependiente de ATP localizada en el dominio canalicular de la membrana plasmática del hepatocito. Esta bomba tiene tres dominios bien caracterizados: dominio P bajo el que se realiza el proceso de la fosforilación, dominio G de reconocimiento del glutatión y dominio C con mayor afinidad por la zona hidrofóbica del correspondiente S-conjugado (Ishikawa, 1992).

1.4.1.- Sistemas microsómicos de detoxificación

En los microsomas de los hepatocitos existen dos tipos distintos de mono-oxigenasas, que difieren en su composición y mecanismo, y que se conocen en función de su grupo prostético como monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 y mono-oxigenasas dependientes de flavina (Jakoby y Ziegler, 1990).

El citocromo P-450 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, conociéndose 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 equivalente reductor (Porter y Coon, 1991). Al aumentar la actividad del citocromo P-450, se incrementa la de la NADPH-citocromo P-450 reductasa. El sistema monooxigenasa de función mixta se encuentra asociado a otra hemoproteína denominada citocromo b₅, cuyo papel aún no está perfectamente esclarecido (Kyle y Farber, 1991).



SECUENCIA DE REACCIONES DE LAS MONO-OXIGENASAS dependientes de citocromo P-450 a la izquierda (White y Coon, 1980) y con flavina en su estructura a la derecha (Ziegler, 1990)

La primera monooxigenasa con flavina en su estructura fue purificada en hígado de cerdo como un enzima que catalizaba oxidaciones dependientes de NADPH y O₂ en xenobióticos nucleofílicos; hoy en día se ha visto que todas las existentes son proteínas integrales de membrana localizadas en diferentes tejidos con un alto grado de homología entre si. Son proteínas tetraméricas con subunidades idénticas y un mol de FAD por subunidad (Ziegler, 1993), presentando un amplio espectro de acción y con actividad demostrada sobre pesticidas y otros xenobióticos tanto inorgánicos (Ziegler, 1990) como orgánicos con nitrógeno (Ziegler, 1988) azufre (Hodgson y Levi, 1988), fósforo (Smysler y Hodson, 1985) o selenio (Chen y Ziegler, 1994) en su estructura.

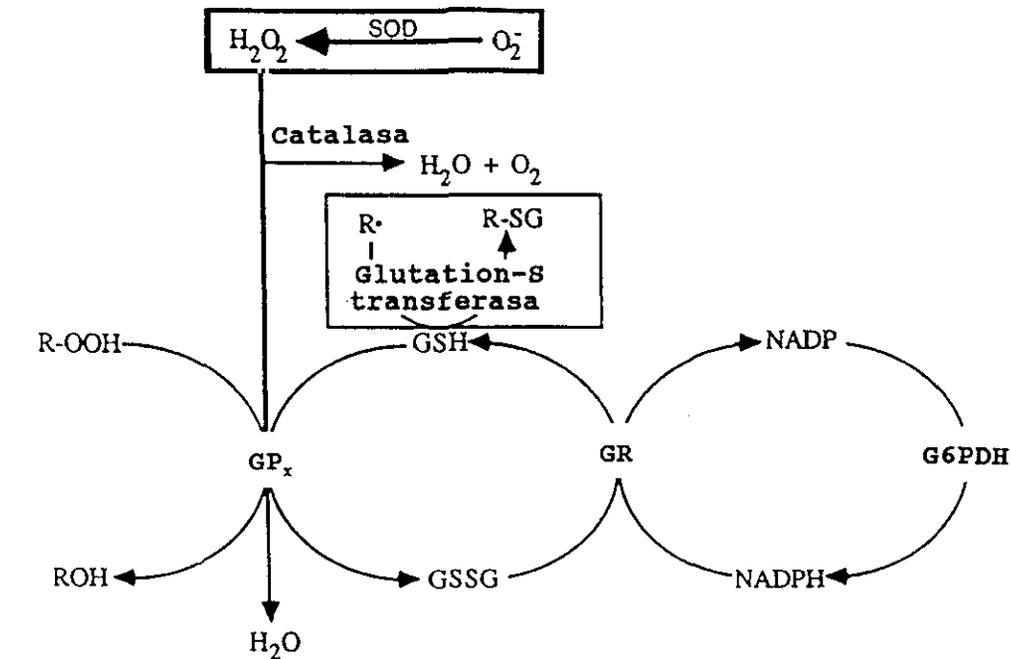
1.4.2.- El glutatión como sistema antioxidante endógeno

El sistema antioxidante endógeno está constituido por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los enzimáticos podemos hablar de la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa y entre los no enzimáticos se encuentran el glutatión, el ácido ascórbico, y el ácido úrico como compuestos hidrosolubles y la vitamina E, los carotenos y la melatonina como liposolubles (Groot, 1994; Pierrefiche y Labarit, 1995).

El glutatión se encuentra en todos los tejidos de mamíferos, pero su importancia es mayor en los órganos más expuestos a toxinas exógenas, como es el caso del hígado. Dentro de la célula, puede considerarse al GSH mitocondrial como la defensa principal frente al estrés oxidativo fisiológico generado en la respiración celular y supone un objetivo crítico para las especies tóxicas de oxígeno y los metabolitos electrofílicos. El hígado además, juega un papel muy importante en la homeostasis del glutatión, ya que es el encargado de suministrar GSH a órganos extrahepáticos a través de sistemas transportadores de membrana localizados en el polo sinusoidal y en el polo canalicular del hepatocito. Ambos sistemas de transporte exhiben características, algunas de las cuales comunes, como puede ser que ambos sean bidireccionales y electrogénicos. Entre las características diferentes se encuentra la afinidad por el GSH y especificidad por cis-inhibición y trans-estimulación por aniones orgánicos (Fernández-Checa *et al*, 1993). Cabe resaltar también que las mezclas de disulfuros

pueden afectar notablemente el transporte de GSH a través del sinusoides (Lu *et al*, 1993).

El glutatión realiza su acción como antioxidante endógeno de manera coordinada con los sistemas enzimáticos nombrados anteriormente y que se resume en el siguiente esquema:



SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDOGENO

Los radicales libres en forma de anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) generan H_2O_2 mediante la SOD. Este enzima existe en el organismo en dos formas moleculares: la SOD Cu-Zn abundante en el citoplasma y sensible a cianuro, dimerica y con un peso molecular bajo y la SOD Fe-Mn localizada en mitocondria, tetramérica e insensible a cianuro. El H_2O_2 generado en el paso anterior puede ser sustrato de dos enzimas: la catalasa y la glutatión peroxidasa; el segundo parece ser el enzima más importante, ya que su localización a nivel citoplasmático y mitocondrial le hace más accesible que la catalasa que, se ubica exclusivamente en fracción soluble. La glutatión peroxidasa, además, tiene la capacidad de eliminar peróxidos no sólo inorgánicos sino también orgánicos como pueden ser los que aparecen en el proceso de la peroxidación lipídica. El GSSG formado tiene que ser eliminado bien directamente vía biliar o puede reducirse a GSH mediante la glutatión reductasa,

presente de igual modo en citosol y mitocondrias, precisando para ello el NADPH generado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Inove, 1994).

La relación entre las dos formas del glutatión (GSH/GSSG) es uno de los marcadores del estado redox tiólico tisular y su alteración tiene un efecto importante sobre el estado de óxido-reducción de los grupos tiólicos proteicos que influyen en la actividad de procesos como son la catálisis enzimática, la síntesis de proteínas y la unión a receptores (Gilbert, 1982).

1.5.- Regeneración hepática post-necrótica

La pérdida de las propias células del hígado puede deberse a tres causas: infección, intoxicación química o hepatectomía parcial siendo la respuesta celular aparentemente la misma en cualquiera de estos tres casos. El modelo de regeneración hepática más utilizado para el estudio de la respuesta proliferativa sincronizada se consigue en ratas por hepatectomía de porciones de hígado que pueden superar hasta un 70% del total. Sin embargo, la caracterización de parámetros relacionados con la proliferación celular post-necrótica presenta un gran interés desde el punto de vista fisiopatológico y clínico (Mehendale, 1991) ya que el hígado responde a una agresión tóxica que implique necrosis hepatocelular, induciendo la división de los hepatocitos remanentes. De esta manera, el hígado lesionado es capaz de recuperar tanto la masa como el número de células inicial en un período no superior a dos semanas. 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, así como 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 división celular rápida típico de regeneración hepática. Durante mucho tiempo se ha creído que la pérdida en la masa hepatocelular era el agente que desencadenaba la división de las células remanentes, pero en el caso de hígados de ratones transgénicos con una supresión somática del gen que codifica para el plasminógeno activador tipo uroquinasa fusionado con un promotor de la albúmina (Sandgren *et al*, 1991), se ha observado regeneración hepatocelular de las células residentes en los nódulos sin que existan

pérdidas en la masa o en el número de células hepáticas. Esto indica que el agente desencadenante tiene que ser algún indicador de la función hepática y que, sólo 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.

Aunque son células altamente diferenciadas que se encuentran en estado quiescente, los hepatocitos tienen la capacidad de dividirse para reemplazar a las células que se han dañado. En condiciones normales la capacidad proliferativa del hígado es muy baja y 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 de los hepatocitos ($< 1\%$) se encuentra en la fase S (Cascales y Martín-Sanz, 1990a). 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, observándose, ocasionalmente, mitosis.

La proliferación del parénquima hepático comienza en las zonas periportales 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 (Michalopoulos, 1990). Para entender la regulación del crecimiento hepático es fundamental conocer los cambios que tienen lugar en la función del hepatocito después de la hepatectomía parcial. La regeneración hepática parece presentar una respuesta bifásica; durante el primer "round" de división, son los hepatocitos las únicas células hepáticas que se encuentran involucradas en la replicación del DNA (fase S con máximo a las 24 horas) y en la actividad mitótica (fase M con máximo a las 30 horas). El segundo "round" mitótico ocurre 24 horas más tarde, es menos sincronizado y en él participan todas las células hepáticas, parenquimales y no parenquimales (Fausto, 1992). Durante las transiciones proliferativas se verifica la desdiferenciación celular, proceso que implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo.

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, el hígado sufre necrosis hepatocelular debida al mecanismo de bioactivación de la toxina. Por mecanismos aún no completamente esclarecidos, el hígado responde estimulando la división 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 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 (Mangipudy *et al*, 1995). La aparición del *fenotipo resistente* en los hepatocitos es una respuesta adaptativa del hígado frente a una amplia variedad de xenobióticos. Esta resistencia es un mecanismo de adaptación clonal (gen *mdr1*) para sobrevivir en un ambiente hostil, el cual se encuentra involucrado en la promoción tumoral y en la resistencia a la quimioterapia de muchos cánceres humanos (Abraham *et al*, 1993).

Recientemente se ha descubierto un método de gran valor como diagnóstico de rutina para detectar las células proliferantes, que ha permitido evaluar la regeneración hepática en muestras humanas. Este método utiliza anticuerpos monoclonales frente a un *antígeno nuclear de células proliferantes* (PCNA), factor auxiliar de la DNA polimerasa δ (Fairman, 1990). La detección inmunohistoquímica de este antígeno no depende de la incorporación de marcadores externos, como la bromodeoxiuridina o la timidina tritiada y se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-PCNA pueden aplicarse con éxito a tejidos fijados con formol e incluidos en parafina (Kamel *et al*, 1991; Kayano *et al*, 1992).

1.5.1.- Renovación celular hepática

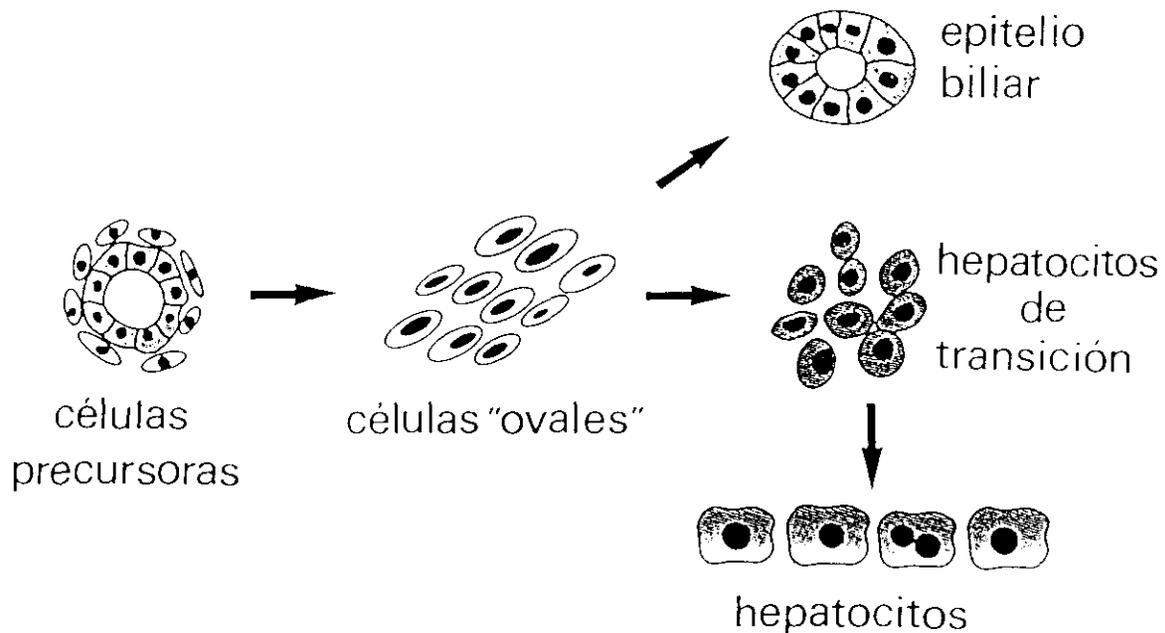
El desarrollo embrionario del hígado se inicia a las 3 ó 4 semanas de gestación a partir del mesodermo. En el interior del mesénquima del septum transversal, se diferencia y crece una masa de células progenitoras inmaduras que pueden diferenciarse, unas en el linaje hepatocítico (hepatoblastos), mientras que otras, las que se encuentran en contacto directo con el mesénquima que rodea al terminal porta, pueden transformarse en células de la placa ductular que se diferencian en el linaje biliar epitelial (Terada y Nakanuma, 1993; Cascales, 1994).

Interesa conocer de qué manera pueden intervenir las células precursoras en el proceso de la regeneración hepática. En condiciones normales la renovación celular en hígado es muy baja y la mayoría de sus células epiteliales se encuentran en estado quiescente (Reid, 1990). Los hepatocitos adultos diferenciados, sin embargo, mantienen la capacidad de uno o dos "rounds" de replicación y pueden responder rápidamente a cualquier agresión hepática que conlleve una pérdida moderada de células. De la misma manera que los hepatocitos, las células del conducto biliar mantienen la capacidad de replicarse y responden a la obstrucción biliar y a otras formas de enfermedad del tracto biliar con la proliferación de estas células. Hay casos, sin embargo, en los que parece ser que desaparece la capacidad regenerativa de los hepatocitos maduros y el hígado necesita recurrir a poblaciones precursoras para restaurar su funcionalidad. Existen dos hipótesis en relación con la intervención de las células precursoras en el proceso de regeneración hepática:

- primera, la hipótesis del flujo hepático vectorial o "streaming liver" que sugiere que el hígado, al igual que la piel o el intestino, posee una población celular activa precursora que reemplaza continuamente a aquellas células maduras que han perdido su capacidad de proliferar (Arber y Zajicek, 1990). Los hepatocitos que se generan en la región periportal, migran a velocidad casi constante y mueren, al final de su período de supervivencia, en la región perivenosa. Por tanto, si los hepatocitos periportales son las células que proliferan después de la hepatectomía parcial, el compartimento de células precursoras o progenitoras ha de ubicarse en esta región del acino. Esta teoría tiene una gran aceptación, pero

investigaciones más recientes rechazan la renovación vectorial de los hepatocitos en el interior del acino, y proponen que ésta puede realizarse en cualquier punto del parénquima hepático (Schuler y Salvi, 1991).

- y segunda, la que propone la existencia de células pluripotentes "facultativas", a modo de una pequeña población de células durmientes que se multiplican sólo cuando el hígado sufre una lesión tan grave que aborta la capacidad regenerativa de los hepatocitos maduros, son las células *precursoras pluripotentes hepáticas* las que se activan. Esto da lugar a la proliferación rápida de las células precursoras inmaduras que expresan marcadores tanto de las líneas celulares precursoras de los hepatocitos (hepatoblastos) como de las líneas celulares precursoras del epitelio biliar. Estas observaciones han hecho que a estas líneas celulares se las denomine *hepatocitos ductulares* y que se sugiera la existencia de una similitud de éstas con las células ovasales debido a que poseen un potencial de diferenciación bidireccional. Posteriormente estas células se diferencian en hepatocitos y células epiteliales biliares (Gerber y Thung, 1993; Travis, 1993).



Se ha descrito la existencia de células progenitoras del epitelio del conducto biliar en hígado adulto humano (Sell, 1991). Cuando estas células entran en estado proliferativo, lo que ocurre en casos de colestasis, expresan una *molécula de adhesión celular neural* (Roskham y Van Den Oord, 1990). Esta molécula no se encuentra en células epiteliales adultas y es típica de células epiteliales embrionarias durante el proceso normal de diferenciación. La expresión de esta molécula por células del tracto biliar en proliferación, es un índice de la existencia de células progenitoras en la formación de nuevos canalículos biliares.

Las *células ovals* son células epiteliales que proliferan rápidamente en hígado de rata por efecto de los tóxicos que inducen lesión hepática severa. Son células pequeñas, redondas, con una elevada relación núcleo/citoplasma que surgen en el área periportal del acino hepático expandiéndose con gran rapidez hacia la región perivenosa. Constituyen una población procedente de la proliferación de células precursoras multipotentes. Para considerar a las células ovals como células precursoras hepáticas es necesario demostrar que poseen una serie de propiedades tales como: elevada capacidad de replicación, características de hepatoblastos fetales y capacidad de diferenciarse en los dos linajes, el hepatocítico y el biliar. Está bien definido que las células ovals poseen una elevada capacidad de replicación y un ciclo de vida corto. Después de la exposición a un hepatotóxico estas células son, entre todas las células hepáticas ensayadas, las que incorporan los niveles más elevados de timidina tritiada. La proliferación de las células ovals se encuentra bajo un control estricto. También las células ovals muestran una elevada expresión de oncogenes asociados con el ciclo de división celular como el *c-myc*, *c-fos* y *c-ras*. Por ejemplo, las células ovals expresan altos niveles de la proteína p53, producto de un gen supresor que controla la entrada de las células en el ciclo de división celular. Un argumento más en apoyo de las células ovals como presuntas representantes de las células progenitoras hepáticas, es que algunas de ellas se asemejan a hepatoblastos por su elevada expresión de α -fetoproteína y moderada expresión de albúmina. Las células ovals contienen el mRNA de 2,3 kb de la α -fetoproteína, característico de los hepatocitos fetales, que se encuentra ausente en hepatocitos maduros. Por último, ciertas células ovals coexpresan marcadores de superficie considerados específicos de células hepáticas maduras, tanto de las células del tracto biliar como de los hepatocitos adultos (Sirica y Mathis, 1990).

La mayor parte de las células ovales desaparecen por apoptosis y no se diferencian. Está demostrado que las células ovales remanentes se diferencian en el linaje biliar, pero no está aún del todo claro que puedan diferenciarse en el linaje hepatocítico. La primera evidencia de esta diferenciación ha sido la identificación de células intermedias entre las células ovales y las hepatocíticas en ciertos modelos de hepatocarcinogénesis química; estas células de transición aparecen como pequeños hepatocitos que expresan α -fetoproteína y albúmina, contienen los mismos isoenzimas fetales que las células ovales y exhiben marcadores de superficie típicos de ambas clases de células.

Se desconoce aún el mecanismo que regula la proliferación y diferenciación de las células precursoras en casos de lesión hepática y la influencia de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento en la señalización inductora de la proliferación de líneas celulares específicas. Parece ser que las células precursoras exhiben una adaptabilidad y/o plasticidad frente a la diferenciación, cuya limitación aún no se ha definido. La mayor parte de los conocimientos que se poseen acerca de los mecanismos que regulan la diferenciación de las células madres multipotentes deriva de los estudios realizados sobre la mielopoyesis (Scoazec, 1993). La mielopoyesis supone la progresión de tres transformaciones celulares: la célula madre se diferencia en dos líneas celulares, la linfoide y la mieloide, que se diferencian a su vez, en diversos tipos de células progenitoras. Estas células progenitoras, mediante el estímulo de factores de crecimiento apropiados, entran en una fase de expansión clonal acoplada a una progresiva diferenciación. Los dos procesos, multiplicación y diferenciación son paralelos pero inversos, de modo que cuanto más diferenciada sea una célula, menor es su capacidad proliferativa. En la mayor parte de los epitelios adultos el proceso se puede incluir en tres compartimentos: en el primero, se encuentran las células precursoras capaces de autoreplicarse; en el segundo, las células progenitoras que unen a su capacidad replicativa su tendencia hacia la diferenciación; y en el tercero, las células diferenciadas. Esta organización permite la renovación permanente de las células maduras que mueren una vez finalizado su ciclo de vida normal. Algunos tejidos adultos, como el muscular y el nervioso, no se ajustan a este modelo porque al carecer de células precursoras, sus células diferenciadas no pueden reemplazarse.

Ya hemos comentado que la existencia en hígado de células precursoras es un tema controvertido. Los investigadores que abogan en contra de esta existencia aluden que si bien los hepatocitos tienen una supervivencia larga (200 a 400 días) y su renovación fisiológica es muy baja (menor del 1%), sin embargo, retienen su capacidad replicativa en respuesta a factores que estimulan el crecimiento, y esta capacidad de proliferación de los hepatocitos adultos normales se considera suficiente para permitir la restauración completa de la masa hepática después de una pérdida por lesión tóxica o por hepatectomía asegurando así la renovación y la restauración de la funcionalidad hepática (Fausto, 1990; Michalopoulos, 1990).

1.5.2.- Ciclo de división celular; análisis de la ploidía y distribución de DNA por citometría de flujo

La citocinética comprende el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y poblaciones de células (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 progenitoras, y el final de la mitosis de las células hijas.

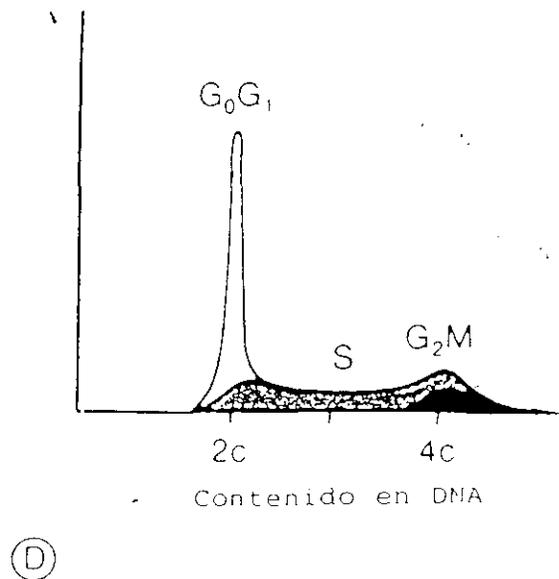
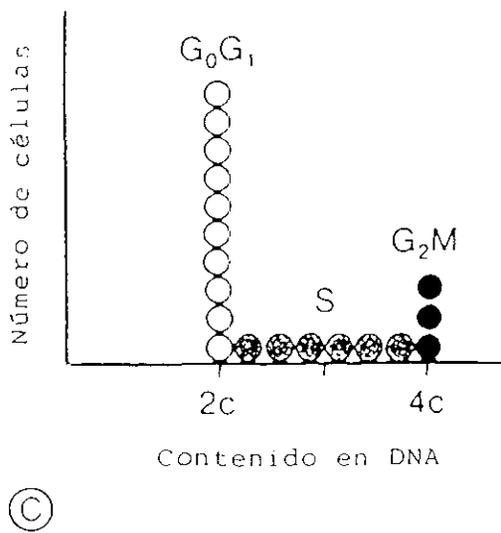
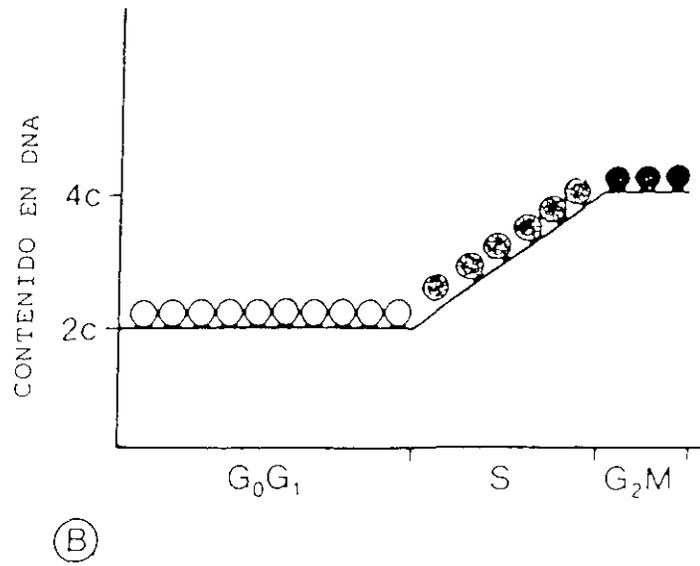
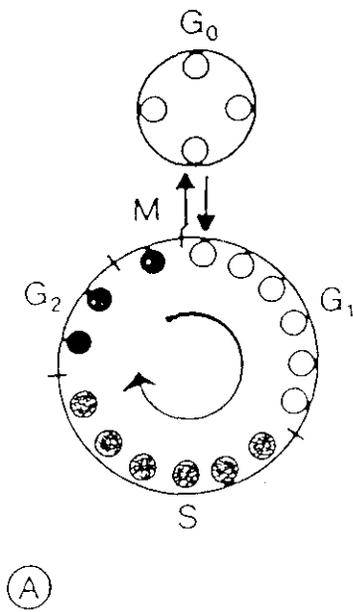
Para conseguir la multiplicación por división, las células de cualquier tejido abandonan el estado quiescente (G_0) para entrar y proceder a través del *ciclo celular*. Esto supone una serie de pasos consecutivos que culminan en la división mitótica. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G_1 o fase postmitótica, S o período de síntesis del DNA, G_2 o fase premitótica y M o mitosis (Sandberg, 1992). La única fase visible al microscopio, es la mitosis. G_1 es una fase de latencia, que precede a la replicación del DNA, donde las células tienen el mismo contenido en DNA que las G_0 , pero donde tienen lugar el transporte de proteínas, una serie de 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 (síntesis del DNA) se verifica la duplicación del DNA y la síntesis de la mayoría de proteínas e histonas. La fase G_2 con dos veces el contenido G_0/G_1 de DNA es, de nuevo, una fase de latencia que precede a la mitosis sin cambios en el

contenido de DNA. Aquí tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas como preparación para la mitosis, y se produce la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en división en la fase mitótica (M) y las células hijas vuelven a la fase G_0 (fase quiescente) o a la fase G_1 (Vielh *et al*, 1991). Durante la transición de G_1 a G_0 ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis proteica decrece y cesa la síntesis de RNA.

En general, la fase S, dura entre 7 y 8 horas, la G_2 , entre 2 y 4 horas y la M menos de 1 hora, mientras que la duración de la fase G_1 es la más variable. En un momento dado de muestreo de una población celular, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2N de la fase G_0/G_1 hasta dos veces este contenido (4N) de la fase G_2/M . Los hepatocitos y células de Kupffer, se encuentran en el estadio G_0 , es decir, normalmente no se dividen, si no es, por ejemplo, tras una hepatectomía parcial o por el tratamiento con sustancias químicas.

La fracción en crecimiento, o fracción de células, que participa en el ciclo celular, es un concepto importante en el análisis de la reparación tisular tras la lesión celular ya que la fracción en crecimiento se incrementa al inicio de la reparación y decrece cuando la reparación es completa. La mitosis también se puede considerar como un marcador del ritmo de proliferación mediante el cálculo del índice mitótico o proporción de células en mitosis en la población celular total, en un tiempo concreto.

La citometría de flujo está especialmente indicada para el estudio del ciclo celular, el cual puede ser explorado a lo largo de sus diferentes fases, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA que permite clasificar las poblaciones celulares en G_1 , S ó G_2 , o bien poblaciones en G_0 mediante otras tinciones ligadas a DNA y RNA como el naranja de acridina. La medida del DNA, célula por célula en el ciclo celular, es importante en los estudios tanto de células cancerígenas como de las células regenerantes ya que ambos casos presentan alteraciones en la ploidía del DNA (Díez-Fernandez, 1992; Gascó, 1993; Spyrtatos, 1993).



ESTUDIO DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO

(A) Fases del ciclo celular. (B) Relación entre el contenido de DNA y la progresión de las fases del ciclo celular. (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de la población ilustrada en B. (D) Distribución analítica del DNA en una población de células.

Para el análisis del DNA se emplean fluorocromos intercalantes o fluorocromos no intercalantes. Los fluorocromos intercalantes, tales como el yoduro de propidio o el bromuro de etidio, forman complejos con la doble hélice de DNA por intercalación entre los pares de bases. Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del DNA (Crissman *et al*, 1979), en el presente trabajo se ha utilizado la técnica de Vindelov *et al* (1983), que utiliza el yoduro de propidio y analiza la distribución del DNA en 10 ó 50 x 1000 células. Este fluorocromo presenta, sobre otros, las propiedades de ser muy estable y poder ser excitado por un laser de argón standard, producir histogramas con un coeficiente de variación bajo y emitir en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultáneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína. Para los complejos formados con el yoduro de propidio, las longitudes de onda de máxima excitación y emisión son 545 y 623 nm, respectivamente.

Pero la utilidad de la citometría de flujo sobre el estudio de la ploidía de las células no queda ahí sino que puede detectar con rapidez si se produce una aneuploidía en la población celular que está expuesta a un agente, supuestamente tóxico. En células en división, se puede producir una distribución desigual del DNA en las células hijas; ésto se puede detectar por un ensanchamiento, en el pico, obtenido para la fase G₁ del ciclo celular.

1.5.3.- Factores y mecanismos que controlan el crecimiento hepático

Los mecanismos que controlan el crecimiento del hígado han sido extensamente investigados mediante la regeneración hepática inducida tras una hepatectomía parcial. En este modelo se producen rápidamente dos fenómenos fundamentales: por un lado la activación de genes tempranos inmediatos debido al incremento de los niveles de factores de crecimiento circulantes, y por otro, la rápida adaptación metabólica que permite a los hepatocitos responder a los factores de crecimiento extra e intrahepáticos que activan numerosos genes.

1.5.3.1.- Reguladores de la proliferación celular. Niveles de óxido nítrico.

Entre estos agentes que desempeñan una misión destacada o son esenciales para la

entrada de las células en la fase de replicación del DNA cabe citar las hormonas, los factores de crecimiento, las citoquinas, así como otras sustancias como el piruvato, el calcio, los aminoácidos y las poliaminas (Andus *et al*, 1991). Las señales resultantes se producen por combinación de interacciones entre estas moléculas, nutrientes y metabolitos, pero el problema se complica cuando un mismo factor de crecimiento puede actuar positiva o negativamente, caso del factor transformante del crecimiento β (TGF β) y el factor de crecimiento hepático (HGF) (Sporn y Roberts, 1990).

I. HORMONAS

- Insulina y glucagón
- Norepinefrina, vasopresina, angiotensina II y neurotensina
- Hormona del crecimiento y factores de crecimiento para insulina 1 y 2 (IGF 1 y 2)
- Hormona paratiroidea, calcitonina y dihidroxicolecalciferol
- Glucocorticoides
- Hormona tiroidea
- Prolactina
- Prostaglandinas
- Estrógenos y andrógenos

II. FACTORES DE CRECIMIENTO

A. Estimulantes

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
- Factor transformante del crecimiento α (TGF α)
- Factor de crecimiento hepático (HGF)
- Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF)
- Sustancia estimuladora de hepatocitos (HSS)

B. Inhibidores

- Factor transformante del crecimiento β (TGF β)
- Activina
- Inhibidor de la proliferación hepática (HPI)
- Inhibidores del crecimiento derivados de plaquetas α y β (PDGI α y β)

III. CITOQUINAS

- Interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6)
 - Factor de necrosis tumoral (TNF α)
-

EFFECTORES QUE CONTROLAN LA REGENERACION HEPATICA (Bucher, 1995)

En general, todas las hormonas parecen ser moduladoras del crecimiento, pero las que más interés han despertado son la insulina, el glucagón y la norepinefrina ya que, tanto en hepatocitos *in vivo* como *in vitro*, han demostrado modular la actividad de otros efectores, por ello que hoy en día se consideran de gran importancia en la terapéutica a nivel de los trasplantes (Bucher y Strain, 1992).

El *factor de crecimiento epidérmico* (EGF) es uno de los responsables clave de la proliferación celular en hígado durante el desarrollo fetal y después de la hepatectomía parcial o lesión tóxica (Slack, 1989). La acción del EGF se encuentra modulada por una serie de hormonas que intervienen modificando las interacciones entre este factor y su receptor. El EGF actúa sinérgicamente con la insulina y el glucagón en el estímulo de la regeneración hepática y se ha comprobado que el número de receptores EGF hepáticos se regula de manera específica según el diferente ritmo en la secreción de la hormona pituitaria (Jamso *et al*, 1988). En cultivos primarios de hepatocitos de rata, se ha observado que los estrógenos antagonizan la unión del EGF a su receptor inhibiendo por ello el efecto mitogénico del EGF (Francavilla *et al*, 1987). Los glucocorticoides, por otro lado, actúan modulando la fosforilación de la tirosina del receptor EGF inducida por el propio factor EGF (Karasik y Kahn, 1988). No obstante, se sabe poco acerca del mecanismo mediante el cual el EGF estimula la proliferación celular. El receptor situado en la superficie celular necesario para la acción del factor contiene una porción amino que se une al EGF, un dominio transmembrana y un dominio quinasa. Estos dos dominios son homólogos al producto proteico del oncogen viral *erb B*. Se ha descrito que el EGF disminuye el número de sus receptores sobre la superficie celular durante el período prereplicativo alcanzando su mínimo a las 36-48 horas debido a que al unirse el HGF al receptor, éste se internaliza (Michalopoulos, 1990).

El *factor transformante del crecimiento α* ($TGF\alpha$) y el EGF se unen al mismo receptor y ambos promueven la síntesis del DNA en hepatocitos de rata. A pesar de que el $TGF\alpha$ se une al receptor EGF con una afinidad cuatro veces menor que el EGF, su actividad biológica es más efectiva. Durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial, la síntesis de $TGF\alpha$ aumenta en hepatocitos y alcanza su máximo en el momento de mayor síntesis del DNA (Evarts *et al*, 1992). La elevación del $TGF\alpha$ durante las primeras 24 horas que siguen a la hepatectomía parcial coincide con una disminución en el número de receptores de EGF debida a su mayor internalización y es paralela a un incremento en el mRNA de este receptor (Gruppusso *et al*, 1990). También, durante el desarrollo fetal del hígado en los últimos estadios de la gestación se registra un incremento en la expresión del receptor del EGF (Gruppusso, 1989). La elevación en el contenido del $TGF\alpha$ es necesaria

para que los hepatocitos progresen desde G₁ a S. La expresión de este factor alcanza su máximo después de la lesión tóxica con tetracloruro de carbono o galactosamina o tras hepatectomía parcial.

Otro factor específico del crecimiento de hepatocitos, desencadenante de la regeneración hepática en respuesta de la pérdida de hepatocitos es el *factor de crecimiento específico de los hepatocitos* (HGF) (Nakamura *et al*, 1989). Este factor aparece en suero de rata después de la hepatectomía parcial y en suero humano después de una hepatitis fulminante y se ha manifestado como el mitógeno con actividad más potente en cultivos primarios de hepatocitos, ejerciendo sus efectos biológicos a través de un único receptor de superficie (Michalopoulos, 1992). El HGF también denominado *hematopoyetina* fue identificado por primera vez en suero de ratas parcialmente hepatectomizadas, más tarde se purificó a partir de plaquetas, plasma humano e hígado de rata (Asami *et al*, 1991) y su secuencia de aminoácidos se ha deducido por clonaje de su DNA complementario (Miyazawa *et al*, 1989). El HGF se sintetiza y segrega en hígado normal por las células Kupffer y las endoteliales. Hasta hace poco, el HGF se consideró que poseía una estrecha especificidad actuando principalmente como mediador humoral de la regeneración hepática después de hepatectomía parcial o lesión hepática, sin embargo las investigaciones más recientes han demostrado que el HGF es un polipéptido funcional que actúa de forma paracrina sobre una amplia variedad de tipos celulares (Noji *et al*, 1990), ya que se expresa en diversos órganos, se libera por fibroblastos en cultivo (Rubin *et al*, 1991) y estimula la proliferación de un amplio espectro de células. Estudios de Montesano *et al* (1991) han revelado una propiedad adicional del HGF, la capacidad de transmitir información para determinar el reordenamiento espacial de las células epiteliales; es interesante destacar que entre un número de citoquinas bien caracterizado, sólo el HGF induce la tubulogénesis en fibroblastos lo que le atribuye una función morforegulatoria específica. Se ha demostrado la existencia de elevados niveles de HGF en suero de ratas después de la necrosis inducida por hepatotoxinas tales como el CCl₄ o la D-galactosamina (Andus *et al*, 1991).

El *factor de crecimiento de fibroblastos* (FGF) participa también en el desarrollo del hígado fetal (Presta *et al*, 1989) y en la regeneración hepática post hepatectomía y post

necrótica. A concentraciones 10^{-12} M, el FGF estimula la síntesis del DNA en hepatocitos, sin embargo, a concentraciones 10^{-9} M este factor inhibe el crecimiento inducido por el EGF. Después de la hepatectomía parcial la elevación en la expresión genética del FGF hepático es anterior a las del $TGF\alpha$ y $TGF\beta$. De esta manera, la proliferación de los hepatocitos se inicia inmediatamente después de la necrosis hepática y se eleva a medida que surgen primero el FGF (10^{-12} M) y después el $TGF\alpha$ y el EGF, pudiendo continuar mientras los niveles de $TGF\beta$ sean bajos (10^{-12} M). Más tarde, la elevación en las concentraciones del FGF y del $TGF\beta$ pone límite a la proliferación de los hepatocitos (Kan *et al*, 1989).

En la búsqueda de otros factores de crecimiento involucrados en el proceso de la regeneración hepática, se ha encontrado que el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor considerado miembro de la familia del FGF, estimula también la síntesis del DNA en hepatocitos de rata en cultivo primario. La capacidad mitogénica de este factor es superior a la del EGF y el $TGF\alpha$ y es sólo comparable a la del HGF (Itoh *et al*, 1993). El KGF se produce en grandes cantidades en el ileon y parece ser que una vez segregado por esta porción del intestino delgado, llega al hígado vía vena porta y actúa sobre la regeneración hepática como factor endocrino.

Otros factores como la *sustancia estimuladora de hepatocitos* (HSS), descubierto por primera vez en hígados de ratas lactantes o regenerantes en 1975, o *el factor de crecimiento derivado del bazo* (SDGF) (Suzuki *et al*, 1992) son mitógenos hepáticos de los que todavía no se sabe lo suficiente como para conocer su especificidad celular (Michalopoulos, 1990).

El *factor transformante del crecimiento β* ($TGF\beta$), al contrario que el $TGF\alpha$, es un regulador negativo muy potente de la proliferación de los hepatocitos, tanto en condiciones normales en las que la proliferación celular es muy baja, como en estados de regeneración post-necrótica, preneoplásicos y neoplásicos, antagonizando el crecimiento hepático inducido por el $TGF\alpha$. La familia de los $TGF\beta$ se compone de 3 isoformas siendo el más relacionado con los hepatocitos el $TGF\beta_1$; este factor se secreta biológicamente inactivo por lo que se requiere su activación proteolítica (Dennis y Rifkin, 1991). La administración *in vivo* de $TGF\beta_1$ a ratas hepatectomizadas inhibe la síntesis del DNA en hígado en regeneración

(DuBois *et al*, 1994). Durante el proceso regenerativo originado por hepatectomía parcial se eleva notablemente la expresión del TGF β 1 en hígado, pero el punto máximo de expresión del TGF β 1 es posterior al del TGF α (Bucher y Strain, 1992). Por técnicas de inmunoensayo se ha detectado que su expresión comienza en hepatocitos periportales justo antes de comenzar la síntesis del DNA y luego progresa hacia la región pericentral en el momento que estos hepatocitos se encuentran en su máxima fase de síntesis (Jirtle *et al*, 1991). No existen, sin embargo, muchas evidencias del resto de los factores inhibidores del crecimiento como son la activina, péptido de alta homología con el TGF β , el inhibidor de la proliferación hepática, o los inhibidores del crecimiento derivados de plaquetas α y β (Bucher y Strain, 1992).

Estudios recientes han implicado a las citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF α , producidas en células no parenquimales activadas, en el proceso regenerativo, y concretamente a nivel prereplicativo (Kuma *et al*, 1990). El pretratamiento con lipopolisacárido, un activador de la producción de citoquinas, 24 horas antes de la hepatectomía parcial, aumenta la síntesis de DNA (Cornell, 1990a); además, las concentraciones séricas de IL-6 se incrementan significativamente tras hepatectomía parcial, incremento que es inhibido por la administración de anticuerpos frente al TNF α , factor que induce la liberación de IL-6 (Akerman *et al*, 1992). Sin embargo, el papel de la IL-1 es más complejo, ya que la IL-1 α en combinación con IL-6 incrementan el índice mitótico, mientras que la IL-1 β inhibe la proliferación en hepatocitos en cultivo (Bucher, 1991). La administración de TNF α a ratas estimula la síntesis de DNA unas cuatro veces por encima del control, no obstante, estos valores no son tan elevados si se comparan con las 50 veces que se incrementa ésta tras una hepatectomía parcial. Existe cierta controversia sobre el tipo de células sobre las que produce sus efectos ya que, según Feingold *et al* (1991), sólo actúa sobre macrófagos hepáticos; hoy en día, mediante la administración de anticuerpos policlonales del TNF α 1 hora antes de la hepatectomía parcial, se ha visto que se inhibe la síntesis de DNA tanto en las células no parenquimales como en los hepatocitos del hígado regenerante (Akerman *et al*, 1992) y por ello que se considere un modulador positivo de la regeneración hepática.

En conclusión, EGF, TGF α , FGF y HGF funcionan como inductores fisiológicos de la síntesis del DNA en hepatocitos durante la regeneración hepática a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. El estímulo del crecimiento hepático por el EGF y el TGF α se modula por el TGF β , el cual se induce un poco después que el TGF α , previniendo así una proliferación celular incontrolada. El destacado papel que juegan estos factores en la regeneración hepática se ha visto reforzado por un interesante descubrimiento: la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial se encuentra muy retrasada en ratones atímicos mantenidos en esterilidad y, por tanto, sin contacto con componentes bacterianos, tales como el lipopolisacárido (LPS). Estos ratones fueron asimismo resistentes al LPS, por una deficiencia en tejido linfoide (Cornell *et al*, 1990b). El retraso en la iniciación de su regeneración hepática puede ser debido a la incapacidad de estos animales para liberar factores de crecimiento en respuestas a toxinas alimentarias o ambientales.

El **óxido nítrico** es un importante mensajero inter e intracelular que desempeña funciones tan diversas como la vasodilatación, la comunicación neuronal y los mecanismos de defensa (Moncada *et al*, 1991). El NO es sintetizado a partir de la L-arginina, en presencia de coenzimas tales como FAD, FMN, NADPH y BH $_4$, por la óxido nítrico sintasa, un enzima de la que al menos se han descrito tres isoformas (Albina *et al*, 1993; Lowenstein y Snyder, 1992). Las células endoteliales y nerviosas contienen dos diferentes que se expresan constitutivamente y que requieren Ca $^{2+}$ y calmodulina para ser activas, mientras que la isoenzima expresada en macrófagos no necesita estos cofactores pero es inducida por citoquinas y factores de crecimiento tales como el IFN- γ o el TNF- α (Hauschild *et al*, 1990; Yui *et al*, 1991). La inducción enzimática puede ser retro-regulada por TGF- β y PDGF en células de músculo liso vascular y en macrófagos, donde tres miembros de la familia de los TGF- β , el β_1 , β_2 y β_3 bloquean la habilidad del IFN- γ para inducir la liberación de NO (Ding *et al*, 1990). Se ha comprobado también que la IL-4 puede inducir la NOS mientras que la IL-10 la inhibe (Cunha *et al*, 1992).

1.5.3.2.- Genes tempranos inmediatos

Tras la hepatectomía parcial tienen lugar sucesos muy rápidos que preparan a los

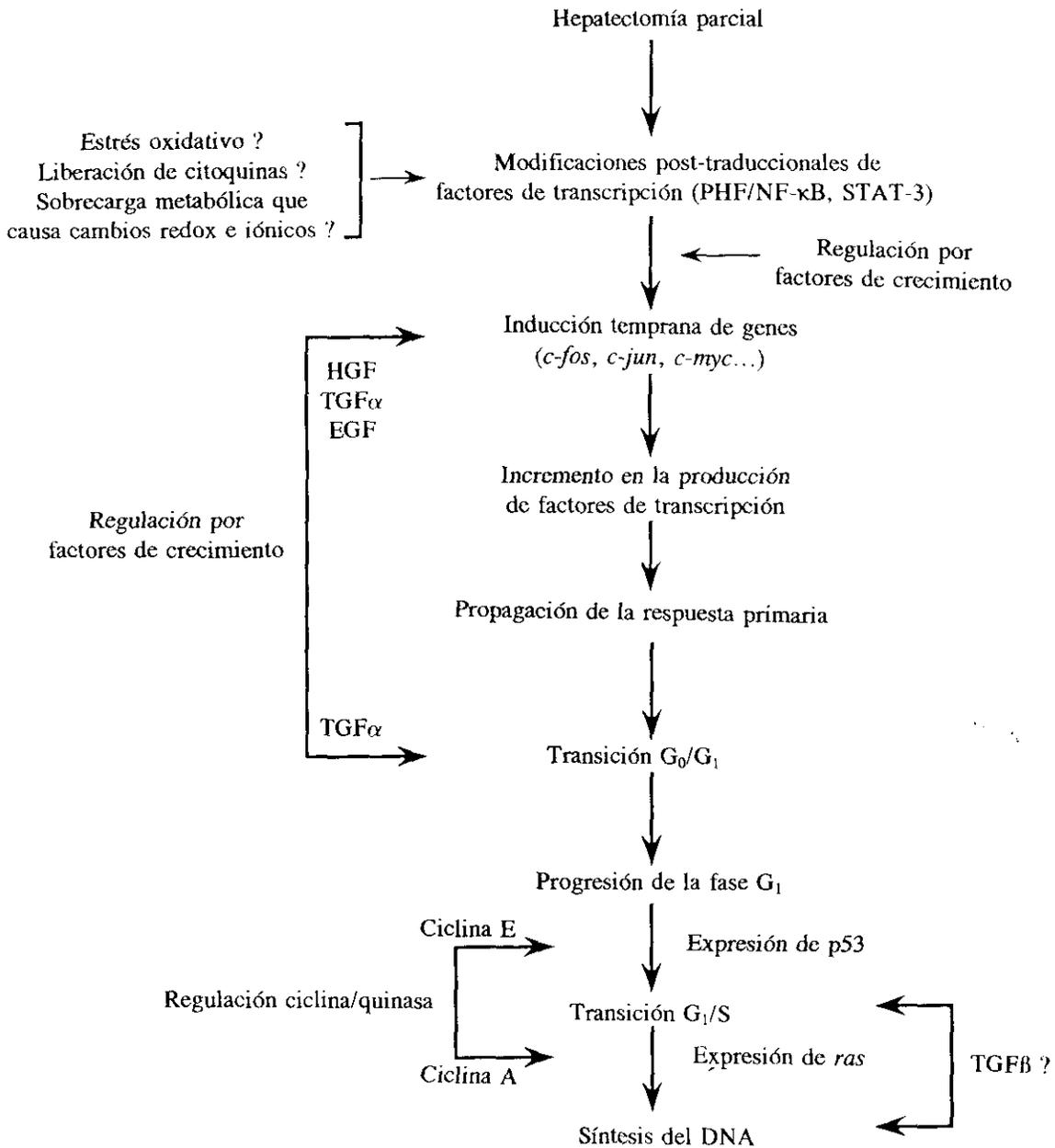
hepatocitos para ser competentes y responder a los factores de crecimiento, permitiendo así su progresión hacia el ciclo de división celular (Fausto y Webber, 1993,1994; Fausto N, 1991; Mead *et al*, 1990). La activación de los factores de transcripción puede ser uno de los principales componentes de esta fase inicial.

Los genes que se inducen en la transición del estado normal quiescente del hígado (G_0) a la fase de crecimiento (G_1) se denominan genes tempranos inmediatos. Entre ellos se incluyen NF- κ B, AP-1 (Westwick *et al*, 1995) y STAT-3 (Cressman *et al*, 1995), y muchos de los protooncogenes implicados en el crecimiento canceroso, tales como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* (LaBrecque, 1994). Puesto que muchos de los productos de los genes de respuesta temprana inmediata, son por sí mismos factores de transcripción, la respuesta génica inicial producida tras la hepatectomía parcial se amplifica.

También son importantes los genes tempranos diferidos que se expresan tras la transición G_0/G_1 y que son responsables de la progresión de las fases del ciclo celular hasta inducir la síntesis del DNA, este es el caso de *p53* y *ras* además de varias ciclinas y quinasas asociadas que codifican para proteínas con funciones metabólicas esenciales (Fausto y Mead, 1989; Lanahan *et al*, 1992).

Sin embargo, todavía existen ciertas dudas respecto a las causas que inducen las modificaciones post-traduccionales de los genes inmediatos que codifican para los factores de transcripción. Los estudios más avanzados han identificado diversas citoquinas y factores de crecimiento, la IL-1 y el TNF α en el caso del PHF/NF κ B y la IL-6 y el EGF para el STAT-3, como los responsables de la cascada de señales responsables de su activación nuclear (Searce *et al*, 1996; Taub, 1996).

Todos estos estudios se han realizado en el modelo de regeneración post-hepatectomía parcial, sin embargo, poco se sabe de la secuencia de eventos que conlleva la regeneración hepática post-necrótica inducida por xenobióticos.



REGENERACION HEPATICA TRAS LA HEPATECTOMIA PARCIAL
(Fausto y Webber, 1994)

1.6.- Hepatotoxicidad de la tioacetamida

La tioacetamida, al igual que muchos otros agentes hepatotóxicos, se metaboliza rápidamente en microsomas de hígado de rata dando lugar a la tioacetamida S-óxido, que se considera el compuesto electrofílico capaz de formar aductos N- ϵ -acetil lisina con las proteínas y ejercer así sus efectos necrogénicos (Dyroff y Neal, 1983), cirrogénicos (Sanz *et al*, 1995; Sanz *et al*, 1996a) y carcinogénicos (Becker, 1983). El sistema monooxigenasa microsómico, dependiente de flavina, el N,N-dimetil anilina N-oxidante (EC 1.14.13.8), es el sistema enzimático responsable del metabolismo de la tioacetamida S-óxido (Chieli y Mavaldi, 1984). Se han utilizado modelos experimentales de disfunciones hepáticas, inducidas por diferentes dosis de tioacetamida a ratas, para estudiar en órgano entero parámetros bioquímicos relacionados con la biotransformación de esta sustancia hepatotóxica y la funcionalidad hepática (Cascales y Martín-Sanz, 1990a; Osada *et al*, 1993; Mangipudi *et al*, 1995).

1.6.1.- Alteraciones morfológicas y variaciones en el ciclo celular

La administración intraperitoneal a ratas de 2 meses de edad de una dosis subletal de tioacetamida de 6,6 mmoles/Kg produce necrosis hepatocelular masiva que presenta su máximo a las 24 horas de la administración del hepatotóxico y el subsiguiente proceso regenerativo. Morfológicamente, a las 24 horas, aparecen hemorragias e infiltrados inflamatorios con leucocitos polimorfonucleares; esta lesión hepatocelular masiva, de aproximadamente el 50% del tejido, se caracteriza por cariólisis, picnosis y cariorexis. A las 48 horas de la intoxicación se observa cómo se mantiene la necrosis central aunque ya en fase de resolución, el infiltrado inflamatorio es de tipo mixto, leucocitos polimorfonucleares típicos de inflamación aguda y linfocitos y monocitos característicos de inflamación crónica; también se manifiesta una dilatación de los sinusoides perivasculares y reacciones fibrosas asociadas a las venas centrales. A las 72 horas son pocas las zonas que se encuentran todavía afectadas por la acción del hepatotóxico, aunque persisten las células del infiltrado crónico, fibroblastos y algunos hepatocitos necrosados a nivel periférico; los hepatocitos mediozonales presentan un cierto grado de tumefacción y abundantes mitosis.

El porcentaje de células hepáticas en fase S (síntesis), se eleva a partir de las 24 horas de la administración del hepatotóxico y alcanza su punto máximo entre las 36 y 48 horas con cotas tan elevadas como 21 y 19 veces, respectivamente, los valores control. Del mismo modo, a las 24 horas se produce la casi desaparición de la fracción tetraploide. Considerando que el punto mínimo de fracción G2 + M precede en horas al de máxima síntesis del DNA se deduce que una parte de la fracción tetraploide desaparece debido, por un lado, a un mayor índice mitótico y por otro, a que la necrosis afecte mayoritariamente a las células que se encuentren en G2 + M. La población en fase G1 también se modifica durante el proceso de necrosis y regeneración, llegando a su máximo (94%) a las 24 horas de la intoxicación, punto en el que el perfil de la distribución de las distintas poblaciones cambia hacia el típico fetal. Es curioso observar como este abrupto cambio de adulto a fetal se verifica en un período de seis horas, desde las 18 a las 24 horas de la intoxicación; por tanto, cabe insistir en el hecho de que la necrosis afecta mayoritariamente a las poblaciones tetraploides y que es realmente la pérdida celular la que desencadena la síntesis del DNA. A las 72 horas aún no se ha llegado a establecer el perfil adulto en las poblaciones de hepatocitos (Díez-Fernández *et al*, 1993).

La autofluorescencia emitida por la mayor parte de las células de mamíferos, paralela al estado redox de la célula y por consiguiente a su estado metabólico, parece que se debe a la presencia de nucleótidos de flavina y piridina que producen emisión de fluorescencia cuando se excitan con luz azul-verde y ultravioleta, respectivamente (Shapiro, 1989). Para que se verifique una respuesta proliferativa en el hígado de ratas por efecto del tratamiento con tioacetamida, las poblaciones remanentes de hepatocitos maduros altamente diferenciados, con una fluorescencia elevada índice de menor energía, tienen que pasar por un proceso de desdiferenciación en el que adquieren propiedades características de los hepatocitos fetales, fluorescencia más baja que se corresponde con un nivel energético más elevado. De estos análisis se deduce que los hepatocitos aislados de hígado en regeneración post-necrótica, muestran características muy diversas en tamaño, complejidad y fluorescencia ya que una serie de poblaciones presenta propiedades de hepatocitos adultos, otra de hepatocitos fetales y otra de hepatocitos con características intermedias (Cascales *et al*, 1992a).

1.6.2.- Alteraciones funcionales y bioquímicas

La necrosis hepática masiva, que a nivel histopatológico presenta su máximo a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina, coincide con el punto de máxima actividad de los enzimas marcadores de la necrosis. Los enzimas ensayados en plasma, las aspartato y alanina aminotransferasas y la isocitrato deshidrogenasa NADP^+ , alcanzan valores a las 24 horas de la intoxicación de 14, 7, y 27 veces, respectivamente. Los cambios observados en las actividades aminotransferasas son relativamente débiles hasta las 12 horas, momento en el que se registra una brusca elevación hacia el punto de máxima actividad alcanzado a las 24 horas. Las actividades plasmáticas de estos tres enzimas marcadores de necrosis descienden en las muestras obtenidas a las 48 y a las 72 horas hasta valores cercanos a la normalidad.

La mayor parte de las sustancias que son tóxicas mediante su biotransformación en intermediarios reactivos, afectan la concentración celular del glutatión. Los enzimas marcadores de la lesión hepática, la gamma-glutamil transferasa plasmática y la glutatión S-transferasa, alcanzan los valores más elevados en los momentos coincidentes con el punto de máxima necrosis hepatocelular, hecho que puede dar lugar a la depleción transitoria del glutatión observada. A partir de este momento la concentración de glutatión intrahepática aumenta a las 48 y 72 horas. La concentración de malondialdehído, marcador del grado de lesión hepática referida a la peroxidación lipídica y a la degradación de las membranas plasmáticas, muestra un incremento sostenido en el período que fluctúa entre las 24 y 48 horas, para más tarde descender. Glutatión y malondialdehído muestran perfiles inversos, pero el descenso del glutatión es anterior al incremento del malondialdehído, lo que está de acuerdo con el hecho de que una disminución de glutatión moderada no tiene que ir acompañada de una elevación del malondialdehído y que la elevación en la concentración de este último ocurre sólo en la fase terminal de la necrosis (Díez-Fernández *et al*, 1993).

Respecto al metabolismo energético, a las 6 horas de la administración de tioacetamida el glucógeno desciende bruscamente, antes de la síntesis del DNA, mostrando a las 48 horas niveles inferiores al 10% del control. La glucosa plasmática, sin

embargo, no experimenta variaciones (Cascales *et al*, 1992a). En el hepatocito de mamíferos, la degradación del glucógeno se controla hormonalmente a través de la formación del inositol trifosfato que promueve la liberación del calcio de los reservorios en el interior de la célula (Berridge e Irvine, 1984), incrementando el calcio citoplasmático desde 0,1-0,2 μM hasta 0,5-1,0 μM . El calcio activa la glucógeno fosforilasa quinasa y estimula la degradación del glucógeno, mientras que la proteína quinasa C inhibe la glucógeno sintetasa (Bourne y De Franco, 1989). También el incremento en los niveles de cAMP encontrados por Rosa *et al* (1990) en hígado en regeneración junto con la actividad de la proteína quinasa dependiente del cAMP, pueden contribuir a la degradación del glucógeno. La glucoquinasa (glucosa 100 mM) desciende a las 6 horas, mientras que las hexoquinasa (glucosa 0,5 mM y fructosa 33 mM) se incrementan paulatinamente hasta alcanzar a las 36 y 48 horas actividades significativamente elevadas. Los niveles intracelulares del calcio basal en poblaciones de hepatocitos obtenidos después de la administración de tioacetamida muestran un incremento paulatino que alcanza su valor más elevado a las 24 horas, siendo en este mismo momento mínimo el calcio localizado en retículo con valores del 10%; ésto se debe entre otras causas a la inhibición de la ATPasa microsomal que a las 24 horas sólo alcanza valores del 35%. Estos niveles de calcio producen una estimulación de la glucógeno fosforilasa con un máximo del 291% a las 24 horas. (Díez-Fernández *et al*, 1996a).

Los enzimas generadores de NADPH enzima málico y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sufren un drástico descenso en sus actividades enzimáticas a las 12-24 horas del tratamiento para aumentar posteriormente durante el proceso de regeneración; no obstante, si bien el primero tiende a la normalidad, la G6PDH alcanza valores del 230% a las 48 horas. Estos resultados vienen apoyados por las expresiones respectivas de sus mRNAs ya que el transcrito del enzima málico solo alcanza a las 96 horas del tratamiento la mitad del valor control mientras que la G6PDH alcanza valores del 247% a las 48 horas. El descenso en el punto de máxima necrosis se debe a la localización perivenosa de ambos enzimas que disminuyen al ser éstas las células afectadas por el proceso necrótico. El hecho de que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa supere los valores controles al final del proceso estudiado, es debido a que participa activamente en la síntesis del DNA por ser el proveedor de la ribosa-5-fosfato necesaria para la misma (Díez-Fernández *et al*, 1996b).

Los lisosomas y su composición lipídica también juegan un papel fundamental en la progresión del proceso necrótico inducido por tioacetamida, ya que en el punto de máxima necrosis se produce un incremento en el contenido tanto de sus proteínas como de sus fosfolípidos debido al aumento en el número de lisosomas, y un descenso en su contenido de colesterol. Sin embargo, está comprobado que la S-adenosil-metionina actúa como agente protector en el proceso necrótico debido a su capacidad de prevenir la proliferación lisosomal además de recuperar los niveles normales de colesterol (Osada *et al*, 1993).

Todos estos cambios producidos por la tioacetamida pueden resumirse en:

MEMBRANA CELULAR

- pérdida de la permeabilidad de la membrana

CITOSOL

- descenso del enzima málico y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- aumento del calcio citosólico → estimulación de la glucógeno fosforilasa

MITOCONDRIA

- inhibición de la fosforilación oxidativa → descenso del ATP → lesión mitocondrial

RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO

- inhibición de la ATPasa microsomal → disminución de la concentración de calcio del retículo
- desacoplamiento de ribosomas → alteración de la síntesis de RNA → división mitótica a las 36-48 horas

LISOSOMAS

- incremento del volumen lisosomal → incremento de proteínas y fosfolípidos
- disminución de la concentración de colesterol

NUCLEO

- aumento del nucleolo e incremento del volumen nuclear
-
-

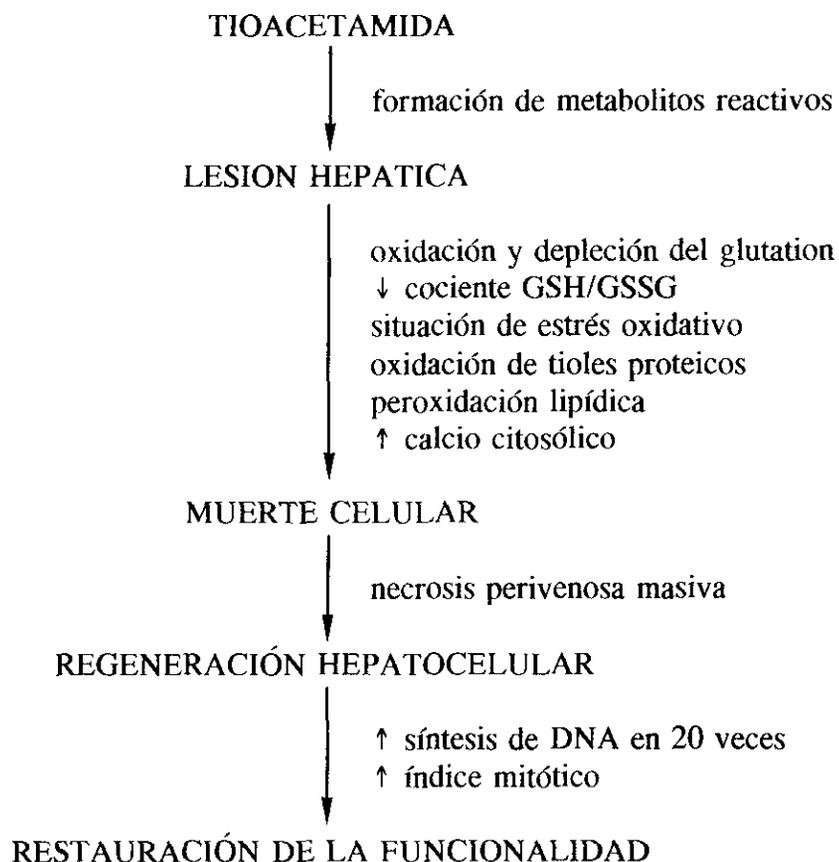
ALTERACIONES HEPATICAS INDUCIDAS POR LA TIOACETAMIDA

La administración de una dosis baja de tioacetamida previamente a una dosis subletal del mismo u otro agente hepatotóxico consigue un modelo de autoprotección muy utilizado para estudiar las causas de la aparición de poblaciones resistentes. Este fenómeno no se debe, como se creía en un principio a una disminución en los niveles de la monooxigenasa responsable de su biotransformación, sino a una inicial estimulación de la división celular y reparación del tejido hepático. Este fenómeno de autoprotección desaparece totalmente cuando 6 horas antes de la administración de la dosis subletal se inyecta colchicina, conocido agente antimitótico (Mangipudy *et al*, 1995; Chanda *et al*, 1995).

La totalidad de estos estudios, sin embargo, se ha realizado hasta ahora en órgano completo, por lo que el analizar estos parámetros a nivel del propio hepatocito, puede suponer un increíble avance en el conocimiento de la lesión y respuesta directa de las células parenquimales hepáticas frente a la agresión tóxica.

1.7.- Objetivos del trabajo

La senescencia se caracteriza por una modificación de la capacidad funcional de las células hepáticas que puede conllevar la mayor incidencia de reacciones adversas producidas por efecto de los fármacos. Trabajos previos han detectado cambios en los sistemas antioxidantes en ratas desde los 2 a los 8 meses de edad (Sanz *et al*, 1996b), pero este período supone en la rata la etapa de desarrollo, por lo que para el estudio del envejecimiento ha habido que ampliar el período de experimentación desde los 2 meses hasta los 2 años y medio. Para profundizar en el problema, los animales de las diferentes edades se han sometido a una dosis subletal de un agente hepatotóxico, ya que a las especies reactivas de oxígeno que se forman espontáneamente en la respiración mitocondrial y que se acumulan en edades avanzadas, se unen los metabolitos tóxicos generados por el xenobiótico. En nuestro caso, el hepatotóxico utilizado ha sido la tioacetamida debido al conocimiento del que disponemos de la secuencia de acontecimientos que tiene lugar en el hígado por efecto de la misma:



Por ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Diagnosticar las modificaciones debidas a la edad en la intensidad, el momento y la evolución de la lesión hepática inducida por el hepatotóxico tioacetamida.
- 2.- Determinar las variaciones con la edad en el estado de los sistemas de defensa antioxidante hepáticos y la situación de estrés oxidativo generadas como consecuencia de la acción del hepatotóxico.
- 3.- Estudiar la influencia de la edad sobre el proceso de regeneración hepática post-necrótica.

2. MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- Aparatos

- Agitadores magnéticos, Selecta.
- Autoclave Autester-G.
- Balanza de precisión modelo 1203 MP.
- Baño termostatzado Heto-Denmark.
- Baño termostatzado con agitación Unitronic 320 OR.
- Baño termostatzado hasta 100 °C Precisterm S-140.
- Bomba de perfusión Miniplus-2 de Gilson.
- Bomba de filtración en vacío Milipore.
- Cámara de contaje de células Neubauer.
- Campanas de flujo laminar Telstar modelo PV-100.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Minifuge T.
- Centrífuga refrigerada Kontron, modelo Centrikon H-401.
- Citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un laser de argón de 15 mW y un ordenador Macintosh Quadra 650 AV.
- Contador líquido de centelleo LKB Wallac. 1209 Rackbeta.
- Cronómetros Smiths.
- Cubetas de electroforesis y fuentes de alimentación (Power 300 y 3000) de la marca Bio-Rad (Richmond C.A. Estados Unidos).
- Densitómetro laser Molecular Dynamics (Kemsing, Reino Unido).
- Espectrofotómetro UV-V Hitachi, modelo U-2000.
- Granatario Sartorius 1207 MP-2.
- Homogeneizador para pistilo de teflón modelo K43 de Tris-R Instruments (Rockville, N. Y., Estados Unidos).
- Incubador de células Heraeus con un 5 %de CO₂ y saturación de humedad.
- Jaulas de plástico de la casa comercial Panlab.

- Lector de placas SLT LabInstruments 340 ATC. Austria, con impresora Citizem 120D.
- 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, Heraeus Biofuge 13.
- Microscopio óptico Wild-Herbrugg.
- Microtomo de deslizamiento de la casa comercial Reichert.
- pHmetro Radiometer Copenhagen, modelo 52.
- Revelador Curix 60 de Agfa.
- Sonicador Microson Vibra Cell™ (modelo 100 W), Heat systems-ultrasonic Inc.
- Transiluminador de UV: Ultraviolets Products Co. Chromatowe C-16.
- Ultracentrífuga Kontron, modelo Centrikon T 2080.
- Vacumm-Blot modelo Vacu Gene™XL con bomba de vacío modelo 5KH 33EN25T.

2.2.- Productos

- El pienso comercial fue suministrado por Sander, S.A.
- Los ácidos, bases y las sales minerales utilizados fueron de las casas comerciales Merck y Panreac, en su grado analítico.
- Los sustratos, coenzimas y enzimas fueron suministrados por las casas comerciales Sigma y Boëhringer Mannheim.
- Heparina sódica de la casa Leo.
- Solución fisiológica de Ibys.
- Colagenasa de Boehringer.
- Medios DMEM con rojo fenol y RPMI con y sin rojo fenol de Bio-Whittaker (Walkesville, Estados Unidos).
- Suero fetal de ternero, Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel).
- Sephadex G-50 por Pharmacia.
- Resina AG 50W-X8 de BioRad.
- La agarosa y los medios para el crecimiento de bacterias fueron de Hispanagar (Barcelona, España).

- Membranas de nylon NYTRAN NY 13N 0,45 μm para RNAs de Schleicher y Schuell (Darmstadt, Alemania).
- Películas de autorradiografía Hyperfilm MP y el [α - ^{32}P]dCTP de Amersham (Reino Unido).
- La [^3H]-timidina y el líquido de centelleo BetaMaxTM de ICN.
- Kit de determinación de ciclo celular de Bio-Rad.
- Multiprimer DNA labelling y Tumor necrosis factor alpha [(m)TNF α] mouse ELISA system de Amersham.
- Material de plástico para cultivos celulares de Becton Dickinson (Plymouth, UK).

2.3.- Animales

Se utilizaron ratas macho de 2 meses (200-250 g), seis meses (350-400 g), un año (450-500 g), año y medio (500-550 g) y dos años y medio (550-650 g) de la raza Wistar con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua, que se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura.

2.4. Tratamiento con tioacetamida

Grupos de ratas se inyectaron por vía intraperitoneal con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg de peso corporal), preparada extemporáneamente disuelta en ClNa 0,15 M. Paralelamente se llevaron los controles consistentes en ratas que recibieron, por vía intraperitoneal, dosis de 0,5 ml de ClNa 0,15 M. Los tratamientos se realizaron a primera hora de la mañana y cada experimento se repitió cuatro veces. Las ratas se sacrificaron a determinados tiempos después de la administración del hepatotóxico (0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), por distintos procedimientos según el parámetro a evaluar. En unos casos se obtuvo la sangre y posteriormente se extrajo un lóbulo del hígado para su estudio histológico y en otros, las ratas se utilizaron para la obtención de hepatocitos por perfusión con colagenasa. El anestésico utilizado en ambos casos fue pentobarbital sódico (nembutal) (50mg/Kg).

2.5.- Obtención de suero

Los sueros se obtuvieron, tanto de ratas control como de ratas inyectadas intraperitonealmente con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/kg). Las ratas se anestesiaron con nembutal (50 mg/Kg), y tras proceder a la apertura de la región abdominal se obtuvo la sangre por punción cardiaca. La sangre se mantuvo a 4 °C durante 24 horas y posteriormente, se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, obteniendo así el suero como sobrenadante.

2.6.- Obtención y fijación de muestras para la preparación de cortes de tejido

Tras la extracción de sangre se obtuvieron muestras de hígado que se utilizaron para su observación morfológica. Las muestras de hígado se fijaron en formol al 10%, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras, se eliminó la parafina, se hidrataron y se tiñeron con una mezcla de hematoxilina-eosina. Posteriormente se procedió a su deshidratación y montaje. Con estas preparaciones se llevó a cabo la observación morfológica y la determinación del índice mitótico (García del Moral *et al*, 1993).

2.6.1.- Cálculo del índice mitótico

El índice mitótico (IM) se define como la relación existente entre el número de mitosis y el número de células (Simpson *et al*, 1992). La estimación del número de células se hizo, utilizando el objetivo de 40x, por conteo del número de núcleos celulares que son interceptados por una línea (n) que coincide con el diámetro del círculo. Se estudiaron diez campos y la fórmula empleada para estimar el número de células por campo es la del área del círculo: $A = \pi r^2$, donde r (radio) = $n/2$.

2.7.- Aislamiento y cultivo celular: hepatocitos, macrófagos y fibroblastos NIH 3T3

El aislamiento de los diferentes grupos celulares en las ratas tratadas con tioacetamida

(500 mg/Kg de peso del animal) y en los controles correspondientes, se llevó a cabo por el método clásico de perfusión hepática con colagenasa (Hue *et al*, 1978) en el caso de los hepatocitos y mediante administración intraperitoneal de PBS cuando se aislaron los macrófagos. Los fibroblastos corresponden a la línea celular NIH 3T3.

2.7.1.- Obtención de hepatocitos

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión *in situ* del hígado con medio Hepes (Hepes 20 mM, KCl 5 mM, SO₄Mg 1 mM, PO₄H₂K 5 mM, ClNa 150 mM y glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método clásico de Krebs *et al* (1974) y modificado por Hue *et al* (1978) que permite obtener hepatocitos con un elevado grado de viabilidad.

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico disuelto en solución salina (ClNa al 0,15 M), por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/Kg. La heparinización se realizó por vía femoral (2,5 ml/Kg de heparina Leo al 1%), para evitar la coagulación sanguínea y facilitar el lavado del hígado de su contenido hemático. Posteriormente se procedió a la apertura de la región abdominal y se introdujo en la vena porta una cánula de plástico (Braunula 1-G16, Braun Melsungen AG, RFA), 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 con un flujo constante a 40 ml/min. Para facilitar el drenaje se produjo una abertura en la vena cava inferior por debajo de la desembocadura de las venas renales. Inmediatamente se abrió la cavidad torácica y se seccionaron los dos nervios frénicos, con objeto de evitar posibles espasmos en el diafragma que pudieran obstruir el flujo de salida a nivel de la vena suprahepática. A continuación se abrió un orificio en la orejuela derecha 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 50 mg de colagenasa (0,38 U/mg Boehringer) y Cl₂Ca 5 mM. Tras 5-10 minutos de perfusión con el medio adicionado de 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 g, 2 minutos). El sedimento de células se resuspendió en PBS 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). Las células muertas o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que mantienen su membrana íntegra aparecen sin teñir. El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima con valores superiores al 90%. Unos hepatocitos se procesaron para DNA y otros se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

2.7.2.- Preparación y cultivo de macrófagos

La obtención se realizó siguiendo el método descrito por Hortelano *et al* (1995), según el cual, ratas macho Wistar controles de dos meses fueron sacrificadas por dislocación cervical. Tras retirar la piel de la cavidad abdominal, se inyectaron intraperitonealmente unos 50 ml de PBS frío, procediendo a aplicar un masaje en la zona. Transcurridos 10 minutos, se recuperó el líquido ascítico que fue centrifugado en frío durante diez minutos a 200 g. El sedimento obtenido (constituido por macrófagos y linfocitos), se resuspendió en RPMI 1640 y suero fetal bovino (FCS) inactivado al 10%, sembrando las células en una placa estéril ($10^6/\text{cm}^2$) y manteniéndolas durante una hora en incubación a 37 °C; de este modo, los macrófagos quedan adheridos al fondo de la placa. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, lavándose la placa tres veces con PBS frío para eliminar las células no adheridas y los linfocitos en suspensión. Los experimentos se llevaron a cabo en medio RPMI sin rojo fenol. Para la determinación de nitritos, se adicionaron sueros al 10% de animales tratados y controles, incubándose las células durante 24 horas. Como positivo se utilizó PDBu (25 ng/ml). Para determinar la concentración de proteínas, las células se extrajeron con 200 μl de NaOH 50 mM.

2.7.3.- Condiciones de cultivo de fibroblastos NIH 3T3, adición de sueros y determinación de la incorporación de timidina tritiada

Los fibroblastos de la línea celular NIH 3T3 se resuspendieron en medio DMEM con FCS al 10% y se dispusieron 600.000 células por placa de cultivo (1,5 cm de diámetro) manteniéndose a 37 °C en un incubador en atmósfera de aire con CO₂ al 5%. Después de varios días, se aspiró el medio y tras lavar con PBS, se adicionó tripsina y se dejó actuar durante 3 ó 4 minutos. Cuando la monocapa presentó un aspecto granular, señal de que las células se han despegado, se adicionó DMEM y FCS al 10% y se recogió el medio en un tubo estéril que se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en DMEM con 10% de FCS y se sembró en placas de 96 pocillos a razón de 50.000 células por pocillo.

Después de 2 ó 3 días, se aspiró el medio y se añadió medio fresco adicionado de FCS al 0,2%. Después de 2 horas de incubación se añadieron los sueros estériles procedentes de ratas tratadas con tioacetamida y ratas control al 10% y se incubaron durante 24 horas. Pasado este tiempo se determinó la síntesis de DNA siguiendo el método de Huang *et al* (1989), que conlleva la eliminación del medio y adición de medio fresco con FCS inactivado al 0,2% y 0,2 μ Ci de [³H]-timidina por pocillo. Al cabo de 24 horas se aspiró el medio y se lavaron todas las placas con PBS procediendo a la adición de los reactivos necesarios para recoger las células, para ello se añadió NaOH 10 mM y SDS 0,1%, lavándose la capa celular dos veces con agua. Todo ello se transfirió a tubos donde se añadieron 1-2 ml de ácido tricloroacético al 10%. Después de 15 minutos a 4 °C se filtraron, se secaron los filtros y se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas para evitar fenómenos de quimioluminiscencia. Pasado este tiempo se midió la radiactividad en un contador de centelleo.

2.8.- Preparación de fracciones subcelulares

Muestras de 4 x 10⁶ hepatocitos se homogeneizaron en frío, en vaso provisto de pistilo de teflón, con 3 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 1:4. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Después de separar el sobrenadante, éste se volvió a centrifugar a 105.000 g durante 45 minutos a 4 °C correspondiendo el precipitado a la fracción microsomal y el sobrenadante a la fracción citosólica (Díez-Fernández, 1992).

2.9.- Determinación de actividades enzimáticas

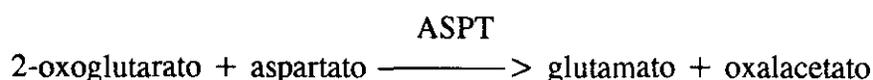
Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en suero y en las diferentes fracciones subcelulares del extracto hepático, en condiciones óptimas de pH y temperatura, a saturación de sustrato y cofactores. En todos los casos se siguió una cinética de orden 0, al menos durante 2 min. Las actividades enzimáticas 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 ml de solución).

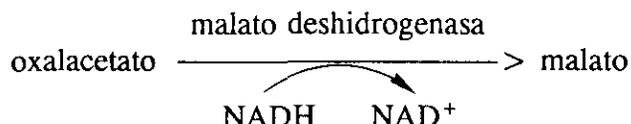
2.9.1.- En suero

Se midieron en suero las actividades enzimáticas de la aspartato aminotransferasa (ASPT) y la γ -glutamil transferasa (GGT), enzimas que podemos considerar determinantes del grado de necrosis y funcionalidad hepática, respectivamente.

2.9.1.1.- Aspartato aminotransferasa (ASPT)

La actividad de este enzima se determinó espectrofotométricamente en suero, 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 la siguiente reacción:

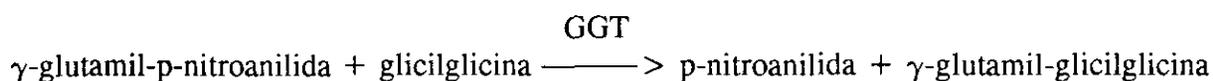




La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: tampón fosfato 0,8 mM a pH 7,6; NADH 0,2 mM; 2-oxoglutarato 15mM a pH 7; aspartato 0,8 mM y 20 μ g de malato deshidrogenasa.

2.9.1.2.- γ -glutamil transferasa (GGT)

Tanto en suero de ratas control como de ratas tratadas con tioacetamida se midió la variación de absorbancia a 405 nm utilizando: Tris 125mM pH 8,5, glicilglicina 75 mM y γ -glutamil-p-nitroanilida 5 mM, según el método de Wahlefeld y Bergmeyer (1987). La γ -glutamil transferasa cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamilo de la γ -glutamil-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 γ -glutamil transferasa en la muestra ensayada.



2.9.2.- En hepatocitos aislados

En los hepatocitos aislados según el apartado de métodos 2.7.1, se han medido actividades enzimáticas determinantes de lesión hepática y otros enzimas implicados en la funcionalidad.

2.9.2.1.- FAD monooxigenasa

La FAD monooxigenasa o amino oxidasa de función mixta se determinó por el método de Sum y Kasper (1982), midiendo espectrofotométricamente a 420 nm el derivado

p-nitroso de la N,N-dietilanilina (DMA). Para ello, la fracción microsomal (3-4 mg de proteína) se incubó en presencia de glicina 0,1 M, buffer pirofosfato 0,025 M pH 8,4, 1,5 μ moles de NADP⁺, 0,5 μ moles de glucosa 6-fosfato, 15 μ moles de MgCl₂, 2 U.I. de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 3 μ moles de N,N-dimetilanilina, durante 5 minutos a 37 °C, obteniendo de esta forma el derivado N,N-dietilanilina N-óxido. Tras precipitar las proteínas con ácido tricloroacético 0,9 N se ajustó a pH 9,4 con KOH 6 N y se extrajo con éter dietílico para eliminar la N,N-dietilanilina no utilizada en la reacción. Posteriormente se acidificó con ClH 1 N y NO₂Na 0,11 N y se calentó a 60 °C durante 5 minutos, con el fin de reducir el N-óxido a N,N-dietilanilina, compuesto responsable de la coloración al formar el p-nitroso derivado correspondiente. La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción de 8,2 cm²/mmol.

2.9.2.2.- 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 se basa en el hecho de que el citocromo c oxidado (Fe³⁺) se convierte en reducido (Fe²⁺), 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 (25-50 μ g de proteína) se incuba en 1ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7,2, en presencia de 0,1 μ mol de EDTA, 50 μ moles de CNK, 0,05 μ mol de citocromo c y 0,1 μ mol de NADPH. La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción de 21 cm²/mmol.

2.9.2.3.- Citocromo b₅ reductasa NADH

Esta reductasa es otra flavoproteína microsómica, que transfiere equivalentes

reductores desde el NADH al citocromo b_5 (Mihara y Sato, 1978). Esta puede determinarse midiendo su actividad como ferrocianuro NADH reductasa utilizando por ello ferrocianuro potásico exógeno como aceptor de electrones, el cual alcanza su absorción máxima a 420 nm. La actividad se mide en un espectrofotómetro termostaticado a 25 °C. Una alícuota de la fracción microsómica (25-50 μ g de proteína) se incuba en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5, en presencia de 0,1 μ mol de NADH. La actividad enzimática se calcula utilizando el coeficiente de extinción de 1,02 cm^2/mmol .

2.9.2.4.- Glutation S-transferasa (GST)

La actividad de la glutatión S-transferasa se determinó en la fracción soluble obtenida al centrifugar el homogenado realizado con tampón fosfato a 10.000 rpm durante 30 minutos, según el método de Habig *et al* (1974), midiendo la variación de absorbancia a 340 nm con glutatión reducido 0,1 mM y CDNB (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; glutatión 0,5 mM; fosfato potásico 0,5 M a pH 6,5.

2.9.2.5.- Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa, se determinó según el método de Del Maestro *et al* (1983). Este método se basa en la autooxidación del pirogalol debido a que la SOD reacciona con el radical superóxido O_2^- lo cual hace decrecer dicha autooxidación. El fundamento de la reacción SOD es como sigue:

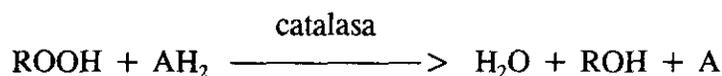
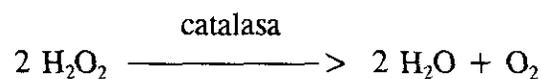


Los reactivos utilizados fueron: tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8,2 con dietilentriamina pentacético (DTPA) 1 mM, pirogalol 24 mM en ClH 10 mM y cianuro sódico 0,33 M. La reacción se inicia por adición de la solución de pirogalol sobre la muestra y se registra el cambio de densidad óptica a 420 nm, frente al blanco (tampón Tris-HCl 50mM pH 8,2 y pirogalol 24 mM en HCl 10mM), durante 2 a 3 minutos. La unidad de actividad enzimática de la superóxido dismutasa, se define por su capacidad para inhibir el 50 % la autooxidación del pirogalol.

Se determinaron la SOD total, SOD no enzimática y SOD real, 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 real, se utilizó un extracto dializado, que contiene SOD sensible e insensible al CNK. Como blanco se empleó un extracto dializado y calentado.

2.9.2.6.- Catalasa (CAT)

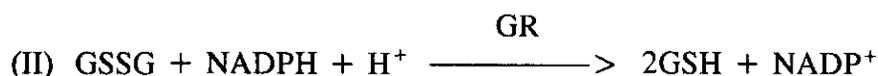
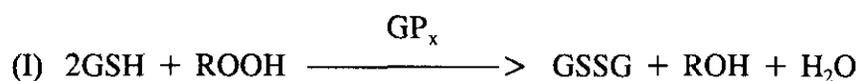
La medida de la actividad enzimática de la catalasa, peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, se llevó a cabo en fracción soluble de homogenados de hepatocitos, siguiendo el método descrito por Aebi (1987), que mide la actividad enzimática a partir de la descomposición del H₂O₂ con liberación de O₂. El 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 fue la siguiente: tampón fosfato 50 mM pH 7 y peróxido de hidrógeno 10 mM.

2.9.2.7.- Glutation peroxidasa (GP_x)

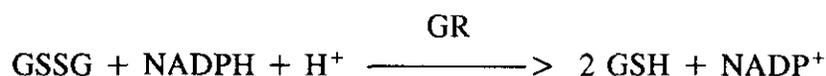
La actividad de la glutatión peroxidasa se determinó espectrofotométricamente en fracción soluble de hepatocitos de rata, según el método de Günzler *et al* (1974) modificado por nuestro grupo, midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADPH, según las siguientes reacciones:



La concentración que dichos reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: tampón fosfato potásico 45 mM pH 7,4; dietilentriamina pentacético (DTPA) 0,45 mM; GSH 2 mM; glutatión reductasa (GR) 1 U/ml; NADPH 0,2 mM y *terc*butil hidroperóxido (t-BOOH) 0,6 mM.

2.9.2.8.- Glutation reductasa (GR)

La actividad de este enzima, GSSG oxidoreductasa, se determinó espectrofotométricamente en fracción soluble, siguiendo 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:

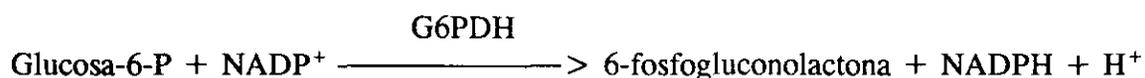


Esta reacción, si bien es reversible, se encuentra muy favorecida en el sentido de la formación de glutatión reducido. La concentración de los diferentes reactivos en la cubeta fue la siguiente: tampón fosfato 100 mM pH 7,2; EDTA 0,5 mM; GSSG 2,20 mM y NADPH 0,17 mM.

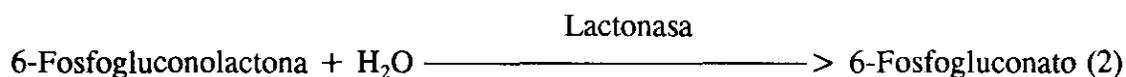
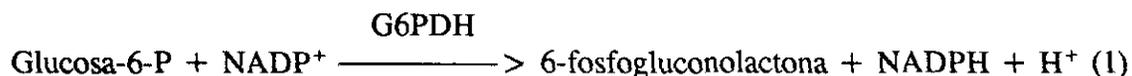
2.9.2.9.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 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 se encuentra 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 fue la siguiente: NADP^+ 0,38 mM; Glucosa-6-fosfato 3,3 mM; MgCl_2 6,3 mM.

2.10.- Determinación de la concentración de metabolitos

La determinación de la concentración de metabolitos se llevó a cabo en muestras de hepatocitos aislados y células en cultivo, congelados en N₂ líquido y conservados a -80 °C, según las técnicas que a continuación se describen para cada uno de ellos.

2.10.1.- Citocromo P-450

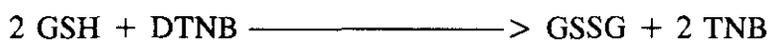
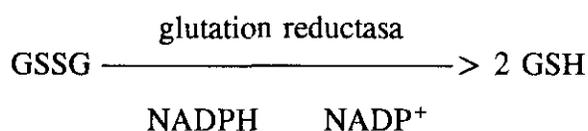
El Citocromo P-450 se determinó espectrofotométricamente, por el método de Omura y Sato (1964), midiendo el espectro de absorción característico, con un máximo a 450 nm, que se produce al reducirse el Fe³⁺ del grupo hemo, por unión de la hemoproteína con monóxido de carbono. La determinación se llevó 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 cm²/mmol y los resultados se expresan como nmoles de citocromo P-450 por mg de proteína de la fracción microsomal.

2.10.2.- Citocromo b₅

El citocromo b₅ es otra hemoproteína, presente en la fracción microsomal. El fundamento del método (Baggioni *et al*, 1970) es la determinación del espectro redox del NADH reducido *versus* citocromo oxidado. La reducción del citocromo b₅ es catalizada en presencia del enzima microsomal NADH-citocromo b₅ 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 concentración de citocromo b₅ se calcula utilizando el coeficiente de extinción de 185 cm²/mmol.

2.10.3.- Glutation reducido (GSH), glutacion oxidado (GSSG) y GSH/GSSG

4 x 10⁶ hepatocitos se homogenizaron con 0,25 ml de ácido pícrico al 1%, se sonicaron y se centrifugaron a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C. El glutacion total se determinó por el método de Griffith (1980), monitorizando los cambios en la absorbancia a 412 nm en presencia de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0,6 mM, NADPH 0,3 mM y 0,5 unidades de glutacion reductasa en buffer fosfato 0,125 M pH 7,5. La velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de glutacion y se basa en la formación de 5 tio-2-nitrobenzoato:



El glutacion oxidado se determinó tratando previamente el sobrenadante obtenido de la homogeneización con 10 µl de 2-vinilpiridina que se acompleja con el GSH. En ambos casos se utilizaron curvas de calibrado con GSH 0,1 mM y GSSG 0,1 mM, respectivamente.

2.10.4.- Grupos tiólicos de las proteínas

A 4 x 10⁶ hepatocitos se añadieron 0,25 ml de TCA al 12% y 0,5 ml de buffer compuesto por Na₂HPO₄·2H₂O 95 mM; Na₂HPO₄·H₂O 5 mM pH 8 y EDTA 5 mM; se sonicaron la células y se centrifugaron a 4 °C a 800 rpm durante 10 min, siguiendo el método de Di Monte *et al* (1984). El precipitado se resuspendió en 1 ml de TCA al 5% lavando dos veces y centrifugando a 1000 rpm 5 y 10 min respectivamente. El precipitado se resuspendió ahora en 1 ml de Tris-ClH 0,5 M pH 7,6 y de ahí se tomaron 20 µl para medir proteínas, 450 µl a los que se añadieron 50 µl de reactivo de Ellmann's (10 mM en metanol) y 450 µl a los que se adicionaron 50 µl de N-etilmaleimida (5 mM en buffer) y 50 µl de Ellmann's para utilizarlo como blanco. Se midió la absorbancia a 412 nm tras 20 min de reacción.

2.10.5.- Malondialdehído

El malondialdehído se determinó por el método de Niehaus *et al* (1969). 4×10^6 hepatocitos se homogenizaron con 1 ml de TCA al 0,1% y después de centrifugar a 15.000 g durante 10 minutos, 0,5 ml del sobrenadante se incubaron con 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% en TCA 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 g durante 5 minutos, se midió la densidad óptica en el sobrenadante a 532 nm.

2.10.6.- Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

La determinación de los niveles de TNF- α en los sueros de animales tratados con tioacetamida y controles se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Amersham basado en una técnica de ELISA que utiliza un anticuerpo para el (m) TNF- α conjugado con peroxidasa. La sensibilidad del método tiene un rango de 50-2450 pg/ml.

2.10.7.- Oxido nítrico (NO)

La liberación de óxido nítrico en los cultivos de macrófagos se determinó por la acumulación de nitritos y nitratos (NO total) según el método de Griess, que consiste en la formación de un complejo diazo entre el ácido sulfanílico y el óxido nítrico, y posterior reacción con el naftil-etilenodiamino para dar un complejo coloreado (Green *et al*, 1982). Así, se transfirieron 200 μ l del medio de cultivo a un eppendorff, y los nitratos se redujeron a nitritos con 0.5 unidades de nitrato reductasa (Boehringer) en presencia de NADPH 50 μ M y FAD 5 μ M (Schmidt *et al*, 1992). El exceso de NADPH que interfiere en la determinación química de los nitritos, se oxidó en presencia de 0.2 mM de piruvato y 1 μ g de lactato deshidrogenasa. Los nitritos se determinaron con el reactivo de Griess, por la adición de ácido sulfanílico 1mM y HCl 100 mM. Tras incubar durante 5 minutos, los tubos fueron centrifugados y tras una primera lectura de la absorbancia a 548 nm, se añadió naftiletileno diamino 1 mM. La reacción se completó tras 15 minutos de incubación, comparándose la

absorbancia obtenida a 548 nm con la correspondiente a un patrón de NaNO_2 .

2.11.- Determinación de proteínas

Las proteínas se evaluaron por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como patrón y reactivo de Coomasie. Este método se basa en la reacción, por fuerza iónica, entre grupos sulfonados ácidos presentes en el azul Coomasie y grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína.

2.12.- Preparación de plásmidos. Obtención de insertos

Bacterias *Escherichia coli* DH5 α se hicieron competentes por el método de Hanahan modificado (Sambrook *et al*, 1989), transformándose posteriormente con 1 ng del plásmido que contenía el inserto empleado en el análisis por Northern Blot. Las bacterias transformadas se crecieron en placas de medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y ClNa 10 g/l) a las que se añadió el antibiótico ampicilina al que eran resistentes en virtud del plásmido introducido.

Las colonias de bacterias transformadas con el plásmido se crecieron en 100 ml de medio LB+antibiótico (50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina), manteniéndose durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. El cultivo de bacterias se centrifugó a 3.000 g durante 3-5 min, tras lo cual se resuspendió suavemente en medio TE-glucosa (Tris-ClH 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, glucosa 50 mM), al que se añadió una punta de espátula de lisozima con el fin de romper la pared bacteriana. La resuspensión se mantuvo 15 minutos a temperatura ambiente, añadiendo la solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) durante 5 minutos; después con el objeto de precipitar las proteínas y el DNA cromosómico, se añadieron 4,5 ml de acetato potásico 5M pH 4.5 y se incubó a 4 °C durante 15 minutos, eliminándose posteriormente por filtración. El DNA plasmídico se precipitó con isopropanol y se añadieron 50 $\mu\text{l/ml}$ de RNasa A 10 mg/ml, incubando a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron

250 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K y se incubó 2h a 50 °C.

Finalmente, se extrajo el DNA plasmídico con 500 μl de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol/cloroformo; este proceso se repitió hasta que no se apreció interfase. El DNA se precipitó a -20 °C durante toda la noche con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La cantidad de plásmido obtenido se analizó espectrofotométricamente y por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris 0,02 M pH 8,5, EDTA 0,4 mM, ácido bórico 0,2 M).

Los insertos se obtuvieron por digestión de los plásmidos con los enzimas de restricción adecuados. Para ello, se mantuvo durante toda la noche a la temperatura adecuada, una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 150 μl , tampón de restricción 1x, 200 μg del plásmido a digerir y una unidad/ μg plásmido de cada uno de los enzimas de restricción. El inserto se separó del plásmido digerido por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y extracción con fenol/cloroformo.

El inserto se precipitó con acetato sódico 3 M (0,3 M, concentración final) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, manteniéndolo toda la noche a -20 °C. Después de la precipitación, las muestras se centrifugaron a 4 °C a 13.000 rpm, se lavó el precipitado con etanol al 75% y el DNA se resuspendió en medio TE 10:1. La valoración del inserto se realizó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% empleando marcadores de DNA.

Los plásmidos pGEM4Z de 2,746 kb con los cDNAs de catalasa, superóxido dismutasa de Cu-Zn (Cu-Zn SOD), superóxido dismutasa de Mn (Mn SOD) y glutation peroxidasa (GPx) fueron generosamente cedidos por el Dr. Jonathan L. Tilly (Tilly y Tilly, 1995). El cDNA correspondiente a la 18S ribosomal fue sintetizado en el Imperial Cancer Research (Londres) y cedido generosamente por el Dr. E. Rozengurt. Sus características particulares se muestran en la siguiente tabla:

	Plásmido	Resistencia	Enzimas de restricción	Inserto (kb)
Mn SOD	pGEM4Z	Amp	BamHI HindIII	0,396
Cu-Zn SOD	pGEM4Z	Amp	BamHI HindIII	0,380
Catalasa	pGEM4Z	Amp	BamHI HindIII	0,424
GPx	pGEM4Z	Amp	BamHI HindIII	0,316
18S	pBR322	Tet	—	0,2

2.13.- Determinación de transcritos de ciertas enzimas

Una vez obtenidos los insertos correspondientes se procedió a determinar cuantitativamente los niveles de sus transcritos tanto en animales controles como en los intoxicados, así como sus modificaciones a lo largo de la edad.

2.13.1.- Aislamiento del RNA de muestras de hepatocitos

Para la extracción de RNA de muestras de hepatocitos se siguió el método descrito por Chomzynsky y Sacchi (1987). El método se basa en las propiedades únicas de las moléculas de RNA para mantenerse en solución acuosa formando complejos con el tiocianato de guanidinio. Las células (4×10^6) se homogeneizan rápidamente, siempre en frío, con 1 ml de una solución compuesta por tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, sarcosil al 0,5 %, β -mercaptoetanol 0,1 M, 1 ml de fenol bidestilado saturado pH 7 y 100 μ l de AcNa_2 2 M, solución en la que las proteínas quedan neutralizadas y desnaturalizadas evitando que las RNAsas puedan degradar el RNA. A continuación, se añaden 100 μ l de CHISAN (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1) para cada unidad, se agita

vigorosamente durante 30 segundos para solubilizar el RNA y se deja 15 minutos a 4 °C para posteriormente centrifugar 15 minutos a 4 °C. La fase inferior fenol-cloroformo contiene el DNA, mientras que en la superior se encuentra el RNA; asimismo se aprecia una interfase opaca que contiene la fracción proteica. La fase superior se pasa a otro tubo donde se precipita con un volumen igual de isopropanol, se mezcla bien y se mantiene toda la noche a -20 °C para precipitar el RNA. Transcurrido este tiempo se centrifugan las muestras 15 min a 4 °C y el precipitado de RNA se lava dos veces con etanol al 75%.

Para valorar la cantidad y calidad del RNA, se eliminó el etanol y se resuspendió en EDTA 1 mM pH 7 en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). La muestra se valoró en el espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 260, 280 y 310 nm, valores que corresponden al RNA, proteínas e impurezas, respectivamente. La concentración de RNA en mg/ml se calculó mediante el valor de absorbancia a 260 nm. La relación entre A_{260}/A_{280} es un índice de calidad del RNA y se considera correcto si está comprendido entre 1,9 y 2.

2.13.2.- Hibridación con las sondas específicas

Alícuotas de RNA total (30 μ g) se desnaturalizaron en formamida 50%, formaldehído 5%, glicerol 8%, azul de bromofenol 0,4% y cianol xileno 0,4% a 65 °C durante 15 minutos. Tras la desnaturalización, el RNA total se fraccionó por electroforesis (20 mA, 15 horas) en un gel de agarosa al 0,9% que contenía formaldehído al 2% y tampón MOPS 1x (MOPS 0,02 M, acetato sódico 0,005 M y EDTA 0,5 mM pH 7.4) (Sambrook *et al*, 1989). Después de transferir el RNA del gel a filtros de nylon (NY 13N, 0,45 μ m) con SSC 10x (CINa 1,5 M y citrato sódico 0,3 M pH 7,4) por medio de un sistema de vacío a baja presión y fijar los RNAs con luz ultravioleta, las membranas se prehibridaron durante un mínimo de 6 horas a 42 °C, en un medio que contenía formamida 50%, CINa 0,25 M, fosfato sódico 0,1 M pH 7,2, DNA de esperma de salmón 0,1% y SDS 7%; hibridándose posteriormente con las sondas específicas marcadas a razón de 3×10^6 DPM/ml durante toda la noche a 42 °C (Amasino, 1986).

El marcaje de los cDNAs se realiza por dos métodos diferentes en función del cDNA:

Random Primer ó Nick Translation.

Los fragmentos se marcaron con [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol) por el método "*random primer*" desarrollado por Feinberg y Vogelstein en 1984, que se basa en la hibridación de una mezcla de hexanucleótidos al DNA que se ha de marcar. La cadena complementaria se sintetiza a partir del extremo 3'OH terminal del cebador hexanucleótido, utilizando un enzima Klenow de alto grado de marcaje constituido por el C-terminal de la DNA polimerasa I de *E. coli* (este enzima presenta actividad DNA polimerasa y 3'- 5' exonucleasa careciendo de actividad 5'- 3' exonucleasa). En los hexanucleótidos están representadas, prácticamente, todas las combinaciones de secuencia, uniéndose, de esta forma, el cebador al DNA molde de manera estadística. Los deoxinucleótidos trifosfato marcados con [α - 32 P] presentes en la reacción se incorporan a la nueva cadena complementaria de DNA sintetizada. Para ello utilizamos el método "Multiprimer DNA labelling" comercializado por Amersham, donde en primer lugar, se procede al tratamiento de los cDNAs (40-100 ng) a 95-100 °C durante 2 min con objeto de producir la desnaturalización del DNA. A continuación, las muestras se ponen inmediatamente en hielo para evitar así la renaturalización. La reacción se inicia añadiendo al tubo que contiene la mezcla de nucleótidos marcados, el cebador y la DNA polimerasa (fragmento Klenow), nuestro cDNA y 50 μ Ci de [α - 32 P] dCTP a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Transcurrido este tiempo, la muestra se pasa por una columna de Sephadex G-50 de 10 cm de longitud, que había sido empaquetada y equilibrada con tampón C1Na 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1% (p/v) y Tris 50 mM pH 7,5 estéril. Una vez cargada la muestra en la columna, esta se centrifuga a 1.500 rpm durante 4 minutos. La muestra eluida contiene los cDNAs marcados, quedando retenida en la columna la radiactividad no incorporada.

En el método de marcaje de "*Nick-Translation*", también llamado de desplazamiento de mella, el enzima *E. coli*. DNA polimerasa I adiciona nucleótidos al extremo 3'OH terminal que se crea cuando una cadena de una molécula de DNA se corta. La eliminación simultánea de nucleótidos del extremo 5', debida a la actividad 5'- 3' exonucleasa del enzima, unido a la adición de nucleótidos al extremo 3', da como resultado el movimiento del corte ("*nick-translation*") a lo largo del DNA (Kelly *et al*, 1970). De esta forma,

reemplazando los nucleótidos preexistentes por nucleótidos trifosfato radiactivos, es posible marcar el DNA con una elevada actividad específica.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron una vez a temperatura ambiente con SDS 0,1% y SSC 0,1% durante 10 minutos y una o dos veces a 42 °C durante 30 min hasta que la relación señal/fondo es 3:1, en este momento se expone con una película Hyperfilm-MP. La cuantificación de las señales obtenidas se realizó por densitometría (Molecular Dynamics, Kemsing, U.K), utilizando como control interno una sonda que reconocía al RNA ribosomal 18S marcada por el método del desplazamiento de mella, expresando de este modo los resultados como el cociente de expresión del RNAm a estudio/18S.

2.14.- Análisis por citometría de flujo del contenido y distribución del DNA genómico en poblaciones de hepatocitos

Los hepatocitos, tanto de ratas controles como de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida, se aislaron a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, por el procedimiento descrito en el apartado 2.7.1 de Métodos. El estudio a nivel celular del contenido y distribución del DNA genómico se considera de gran utilidad para determinar la cito y genotoxicidad de los xenobióticos (Dallas y Evans, 1990). Las células se analizaron utilizando un kit suministrado por Bio-Rad basado en el método de Vindelov *et al* (1983). 2×10^6 de los hepatocitos recién obtenidos se lavaron dos veces con una solución tampón a pH 7,6, que contenía sacarosa 250 mM, citrato trisódico 40 mM y DMSO al 5% (v/v). El precipitado se resuspendió en 250 μ l de esta misma solución y las muestras se congelaron hasta el momento del análisis en el cual se añadió yoduro de propidio manteniéndose 30 minutos a temperatura ambiente y luego en baño de hielo.

Se analizaron 10.000 células por muestra. La señal procedente del yoduro de propidio fue recogida por un DM 610 nm y seleccionada mediante un BP 630/30. Los datos fueron registrados utilizando una restricción de dobletes (DDM) para recoger las señales fluorescentes provenientes de células únicas.

2.15.- Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media \pm la desviación estandar (SD) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por cuatuplicado de cuatro experimentos. Las comparaciones se efectuaron mediante el test de la t de student y el nivel de significación estadística se definió como $p < 0,01$.

Los estudios se han realizado en cada una de las edades por separado, reflejando la significación estadística la obtenida al comparar cada grupo de animales intoxicados *versus* su correspondiente control.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Para realizar el estudio de las modificaciones sufridas en la hepatotoxicidad inducida por la intoxicación aguda con tioacetamida a lo largo de la edad, se utilizaron ratas macho de 2 (200-250 g), 6 (350-400 g), 12 (450-500 g), 18 (500-550 g) y 30 meses (550-650 g) de edad de la raza Wistar. La relación peso hígado/peso cuerpo, determinada como parámetro de masa hepática, sufrió una disminución del 35% desde los 12 hasta los 30 meses ($4,3 \pm 0,4$ y $2,8 \pm 0,3$ mg hígado/g cuerpo, respectivamente). Mientras que la tasa de mortalidad en los animales de 2 meses fue prácticamente nula, a partir de los 6 meses se registró un incremento notable, con valores que llegaron a ser superiores al 50% a los 30 meses. La mortalidad se produjo entre las 48 y las 72 horas de la administración del hepatotóxico.

3.1.- Evolución dependiente de la edad de la lesión hepática inducida por el hepatotóxico

Para diagnosticar el momento y la magnitud de la lesión hepática, así como de la subsiguiente regeneración hepatocelular y, de este modo conocer las diferencias relativas al transcurso de la edad en la secuencia de eventos que conducen al proceso necrótico-regenerativo, se han utilizado tanto marcadores séricos como estudios histopatológicos.

3.1.1.- Alteraciones en las actividades séricas de la aspartato aminotransferasa y la γ -glutamil transferasa

Uno de los síntomas clínicos de la patología hepática es la aparición en suero de enzimas procedentes de la rotura de los hepatocitos en el proceso necrótico. 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 suero. Entre estos enzimas figura la aspartato aminotransferasa, cuya actividad sérica se utiliza como determinante del grado de necrosis hepática en casos de intoxicación.

En nuestro estudio, la actividad de la aspartato aminotransferasa (Figura 1) no experimentó variaciones significativas por efecto de la edad, pero es importante destacar las diferencias existentes en la magnitud y duración del proceso necrótico originado por la intoxicación. Así, en todas las edades estudiadas, la necrosis se inicia a las 12 horas de la administración del hepatotóxico. En los animales de dos meses, la máxima necrosis se alcanza a las 24 horas con valores de 14 veces ($p < 0,01$) el valor inicial, mientras que en las ratas de edades más avanzadas, el punto de máxima necrosis aparece a las 48 horas. Estos valores, sin embargo, varían mucho en intensidad, ya que a los 6 y 12 meses los máximos llegan a ser 33 ($p < 0,01$) y 29 ($p < 0,01$) veces respectivamente el valor control, mientras que a los 18 y 30 meses los puntos máximos de necrosis tan sólo alcanzan 8 ($p < 0,01$) y 7 ($p < 0,01$) veces respectivamente los valores iniciales. Posteriormente, esta actividad enzimática va tendiendo a la normalidad que, sólo se consigue en el caso de los animales jóvenes (2 meses) al final del período estudiado (96 horas).

Otra actividad sérica marcadora de lesión hepática es la γ -glutamyl-transferasa, enzima encargado de la degradación del glutatión, que suele encontrarse elevada en casos de enfermedad hepática obstructiva (hepatobiliar), intoxicación etílica y hepatocarcinogénesis (Cascales *et al*, 1991).

Como se observa en la Figura 2, la actividad de la γ -glutamyl transferasa sérica aparece notablemente modificada a lo largo de la edad ya que, sufre un descenso brusco a partir de los 12 meses alcanzando valores tan sólo del 7% ($p < 0,01$) el valor inicial. En el proceso de intoxicación, el perfil de actividad es semejante al de la aspartato aminotransferasa, ya que se inicia un incremento a las 12 horas para alcanzar un máximo en el punto de máxima necrosis. A los 2 meses el máximo se registró a las 24 horas (328%; $p < 0,01$). El incremento mayor lo sufren los animales de 12 meses donde el pico de actividad alcanza valores del 1852% ($p < 0,01$) frente al 328% ($p < 0,01$) y 370% ($p < 0,01$) en los de 2 y 6 meses, respectivamente. En edades más avanzadas las magnitudes disminuyen progresivamente ya que en las ratas de 18 meses la actividad γ -glutamyl transferasa alcanza un 400% ($p < 0,01$) y en las de 30 meses tan sólo un 150%. La restauración a las 96 horas de los valores normales de actividad se registró en muestras de suero de todas las edades.

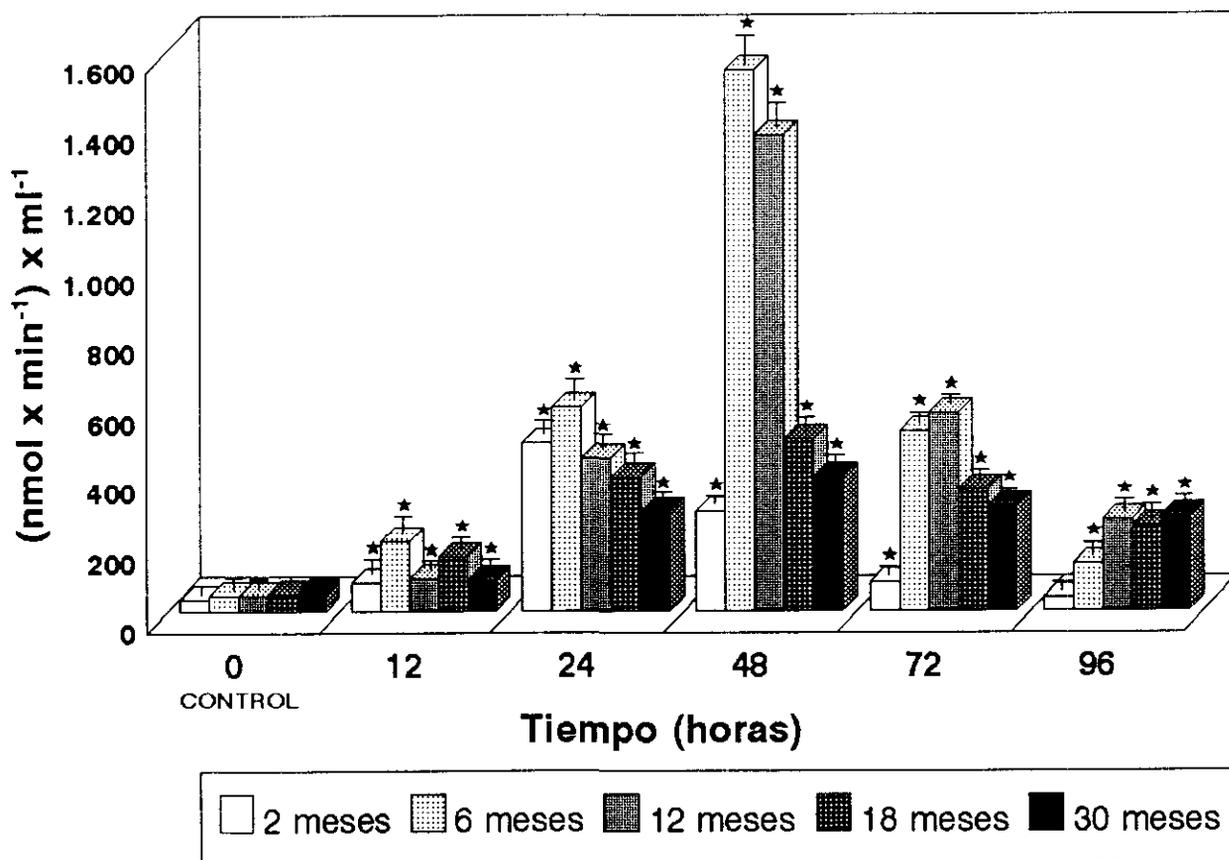


Figura 1.- Actividad de la aspartato aminotransferasa en suero de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg). Los resultados se expresan en (nmol x min⁻¹) x ml⁻¹ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

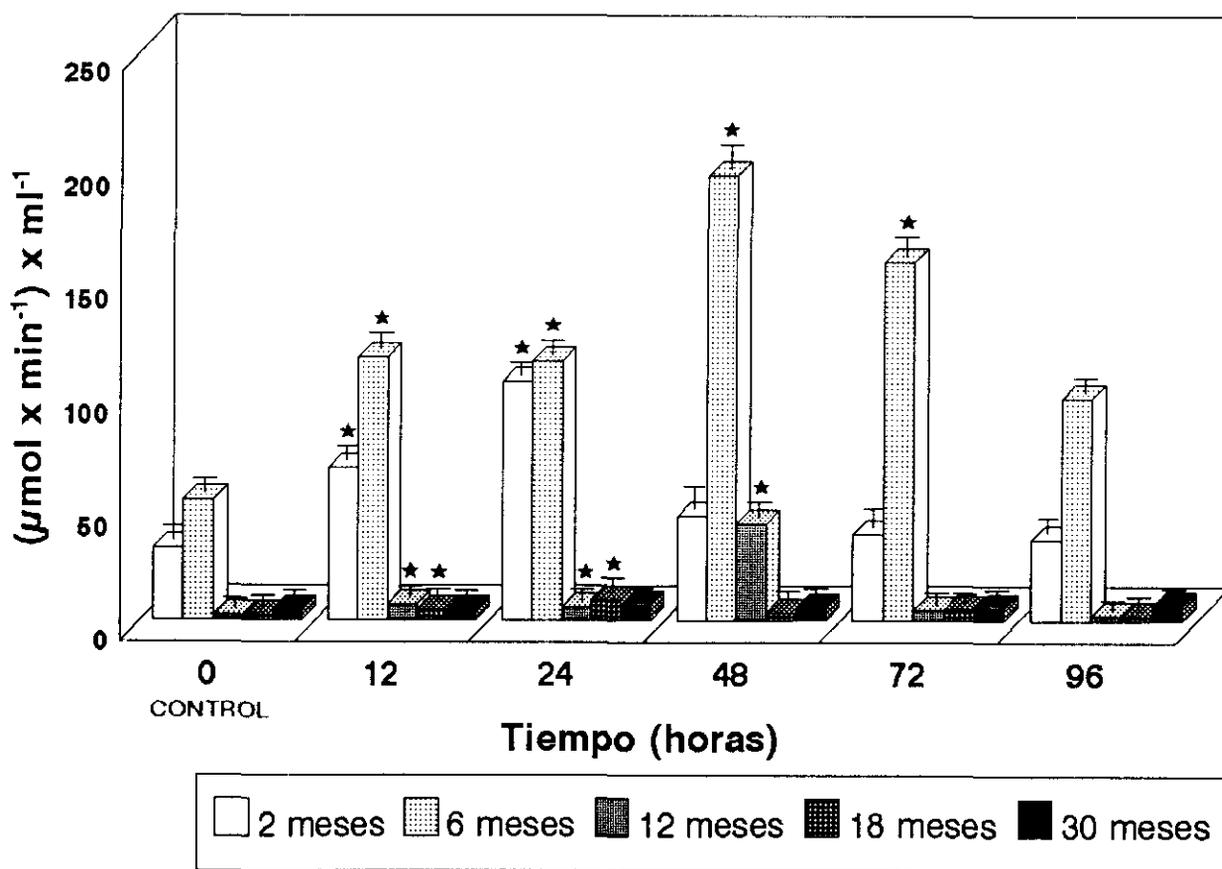


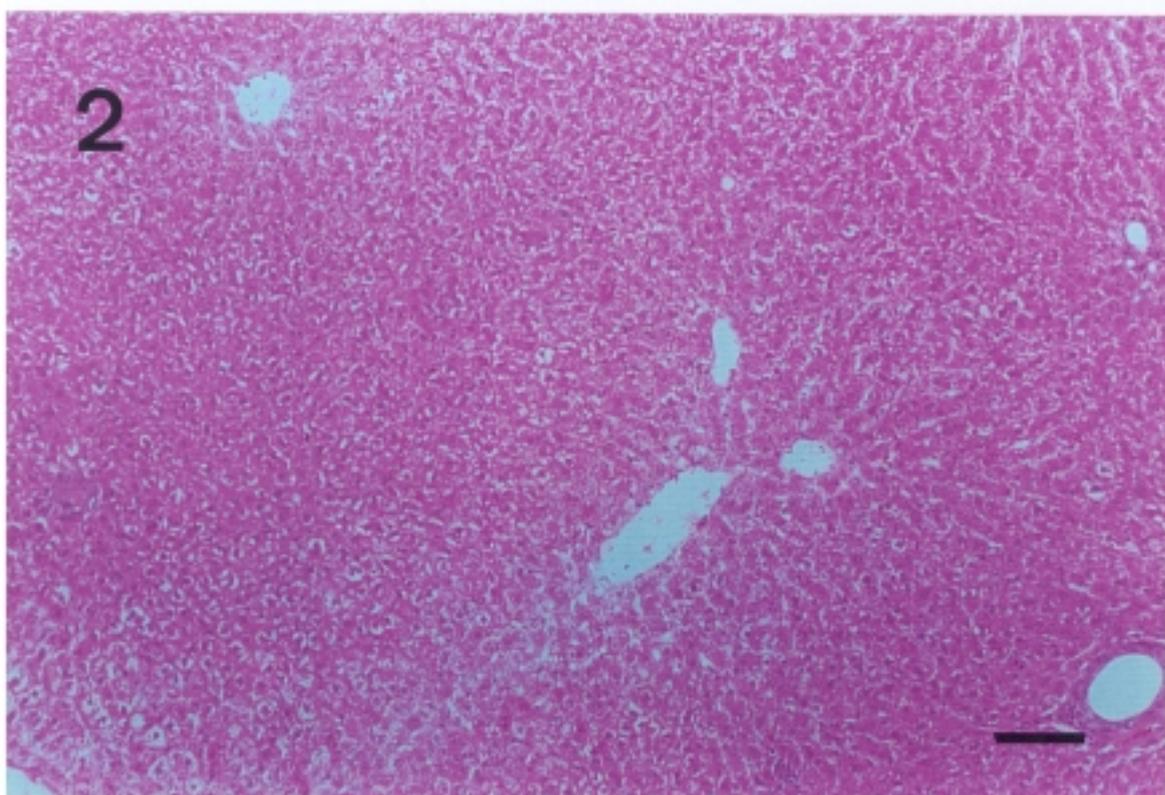
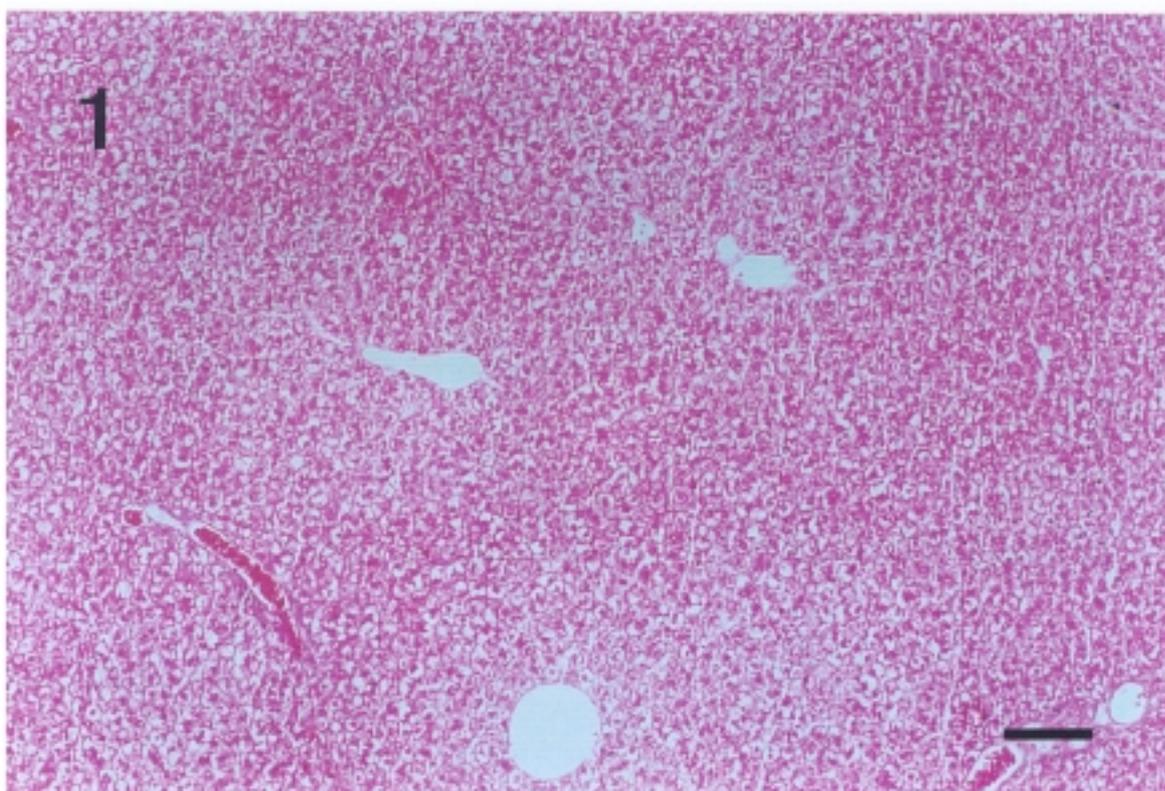
Figura 2.- Actividad de la γ -glutamyl transferasa en suero de ratas tratadas una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en $(\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{ml}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

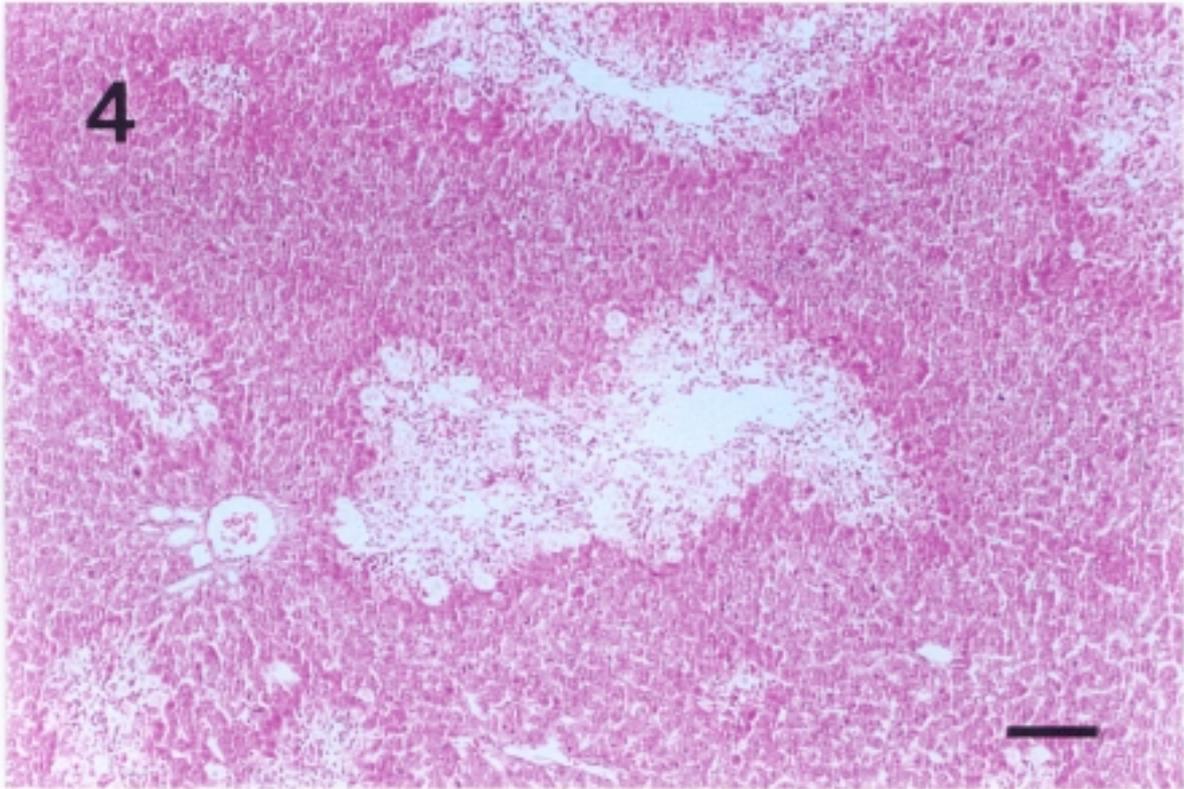
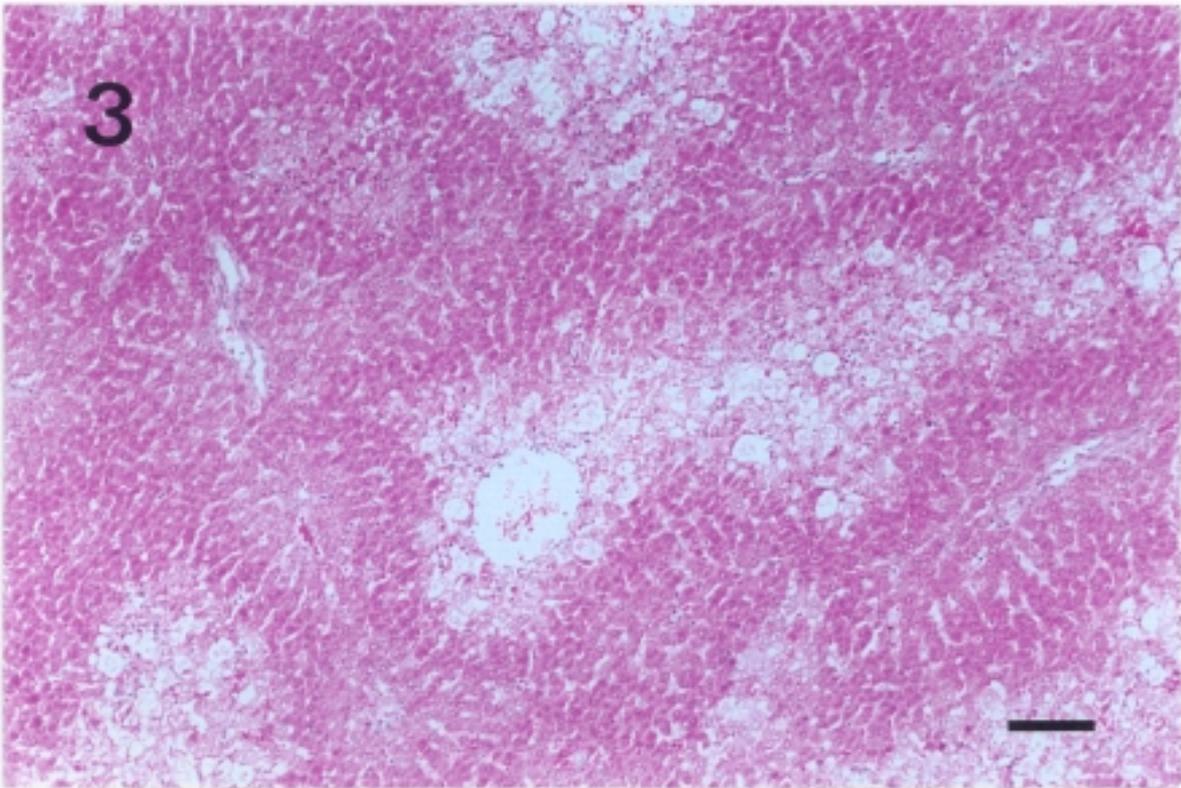
3.1.2.- Estudio histopatológico de hígado de ratas de diferentes edades intoxicadas con tioacetamida

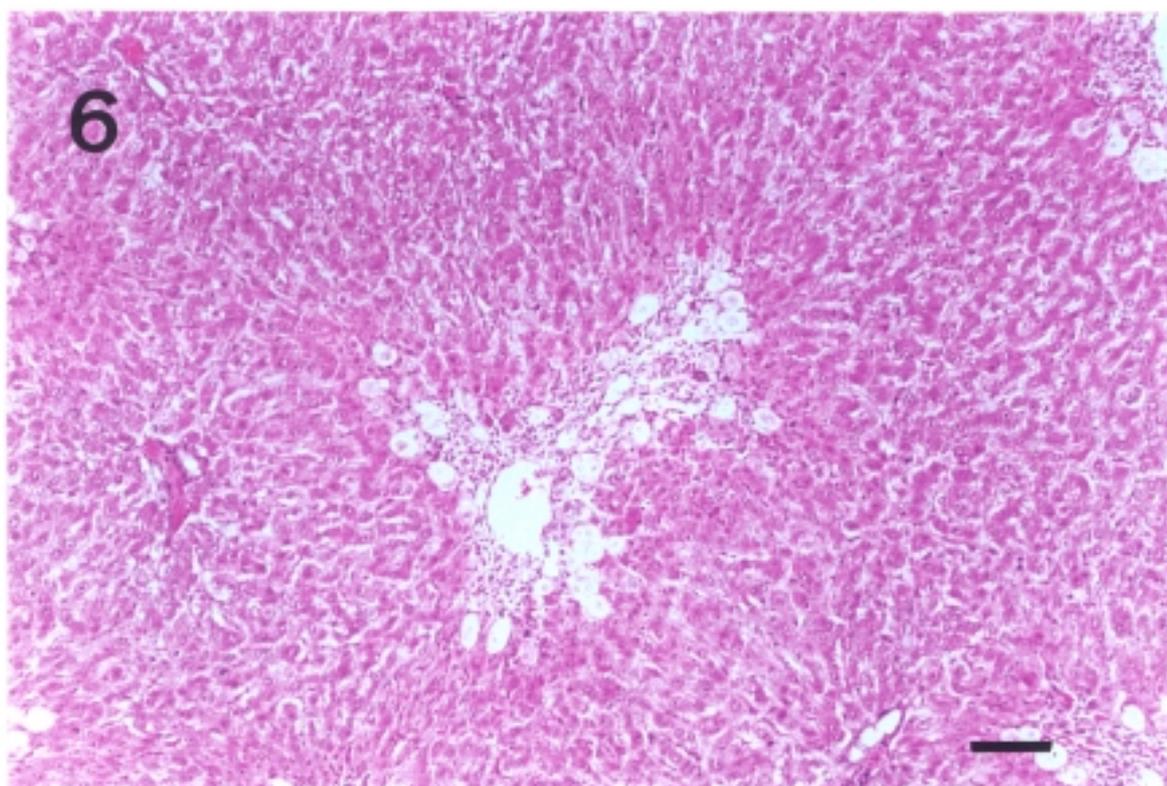
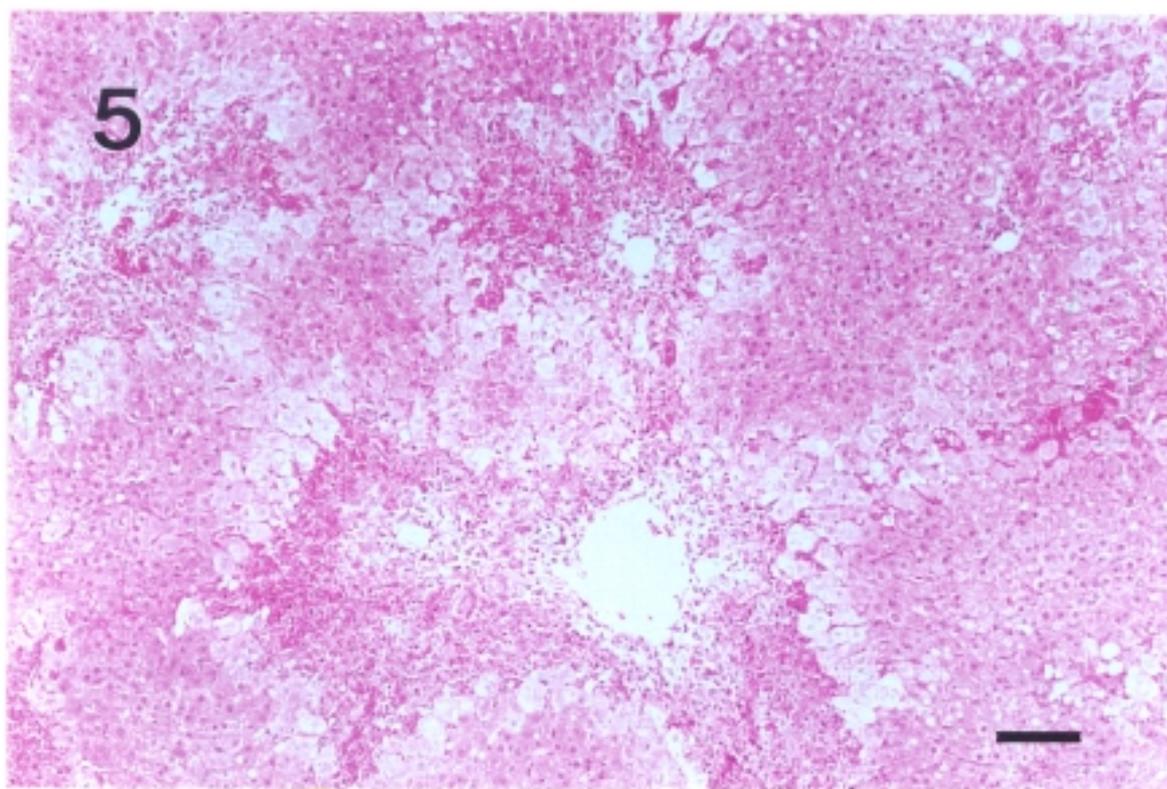
Una vez establecidas las diferencias en la evolución del proceso hepatotóxico, nos propusimos comprobar cómo se vería reflejada la lesión a nivel de la estructura hepática. Para ello, se realizaron observaciones al microscopio óptico de cortes de hígado obtenidos en los momentos de máxima necrosis y regeneración en las distintas edades. Inicialmente, y como se muestra en las panorámicas de las Fotografías 1 y 2, correspondientes a cortes de hígados control de animales de 2 y 30 meses, respectivamente, observamos que no existen modificaciones apreciables debidas al envejecimiento (Barra = 50 μ m).

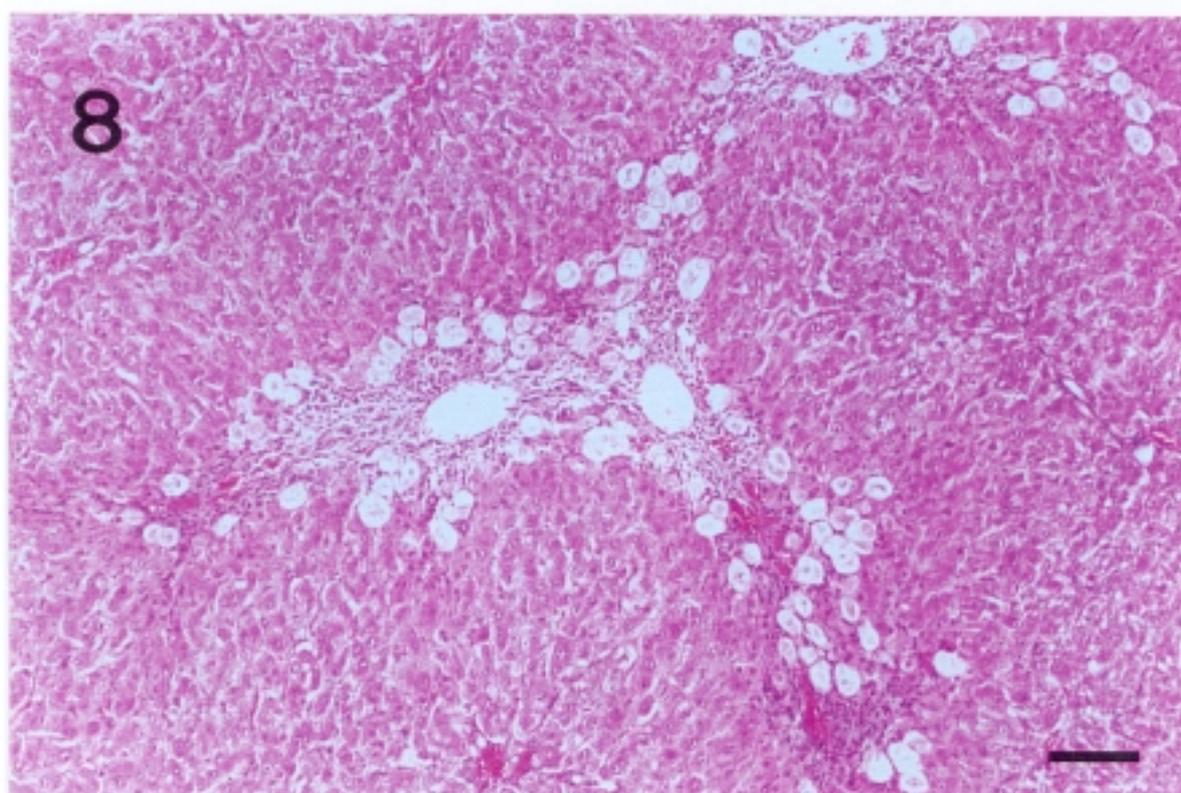
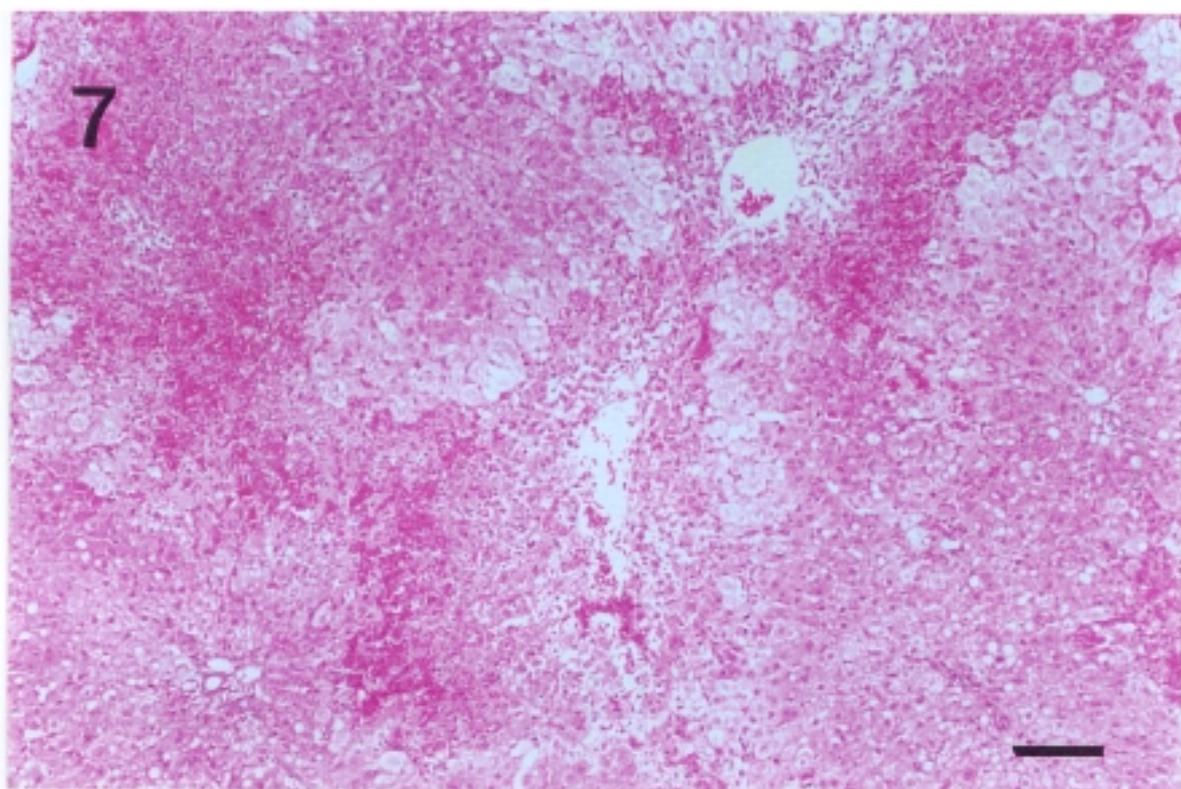
En las Fotografías 3 y 4 se muestran cortes de hígado obtenidos de una rata joven de 2 meses a las 24 y 48 horas de la administración del hepatotóxico, momentos de máxima necrosis y regeneración, respectivamente. Puede observarse claramente la necrosis centrilobular (también llamada perivenosa o de la zona 3 del acino hepático) a las 24 horas del tratamiento, con zonas de hemorragia e infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares. A las 48 horas se observa que, aunque persiste la necrosis, ésta se encuentra en fase de resolución y el proceso de regeneración hepatocelular se hace visible en las numerosas mitosis. También puede detectarse en estas figuras la presencia de infiltrado de tipo mixto (leucocitos polimorfonucleares típicos de la inflamación aguda y linfocitos y monocitos característicos de la inflamación crónica) (Barra = 50 μ m).

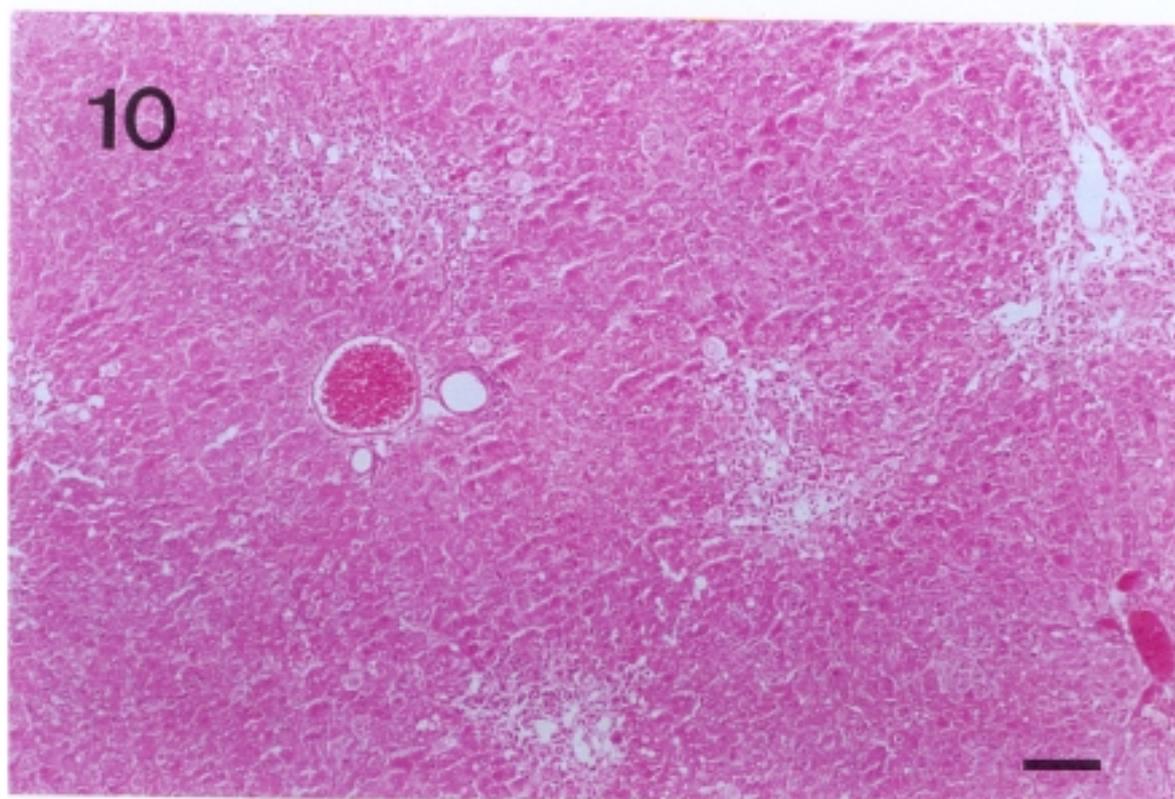
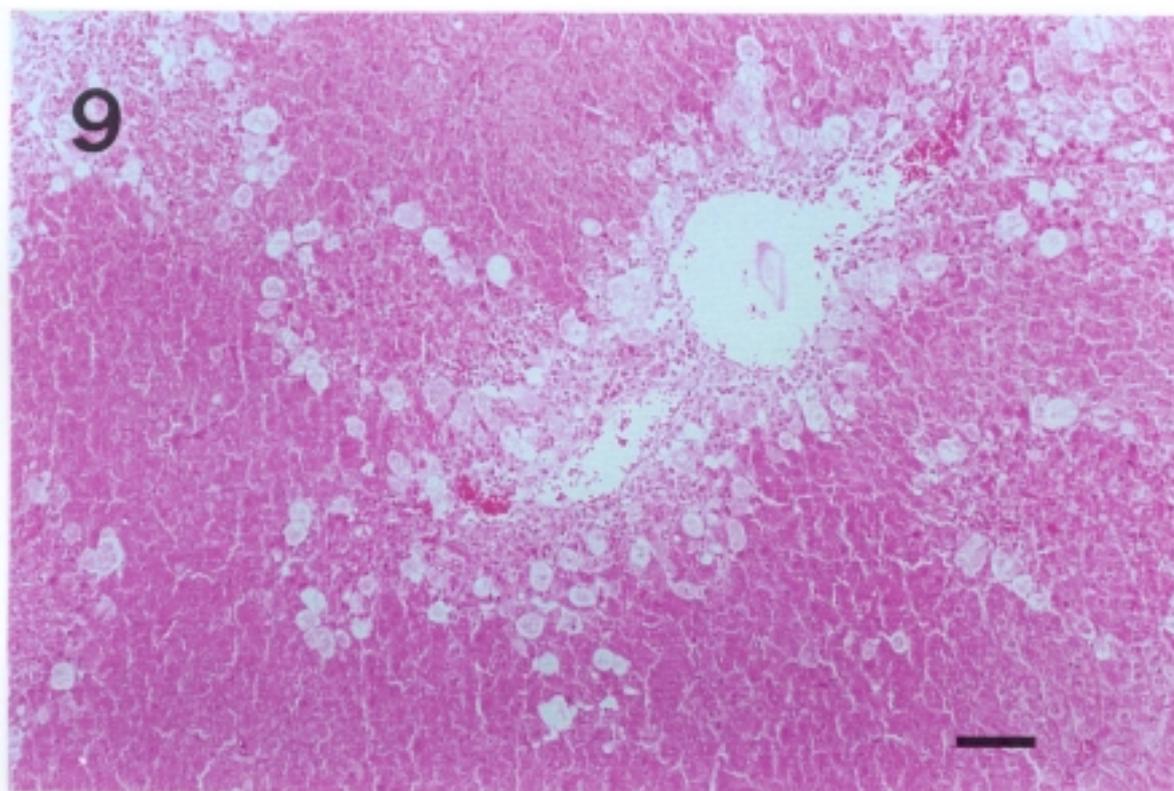
Las series de Fotografías 5/6, 7/8, 9/10 y 11/12 muestran los puntos de máxima necrosis (48 horas) y regeneración (72 horas) en cortes obtenidos de ratas de 6, 12, 18 y 30 meses, respectivamente. Todas tienen en común la presencia a las 48 horas de una intensa necrosis centrilobular que en algunos casos afecta al 50% del parénquima hepático con un importante componente hemorrágico e inflamatorio de tipo mixto con marcada esteatosis central y periportal. A las 72 horas, en todas aparece la necrosis más reducida con infiltrado perivascular inflamatorio de tipo crónico. La diferencia fundamental respecto a la edad se observa en el proceso regenerativo ya que mientras que a los 6 y 12 meses aparecen abundantes mitosis, a los de 18 y 30 meses son muy escasas (Barra = 50 μ m).

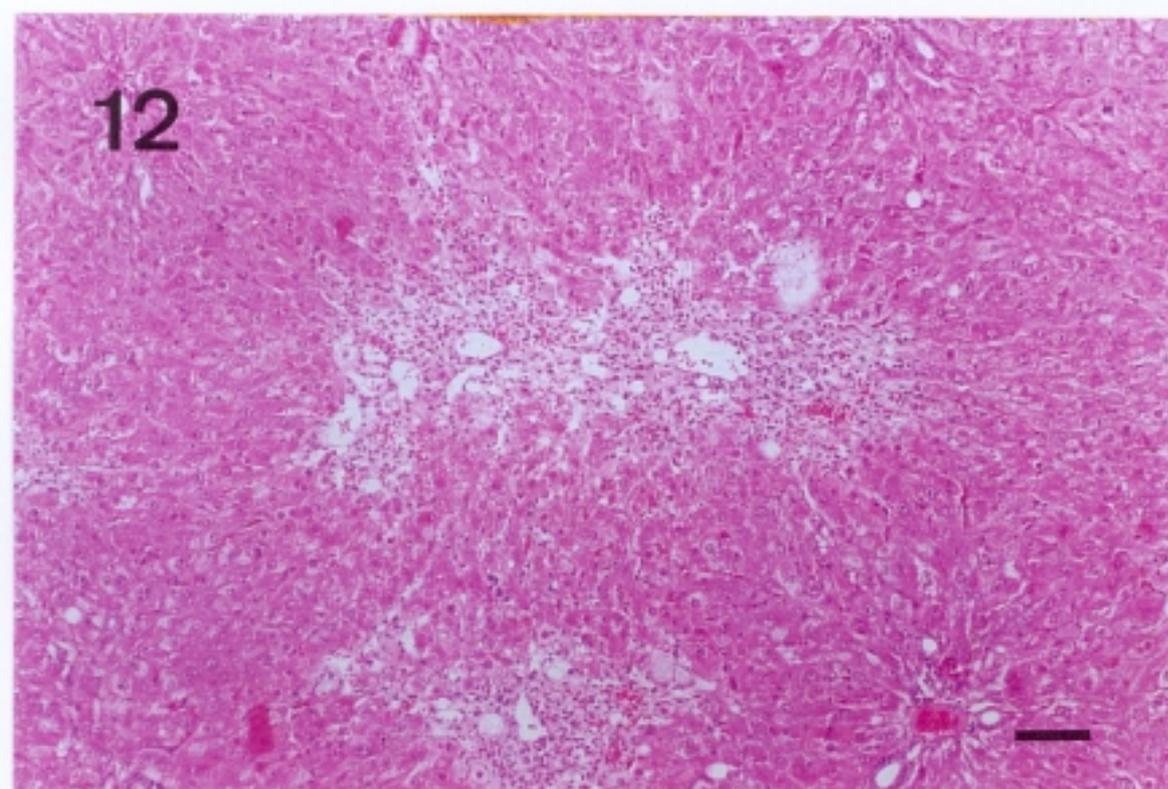
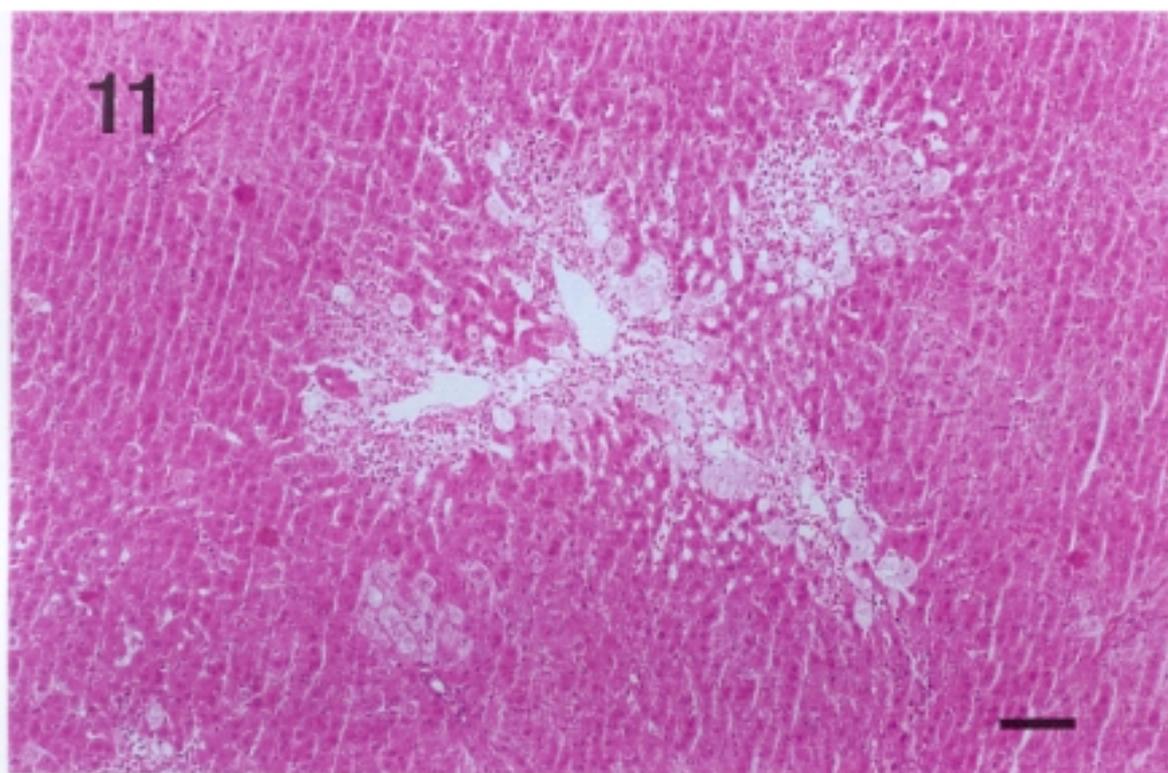












3.2.- Variaciones dependientes de la edad en los sistemas hepáticos de defensa antioxidante frente a un proceso de hepatotoxicidad

La mayoría de los xenobióticos que ingresan en el organismo son biotransformados en el hígado mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación con la finalidad de incrementar la polaridad de dichas moléculas y así facilitar su excreción. Sin embargo, en esta biotransformación se pueden producir metabolitos tóxicos, como es el caso de la tioacetamida que genera tioacetamida S-óxido, intermediario responsable de la formación de aductos con las proteínas con el consiguiente carácter nocivo. Por ello, y una vez establecidas las características de la lesión, nos encaminamos a estudiar en primer lugar, el sistema microsómico monooxigenasa de función mixta responsable de la biotransformación del tóxico y en segundo lugar, el ciclo redox del glutatión, responsable de la respuesta antioxidante hepática y ciclo de por sí fundamental tanto frente al proceso de intoxicación como al de la senescencia, al estar ambos estrechamente relacionados con una mayor generación de radicales libres derivados de la reducción del oxígeno molecular.

3.2.1.- Sistema microsómico monooxigenasa de función mixta

La tioacetamida S-óxido es el resultado de la acción del sistema monooxigenasa de función mixta microsomal. Este sistema está constituido por dos tipos distintos de enzimas que difieren en su composición y mecanismo de acción llamados monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 y monooxigenasas dependientes de flavina. Una parte considerable de las sustancias tóxicas y/o fármacos son metabolizados por el primer grupo, pero en el caso de la tioacetamida existe mucha controversia al respecto. Por ello, nos propusimos identificar el sistema responsable y luego observar sus modificaciones en los diferentes grupos estudiados.

3.2.1.1.- Modificaciones en la actividad de la FAD monooxigenasa

La FAD monooxigenasa o N,N-dimetil anilina N-oxidante es un enzima monooxigenasa microsómico con flavin adenin dinucleótido que consume NADPH y O₂ generando el derivado S-óxido correspondiente y una molécula de H₂O. Este sistema se determinó en la fracción microsómica obtenida por centrifugación a 105.000 g durante 45 minutos a 4°C de homogenados de hepatocitos aislados de ratas y congelados en nitrógeno líquido. En la Figura 3 se muestra cómo la actividad de la FAD monooxigenasa microsómica de hepatocitos de ratas control evoluciona a lo largo de la edad de tal modo que existe un máximo en los animales de 6 meses con valores del 170% ($p < 0,01$) para luego disminuir en edades más avanzadas. Respecto a los animales intoxicados se inicia el incremento a las 12 horas, observándose los valores más elevados a las 24 horas en hepatocitos de ratas de 6 y 12 meses, 278% ($p < 0,01$) y 289% ($p < 0,01$), respectivamente. A los 2 meses el máximo de actividad apareció a las 12 horas (176%; $p < 0,01$), mientras que a los 18 y 30 meses el máximo se registró a las 24 horas con un 170% para ambas edades. Un segundo pico, inferior en magnitud, se detectó a las 48 horas (134%) en ratas de 2 meses y a las 72 horas en el resto de las edades, coincidiendo con el momento de máxima regeneración, que sólo fue significativo en los hepatocitos de los animales de 6 y 12 meses (144%; $p < 0,01$ y 167%; $p < 0,01$, respectivamente).

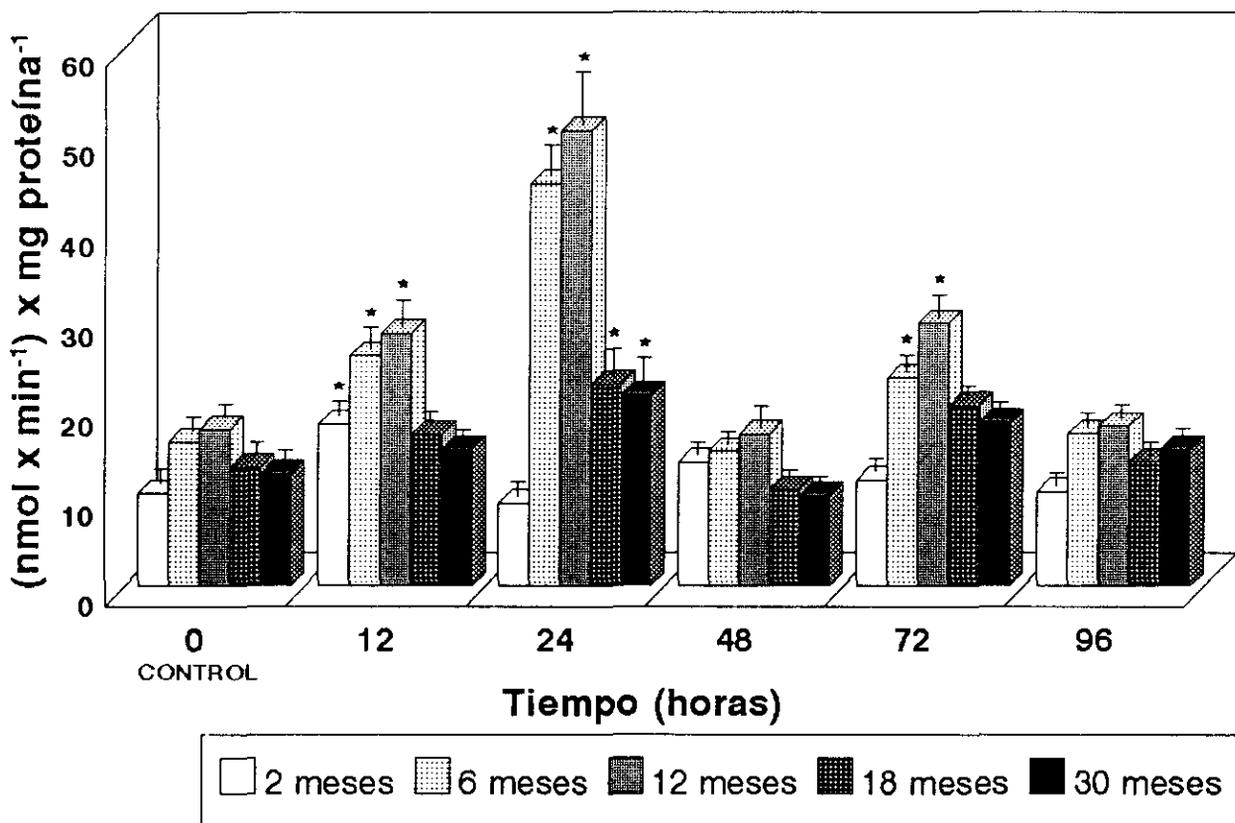


Figura 3.- Actividad de la FAD monooxygenasa en la fracción microsómica de hepatocitos de rata tratados con una dosis subletal de tioacetamida. Los resultados se expresan en $(\text{nmol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

3.2.1.2.- Citocromo P-450, citocromo b₅ y actividades relacionadas

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 b₅ y la citocromo b₅ reductasa. Ambos citocromos y las actividades relacionadas se determinaron en la fracción microsómica obtenida por centrifugación a 105.000 g durante 45 minutos de homogenados de hepatocitos aislados de ratas y congelados en nitrógeno líquido.

En la Tabla 1 se muestran los niveles del citocromo P-450 y citocromo b₅. Los dos citocromos sufren las mismas modificaciones por efecto de la edad de tal modo que, alcanzan un máximo a los 12 meses con valores significativamente elevados, frente a valores registrados a los 2 meses, del 261% ($p < 0,01$) y 234% ($p < 0,01$) respectivamente, para ir disminuyendo progresivamente en las edades más avanzadas. En los animales intoxicados, ambos citocromos alcanzan sus mínimos coincidiendo con el punto de máxima necrosis. Así, en los de 2 meses el mínimo se registra a las 24 horas con valores del 61% ($p < 0,01$) y 61% ($p < 0,01$) para el citocromo P-450 y el citocromo b₅, respectivamente. A partir de los 6 meses y hasta los 30, el mínimo de ambos citocromos se registra a las 48 horas con los descensos más acusados a los 6 (61%; $p < 0,01$ y 51%; $p < 0,01$) y 12 meses (59%; $p < 0,01$ y 52%; $p < 0,01$). A los 18 y 30 meses el descenso no fue significativo en el caso del citocromo P-450 (70% y 69%, respectivamente) y fue significativo en el caso del citocromo b₅ (60%; $p < 0,01$ y 68%; $p < 0,01$). A las 72 y 96 horas de la intoxicación los niveles de estos citocromos se elevaron hacia la normalidad o incluso se superaron los niveles control.

La Tabla 2 muestra las actividades de la citocromo P-450 reductasa NADPH dependiente del NADP⁺ y de la citocromo b₅ reductasa dependiente de NAD⁺, observándose cómo las modificaciones de estas actividades a lo largo de la edad y después de la intoxicación coinciden con las concentraciones de sus respectivos citocromos. Por efecto de la edad, la citocromo P-450 reductasa dependiente del NADP⁺ sufre una elevación progresiva

que a los 12 meses supone un 439% ($p < 0,01$) de la actividad presente a los 2 meses. En edades avanzadas (18 y 30 meses) se registra un brusco descenso hacia los valores de ratas jóvenes. La citromo b_5 reductasa dependiente del NAD^+ sufre variaciones similares por efecto de la edad. Así, a los 12 meses la actividad es un 200% ($p < 0,01$) la correspondiente a los 2 meses, para luego descender en edades posteriores. Las diferencias en esta actividad son menos notables que las de la citocromo P-450 reductasa anteriormente citada.

En animales intoxicados aparecen mínimos en el momento de máxima necrosis. Como el momento de máxima necrosis a los 2 meses se registra a las 24 horas, es en este momento cuando las actividades de estas dos reductasas muestran sus valores más disminuidos: 47% ($p < 0,01$) y 50% ($p < 0,01$) para la reductasa del citocromo P-450 y la citocromo b_5 , respectivamente. A partir de los 6 meses de edad el mínimo de actividad aparece a las 48 horas, con valores significativamente disminuidos frente a sus controles. Así, para la citocromo P-450 reductasa los porcentajes fueron 65% ($p < 0,01$), 60% ($p < 0,01$), 62% ($p < 0,01$) y 57% ($p < 0,01$) a los 6, 12, 18 y 30 meses, respectivamente. En el caso de la citocromo b_5 reductasa los porcentajes de disminución a las 48 horas fueron 57% ($p < 0,01$), 50% ($p < 0,01$), 50% ($p < 0,01$) y 62% ($p < 0,01$), a los 6, 12, 18 y 30 meses, respectivamente.

La disminución paralela de estas actividades enzimáticas así como de los citocromos correspondientes puede explicarse por la heterogénea distribución intraacinar de estos sistemas que se ubican mayoritariamente en la región perivenosa que es la que resulta destruida en el caso de la intoxicación.

Tiempo (horas)	CITOCROMO P-450				
	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
0	262 ± 22	575 ± 50	684 ± 59	455 ± 38	390 ± 38
12	256 ± 22	581 ± 56	676 ± 61	496 ± 39	327 ± 36
24	162 ± 18*	507 ± 29	676 ± 71	451 ± 37	381 ± 22
48	224 ± 17	354 ± 22*	408 ± 47*	321 ± 32	272 ± 20
72	291 ± 22	509 ± 42	658 ± 56	495 ± 47	432 ± 31
96	263 ± 25	623 ± 53	691 ± 62	568 ± 55	487 ± 40

Tiempo (horas)	CITOCROMO b ₅				
	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
0	77 ± 5	160 ± 17	180 ± 18	138 ± 17	113 ± 10
12	90 ± 8	194 ± 17	108 ± 16	155 ± 11	148 ± 12
24	47 ± 5*	204 ± 17	121 ± 16	134 ± 9	113 ± 12
48	66 ± 7	82 ± 6*	95 ± 8*	83 ± 7*	77 ± 5*
72	95 ± 8	169 ± 17	150 ± 17	132 ± 8	127 ± 10
96	102 ± 9	216 ± 19	171 ± 10	163 ± 6	125 ± 10

Tabla 1.- Concentración del citocromo P-450 y citocromo b₅ en la fracción microsómica de hepatocitos de rata tratados con una dosis subletal de tioacetamida. Los resultados se expresan en pmol x mg de proteína⁻¹ del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

Tiempo (horas)	CITOCROMO P-450 REDUCTASA NADP ⁺ DEPENDIENTE				
	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
0	2,3 ± 0,2	6,6 ± 0,5	10,1 ± 0,8	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,3
12	2,4 ± 0,2	6,4 ± 0,6	10,9 ± 1,0	3,0 ± 0,2	2,7 ± 0,3
24	1,1 ± 0,1*	6,2 ± 0,4	10,2 ± 0,9	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,4
48	2,7 ± 0,3	4,3 ± 0,3*	6,0 ± 0,3*	1,8 ± 0,1*	1,5 ± 0,1*
72	2,6 ± 0,4	5,7 ± 0,3	7,8 ± 0,8	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,3
96	2,1 ± 0,2	6,7 ± 0,5	10,4 ± 1,0	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,2

Tiempo (horas)	CITOCROMO b ₅ REDUCTASA NAD ⁺ DEPENDIENTE				
	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
0	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
12	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2
24	0,3 ± 0,1*	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
48	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*	0,4* ± 0,2	0,5 ± 0,1*
72	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2
96	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Tabla 2.- Actividad de la citocromo P-450 reductasa NADP dependiente y la citocromo b₅ reductasa NAD dependiente en la fracción microsómica de hepatocitos de rata tratados con una dosis subletal de tioacetamida. Los resultados se expresan en (nmol x min⁻¹) x mg de proteína⁻¹ del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

3.2.2.- Estrés oxidativo: metabolitos y actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo redox GSH/GSSG

En este apartado se exponen las modificaciones sufridas a lo largo de la edad, en el ciclo de detoxificación del glutatión, así como las variaciones que se derivan de la intoxicación en el proceso de eliminación de las especies reactivas formadas y de los productos de la peroxidación. Se incluyen determinaciones de metabolitos como el glutatión, los grupos tiólicos proteicos y el malondialdehído así como, las actividades enzimáticas siguientes: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutatión-S-transferasa en hepatocitos de ratas de 2, 6, 12, 18 y 30 meses tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg).

Estos parámetros hepáticos son muy útiles a la hora de diagnosticar lesiones hepáticas. El cociente GSH/GSSG es un índice del estado de oxidación celular y un descenso del mismo puede desembocar en una alteración de los grupos tiólicos proteicos. La concentración de malondialdehído indica el grado de peroxidación lipídica originado en el proceso hepatotóxico y la elevación de su nivel deriva de la desintegración y ruptura de las membranas celulares.

El anión superóxido que se genera bien de manera espontánea a lo largo de la edad o bien, en distintos procesos biológicos de detoxificación, se elimina de la célula por la acción de la superóxido dismutasa que lo convierte en peróxido de hidrógeno. La glutatión peroxidasa es el enzima encargado de eliminar peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos. En la eliminación de peróxidos inorgánicos como es el caso del peróxido de hidrógeno, interviene también la catalasa. La glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa son enzimas que utilizan como sustratos el GSSG y GSH, respectivamente; por lo que juegan un papel decisivo en el mantenimiento del cociente GSH/GSSG, siempre que exista un aporte de equivalentes reductores NADPH, generado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de glucosa 6-fosfato y NADP⁺.

3.2.2.1.- Glutation reducido y estado redox GSH/GSSG.

Las reacciones de detoxificación consumen el GSH hepático a la vez que promueven una activación compensatoria de la síntesis del GSH. Sin embargo, en caso de intoxicación masiva, la velocidad de consumo del GSH en hígado puede sobrepasar la de su síntesis y ello originará un agotamiento del glutatión hepático. Esto trae consigo una pérdida de los grupos tiólicos de las proteínas debido a su reacción con los metabolitos tóxicos, lo cual causará alteraciones en las funciones de dichas proteínas. Se ha determinado el glutatión reducido y el cociente GSH/GSSG y los resultados se muestran en la Figura 4.

La concentración de glutatión reducido en los animales control sufre un descenso progresivo a medida que transcurre la edad alcanzando a los 30 meses valores del 64% ($p < 0,01$). En el proceso de intoxicación, el mínimo de GSH se alcanza en todas las edades en el momento de máxima necrosis, con valores del 57% ($p < 0,01$) a las 12 horas de la intoxicación en animales de 2 meses y próximo al 35% ($p < 0,01$) a las 24 horas en el resto de las edades. Posteriormente, los valores tienden a la normalidad excepto en el caso de animales de 18 y 30 meses donde a las 96 horas aún no se han recuperado los niveles de glutatión que, se mantienen semejantes a los de los momentos de máxima necrosis (57%; $p < 0,01$ y 59%; $p < 0,01$, respectivamente).

Respecto al cociente GSH/GSSG, como parámetro indicativo del estado redox celular, las variaciones son semejantes a las acontecidas en los niveles de glutatión reducido. En el transcurso de la edad se produce una evolución semejante a la observada en el GSH ya que las ratas de 30 meses muestran valores del 62% ($p < 0,01$) respecto al control de 2 meses. Después de la intoxicación se alcanza el mínimo en el punto de máxima necrosis, con valores entre el 50% ($p < 0,01$) y 60% ($p < 0,01$), para luego volver a la normalidad en ratas de 2, 6 y 12 meses, mientras que las ratas de 18 y 30 meses mantienen sus bajos niveles de nuevo semejantes a los de máxima necrosis. Todos los grupos sufren pues, una situación de estrés oxidativo que sólo se recupera en las ratas de edades inferiores.

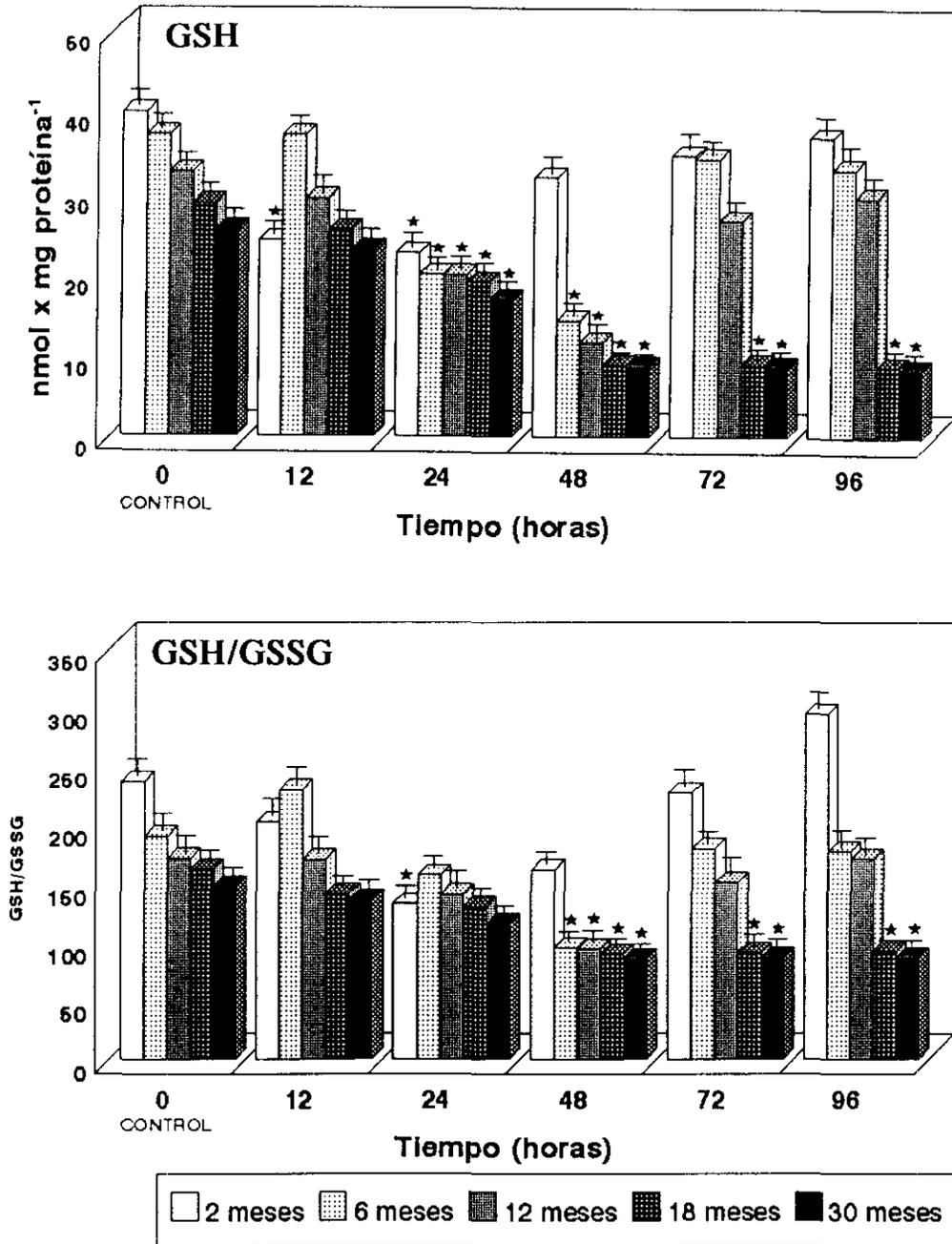


Figura 4.- Concentración de GSH y cociente GSH/GSSG en extractos de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg). Los resultados se expresan en nmol x mg proteína⁻¹ cuando se refiere al GSH y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01). GSH = Glutation reducido; GSH/GSSG = Cociente GSH/GSSG.

3.2.2.2.- Niveles de grupos tiólicos proteicos

Ya hemos comentado anteriormente como en el caso de que se produzca un agotamiento del glutatión intracelular, los radicales libres electrofílicos van a reaccionar con los grupos tiólicos de las proteínas. En la Figura 5 puede observarse que los controles muestran por efecto de la edad un descenso progresivo en los niveles de grupos tiólicos proteicos alcanzando a los 30 meses un 54% ($p < 0,01$) del registrado a los 2 meses. Durante la administración del hepatotóxico se alcanzan los mínimos coincidiendo con la máxima necrosis con niveles del 30% ($p < 0,01$) y 40% ($p < 0,01$). A diferencia del glutatión donde el descenso era progresivo y comenzaba a las 12 horas, los grupos tiólicos de las proteínas permanecen inalterables hasta las 12 horas mostrando su descenso a partir de las 24 horas de la intoxicación. Esto es lógico ya que, primero se agota el glutatión como barrera defensiva primaria y luego se ven implicados los grupos tiólicos proteicos. Del mismo modo que ocurre con el glutatión, no se aprecia recuperación en los grupos tiólicos proteicos en las edades avanzadas de 18 y 30 meses permaneciendo a las 96 horas niveles semejantes a los alcanzados durante la necrosis.

3.2.2.3.- Concentración de malondialdehído

El malondialdehído es un producto resultante de la ruptura de las membranas por peroxidación lipídica, por tanto, su determinación proporciona un índice de dicha lesión producida por los intermediarios reactivos originados. Como se muestra en la Figura 6, la peroxidación lipídica que sufren los hepatocitos a medida que transcurre la edad se detecta por el incremento en los niveles de malondialdehído que a los 30 meses de edad alcanza valores del 152% ($p < 0,01$). Frente al proceso de intoxicación se observa un brusco incremento a las 48 horas en edades de 6 a 30 meses con valores del 293% ($p < 0,01$), 244% ($p < 0,01$), 202% ($p < 0,01$) y 241% ($p < 0,01$), respectivamente que se mantienen hasta las 72 horas. A las 96 horas los animales de 2, 6 y 12 meses vuelven a la normalidad mientras que los de edades más avanzadas (18 y 30 meses) presentan todavía niveles elevados (150%; $p < 0,01$ y 160%; $p < 0,01$, respectivamente). A los 2 meses el máximo se registra a las 24 horas (189%; $p < 0,01$) pero con valores inferiores a los de las 48 horas del resto.

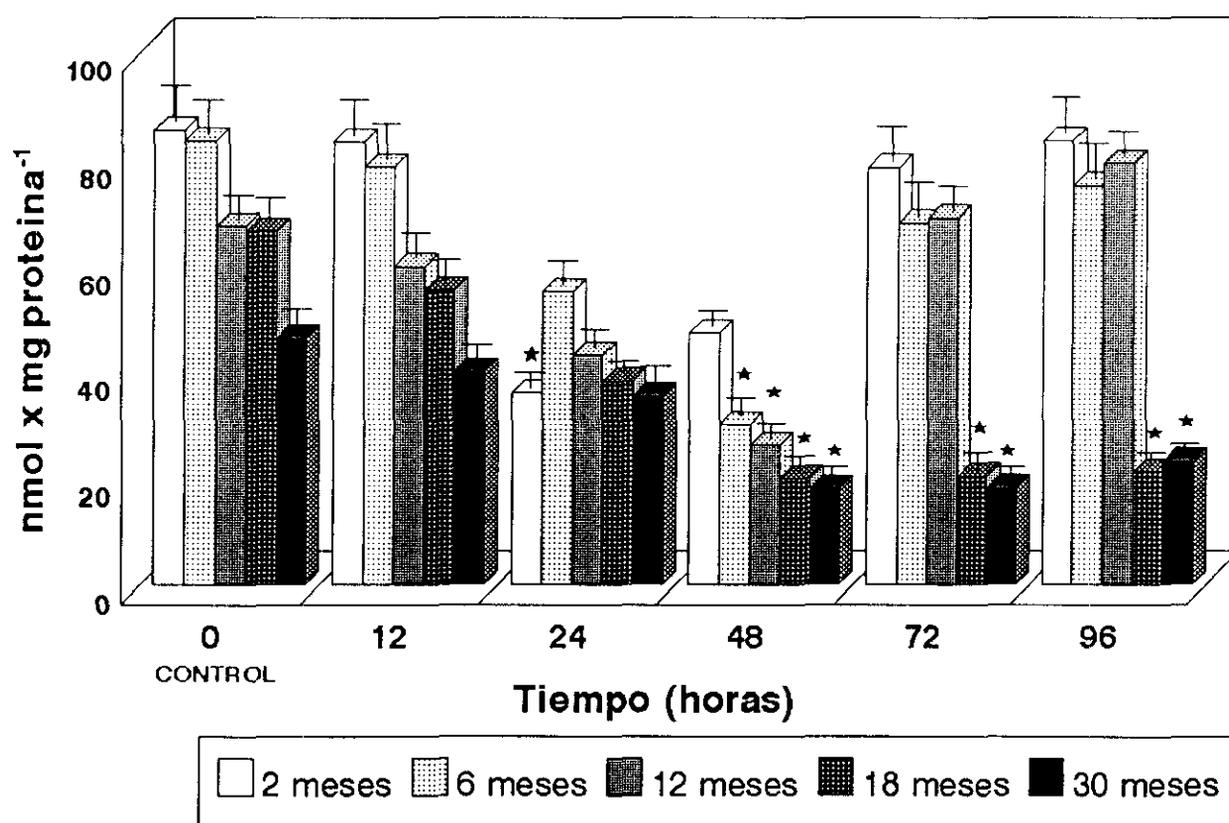


Figura 5.- Concentración de los grupos tiólicos proteicos en extractos de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en nmol x mg proteína⁻¹ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p<0,01).

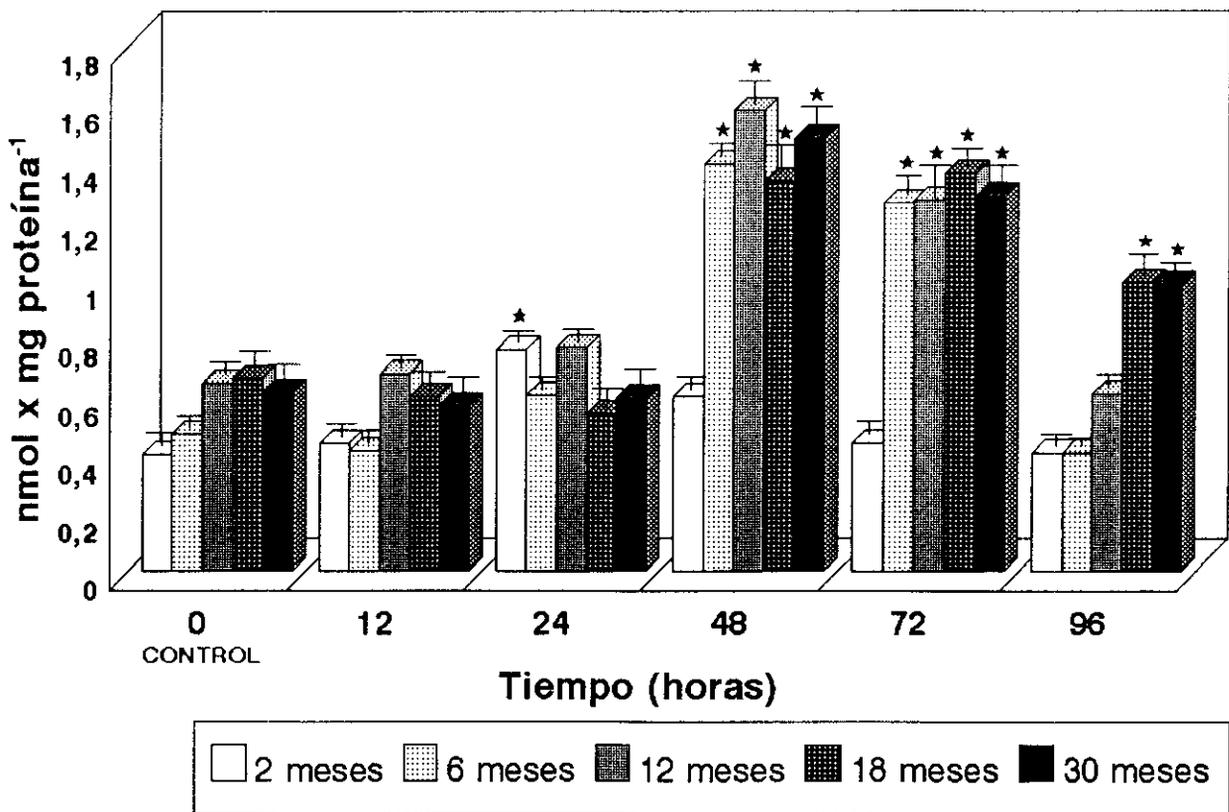


Figura 6.- Concentración de malondialdehído en extractos de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en nmol x mg proteína⁻¹ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

3.2.2.4.- Actividad de la glutathion S-transferasa

La importancia de las reacciones catalizadas por las glutathion S-transferasas se basan en que el grupo -SH del glutathion proporciona los electrones para el ataque del sustrato electrofílico, en este caso un metabolito reactivo derivado de la tioacetamida. La elevación de la actividad de la glutathion S-transferasa en caso de intoxicación puede ser una de las causas de la depleción del glutathion.

En la Figura 7 vemos cómo en los controles a medida que transcurre la edad se observa una cierta tendencia a la elevación, si bien estas modificaciones no son significativas. En el caso de los animales intoxicados, la actividad de este enzima alcanza un máximo que coincide con el momento de máxima necrosis para luego restablecer sus niveles basales, siendo este incremento más acusado en las ratas de edades intermedias, concretamente en las ratas de 6 meses con valores del 340% ($p < 0,01$) y en las de 12 meses con un 261% ($p < 0,01$). En el resto de los grupos se alcanzan valores próximos al 140% que resultan significativos sólo en el caso de los animales jóvenes de 2 meses (189%; $p < 0,01$).

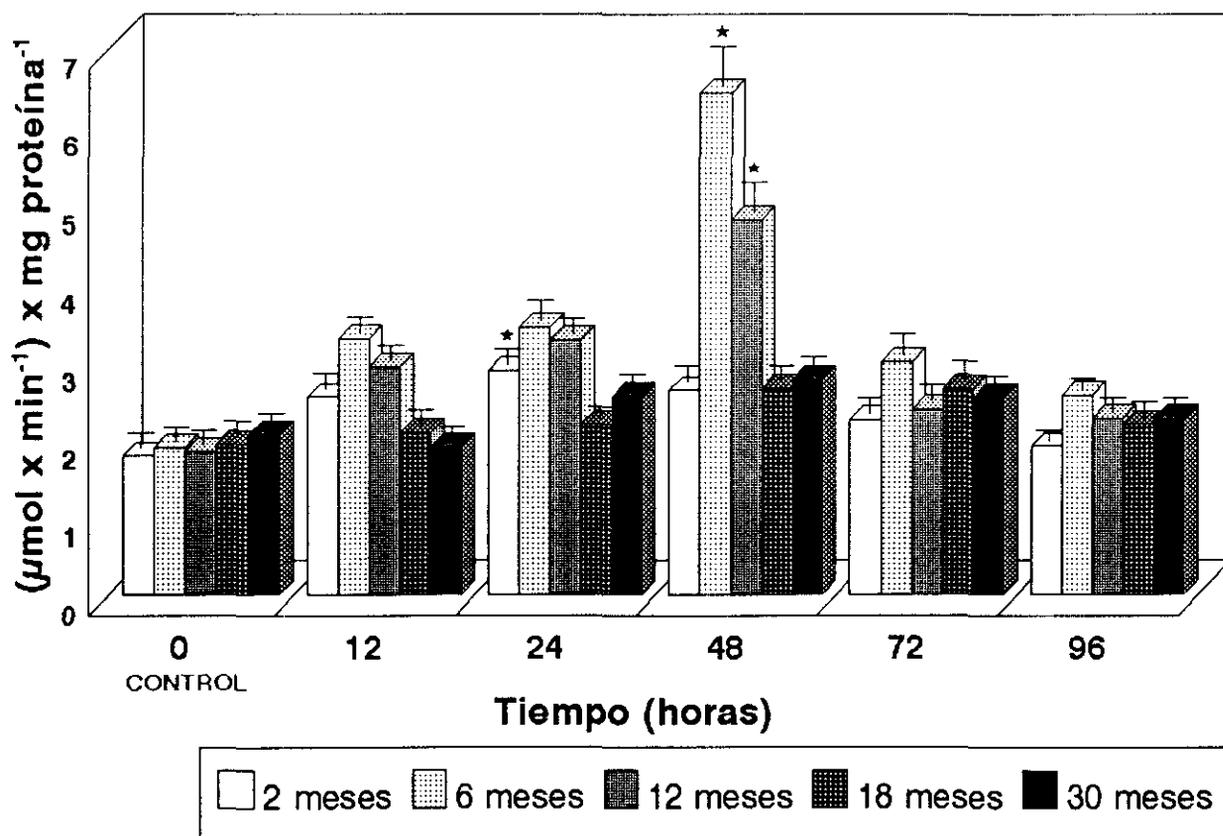


Figura 7.- Actividad de la glutatión S-transferasa en la fracción soluble de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en $(\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{mg} \text{proteína}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa ($*p < 0,01$).

3.2.2.5.- Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa es el enzima que transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Su actuación unida a la de la catalasa o a la de la glutatión peroxidasa, evita la formación del radical hidróxido $\cdot\text{OH}$ y con ello las lesiones generadas por este radical a nivel de las macromoléculas celulares. Este enzima presenta dos isoformas con diferentes características y distribuciones, la Cu-Zn SOD citoplasmática, sensible a cianuro y la Mn SOD mitocondrial insensible a cianuro. Ambos enzimas se incluyen dentro del grupo de los sistemas antioxidantes endógenos.

La Figura 8 muestra como la actividad de las dos isoformas evoluciona de manera semejante a lo largo de la edad aumentando progresivamente hasta alcanzar valores en torno al 140% ($p < 0,01$) a los 30 meses. Sin embargo, en el proceso de intoxicación, ambas alcanzan un mínimo significativo próximo al 20% ($p < 0,01$) del valor inicial, que coincide con el punto de máxima necrosis, debido a la localización perivenosa de estos enzimas en el acino hepático. En el caso de la Mn SOD de localización mitocondrial se registra una elevación previa que en todos los grupos, excepto en el de 2 meses, supera el 120%. A los 2 meses, el descenso ocurre a las 24 horas y la recuperación se inicia a las 48 horas que, es el momento de menor actividad en las edades comprendidas entre los 6 y 30 meses. Posteriormente, durante el proceso de regeneración, la actividad de la Mn SOD de todos los grupos alcanza valores próximos a la normalidad, mientras que en el caso de la Cu-Zn SOD en edades avanzadas no.

Las Figuras 9 y 10 muestran los niveles del transcrito de la SOD Mn y SOD Cu-Zn, respectivamente, reflejándose en ellos las modificaciones observadas en las correspondientes actividades enzimáticas con valores mínimos que oscilan entre el 5 ($p < 0,01$) y el 20% ($p < 0,01$) en el punto de máxima necrosis. En el caso de la Mn SOD aparece de nuevo una inducción previa que tan sólo alcanza valores significativos en el caso de los animales de 2 a 12 meses. Del mismo modo durante la regeneración, los valores tienden a la normalidad en todas las edades estudiadas.

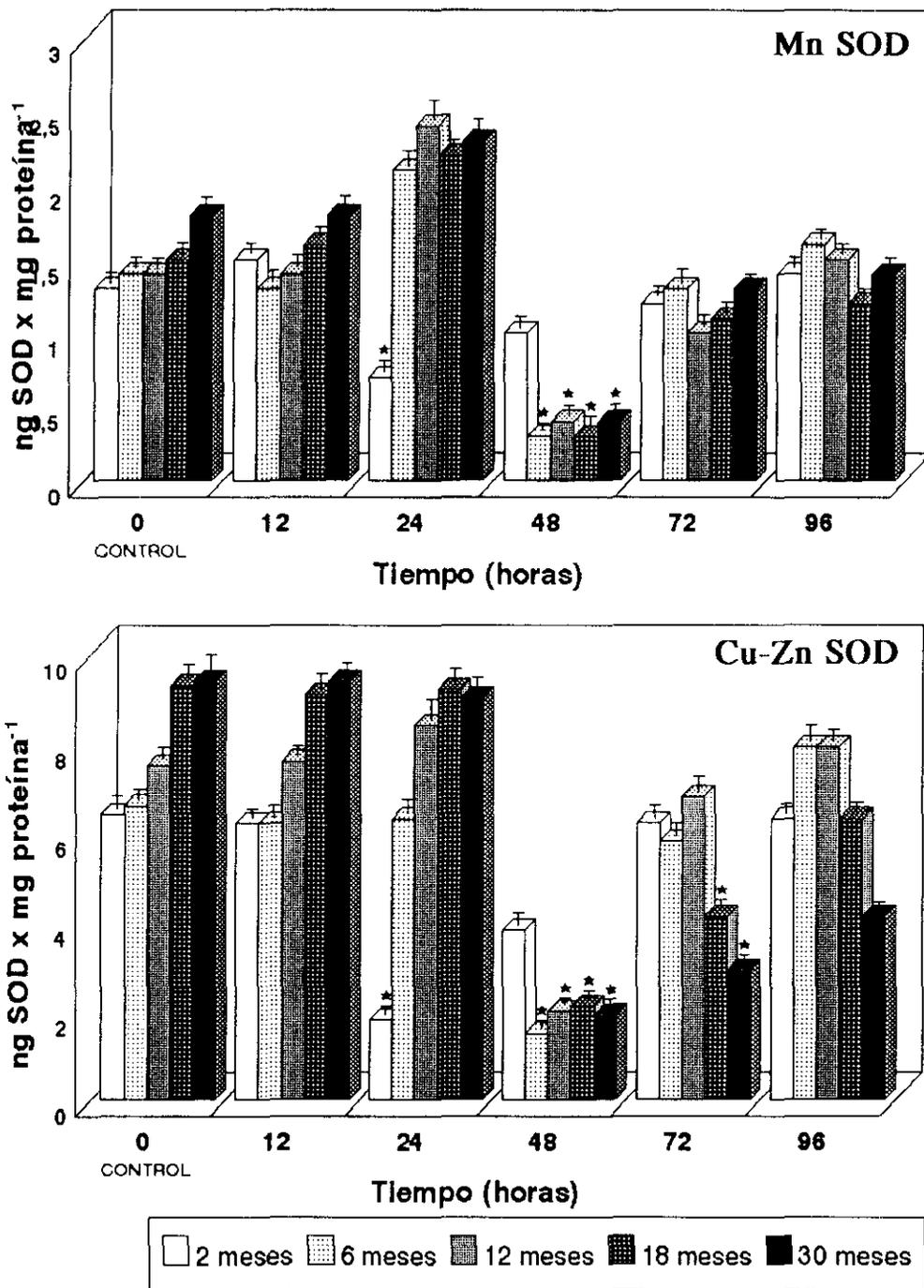


Figura 8.- Actividades de la superóxido dismutasa de Mn y la superóxido dismutasa de Cu-Zn en homogenado de hepatocitos (soluble + microsomas) de ratas tratados con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en ng de SOD x mg proteína⁻¹ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

Mn SOD = SOD mitocondrial; Cu-Zn SOD = SOD citosólica

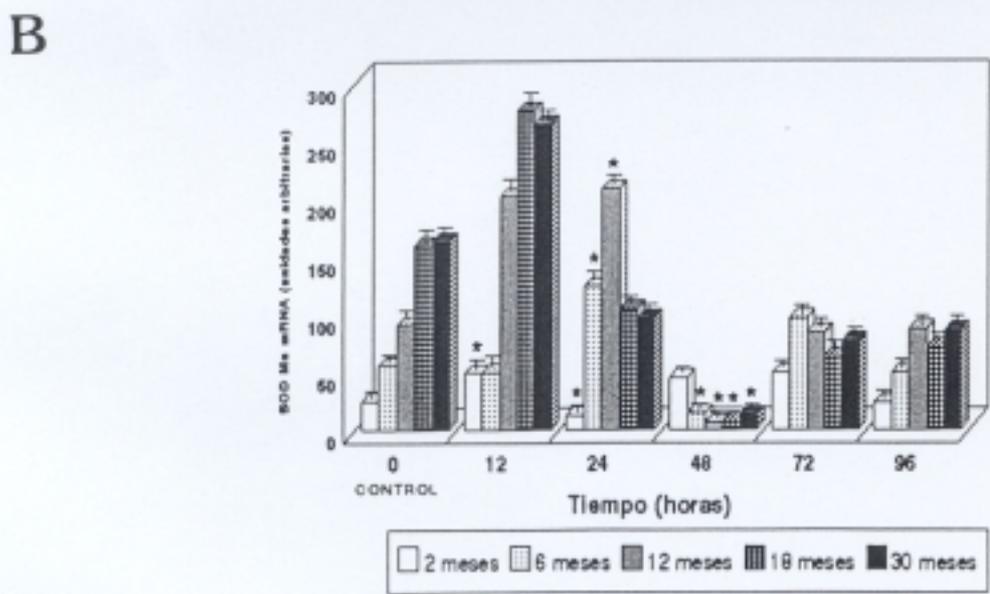
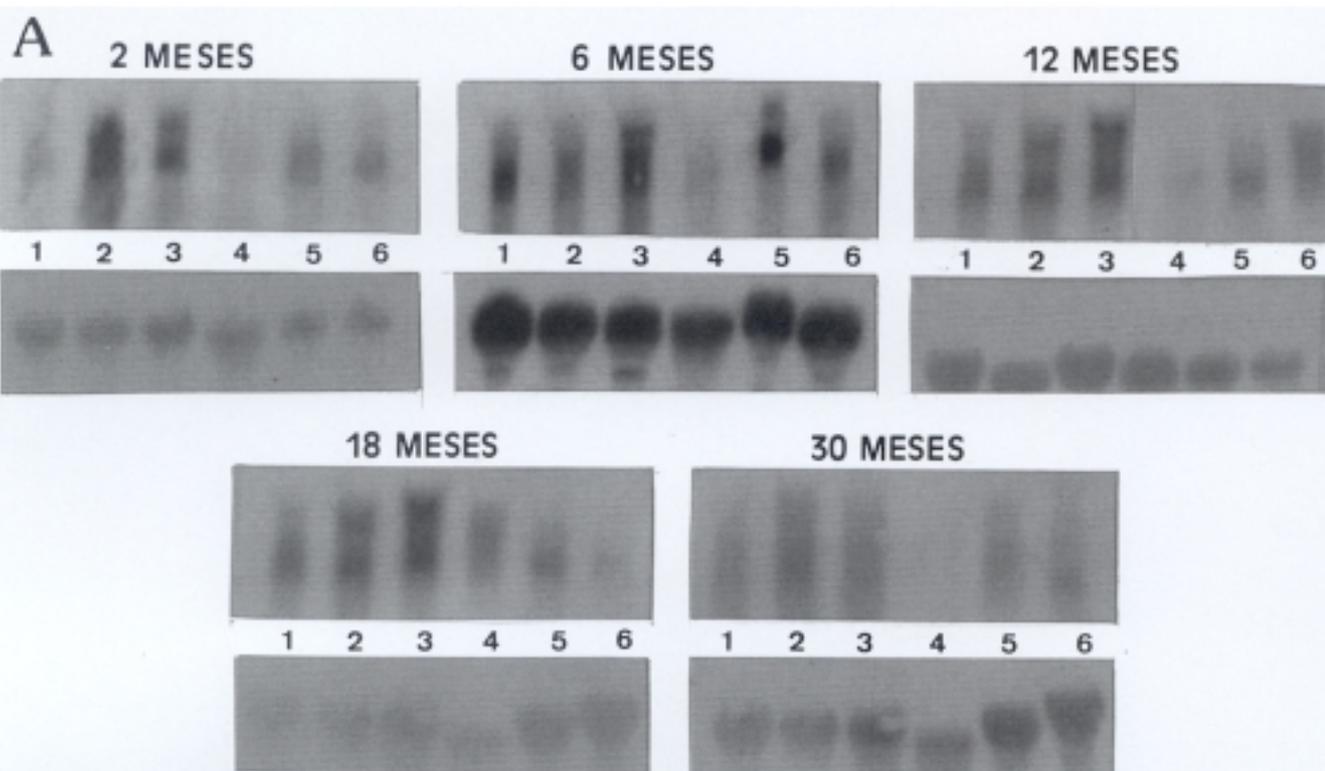
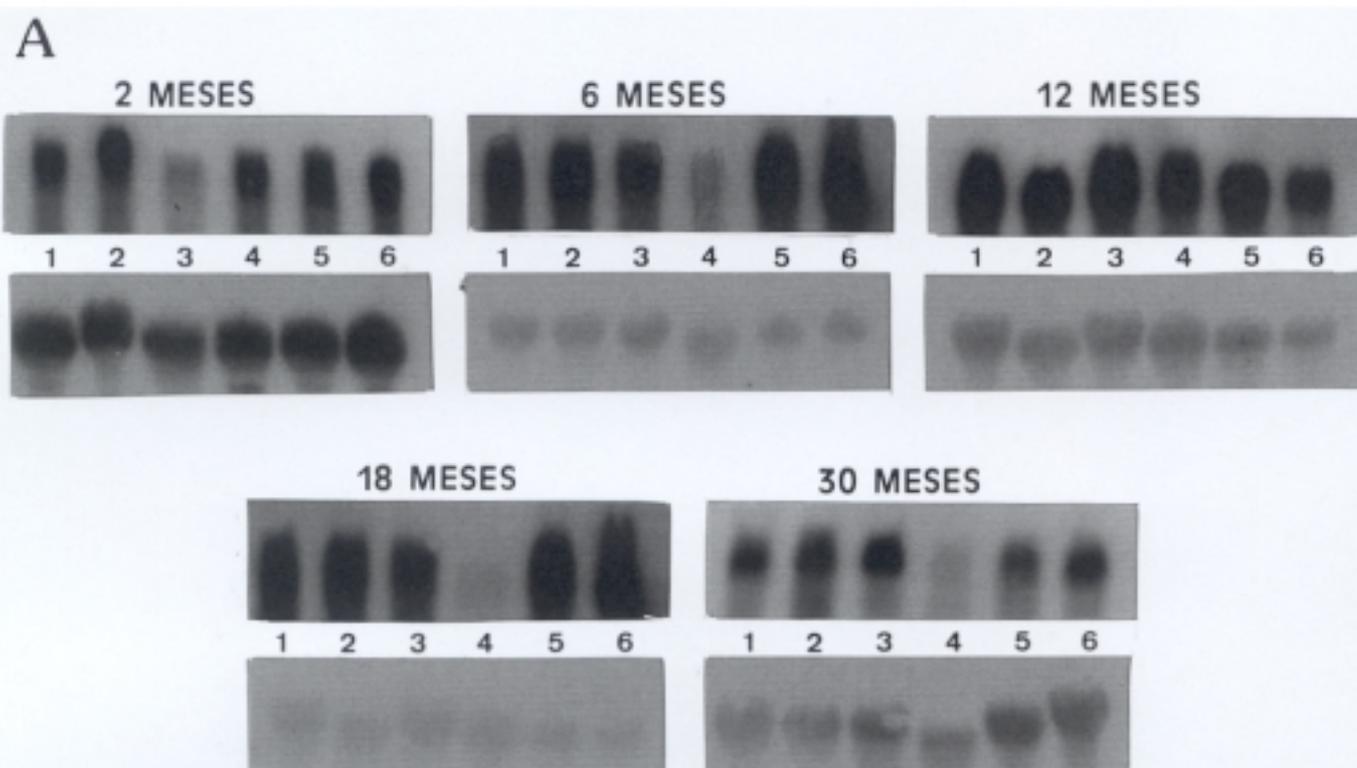


Figura 9.- Análisis por Northern blot del mRNA de la SOD Mn en hepatocitos de rata durante la administración subletal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg). El panel A muestra unos northern blot representativos, de cuatro experimentos diferentes, de 30 µg de RNA total hibridados con el cDNA de la SOD Mn marcado con α-³²P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18 S. (1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente). En el panel B se muestran las cuantificaciones de dichos mRNAs. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).



B

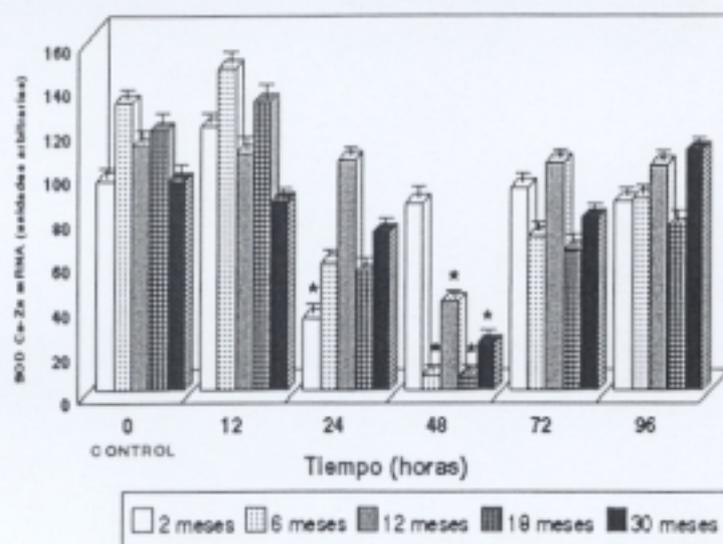


Figura 10.- Análisis por Northern blot del mRNA de la SOD Cu-Zn en hepatocitos de rata durante la administración subletal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg). El panel A muestra unos northern blot representativos, de cuatro experimentos diferentes, de 30 μ g de RNA total hibridados con el cDNA de la SOD Cu-Zn marcado con α - 32 P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18 S. (1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente). En el panel B se muestran las cuantificaciones de dichos mRNAs. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

3.2.2.6.- Catalasa

La catalasa es el enzima que elimina peróxido de hidrógeno con producción de oxígeno molecular y agua. Este enzima actúa exclusivamente a nivel citosólico, a diferencia de la glutation peroxidasa, cuya actividad se localiza en citosol y en mitocondria.

La Figura 11 muestra la actividad enzimática de la catalasa que a lo largo de la edad tiende a incrementarse progresivamente mostrando a los 30 meses un 169% ($p < 0,01$) del valor registrado a los 2 meses. Durante el proceso de intoxicación, la actividad de la catalasa alcanzó valores mínimos en los momentos de máxima necrosis, con valores próximos al 10% ($p < 0,01$), para luego ascender lentamente hacia la normalidad. Sin embargo, en los animales de 18 y 30 meses esta tendencia fue mucho más lenta ya que, no se llegó a superar el 60% ($p < 0,01$) de la actividad control.

Estos resultados de actividad enzimática son corroborados por los niveles de mRNA (Figura 12) ya que con ellos se comprueba que a medida que transcurre la edad se eleva la expresión de este enzima (338%; $p < 0,01$, en animales de 30 meses). Por efecto de la intoxicación se detecta un descenso en el punto de máxima necrosis con valores cercanos al 5% ($p < 0,01$) en todas las edades estudiadas. Cabe destacar el hecho de que en las ratas de 30 meses, la expresión se mantiene todavía con valores significativos da tan sólo un 10% ($p < 0,01$) a las 72 horas de la intoxicación.

Tanto la actividad de la catalasa como la expresión de su transcrito disminuyen notablemente debido probablemente a su localización en la zona perivenosa del acino hepático, al igual que las dos isoformas de la superóxido dismutasa estudiadas anteriormente.

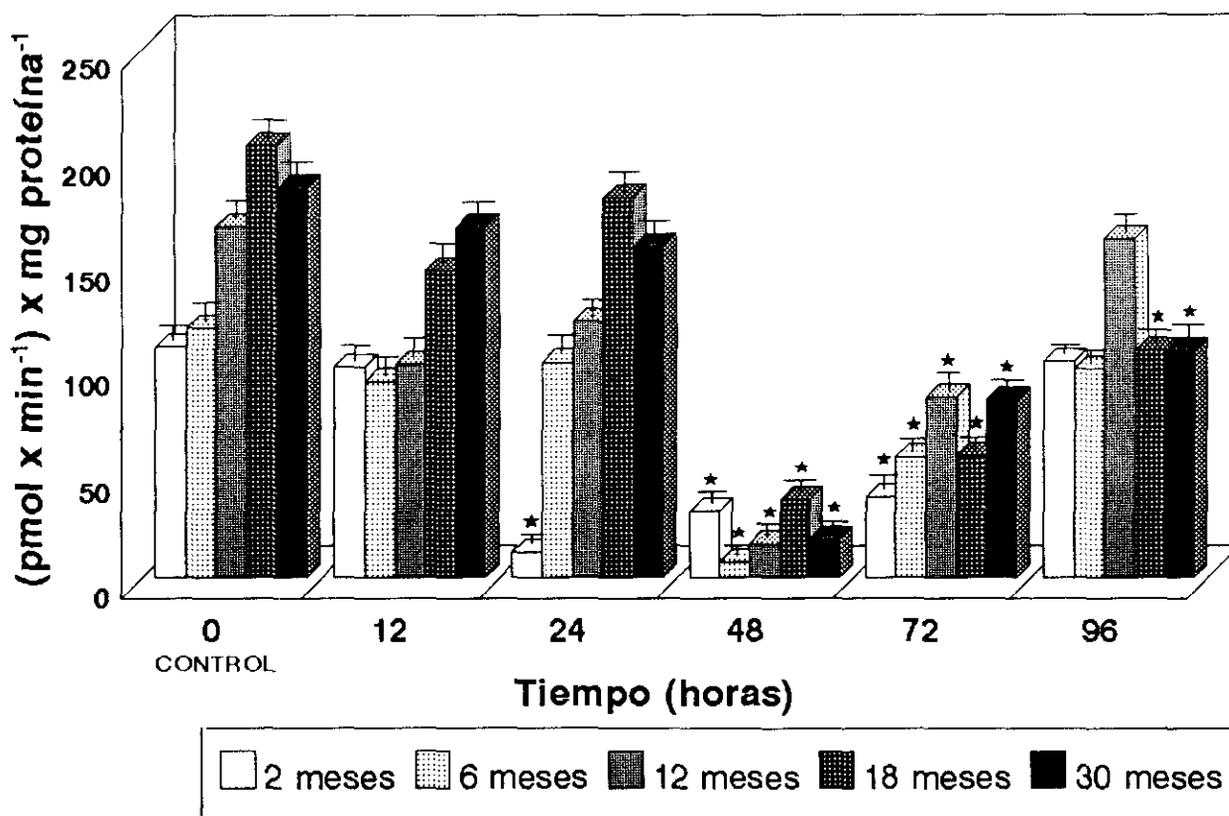


Figura 11.- Actividad de la catalasa en fracción soluble de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en $\mu\text{Us} \times \text{mg de proteína}^{-1}$, considerando una unidad la cantidad de enzima que transforma $1 \mu\text{mol}$ de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

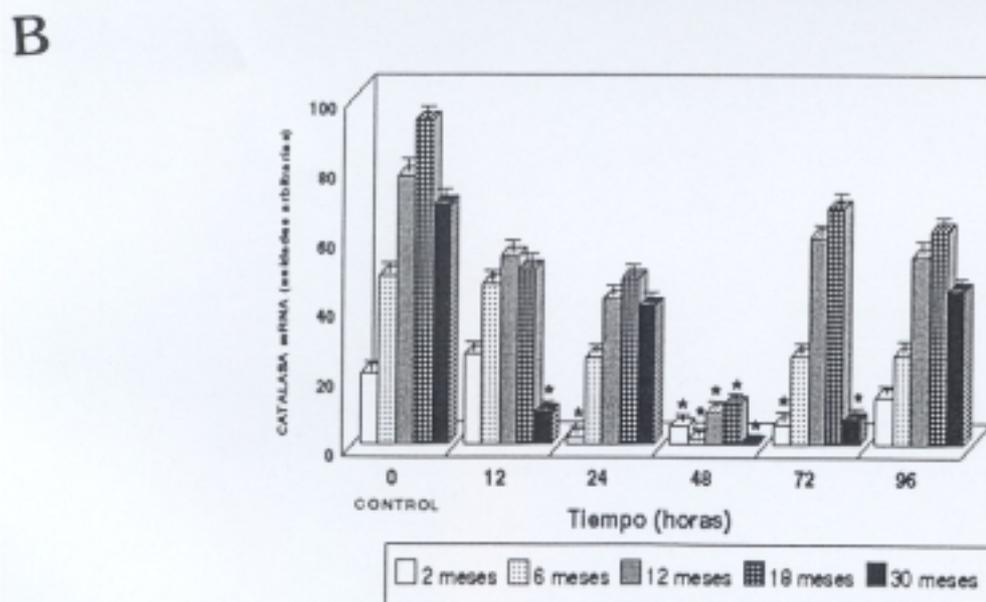
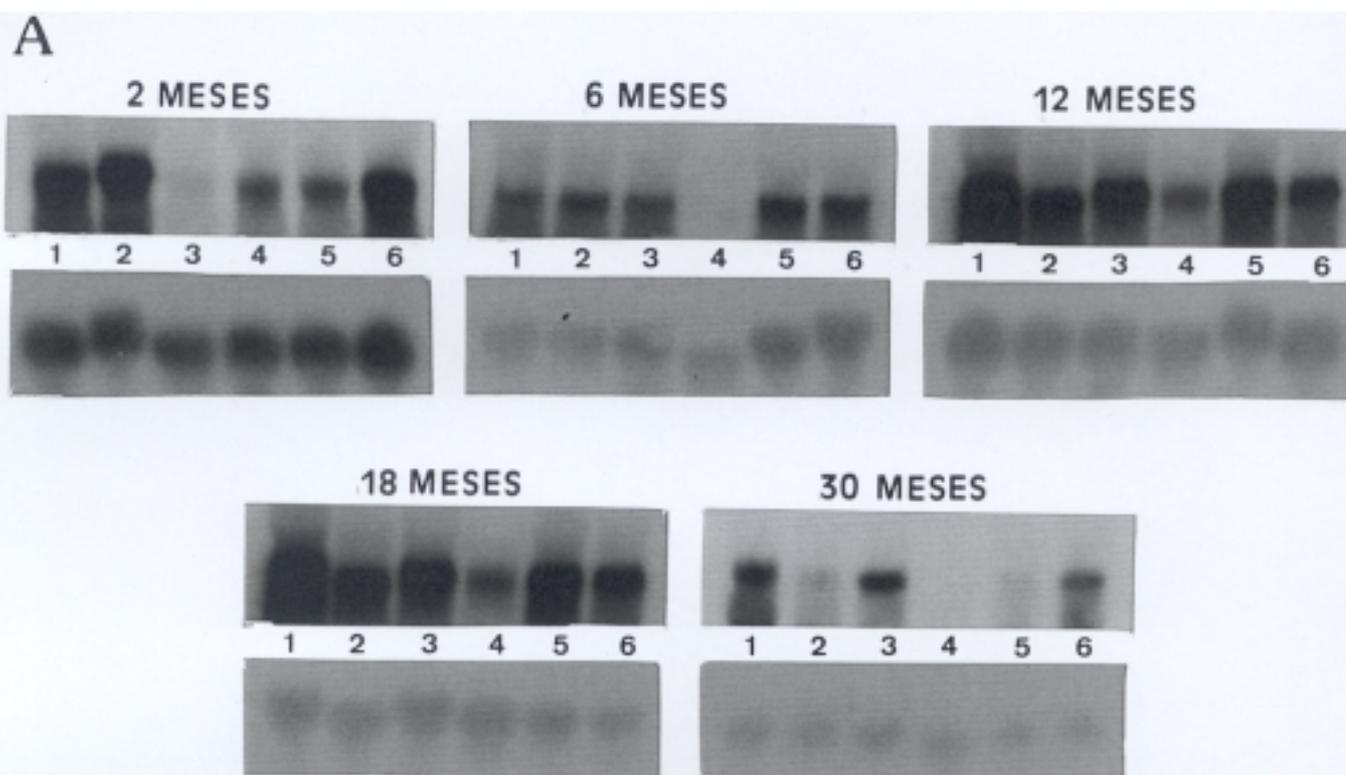


Figura 12.- Análisis por Northern blot del mRNA de la catalasa en hepatocitos de rata durante la administración subletal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg). El panel A muestra unos northern blot representativos, de cuatro experimentos diferentes, de 30 µg de RNA total hibridados con el cDNA de la catalasa marcada con α - 32 P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18 S. (1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente). En el panel B se muestran las cuantificaciones de dichos mRNAs. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

3.2.2.7.- Glutation peroxidasa

La glutacion peroxidasa junto con la catalasa, son los enzimas encargados de eliminar los peróxidos existentes en el medio, si bien la glutacion peroxidasa no sólo elimina peróxidos inorgánicos sino también orgánicos, de ello deriva que sea un enzima limitante en el ciclo redox del glutacion. En esta reacción enzimática, el GSH se oxida a GSSG.

La actividad de la glutacion peroxidasa, Figura 13, se eleva progresivamente a medida que transcurre la edad alcanzando valores de un 210% ($p < 0,01$) a los 30 meses. En el caso de los animales intoxicados las variaciones son semejantes en todas las edades estudiadas ya que alcanzan un máximo en el punto de máxima necrosis que se mantiene aunque no en tan elevada proporción durante la regeneración hepática. Estos incrementos, sin embargo, son más acusados en los animales de 6 y 12 meses con valores del 379% ($p < 0,01$) y 320% ($p < 0,01$), respectivamente frente a valores del 197% en los animales de 2 meses y valores de un 257% ($p < 0,01$) y 207% ($p < 0,01$) a los 18 y 30 meses, respectivamente. Al final del período estudiado todos los grupos recuperan los valores iniciales.

La Figura 14 muestra un Northern-blot representativo de cuatro experimentos diferentes. En ella podemos distinguir como en el punto de máxima necrosis se induce la expresión del enzima que tan sólo alcanza valores significativos en los animales de 6 meses (200%; $p < 0,01$) frente al 143%, 179%, 129% y 118% de los animales de 2, 12, 18 y 30 meses, respectivamente. A partir de este momento la expresión génica desciende progresivamente hasta el final del período estudiado.

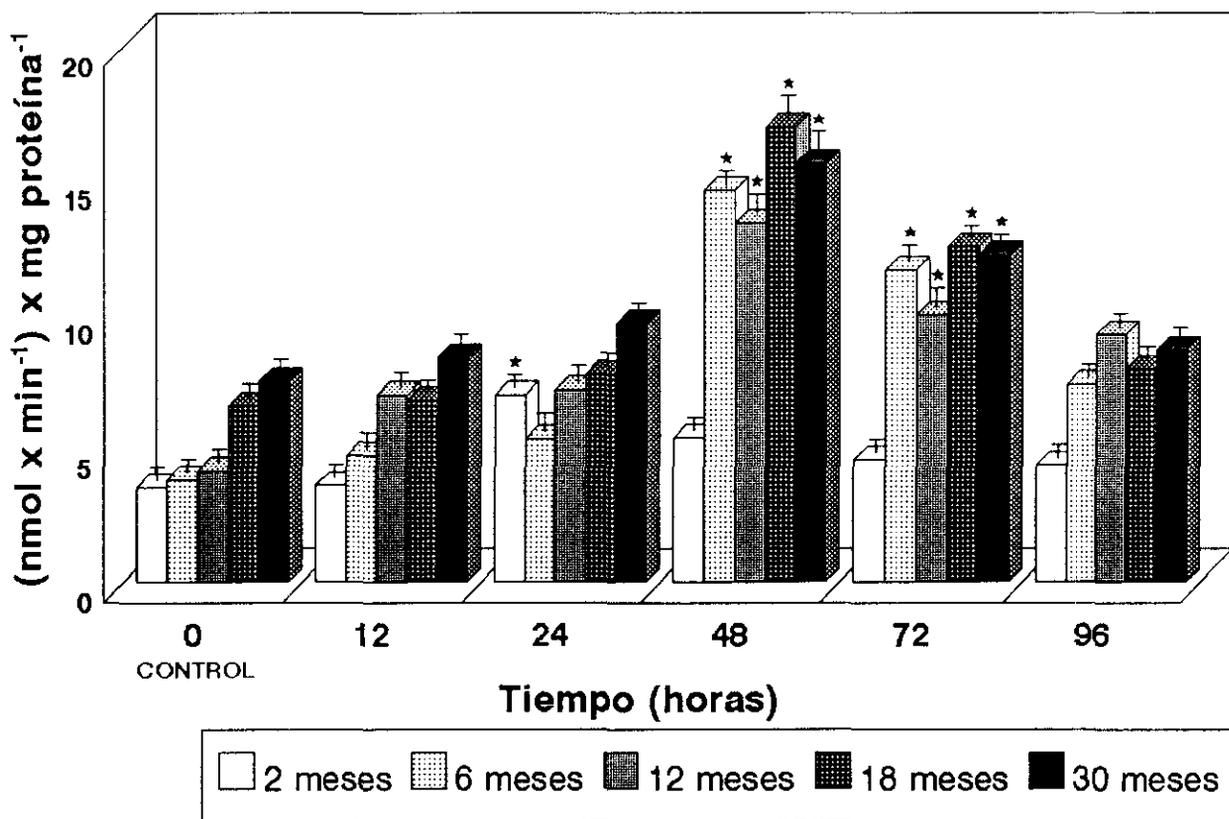
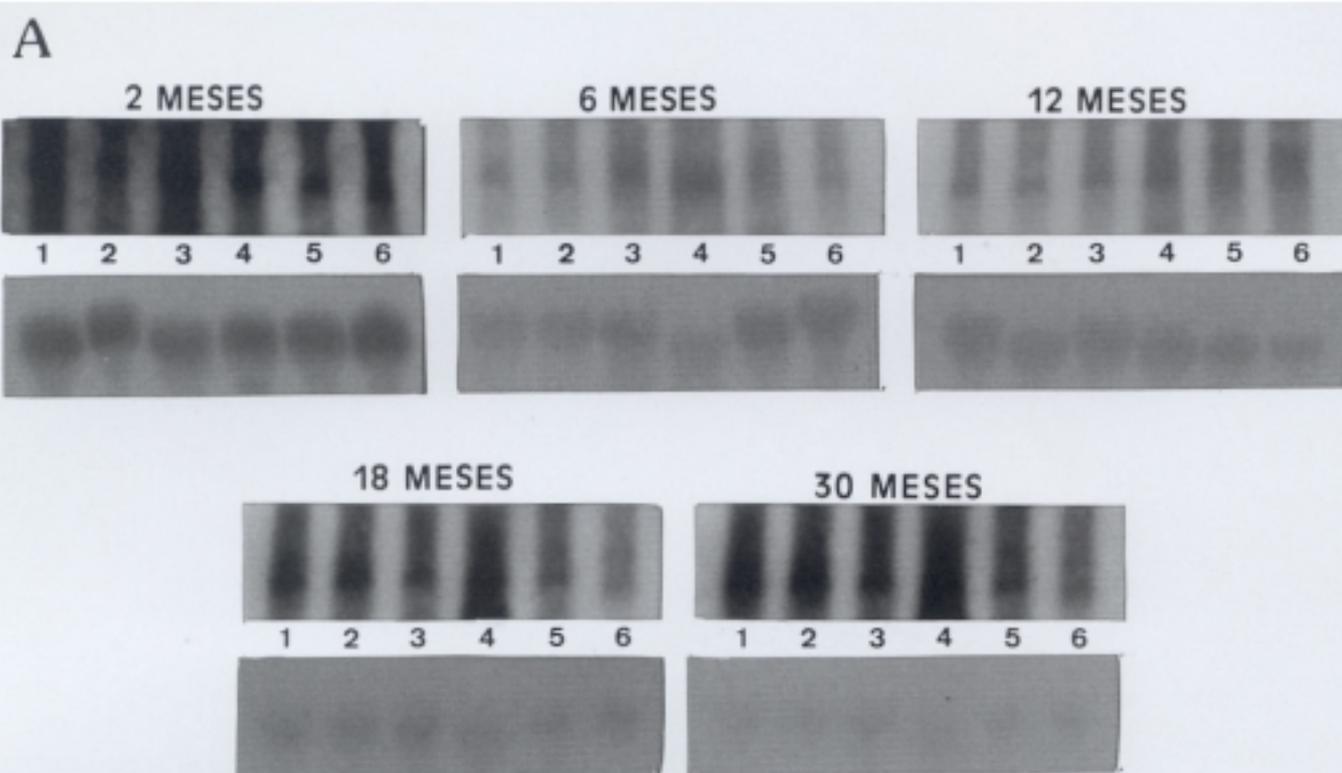


Figura 13.- Actividad de la glutatión peroxidasa en la fracción soluble de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en $(\text{nmol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{mg de proteína}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).



B

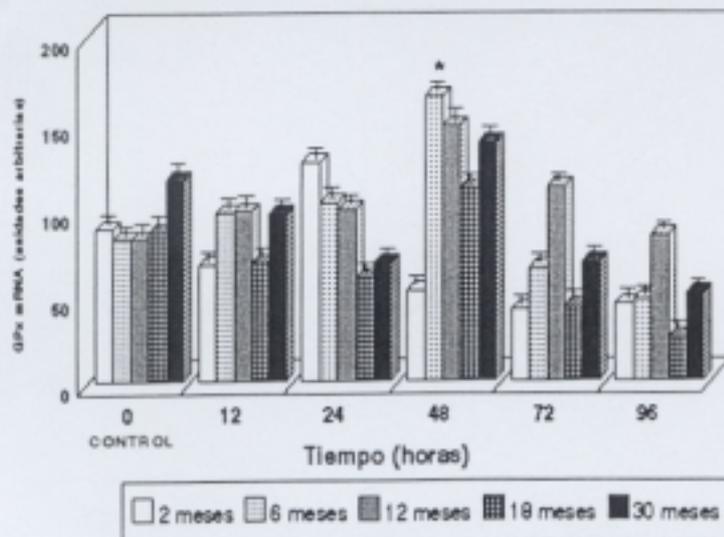


Figura 14.- Análisis por Northern blot del mRNA de la glutación peroxidasa en hepatocitos de rata durante la administración subletal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg). El panel A muestra unos northern blot representativos, de cuatro experimentos diferentes, de 30 μ g de RNA total hibridados con el cDNA de la glutación peroxidasa marcado con α - 32 P utilizando como sonda de normalización el rRNA 18 S. (1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente). En el panel B se muestran las cuantificaciones de dichos mRNAs. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

3.2.2.8.- Glutation reductasa

Este enzima consume NADPH y regenera el glutatión en su forma reducida (GSH) siendo, por ello, una pieza clave en el ciclo de detoxificación dependiente del par GSH/GSSG. La actividad de este enzima (Figura 15) al igual que en el caso de la glutatión peroxidasa, se incrementa progresivamente a medida que transcurre la edad alcanzando valores del 255% ($p < 0,01$) al final del período estudiado (30 meses). En cuanto a los animales intoxicados se produce un claro incremento en el punto de máxima regeneración para luego tender hacia la normalidad. Los valores máximos se producen a los 6 y 12 meses con valores del 400% ($p < 0,01$) a las 72 horas de la intoxicación frente a valores que, en el resto de los casos, no resultan significativos. Sin embargo, a las 96 horas, tan sólo los animales de 6 y 12 meses muestran valores significativamente elevados, aunque inferiores en magnitud a los alcanzados a las 72 horas. A los 2 meses la actividad de la glutatión reductasa se eleva débilmente después de la intoxicación hasta las 48 horas (184%; $p < 0,01$), mostrando una vez más que las variaciones producidas por el hepatotóxico en ratas jóvenes precede en 24 horas a las que aparecen en edades superiores siendo la intensidad de las alteraciones siempre menor.

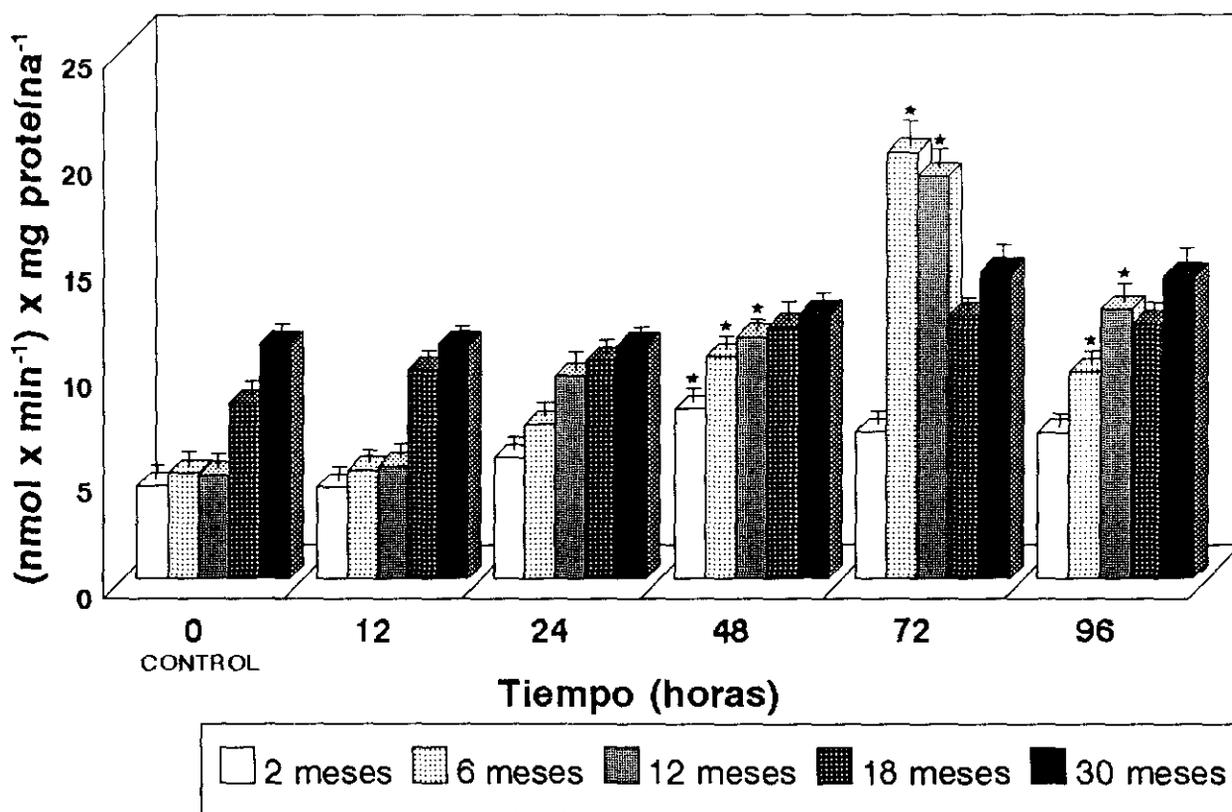


Figura 15.- Actividad de la glutatión reductasa en la fracción soluble de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg). Los resultados se expresan en $(\text{nmol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{mg de protefna}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

3.2.2.9.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es el primer enzima del ciclo de las pentosas fosfato cuya actividad se induce en condiciones fisiológicas en las que se requiere NADPH, como son la lipogénesis, la síntesis de ácidos nucleicos y los procesos de desintoxicación. Su capacidad de generar NADPH le hace actuar de manera concertada con la glutathion reductasa.

En la Figura 16 se muestran las variaciones en la actividad de este enzima. En los controles sin tratamiento tóxico se registra un incremento progresivo con la edad alcanzando a los 30 meses valores del 206% ($p < 0,01$). Con la tioacetamida produce un incremento significativo en el momento de máxima regeneración. Los valores de actividad superiores se registran a las 72 horas en los animales de 6 meses y un año (1715%; $p < 0,01$ y 1469%; $p < 0,01$, respectivamente) frente a los máximos de 612 ($p < 0,01$) y 456% ($p < 0,01$) de los animales de 18 y 30 meses, respectivamente. Por su parte, las ratas jóvenes de 2 meses muestran su máximo a las 48 horas con un incremento del 1036% ($p < 0,01$). Esta actividad tiende posteriormente a sus valores normales, lo que sólo se consigue en los animales de 2 meses de edad.

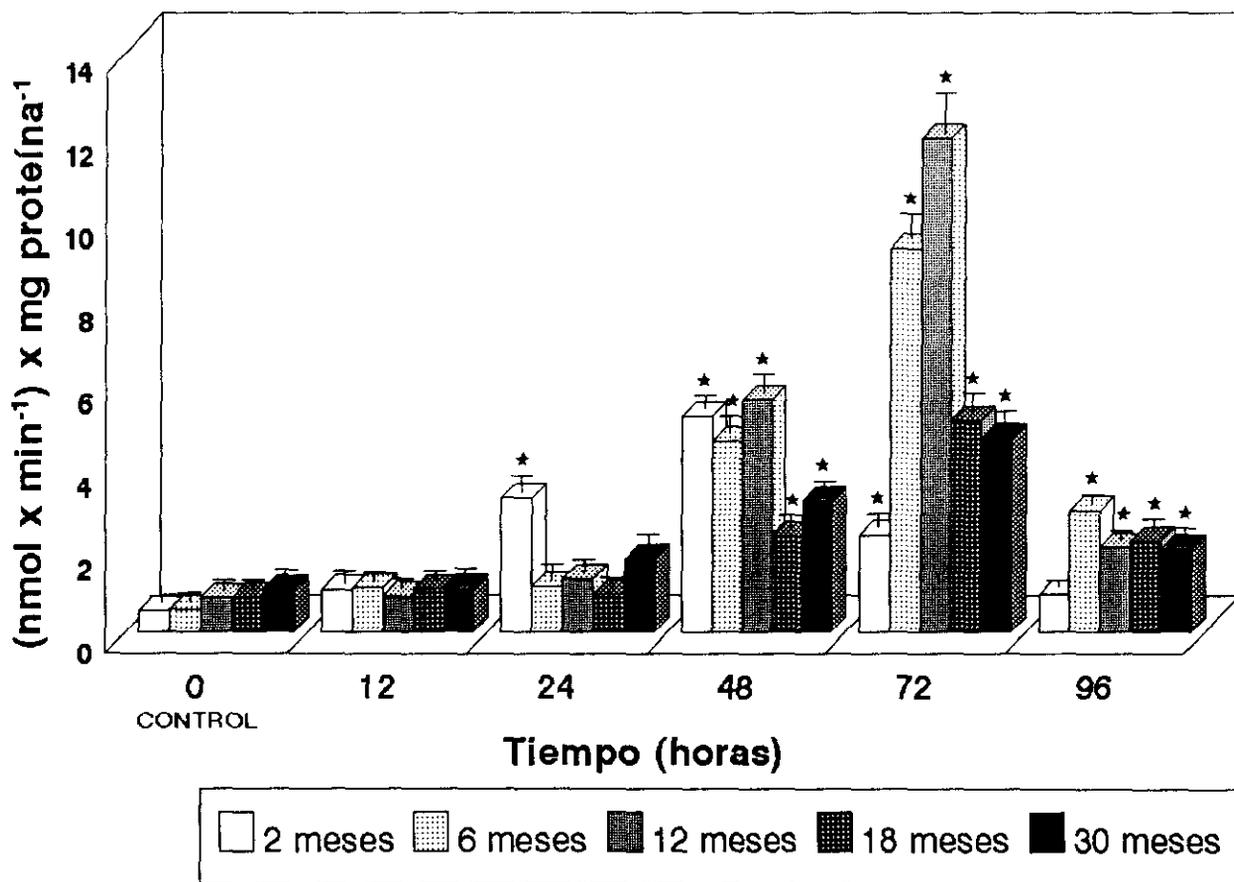


Figura 16.- Actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en la fracción soluble de hepatocitos de ratas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg). Los resultados se expresan en $(\text{nmol} \times \text{min}^{-1}) \times \text{mg de proteína}^{-1}$ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (* $p < 0,01$).

3.3.- Modificaciones en la regeneración hepática post-necrótica inducidas con la edad tras la administración de tioacetamida

Una de las propiedades más fascinantes del hígado es su capacidad de regular su propio tamaño y crecimiento. Esto se debe a que juega un papel fundamental en las funciones metabólicas del organismo y por ello es esencial para la supervivencia del individuo. Así, cuando se produce una deficiencia funcional causada por la muerte de sus células se desencadena un proceso proliferativo compensatorio mediante la coordinación de señales emitidas no sólo por los propios hepatocitos sino también por células no parenquimales y los constituyentes de la matriz extracelular.

Este apartado trata de abordar desde varias vertientes las modificaciones en el proceso de la regeneración hepática post-necrótica inducida por la tioacetamida a medida que transcurre la edad mediante:

- (a) el análisis de las poblaciones de hepatocitos implicadas en el proceso de síntesis del DNA mediante citometría de flujo,
- (b) la determinación cuantitativa de las mitosis sobre cortes de hígado al microscopio óptico,
- (c) la evaluación de la capacidad mitogénica del suero de los animales tratados y
- (d) el estudio de alguno de los factores séricos implicados en el proceso.

3.3.1.- Estudio de las poblaciones de hepatocitos implicadas en el proceso de síntesis del DNA mediante citometría de flujo

La técnica relativamente reciente de la citometría de flujo permite la evaluación de multitud de parámetros celulares, que son de gran utilidad en investigaciones sobre la toxicidad de agentes químicos. El estudio de las variaciones en el contenido y distribución del DNA en poblaciones hepatocelulares se considera una forma de gran precisión para determinar la cito y genotoxicidad de xenobióticos.

Muestras de hepatocitos aislados de ratas de diferentes edades a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la administración de una dosis subletal del hepatotóxico tioacetamida (500 mg/Kg), se procesaron para analizar las poblaciones de estas células en base a su contenido en DNA. De esta manera, se ha establecido el porcentaje de células que se encuentra en una determinada fase del ciclo de división celular y con ello, observar a este nivel la evolución del proceso necrótico-regenerativo inducido por el hepatotóxico tioacetamida, a medida que transcurre la edad.

Las Figuras, 17, 18, 19, 20 y 21, muestran el contenido de DNA determinado por la ploidía de las distintas poblaciones de hepatocitos en cada una de las secuencias de intoxicación a los 2, 6, 12, 18 y 30 meses, respectivamente. Para el cálculo del contenido del DNA se evaluó 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. En las Tablas, 3, 4, 5, 6 y 7, se describen los valores obtenidos en las diferentes poblaciones de células (2N, S₁, 4N, S₂ y 8N), que corresponden a la cuantificación de los picos obtenidos de los histogramas de las correspondientes Figuras (17-21). En las Figuras 22 y 23 se representan las variaciones en el contenido en DNA en las diferentes fases del ciclo celular en los hepatocitos obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración a ratas del hepatotóxico tioacetamida en las distintas edades. Todos los datos corresponden a un experimento representativo de cuatro realizados.

En los animales control de distintas edades se observan alteraciones en la ploidía dependientes de la edad, que coinciden con trabajos descritos por otros investigadores (Saeter *et al*, 1988). Así, se produce una disminución de los hepatocitos comprometidos en la síntesis del DNA, fase S₁ (2N -> 4N), de un 1,4% a los 2 meses a un 0,9% a los 30 meses; un aumento en la síntesis del DNA, fase S₂ (4N -> 8N), de un 0,2% a un 5,2%, y una inversión de fases con descenso en la fase diploide (2N) a favor de células tetraploides (4N) y octoploides (8N); 72,6% -> 34,3% en la población diploide, 23,3% -> 40,1% en la tetraploide y 2,5% -> 16,1% en la octoploide. También comprobamos la aparición a los 12

meses de un pico hipodiploide ($<2N$) característico de pérdida celular por apoptosis. Este pico que a los 12 meses corresponde a una población del 0,9%, se incrementó progresivamente hasta afectar a un 3,4% de la población total a los 30 meses.

En los animales intoxicados, si bien cada edad presenta características concretas como veremos a continuación, la tendencia global del perfil de las poblaciones de hepatocitos comprometidos en cada una de las fases del ciclo celular, se asemeja, en los puntos de máxima necrosis, al perfil típico de los hepatocitos fetales. Así, los hepatocitos con dotación tetraploide y octoploide (poliploides) disminuyen notablemente en el punto de máxima necrosis en favor de un incremento en la población diploide, mientras que las fases de síntesis del DNA (S_1 y S_2) sufren tendencias opuestas ya que, los hepatocitos en fase S_1 se incrementan durante la regeneración mientras que los hepatocitos en fase S_2 disminuyen en el mismo punto.

En animales intoxicados de 2 meses (Figura 17 y Tabla 3) se comprueba que el perfil típico de esta edad, en el que es mayoritaria la población diploide (72,6%), se ve alterado por la administración del tóxico de tal forma, que los mayores cambios se registran a las 24 horas en las poblaciones tetraploides y octoploides, que disminuyen un 33% y 4%, respectivamente, en favor de las células diploides (124% de incremento). La población en la fase de síntesis S_1 se incrementa notablemente del 1,4% al 12% (857%) coincidiendo con la máxima regeneración. La población S_2 también presenta una tendencia a elevarse paulatinamente a medida que transcurre la edad. A las 96 horas el perfil de la ploidía se ha recuperado prácticamente como puede observarse por la semejanza de la distribución respecto a los controles.

Tiempo (horas)	Diploide (2N)	Síntesis S_1 (2N -> 4N)	Tetraploide (4N)	Síntesis S_2 (4N -> 8N)	Octoploide (8N)
0	72,6	1,4	23,3	0,2	2,5
12	69,8	1,6	27,9	0,2	0,5
24	90,2	1,9	7,6	0,2	0,1
48	77,4	12,0	7,9	0,6	2,1
72	82,4	2,3	12,3	0,8	2,2
96	77,7	1,1	18,1	0,8	2,3

Tabla 3.- Determinación cuantitativa de la ploidía del DNA en ratas de 2 meses según los histogramas de la Figura 17. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

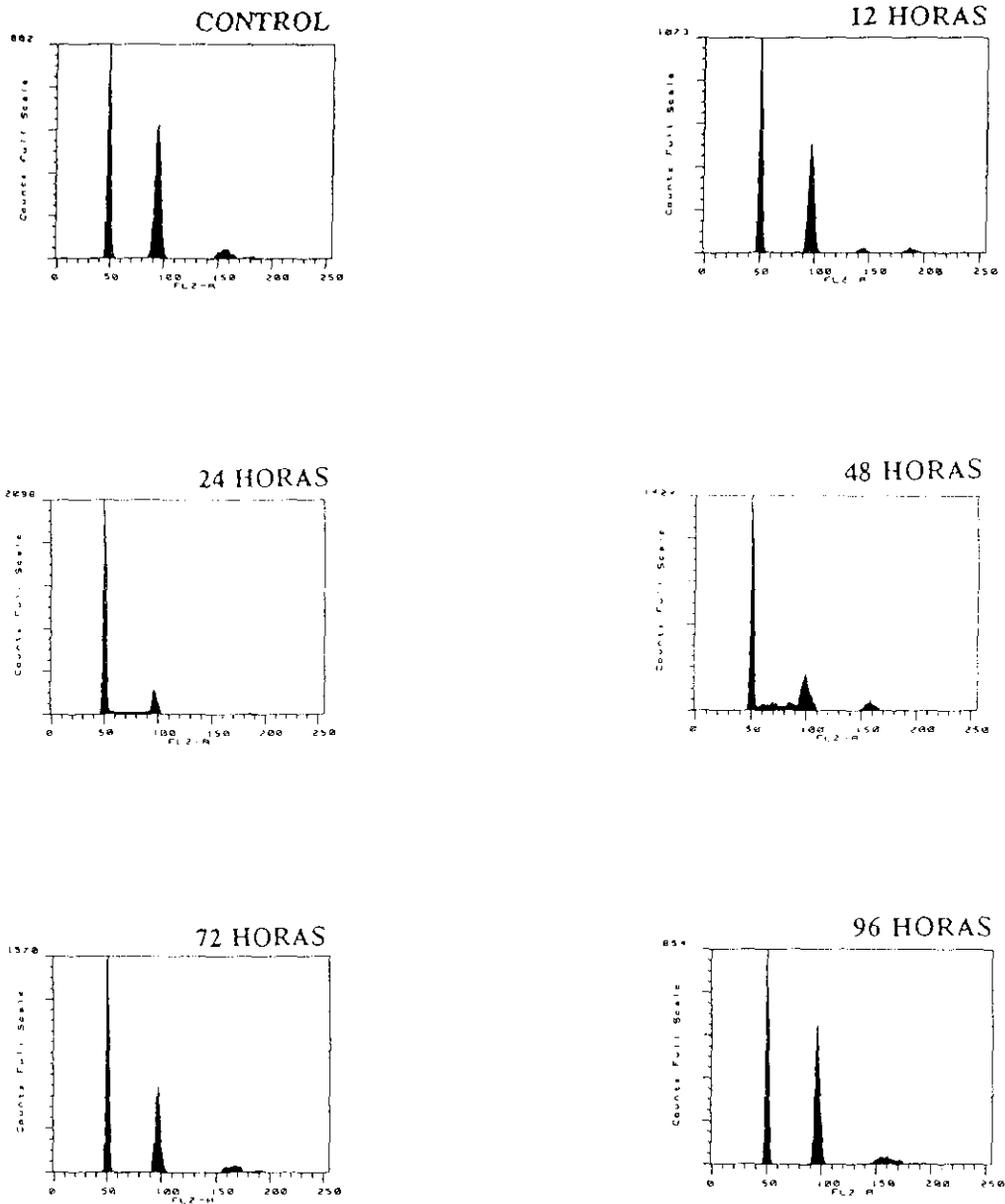


Figura 17.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratas de 2 meses, obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la intoxicación. Histogramas representativos tomados de cuatro experimentos diferentes.

En los animales de 6 meses se puede comprobar que las poblaciones más afectadas por la intoxicación son las tetraploides y octoploides que disminuyen al 66% y 21% *versus* control, respectivamente. Esta disminución de las poblaciones poliploides trae consigo el incremento a las 48 horas de la población diploide (125%). La regeneración, si bien a los 6 meses es más tardía que a los 2 meses, es superior ya que aparece a las 72 horas un mayor porcentaje de células comprometidas en fase de síntesis del DNA, coincidiendo con el momento de la máxima regeneración (14,4 %, lo cual supone 10 veces el valor control). La síntesis del DNA continúa incrementada (si se la compara con los valores iniciales) transcurridas 96 horas de la intoxicación (6,3%) lo cual, puede explicarse como una tendencia a recuperar la población tetraploide inicial. Los histogramas se muestran en la Figura 18 y los valores numéricos correspondientes a los diferentes picos aparecen en la Tabla 4.

Tiempo (horas)	Diploide (2N)	Síntesis S ₁ (2N -> 4N)	Tetraploide (4N)	Síntesis S ₂ (4N -> 8N)	Octoploide (8N)
0	54,4	1,4	33,9	4,0	6,3
12	53,8	1,9	35,9	3,5	4,9
24	66,9	4,1	25,5	1,8	1,7
48	68,3	7,3	22,3	0,8	1,3
72	59,4	14,4	25,7	0,3	0,2
96	60,6	6,3	26,9	2,9	3,3

Tabla 4.- Determinación cuantitativa de la ploidía del DNA en ratas de 6 meses según los histogramas de la Figura 18. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

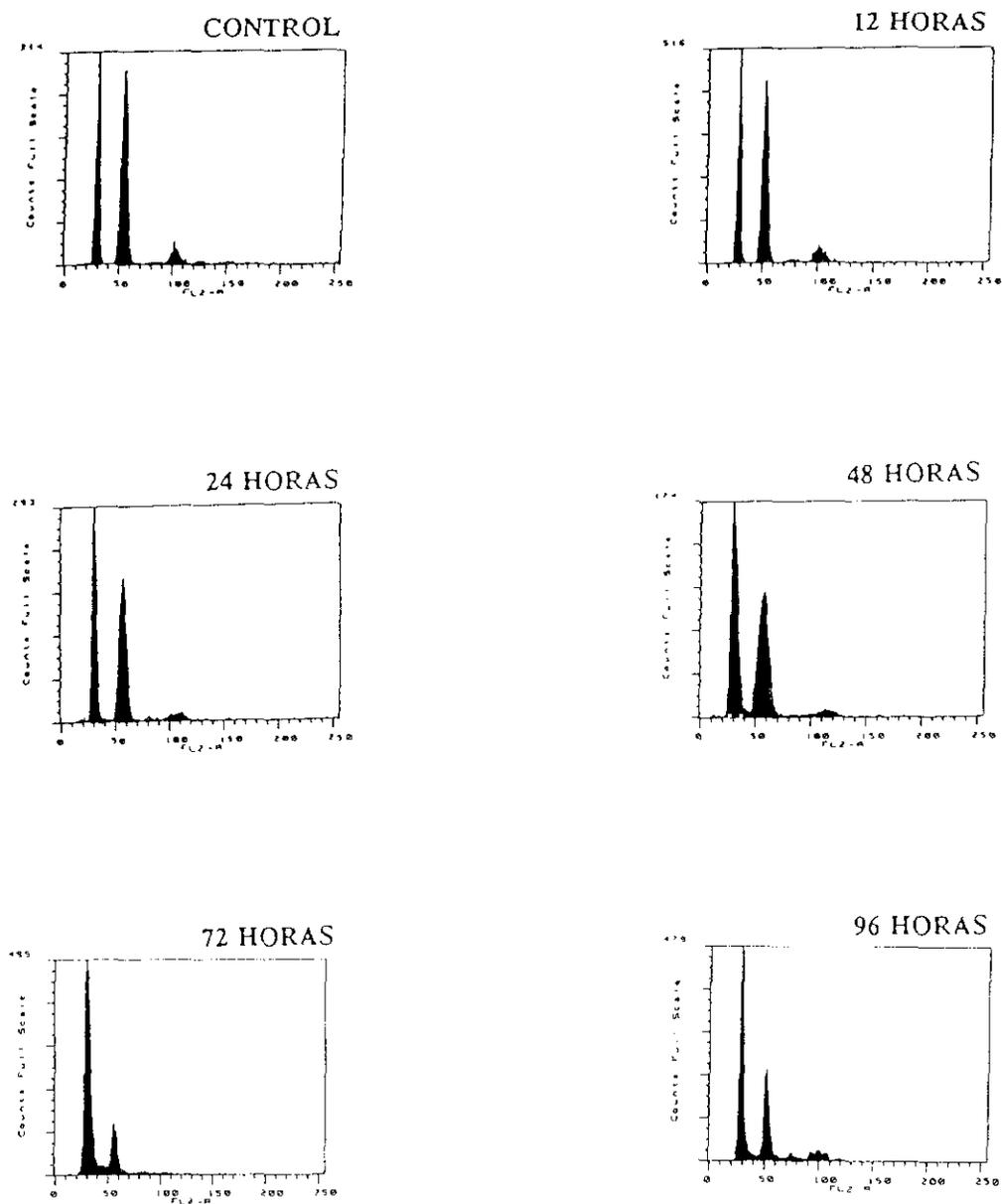


Figura 18.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratas de 6 meses, obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la intoxicación. Histogramas representativos tomados de cuatro experimentos diferentes.

La ploidía y distribución del DNA en las distintas fases del ciclo celular de las poblaciones de hepatocitos de animales de 12 meses se muestran en la Figura 19 y la Tabla 5. Es un caso semejante a la edad anterior en el sentido de la magnitud de la lesión y la posterior recuperación, ya que los valores de síntesis del DNA ascienden a un 1164% en el momento de máxima regeneración. Del mismo modo discurren las fases diploide, tetraploide y octoploide con un descenso en el punto de necrosis al 29% y 3% en las poblaciones 4N y 8N, respectivamente, a favor de un incremento en la población 2N al 168%. Cabe destacar que en los hepatocitos controles de esta edad un 0,9% de hepatocitos se encuentran en fase hipodiploide (< 2N) que desaparece al administrar el tóxico.

Tiempo (horas)	Hipodiploide (< 2N)	Diploide (2N)	Síntesis S ₁ (2N -> 4N)	Tetraploide (4N)	Síntesis S ₂ (4N -> 8N)	Octoploide (8N)
0	0,9	48,9	1,4	36,8	4,2	7,8
12	—	57,5	1,6	35,7	2,1	3,1
24	—	64,9	3,2	29,2	2,1	0,6
48	—	82,2	6,2	10,6	0,8	0,2
72	—	72,1	16,3	11,8	0,4	0,4
96	—	75,7	7,2	13,2	1,2	2,7

Tabla 5.- Determinación cuantitativa de la ploidía del DNA en ratas de 12 meses según los histogramas de la Figura 19. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

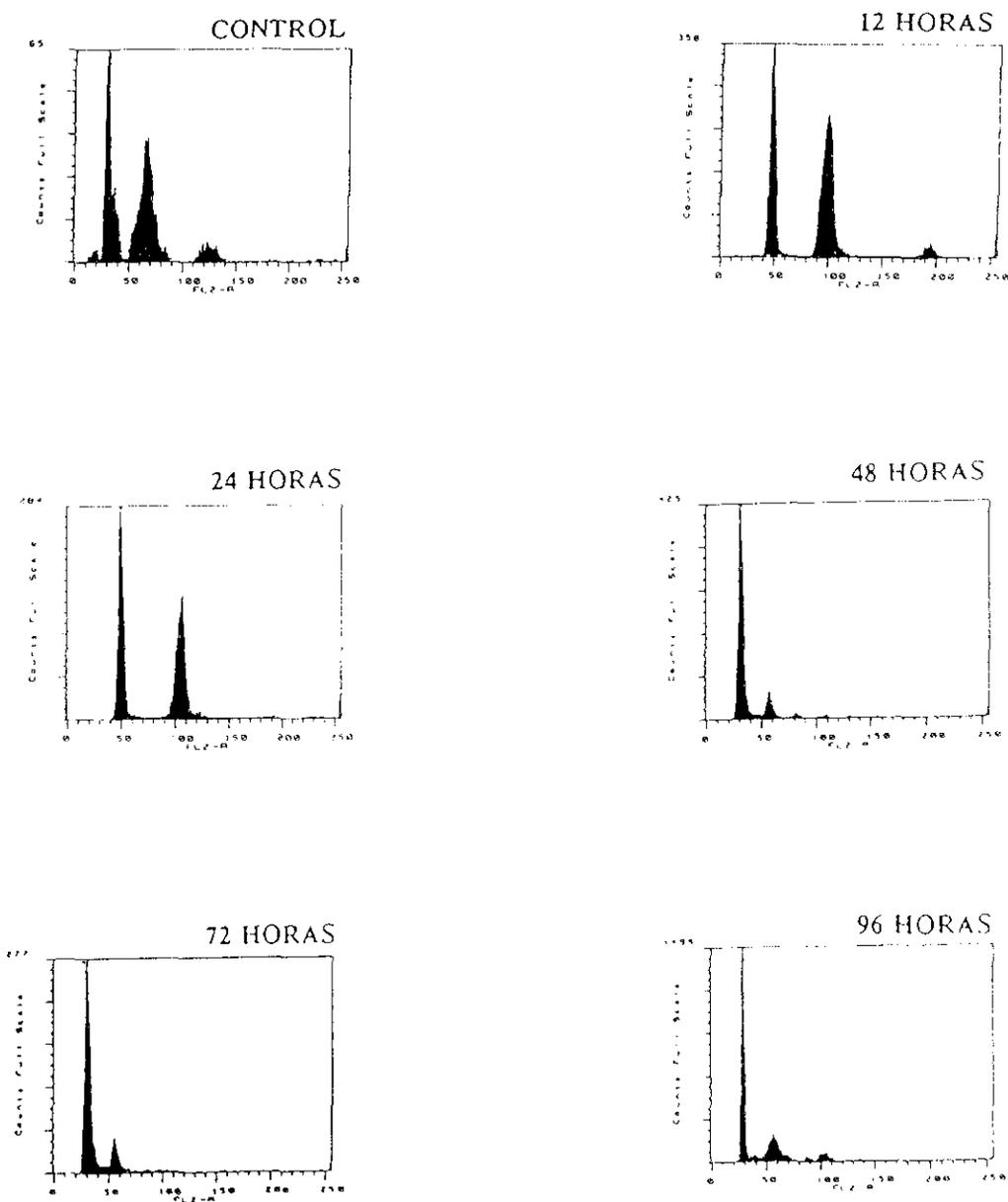


Figura 19.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratas de 12 meses, obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la intoxicación. Histogramas representativos tomados de cuatro experimentos diferentes.

La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de los histogramas de la Figura 20 correspondientes a hepatocitos de ratas de 18 meses de edad. Siguiendo el típico patrón de necrosis celular observamos que a las 48 horas la población de hepatocitos diploides aumenta hasta un 186% mientras que los tetraploides y octoploides disminuyen hasta un 51% y 18%, respectivamente. Sin embargo, en el proceso regenerativo se observa que la síntesis de DNA ya no es tan elevada como a los 6 meses, alcanzando a las 72 horas tan sólo un 708% y manteniéndose a niveles semejantes a las 96 horas. En el control de 18 meses aparece también un pico de aneuploidía superior al de los 6 meses que en este caso constituye un 1,2% de la población total de hepatocitos y que desaparece en el momento de administrar la tioacetamida.

Tiempo (horas)	Hipodiploide (< 2N)	Diploide (2N)	Síntesis S ₁ (2N -> 4N)	Tetraploide (4N)	Síntesis S ₂ (4N -> 8N)	Octoploide (8N)
0	1,2	38,7	1,2	40,8	5,0	13,1
12	—	70,0	1,8	19,7	3,6	4,9
24	—	68,2	2,9	20,2	3,2	5,5
48	—	72,2	3,6	20,7	1,1	2,4
72	—	61,7	8,5	29,7	—	0,1
96	—	66,6	8,1	21,1	0,8	2,2

Tabla 6.- Determinación cuantitativa de la ploidía del DNA en ratas de 18 meses según los histogramas de la Figura 20. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

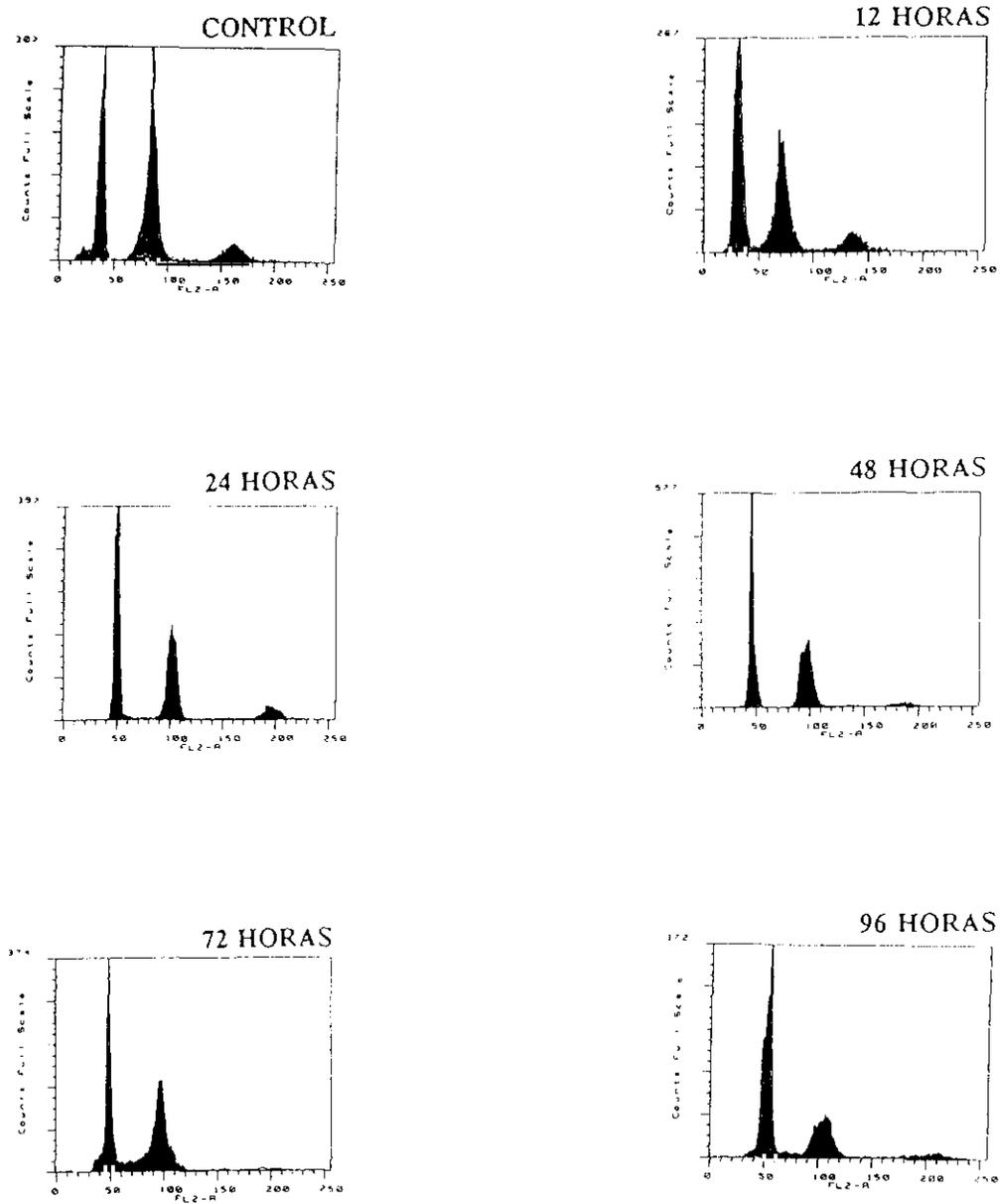


Figura 20.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratas de 18 meses, obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la intoxicación. Histogramas representativos tomados de cuatro experimentos diferentes.

La disminución en la capacidad proliferativa de las células que ya habíamos detectado en hepatocitos de ratas de 18 meses, va a ser mucho más acusada en el caso de los hepatocitos de animales de 30 meses ya que, a las 72 horas el incremento en la población de hepatocitos comprometidos en fase de síntesis S_1 tan sólo alcanza valores del 322%, que de nuevo se mantendrán a las 96 horas de la intoxicación. Hay que destacar que a los 30 meses se produce también un descenso en la población de hepatocitos tetraploides y octoploides en el favor de los diploides, pero sin embargo, la población octoploide, así como la implicada en la fase de síntesis S_2 responsable de su formación, van a disminuir hasta niveles casi nulos y así se van a mantener hasta el final del período estudiado. En el control de 30 meses aparece un pico de hipodiploidía, superior al de los 6 y 12 meses, que constituye un 3,4% de la población total de hepatocitos y que desaparece al administrar el hepatotóxico. Los resultados se muestran en la Figura 21 y en la Tabla 7.

Tiempo (horas)	Hipodiploide (< 2N)	Diploide (2N)	Síntesis S_1 (2N -> 4N)	Tetraploide (4N)	Síntesis S_2 (4N -> 8N)	Octoploide (8N)
0	3,4	34,3	0,9	40,1	5,2	16,1
12	—	56,7	0,7	36,1	3,1	3,4
24	—	54,5	0,7	38,1	3,0	3,7
48	—	79,0	1,5	19,3	—	0,2
72	—	77,5	2,9	19,6	—	—
96	—	77,9	2,7	19,4	—	—

Tabla 7.- Determinación cuantitativa de la ploidía del DNA en ratas de 30 meses según los histogramas de la Figura 21. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

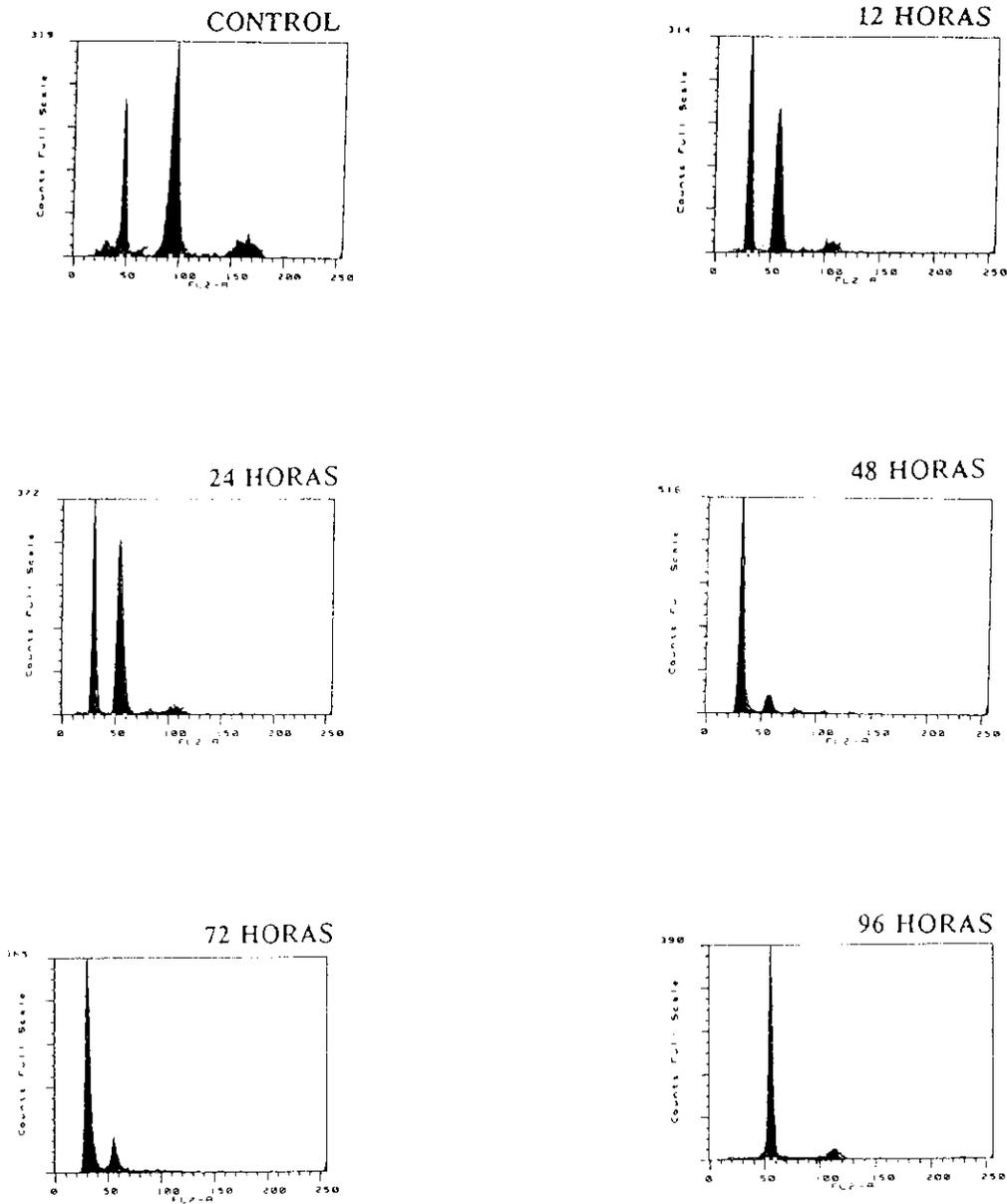


Figura 21.- Histogramas de la distribución del DNA en las distintas fases del ciclo de división celular en hepatocitos de ratas de 30 meses, obtenidos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de la intoxicación. Histogramas representativos tomados de cuatro experimentos diferentes.

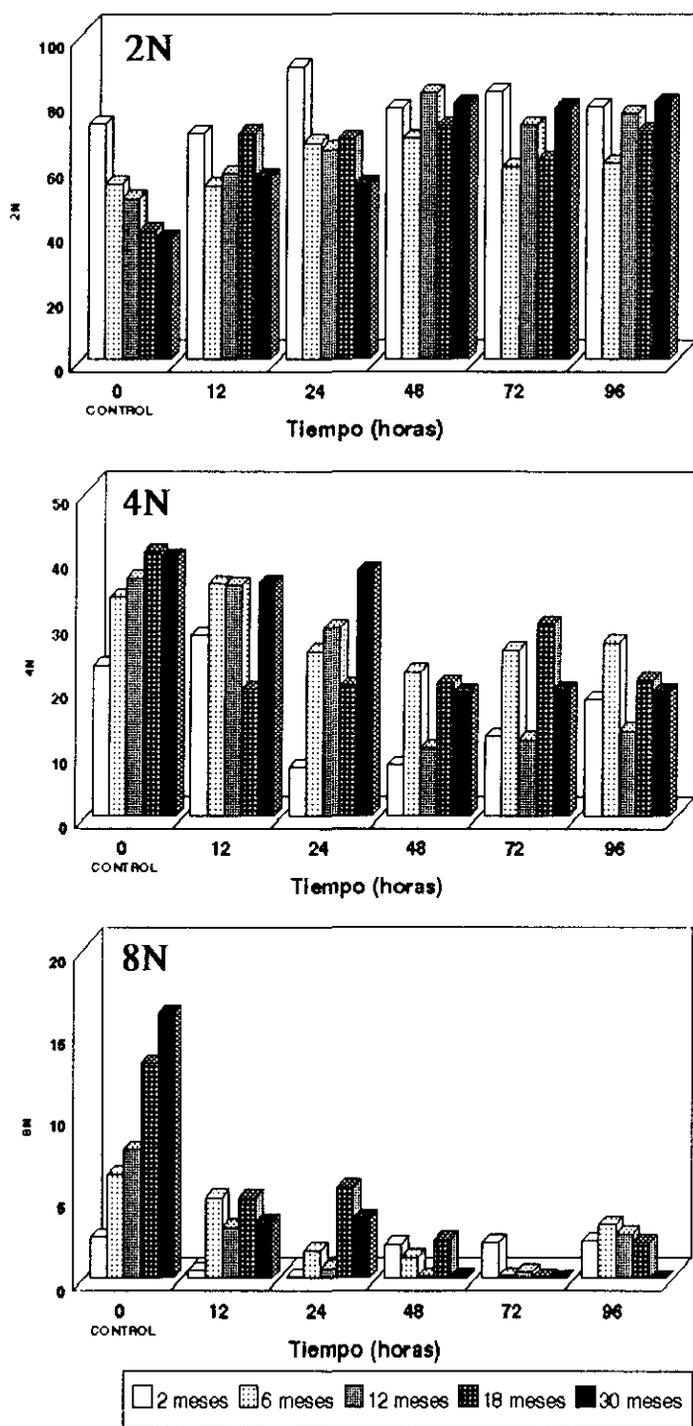


Figura 22.- Distribución del DNA según la ploidía (2N, 4N y 8N) en ratas de todas las edades inyectadas con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg), a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. 2N = Diploide; 4N = Tetraploide; 8N = Octoploide. Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

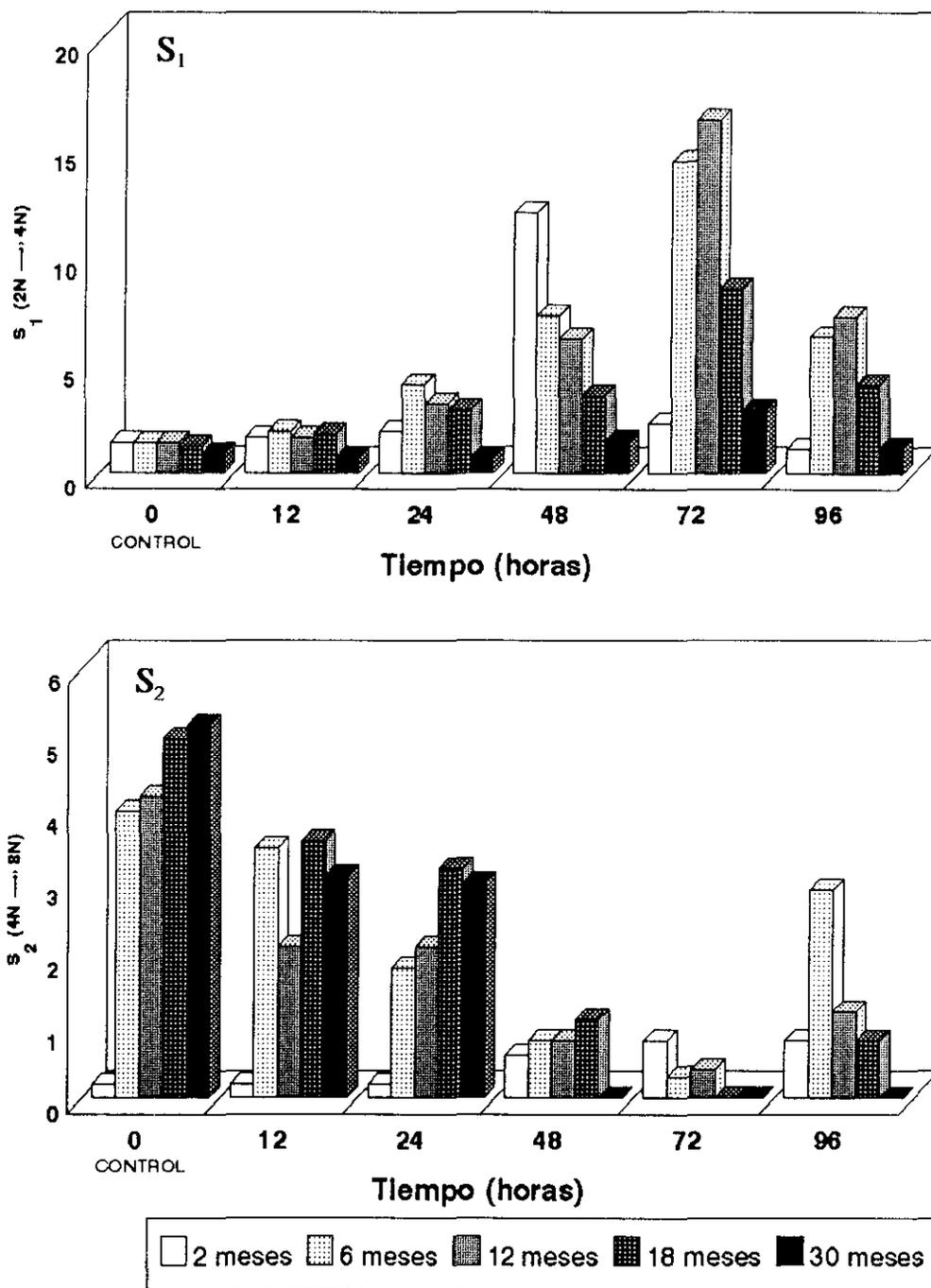


Figura 23.- Distribución del DNA en las fases de síntesis S₁(2N → 4N) y S₂ (4N → 8N) en hepatocitos de ratas de todas las edades con una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg), a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

S₁ = 2N → 4N; S₂ = 4N → 8N

Resultados representativos de cuatro experimentos diferentes.

3.3.2.- Índice mitótico

Con el objeto de poder comprobar el porcentaje concreto de células que participan en la división celular, realizamos el cálculo del índice mitótico (IM) *in situ* basado en la relación entre el número de mitosis y el número de células, analizando al microscopio óptico las zonas perivenosas del acino hepático en cortes semifinos de preparaciones histológicas de hígado de rata teñidos con hematoxilina-eosina.

Los resultados se muestran en la Tabla 8 y se expresan como $IM \times 10^3$. Considerando que los hepatocitos de las distintas edades que no han recibido tratamiento se encuentran en su mayor parte en estado quiescente, no es de extrañar que el índice mitótico de los controles sea nulo en todas las edades ensayadas. Sin embargo, en animales intoxicados, el máximo índice mitótico se alcanza en el punto de máxima regeneración. A las 48 horas, el IM máximo aparece en hígado de 2 meses, $53 \pm 3,6$ frente a un $3 \pm 0,3$ y $4 \pm 0,5$ de las de 6 y 12 meses, respectivamente. El IM muestra los valores más elevados a las 72 horas de la intoxicación en hígado de ratas de 6 y 12 meses ($67 \pm 5,2$ y $67 \pm 4,0$, respectivamente). Estos valores en la máxima regeneración son dos veces superiores a los encontrados en ratas de 2 y 12 meses ($53 \pm 3,6$ y $35 \pm 3,2$, respectivamente) y 3 veces superiores a los de ratas de 30 meses ($22 \pm 2,0$). A las 96 horas los valores tienden a la normalidad aunque prácticamente sólo se consigue en ratas de 2 meses; hecho que no se verifica en el resto de las edades por no haberse logrado la normalidad funcional.

Tiempo (horas)	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
	(IM x 10 ³)				
0	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—
48	53 ± 3,6	3 ± 0,3	4 ± 0,5	—	—
72	32 ± 2,2	67 ± 5,2	67 ± 4,0	35 ± 3,2	22 ± 2,0
96	6 ± 0,8	47 ± 3,7	29 ± 2,1	13 ± 1,7	12 ± 1,6

Tabla 8.- Relación del índice mitótico (IM). Los resultados se expresan como número de mitosis por mil células y son media de cuatro determinaciones experimentales.

3.3.3.- Factores comprometidos en la regeneración

Es un hecho conocido que la pérdida de hepatocitos origina la aparición de factores de crecimiento séricos (Andus *et al*, 1991) que van a ser los responsables de desencadenar la división celular en el proceso regenerativo. Sin embargo, todavía no está completamente esclarecida la secuencia de los acontecimientos que conducen a la regeneración hepática post-necrótica. Por ello, una vez establecidas las alteraciones dependientes de la edad en la proliferación inducida por xenobióticos, llevamos a cabo el estudio de la capacidad mitogénica del suero obtenido de ratas después de la intoxicación.

3.3.3.1.- Efecto mitogénico del suero de ratas intoxicadas sobre cultivos de fibroblastos NIH 3T3

Una medida indirecta de los factores del crecimiento liberados en el proceso de necrosis-regeneración inducida por cualquier hepatotóxico, es la determinación de la capacidad mitogénica del suero de los animales intoxicados. Este efecto mitogénico se ha puesto de manifiesto, en nuestro modelo experimental, sometiendo cultivos secundarios de fibroblastos NIH 3T3, a la acción de suero estéril (10% vol:vol) obtenido de ratas después de la intoxicación.

La Figura 24 muestra los resultados que ponen de manifiesto cómo a medida que transcurre la edad en el suero de ratas no tratadas (control) se eleva progresivamente la capacidad proliferativa que, a los 12 meses llega a un 184% ($p < 0,01$) de la correspondiente a los 2 meses, para luego disminuir alcanzando a los 30 meses niveles semejantes a los obtenidos en las ratas jóvenes. En los animales intoxicados vemos como la aparición en suero de estos factores de crecimiento precede en 24 horas al punto de máxima necrosis. Este incremento es superior en las ratas de 2, 6 y 12 meses, 171% ($p < 0,01$), 181% ($p < 0,01$) y 165% ($p < 0,01$), respectivamente, frente al 110% de los animales de edades más avanzadas. Posteriormente, se produce un descenso que coincide con el punto de máxima necrosis, para después evolucionar hasta llegar a la normalidad.

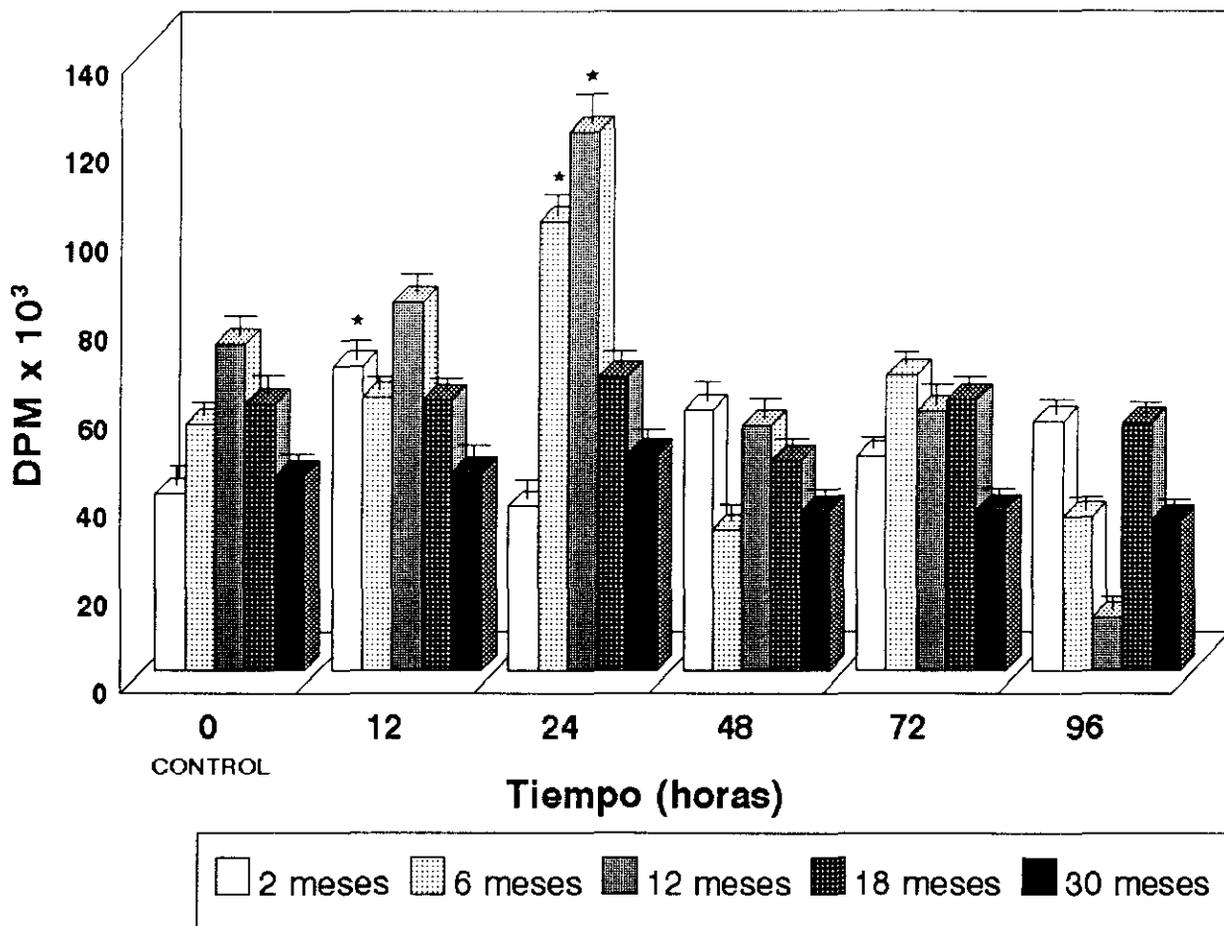


Figura 24.- Incorporación de timidina tritiada a cultivos de fibroblastos después de la adición de suero de ratas tratadas con tioacetamida a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan en DPM x 10³ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

3.3.3.2.- Producción de NO en macrófagos inducida por suero de animales tratados

Otra medida indirecta de los factores comprometidos en el proceso de regeneración hepática es la determinación de algún metabolito cuya generación se encuentra regulada por efectores o inhibidores conocidos. Uno de los compuestos mejor caracterizados en los últimos años es el óxido nítrico generado en hepatocitos y macrófagos por acción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) independiente de calcio, cuya expresión se estimula con endotoxinas bacterianas. En el caso de las citoquinas esto es más complejo ya que la IL-4, la IL-6, el IFN- γ , el TNF- α o el LPS la inducen mientras que otras como el TGF- β , el PDGF o la IL-10 producen su retro-regulación (Pufahl *et al*, 1992; Curran *et al*, 1990).

Cultivos primarios de macrófagos procedentes de ratas control de dos meses de edad se incubaron durante 18 horas en presencia de suero estéril de animales (10% vol:vol) intoxicados de edades diferentes. Como control positivo se utilizó el ester de forbol PDBu (25 ng/ml). La evaluación de los nitritos se llevó a cabo por el método de Griess y los resultados se muestran en la Figura 25.

Las alteraciones dependientes de la edad en los niveles del NO liberado por efecto del suero de ratas control se eleva con un máximo a los 12 meses con valores *versus* 2 meses del 174% ($p < 0,01$). A lo largo del proceso de intoxicación se produce un descenso paulatino en la liberación del NO, alcanzando el mínimo en el momento de máxima necrosis con valores prácticamente indetectables en todos los casos, para luego elevarse progresiva y significativamente a partir de la máxima regeneración y alcanzar a las 96 horas de la intoxicación valores del 582% ($p < 0,01$), 1065% ($p < 0,01$), 839% ($p < 0,01$), 500% ($p < 0,01$) y 239% ($p < 0,01$), a los 2, 6, 12, 18 y 30 meses respectivamente. En el suero de ratas intoxicadas de 2 meses de edad la liberación de NO precedió a las otras edades al iniciarse a las 48 horas. Sin embargo, todos estos valores nunca fueron superiores a los logrados con el control de PDBu 25 ng/ml.

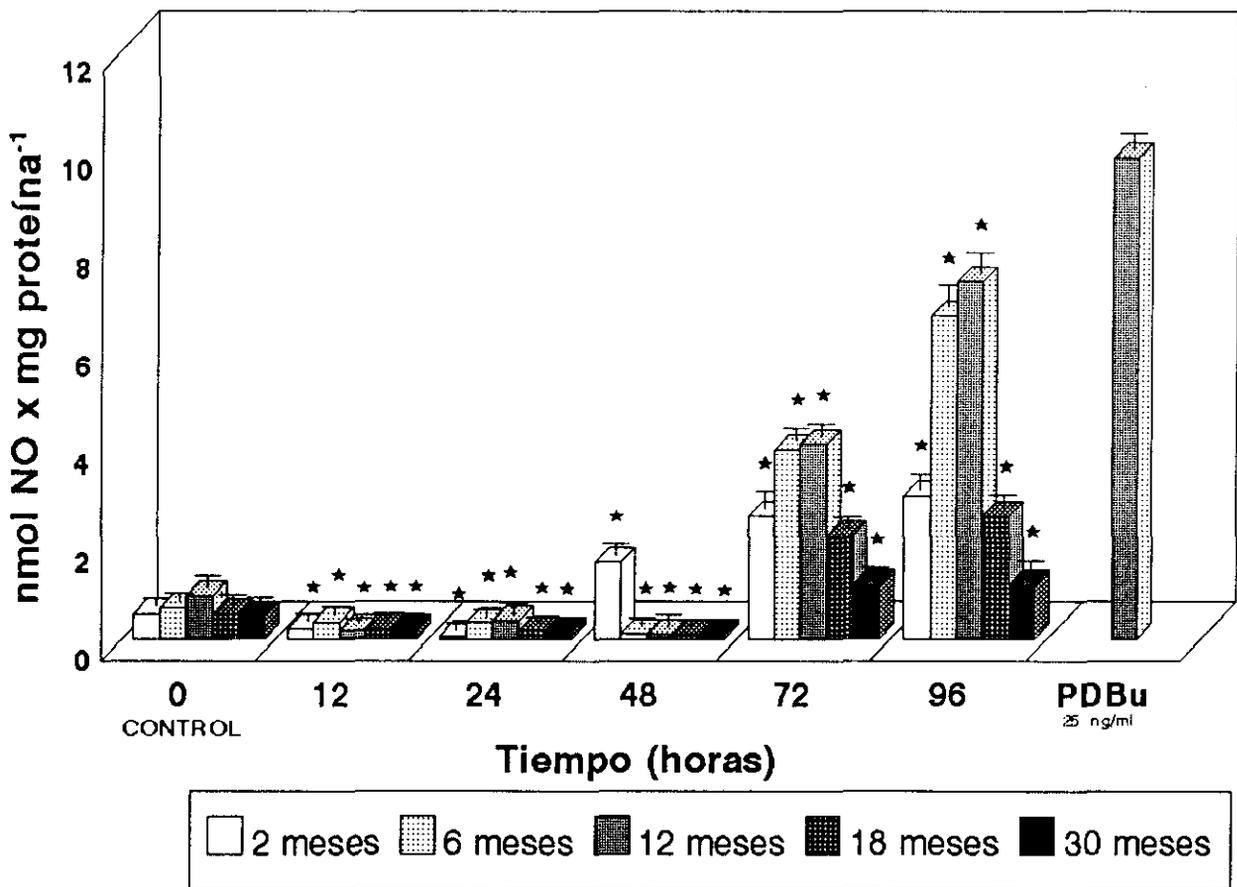


Figura 25.- Liberación de óxido nítrico ex vivo en macrófagos peritoneales de rata control tras la incubación con suero de animales sometidos a tratamiento con tioacetamida. Los resultados se expresan en nmol de NO x mg de protefna⁻¹ y son media de cuatro determinaciones experimentales. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control de cada edad correspondiente; cuando esta diferencia fue superior a 0,01 se consideró no significativa (*p < 0,01).

3.3.3.3.- Niveles de TNF- α en suero de ratas de diferentes edades después de la intoxicación

Para comprobar si el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) interviene directamente en el desencadenamiento de la proliferación celular en el proceso regenerativo post-necrótico se evaluó la concentración de este factor en suero de animales intoxicados a las distintas edades.

Como muestran los resultados de la Tabla 9, no existen niveles basales del TNF- α en ninguno de los sueros control obtenidos de ratas de distintas edades. Sin embargo, en el proceso de intoxicación el TNF- α surge en el momento de máxima necrosis y alcanza su máxima concentración coincidiendo con el momento de máxima regeneración. En ratas de 2 meses el TNF- α aparece a las 24 horas de la intoxicación ($4,1 \pm 0,3$ pg x ml⁻¹), se eleva a las 48 horas ($53,3 \pm 5,4$ pg x ml⁻¹), desciende a las 72 horas a niveles muy bajos ($0,2 \pm 0,01$ pg x ml⁻¹) y no es detectable a las 96 horas. En ratas de 6 y 12 meses, el TNF- α aparece a las 48 horas ($8,0 \pm 0,9$ y $14,9 \pm 1,2$ pg x ml⁻¹, respectivamente), incrementa de manera muy notable su concentración sérica a las 72 horas ($173,5 \pm 12,1$ y $347,4 \pm 30,2$ pg x ml⁻¹, respectivamente) y desciende destacadamente a las 96 horas ($31,6 \pm 0,4$ y $59,2 \pm 4,2$ pg x ml⁻¹, respectivamente). En ratas de 18 y 30 meses, la concentración sérica de TNF- α aparece a las 72 horas con valores de $89,1 \pm 8,1$ y $4,1 \pm 0,3$ pg x ml⁻¹, respectivamente para desaparecer a las 96 horas.

Tiempo (horas)	2 meses	6 meses	12 meses	18 meses	30 meses
	(pg x ml ⁻¹)				
0	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—
24	4,1 ± 0,3	—	—	—	—
48	53,3 ± 5,4	8,0 ± 0,9	14,9 ± 1,2	—	—
72	0,2 ± 0,01	173,5 ± 12,1	347,4 ± 30,2	89,1 ± 8,1	4,1 ± 0,3
96	—	31,6 ± 0,4	59,2 ± 4,2	—	—

Tabla 9.- Niveles de TNF- α en sueros de ratas intoxicadas con tioacetamida. Los resultados se expresan en pg de TNF- α por ml de suero y son media de cuatro determinaciones experimentales.

4. DISCUSSION

4. DISCUSION

A lo largo de la vida el organismo sufre una serie de cambios entre los cuales, y a grandes rasgos, hay que destacar: el desarrollo, el estado adulto y el envejecimiento o senescencia (Kitani, 1992). El hígado de los mamíferos es, en condiciones normales, un órgano quiescente y en este estado de quiescencia se mantiene durante toda la vida, sin embargo, el proceso de regeneración hepatocelular compensatoria, que se desencadena en respuesta a la pérdida de sus propias células debida a la acción de un agente hepatotóxico, experimenta variaciones notables que dependen de la edad del animal.

La destrucción selectiva de los hepatocitos centrilobulares producida por una dosis subletal de tioacetamida y el estado proliferativo del hígado en regeneración que sigue inmediatamente a la necrosis, se han utilizado como modelo para estudiar las variaciones en la respuesta hepática a lo largo de la edad frente a la agresión de un agente tóxico. El período de vida elegido en ratas macho Wistar abarca desde los 2 hasta los 30 meses (2 años y medio) y las edades seleccionadas han sido las siguientes:

- 2 meses - jóvenes (madurez sexual)
- 6 meses - adultas
- 12 meses - adultas maduras
- 18 meses - senescentes incipientes
- 30 meses - senescentes

De acuerdo con esta selección (Rikans *et al*, 1993) y en base a los resultados obtenidos se han establecido tres grupos:

- (1) Ratas jóvenes de 2 meses
- (2) Ratas adultas de 6 y 12 meses
- (3) Ratas senescentes de 18 y 30 meses.

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se abordan dos acontecimientos tan dispares como la senescencia y la hepatotoxicidad, en las investigaciones llevadas a cabo destacamos dos aspectos importantes:

- (A) las variaciones dependientes de la edad, y
- (B) la influencia del envejecimiento en la lesión y recuperación hepática inducida por hepatotóxicos.

La necrosis inducida por la tioacetamida, concretamente por la tioacetamida S-óxido uno de los metabolitos responsables del daño celular, se localiza en el espacio perivenoso al existir en esta región del acino hepático, un desequilibrio entre los enzimas responsables de la activación metabólica de la droga y los enzimas encargados de la detoxificación de las sustancias activadas. Así, los hepatocitos perivenosos muestran una mayor velocidad de producción de metabolitos reactivos que los periportales, debido a la mayor cantidad de monooxigenasas microsómicas de función mixta localizadas en esta zona; mientras que presentan un menor contenido de GSH (Jungermann y Katz, 1982; Baron, 1991).

4.1.- Caracterización de la necrosis y regeneración hepatocelular producida a lo largo de la edad

Tanto el estudio histopatológico de los hígados obtenidos a distintos tiempos después de la administración del hepatotóxico tioacetamida, como el análisis de la actividad del enzima típico marcador de lesión hepática ensayado en suero, la aspartato aminotransferasa, ponen de manifiesto que la necrosis y el proceso regenerativo hepatocelular que tiene lugar inmediatamente después, experimentan variaciones que dependen de la edad del animal. Así, en el caso de animales de 2 meses, la necrosis hepática masiva presenta su máximo a las 24 horas de la administración de tioacetamida, mientras que en los animales de más edad, este punto se alcanza a las 48 horas. Morfológicamente, las mayores diferencias se observan entre el grupo de 2 meses y el conjunto de animales de las diferentes edades estudiadas, ya que los primeros muestran una necrosis inferior en magnitud y un infiltrado inflamatorio de

tipo mixto, frente a un 50% del parénquima hepático dañado e infiltrado de tipo crónico con esteatosis del resto; estos resultados quedan reflejados en la mayor tasa de mortalidad alcanzada en ratas adultas y especialmente en las senescentes donde llega hasta un 50%, en contraste con la prácticamente nula mortalidad obtenida en los animales de 2 meses. Las variaciones observadas en la actividad enzimática de la aspartato aminotransferasa son notables e indican por una parte, que a los 2 meses la culminación de la necrosis precede en 24 horas a la de las otras edades, y por otra, que a los 6/12 meses es máxima la severidad de la lesión. En ratas viejas de 18 y 30 meses, la intensidad decrece, pero se extiende en el tiempo. En animales jóvenes la lesión comienza a remitir a las 48 horas; sin embargo, la reparación en las edades avanzadas es más lenta por lo que se prolonga de tal modo que a las 96 horas todavía persisten las huellas de la lesión (Beyer *et al*, 1991). De estos resultados, es interesante destacar que con la misma dosis de hepatotóxico, la lesión es considerablemente superior en los animales adultos de 6 y 12 meses y que la duración de la misma es superior en animales senescentes.

Edad	Máximo lesión (horas)	Intensidad lesión	Máximo regeneración (horas)	Recuperación a las 96 horas
2 meses	24	++	48	total
6/12 meses	48	+++	72	media
18/30 meses	48	+	72	poca

Esta diferente severidad de la lesión hepática inducida por tioacetamida, a lo largo de la edad, puede deberse a la desigualdad existente en la velocidad de biotransformación de la toxina en las distintas edades.

El metabolismo oxidativo de xenobióticos en hígado se verifica a través del sistema microsómico monooxigenasa de función mixta, sistema constituido por las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 y las monooxigenasas dependientes de flavina. Ambas enzimas sufren las mismas modificaciones en los controles a lo largo de la edad observándose que a los 2 meses las actividades son inferiores a las del animal adulto. Entre los 6 y 12 meses de edad se alcanza un máximo de actividad que luego disminuye en la senescencia, hasta el final de la vida del animal (Kitani, 1992). Concretamente, en el caso del citocromo P-450 se ha demostrado que estos descensos son selectivos de los citocromos P-450 constitutivos y no de los inducibles que permanecen inalterados (Horbach *et al*, 1992).

La FAD-monooxigenasa, el enzima responsable de la biotransformación de la tioacetamida, se induce en momentos previos a la necrosis, disminuye durante la misma y se eleva posteriormente con menor intensidad. Esta respuesta bifásica se detecta en todas las edades aunque con mayor grado en los animales de 6 y 12 meses. A los 18 y 30 meses, la respuesta frente a la misma dosis del hepatotóxico es significativamente menor (aproximadamente un 50%) que en los adultos. Esto explica que en los animales senescentes al metabolizar menos cantidad del hepatotóxico se produzca una lesión menos severa que la de los animales adultos. Hay que destacar que los descensos observados en el citocromo P-450 y sistemas microsómicos relacionados en el punto de máxima necrosis, se deben a su localización mayoritaria en la región perivenosa del acino hepático que es la que resulta destruida en el proceso de intoxicación (Baron, 1991).

Los enzimas marcadores de la lesión hepática determinados en el presente trabajo comprenden la γ -glutamyl transferasa sérica y la glutathion S-transferasa de hepatocitos. Ambos enzimas alcanzaron los valores de actividad más elevados en el momento de la máxima necrosis hepatocelular, y esta elevación puede ser en parte la responsable de la depleción transitoria del glutathion originada por la administración del hepatotóxico. La glutathion S-transferasa es el sistema enzimático más importante de la fase II de la detoxificación ya que cataliza la unión del grupo tiol nucleofílico del glutathion con aceptores electrofílicos (Picket y Lu, 1989). Esta actividad se evaluó a lo largo de la edad en la intoxicación con tioacetamida y pudo observarse que se eleva durante la necrosis para luego

remitir hacia la normalidad. El incremento de la actividad glutathion S-transferasa fue muy destacado en animales adultos, pero, en animales senescentes, las variaciones fueron poco significativas y no pueden relacionarse con la depleción del glutathion, ya que la capacidad detoxificadora de la glutathion S-transferasa no depende sólo de su actividad enzimática sino también de la disponibilidad del GSH como sustrato.

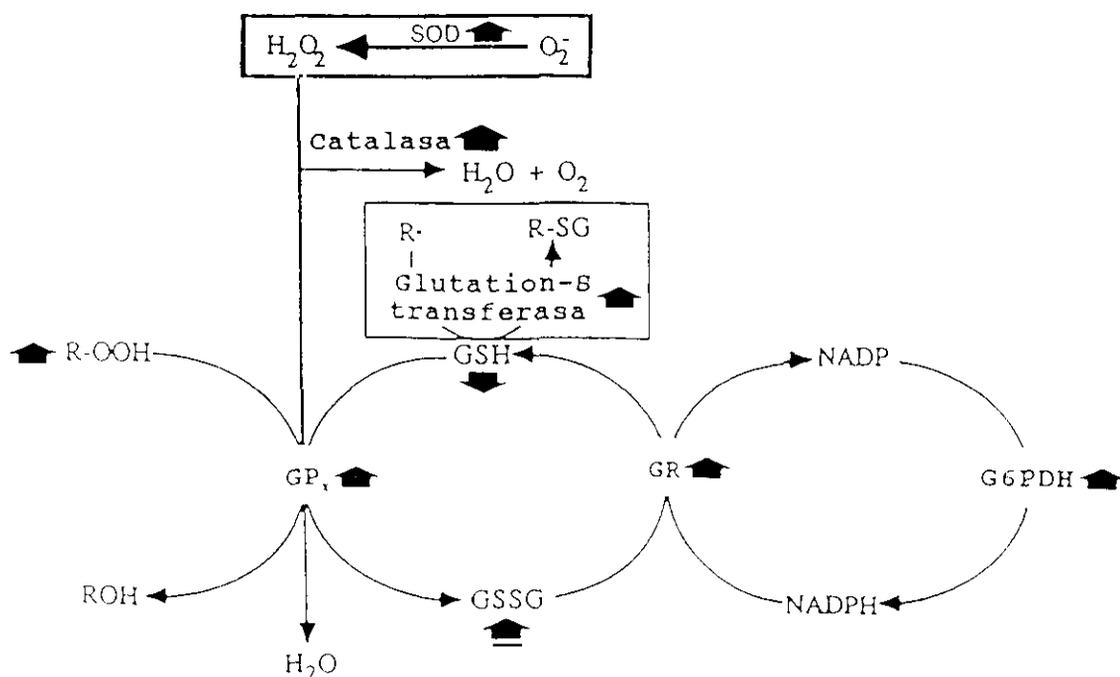
Se desconoce la verdadera causa de la elevación de la actividad de la γ -glutamyl transferasa, aunque se ha sugerido que puede deberse a una serie de factores relacionados con la lesión hepática, puesto que parece ser el enzima clave que acopla el transporte de aminoácidos con el metabolismo del glutathion (Meister y Anderson, 1983). Los valores de esta actividad enzimática se encuentran muy disminuidos con la edad obteniéndose a partir de los 12 meses, valores del 7% respecto a animales de 2 meses. Debido a su localización en el dominio canalicular de los hepatocitos, el descenso observado puede deberse a la disminución en la función hepatobiliar intrínseca o bien producirse como consecuencia de alteraciones en el flujo sanguíneo ó en el estatus hormonal ó bien por descenso en el transporte activo de solutos a la bilis (Handler *et al*, 1994). Esta diferencia en los animales controles va a repercutir en la respuesta ante la agresión tóxica ya que el máximo de actividad, que aparece a los 12 meses, desciende progresivamente en la senescencia. El hecho de que el envejecimiento induzca incrementos débiles y no significativos en ambas actividades enzimáticas (GGT y GST), en el momento de la lesión, podría ser una de las razones del retraso en el proceso regenerativo observado en edades avanzadas.

4.2.- Metabolismo hepático del glutathion y enzimas relacionados

El glutathion es un tripéptido ampliamente distribuido en las células de mamíferos y su concentración hepática se encuentra en el rango milimolar (5-10 mM). Este tripéptido contribuye a la detoxificación celular de xenobióticos endógenos (peróxido de hidrógeno, lípidos peroxidados, etc) y exógenos, a través de la acción de la glutathion S-transferasa y la glutathion peroxidasa. El agotamiento del GSH celular es un hecho que precede a cualquier fenómeno citotóxico y los cambios en el cociente GSH/GSSG implican una situación de estrés

oxidativo que juega un papel integral en los fenómenos que desencadenan la muerte celular (Kaplowitz *et al*, 1985). 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 también resultar afectado por la tioacetamida.

Antes de realizar un estudio del efecto de la edad sobre las modificaciones sufridas en los componentes del ciclo redox del glutatión y en los enzimas relacionados, inducidas por la administración de la tioacetamida, hemos de establecer la situación en la que se encuentran los animales de los distintos grupos para así conocer si existen diferencias en el estado de los mismos al recibir el xenobiótico. Esto es fundamental, debido a las enormes diferencias que se producen en el estado antioxidante entre las distintas especies o incluso dentro de la misma especie entre los distintos sexos (Kitani, 1988; Rikans *et al*, 1991; Kitani, 1992). En nuestro caso, los resultados están de acuerdo con los obtenidos por De y Darad (1991), Bolzan *et al* (1995) y Christon *et al* (1995), y se resumen en el cuadro siguiente:



El hecho de que en la senescencia se produzca, por un lado un incremento en los radicales libres de oxígeno generados espontáneamente en la respiración mitocondrial, y por otro, el descenso en los niveles de GSH, va a desencadenar una situación de estrés oxidativo, demostrada por la disminución del cociente GSH/GSSH, que conlleva la oxidación de los grupos tiólicos proteicos (54%) y la peroxidación lipídica, detectada por un incremento del 154% en los niveles de malondialdehído. Estas alteraciones en el estado de oxidoreducción celular observado en el envejecimiento conllevan a una mayor susceptibilidad de los tejidos a sufrir cualquier lesión (Agarwal y Sohal, 1993; Sohal *et al*, 1995). Ya hemos visto anteriormente que la capacidad del glutatión reducido para formar conjugados se encuentra disminuida en la senectud debido a la menor actividad de la glutatión S-transferasa y la γ -glutamil transferasa, por lo que, este hecho también puede influir en la hepatotoxicidad de los xenobióticos que dependen del glutatión para su detoxificación.

En nuestros experimentos de hepatotoxicidad, los niveles de GSH disminuyen notablemente en el momento de máxima necrosis hasta valores de aproximadamente un 35% en adultas y viejas respecto al control. En el caso de los animales de 2 meses el descenso es menor, sólo hasta un valor que no supera el 57%. Posteriormente, durante la regeneración estos niveles se recuperan en todas las edades estudiadas excepto en los animales senescentes que aún muestran valores significativos a las 96 horas. El agotamiento del GSH va acompañado por una disminución del cociente GSH/GSSG, por la oxidación de los grupos tiólicos proteicos hepáticos y por una situación de peroxidación lipídica determinada por los niveles elevados de malondialdehído. Aunque esta secuencia de acontecimientos se produce en todas las edades estudiadas, los valores de nuevo se encuentran alterados en el tiempo ya que, los animales jóvenes y adultos se recuperan a las 96 horas mientras que los senescentes no. Según estos resultados, el GSH por sí mismo no parece ser muy eficaz, en ninguna de las edades estudiadas, cuando compite con las macromoléculas para reaccionar con los metabolitos reactivos, ya que se produce la lesión a nivel de proteínas y lípidos hepáticos. Probablemente, el glutatión y su residuo cisteína, al ser nucleófilos débiles, pueden no estar capacitados para reaccionar con electrófilos fuertes como las especies reactivas derivadas de la tioacetamida y, cabe la posibilidad, de que ambos se encuentren comprometidos, más bien, en las reacciones de oxidoreducción (Cotgreave *et al*, 1988). El hecho de que los animales

senescentes mantengan la lesión a las 96 horas de la intoxicación indica, que en edades avanzadas el organismo necesita más tiempo para conseguir la completa recuperación.

No encontramos explicación al hecho de que la senescencia traiga consigo alteraciones similares en intensidad a las de los adultos a nivel de depleción de glutatión, oxidación de tioles proteicos e incrementos en malondialdehído, mientras que la actividad de los sistemas biotransformadores generadores de los metabolitos tóxicos y la severidad de la lesión hepática son significativamente menores. Esto parece indicar que algún otro factor ha de estar involucrado en la senescencia y habría que buscarlo a nivel de síntesis y degradación de proteínas.

El ciclo redox del glutatión juega un papel crucial en la protección celular frente al estrés oxidativo, ya que es el responsable del mantenimiento del equilibrio de óxidoreducción tiólico de la célula, mediante el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa acoplado al par NADPH/NADP⁺. La generación del NADPH, catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, depende de la presencia de glucosa y de su flujo a través del ciclo de los pentosa fosfatos. Tanto la actividad como el nivel del transcrito de la glutatión peroxidasa, enzima clave del ciclo que juega un papel importante, en la detoxificación del H₂O₂ y en la eliminación de los hidroperóxidos orgánicos y lipoperóxidos, sufren un incremento en el punto de máxima necrosis que se prolonga durante la regeneración para luego retornar a la normalidad. La inducción de la glutatión peroxidasa precede a la inducción de la actividad de la glutatión reductasa, enzima integrante de este ciclo cuya misión es la regeneración de GSH reducido y que alcanza su actividad máxima durante la regeneración. Como la respuesta celular coordinada frente al estrés oxidativo implica un elevado requerimiento de equivalentes reductores en forma de NADPH, estudiamos la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que se indujo durante el proceso de regeneración postnecrótica (Díez-Fernández *et al*, 1996b). Esta inducción no sólo está involucrada en el mantenimiento del estado redox tisular sino también en la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos por su generación de ribosa 5-fosfato (Molero *et al*, 1994). En el caso concreto de las ratas senescentes, la actividad de la glutatión reductasa no experimenta variaciones significativas durante todo el proceso presentando valores iniciales muy elevados que se incrementan paulatinamente al final del tratamiento. Sin

embargo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se eleva bruscamente durante la regeneración, siendo extraño observar el descenso en su actividad a las 96 horas cuando la regeneración aún no ha finalizado. Todo ello nos lleva a sugerir, que otra de las posibles causas de que en la senectud el proceso de regeneración se verifique con más lentitud sea la falta de coordinación entre estos dos enzimas.

Las especies activas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo), se originan en el proceso de reducción del oxígeno molecular. Existen una serie de mecanismos protectores para evitar que estas especies inicien reacciones en cadena, que conducirían a la formación de peróxidos lipídicos, daño proteico y lesión en el DNA. Uno de los sistemas más importantes en la defensa celular frente a la toxicidad del oxígeno lo constituye la acción concertada de la superóxido dismutasa y la catalasa. Las dos isoformas estudiadas de la SOD sufren en todas las edades descensos en los puntos de máxima necrosis, pero en el caso de la SOD dependiente de Mn, de localización mitocondrial, sufre un incremento previo a la necrosis. Se sugiere que esto podría deberse a que sólo se produce O_2^- a nivel mitocondrial y que este enzima es suficiente para eliminar este radical no teniendo así repercusión a nivel citosólico. En nuestro proceso de hepatotoxicidad, la actividad de la catalasa disminuye progresivamente alcanzando los valores mínimos durante la necrosis, ascendiendo posteriormente hacia la normalidad, excepto en animales senescentes donde a las 96 horas todavía aparecen valores significativos del 60%. El descenso en la actividad de estas enzimas se produce debido a su localización perivenosa en el acino hepático, y ser ésta la zona lesionada selectivamente por la tioacetamida. Sin embargo, el hecho de que no se induzca nada más que la SOD dependiente de Mn y no el resto, puede indicarnos que, en nuestro proceso de lesión inducida por la tioacetamida, no se producen niveles importantes de H_2O_2 , siendo los peróxidos que se generan mayoritariamente de carácter orgánico, esto es, producidos por la peroxidación de las membranas celulares.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la heterogeneidad acinar ha de influir de manera notable en el proceso de necrosis perivenosa y regeneración inducidas por cualquier hepatotóxico. De hecho, existen varios factores a tener en cuenta:

- a) que las monooxigenasas microsómicas responsables de la biotransformación de los hepatotóxicos predominan en la región perivenosa,
- b) que los hepatocitos periportales contienen doble cantidad de glutatión que los perivenosos,
- c) que más importante que la concentración del glutatión es la distribución intraacinar de las vías de detoxificación.

Así, coincidiendo con Kera *et al* (1987), quienes han estudiado la distribución de los enzimas implicados en el *turnover* del glutatión en hepatocitos selectivamente aislados de la región periportal o de la perivenosa por medio de perfusión del hígado con digitonina-colagenasa, observamos que las actividades de las dos isoformas de la superóxido dismutasa y la catalasa se ubican principalmente en las células que rodean al terminal venoso, que la actividad de la glutatión reductasa citosólica aparece uniformemente distribuida en el acino hepático y, que las actividades glutatión peroxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se encuentran en mayor proporción en los hepatocitos de las zonas periportales.

4.3.- Proceso de regeneración hepática y restauración funcional.

La capacidad del hígado de los mamíferos para regenerarse en respuesta a la pérdida parcial de sus propias células es un hecho bien documentado (Michalopoulos, 1990; Mehendale, 1991). La regioselectividad de la necrosis tiene que influir necesariamente en el proceso de regeneración, de hecho, se sabe que es la región periportal la que se encuentra más capacitada para el proceso proliferativo (Jungerman y Katz, 1982), y por ello, que en el caso de la necrosis inducida por la tioacetamida, se efectúe mediante una desdiferenciación de los hepatocitos adultos que adquieren características de hepatocitos fetales (Díez-Fernández *et al*, 1993).

En nuestro modelo de necrosis-regeneración a lo largo del envejecimiento, las variaciones encontradas nos han proporcionado evidencias respecto a los siguientes fenómenos:

- (A) diferenciación celular por efecto de la edad (poliploidización)
- (B) pérdida de la capacidad proliferativa en la senescencia.

Para estudiar el proceso de regeneración hepática postnecrótica del presente trabajo, utilizamos en primer lugar la citometría de flujo con el objeto de determinar cuantitativamente el DNA genómico en poblaciones de hepatocitos control y de hepatocitos cuya división se encuentra inducida, como sucede después de la agresión tóxica necrogénica. Este modelo de regeneración proporciona un medio idóneo donde estudiar diferentes poblaciones de hepatocitos: hepatocitos remanentes, hepatocitos desdiferenciados, en división y hepatocitos recién divididos (Camplejohn, 1992). En segundo lugar, mediante el cálculo del índice mitótico sobre cortes semifinos de hígado de ratas obtenidos en el momento de la regeneración post-necrótica, hemos podido visualizar y evaluar el número relativo de células en mitosis (hepatocitos en división).

El hígado de los mamíferos contiene hepatocitos poliploides, cuyo número relativo depende de la especie y de la edad del animal (Saeter *et al*, 1988; Mossin *et al*, 1994). Los hepatocitos fetales de rata son mayoritariamente diploides con una dotación de un 85,3% de células comprometidas en esta fase, un 7,3% en fase de síntesis de DNA y un 7,4% tetraploides (Díez-Fernández *et al*, 1993). Los animales de 2 meses muestran un número menor de células implicadas en la síntesis del DNA y en la fase tetraploide, a favor de un incremento en la población diploide. A partir de este momento comienza el proceso de poliploidización (incremento en la población de hepatocitos implicada en las fases 4N y 8N). El porcentaje de la población de hepatocitos implicada en la síntesis de DNA (fase S₁) queda reducido en magnitud a valores de un 0,9% en animales de 30 meses frente al 1,4% de los de 2 meses, mientras que los de la fase S₂ se incrementan de un 0,2% a un 5,2%. Esta diferencia de magnitud de la población implicada en la síntesis del DNA a los 30 meses se puede explicar por el hecho de que con la edad se pierde la capacidad replicativa de las células, pero el número de células en fase S₂ (4N -> 8N) se eleva con el fin de adquirir un patrón poliploide. Hasta la fecha no existe una explicación clara respecto a la significación fisiológica del incremento de la ploidía por efecto de la edad, pero se sospecha que es un reflejo de grados crecientes de diferenciación celular y del requerimiento de hepatocitos

con grandes cantidades de productos genéticos diferentes, para realizar su papel metabólico multifuncional. Las células poliploides pueden ser mononucleadas y binucleadas, siendo las mononucleadas las más diferenciadas en el desarrollo.

En las ratas de 12 meses aparece un porcentaje de células en fase aneuploide, concretamente hipodiploide, del 0,9% que se incrementa progresivamente hasta alcanzar valores del 3,4% en animales de 30 meses. Esto se debe a que la apoptosis en estas edades se produce como consecuencia de un proceso fisiológico de renovación tisular, donde los hepatocitos afectados son aquellos que se encuentran en estadios no proliferativos, evitando así la hiperplasia que conllevaría lesiones tisulares (Bursch *et al*, 1992). El pico de aneuploidía desaparece inmediatamente con la administración del tóxico; algo semejante ocurre en la evolución de los procesos tumorales donde desaparecen en primera instancia las células aneuploides a favor de la población diploide, dotándolas de este modo de una elevada capacidad proliferativa y un potencial hacia la inmortalidad (Remvikos *et al*, 1993).

Edad (meses)	Hipodiploid ($< 2N$)	Diploide ($2N$)	Síntesis S_1 ($2N \rightarrow 4N$)	Tetraploide ($4N$)	Síntesis S_2 ($4N \rightarrow 8N$)	Octoploide ($8N$)
2	—	72,6	1,4	23,3	0,2	2,5
6	—	54,4	1,4	33,9	4,0	6,3
12	0,9	48,9	1,4	36,8	4,2	7,8
18	1,2	38,7	1,2	40,8	5,0	13,1
30	3,4	34,3	0,9	40,1	5,2	16,1

El proceso de necrosis-regeneración se caracteriza por un cambio en la distribución de las distintas poblaciones de hepatocitos ya que mientras que, los hepatocitos normales presentan una estabilidad en cuanto a su contenido en DNA y organización cromosómica, los

hepatocitos en estado regenerante se encuentran involucrados en el proceso de proliferación a través del ciclo de división celular que incluye la síntesis programada del DNA para duplicar el material genómico de la célula antes de su división.

En todos los grupos de experimentación del presente trabajo se produce un incremento en la población de hepatocitos con dotación cromosómica diploide en el momento de la necrosis. Esta población comienza a disminuir después de la regeneración, con el fin de volver a adquirir el patrón característico de cada edad. El incremento de la población diploide viene acompañado por un descenso de los hepatocitos tetraploides y octoploides. El incremento de la fracción diploide en los hepatocitos maduros indica que existe una regresión a estados menos diferenciados típicos de las células en desarrollo o neoplásicas, en las cuales los hepatocitos adquieren características fetales (Cascales *et al*, 1992b).

En cuanto a las fases de síntesis de DNA S_1 y S_2 evolucionan de nuevo de manera opuesta. Así, en la fase S_1 los valores más elevados se alcanzan durante la regeneración siendo superiores en los animales adultos de 6 y 12 meses con valores del 14,4% y 16,3%, respectivamente, frente al 12% de los de 2 meses y el 8,5% y el 2,9% de los 18 y 30 meses, respectivamente. Es interesante destacar que el incremento en la replicación del DNA se corresponde con un espectacular descenso en las poblaciones poliploides, lo cual puede ser un índice de una mitosis aún más acelerada que la síntesis del DNA; aunque no obstante, el descenso en los hepatocitos poliploides puede deberse también a que la necrosis afecte mayoritariamente a las células localizadas en G_2/M . Los bajos niveles de síntesis observados en edades avanzadas nos indican que los hepatocitos de animales senescentes sufren una disminución notable de su capacidad proliferativa. Sin embargo, los hepatocitos comprometidos en S_2 sufren un descenso en la máxima necrosis que si bien en edades jóvenes se recupera, en edades avanzadas desaparece sin alcanzar niveles detectables al final del período estudiado.

El hecho de que los animales senescentes tengan una menor capacidad proliferativa se debe a que en edades avanzadas las células poliploides se dividen más lentamente que las diploides (Gerlung *et al*, 1992). Se ha propuesto que la pérdida de la capacidad proliferativa

debida a la edad es consecuencia de una activación y/o alteración en la regulación de un inhibidor específico de la síntesis del DNA denominado Sdi1 (Norwood y Gray, 1996). Este producto génico, también conocido como p21, WAF1, CIP1 y Cap20 (El Deiry *et al*, 1993; Gu *et al*, 1993; Harper *et al*, 1993; Li *et al*, 1994), es un factor peptídico que inhibe la actividad de los complejos ciclina/quinasa-dependiente de ciclina (CDK) responsables de la progresión del ciclo celular en su fase G₁/S (Xiong *et al*, 1993; Hunter, 1993; Ohtsubo y Roberts, 1993; Peter y Herskowitz, 1994; Pines, 1994; Noda, 1994). Esta inhibición, que se manifiesta por una parada de las células en G₁, se debe, a que los complejos ciclina/CDK son necesarios para la fosforilación de la proteína Rb, producto del gen supresor de retinoblastoma. Esta proteína juega un papel fundamental en el envejecimiento ya que, las células senescentes tienen bloqueada la capacidad de fosforilación de Rb en respuesta a estímulos normales de crecimiento (Stein *et al*, 1990).

Esta disminución de la capacidad proliferativa en células senescentes puede ser una de las posibles causas de la lesión que sufre el DNA en edades avanzadas, ya que al no producirse la reparación de las mismas se genera una situación de inestabilidad genómica, caracterizada por mutaciones somáticas tales como sustitución, inserción, translocación, delección, recombinación y cambios en el número de cromosomas, que desemboca en una alteración de las funciones celulares (Bohr y Anson, 1995). Sin embargo, también puede interpretarse como un mecanismo de defensa frente a la propagación de lesiones del DNA no reparadas.

A pesar de que las células progenitoras *in vivo* se localizan en el área periportal, que es la zona más oxigenada del acino hepático, en las fotografías de cortes de hígado obtenidas por microscopía óptica, se observaron mitosis tanto en la zona periportal como en la perivenosa. De esta manera pudo evaluarse *in situ* el proceso de regeneración post-necrótica inducida por la administración de la tioacetamida. El cálculo del índice mitótico (IM) se llevó a cabo en la zona perivenosa, detectándose los IM más elevados en los animales de 6 y 12 meses. En edades avanzadas, 18 y 30 meses, el IM descendió corroborando con ello que en estas edades la regeneración es mucho más lenta.

Es un hecho conocido que la pérdida de hepatocitos da lugar a la liberación de factores de crecimiento séricos (Andus *et al*, 1991) que van a ser los responsables de la división celular en el proceso regenerativo. Este efecto mitogénico se ha evaluado en nuestro modelo experimental de regeneración postnecrótica, sometiendo cultivos de fibroblastos NIH 3T3 a la acción del suero de ratas tratadas con tioacetamida y posterior medida de la incorporación a las células de timidina tritiada. Se detectó una respuesta bifásica consistente en una elevación de los factores de crecimiento en suero 24 horas antes de la necrosis, y un descenso en la actividad mitogénica en el momento de máxima necrosis. No se sabe si este descenso se debe a una menor transcripción de estos activadores de la proliferación o a una aparición en el suero de factores inhibidores que aparecen en etapas posteriores con el objeto de evitar una proliferación celular incontrolada. La actividad mitogénica de estos factores resultó significativamente elevada a las 12 horas en animales jóvenes y a las 24 horas en animales adultos, mientras que fué apenas perceptible en animales senescentes.

Teniendo en cuenta que algunas citoquinas son excelentes promotoras de la expresión de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (Curran *et al*, 1990; Geller *et al*, 1993), se investigó dicha inducción midiendo la liberación de NO por macrófagos aislados de ratas control incubados en presencia de sueros obtenidos de animales de distintas edades tratados con tioacetamida, con el fin de obtener más información sobre los factores específicos involucrados en este caso de hepatotoxicidad. Estos macrófagos cultivados *ex vivo* desarrollan un proceso de expresión de la iNOS semejante al obtenido en macrófagos obtenidos de animales tratados con lipopolisacárido (Nathan y Hibbs, 1991; Hortelano *et al*, 1992). La producción espontánea disminuyó cuando las células fueron incubadas con suero de animales tratados en el momento de máxima necrosis. Este descenso puede deberse a que el NO reacciona con el anion superóxido generando peroxinitrito, especie reactiva involucrada en el proceso de necrosis, al participar en la inactivación de la aconitasa y en la movilización de calcio mitocondrial con una desenergización paralela de la misma (Castro *et al*, 1994; Richter *et al*, 1994). Sin embargo, los sueros obtenidos en momentos posteriores indujeron significativamente la iNOS en todas las edades con valores superiores al propio control. No obstante, la inducción fue incrementándose progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 6 meses (1065%) que luego disminuyó hasta un 239% a los 30 meses.

La citoquina inflamatoria $\text{TNF}\alpha$ se sintetiza en respuesta al estrés y es uno de los factores de activación de la óxido nítrico sintetasa mejor conocido. Por ello, en el presente trabajo se evaluaron sus niveles en el suero de los distintos grupos de animales con el objeto de observar su influencia en el proceso de hepatotoxicidad inducida por la tioacetamida. Esta citoquina es sintetizada en hígado, mayoritariamente por las células de Kupffer (Decker, 1990) en situaciones adversas tales como el trasplante de médula osea, rechazo de trasplantes, shock endotóxico y hepatectomía parcial (Rock y Lowry, 1991). Su papel en los acontecimientos iniciales del proceso de regeneración hepatocelular están perfectamente establecidos (Satoh y Masatoshi, 1992). En nuestro caso, el $\text{TNF}\alpha$ muestra valores significativamente elevados en suero obtenido de ratas que se encontraban en el punto de máxima regeneración, valores que son superiores en suero de animales de 6 y 12 meses frente al resto de las edades estudiadas, verificando así los resultados obtenidos anteriormente. La determinación del $\text{TNF}\alpha$ en suero de ratas intoxicadas con tioacetamida, es un ejemplo de la variabilidad que experimenta este factor a medida que transcurre la edad ya que es en suero de ratas jóvenes donde este factor inicia su aparición 24 horas antes que en suero de ratas de 6/12 meses y 48 horas antes que en el de 18/30 horas.

Aunque las personas de edad avanzada son las que consumen más medicamentos, la mayoría de estudios sobre la eficacia de fármacos hasta la fecha se han realizado en personas jóvenes (Yuen, 1990); por ello, que el presente trabajo pueda proporcionar nuevos conocimientos en los mecanismos del envejecimiento y en algunos aspectos de la patología asociada con la senescencia, ya que hemos comprobado que la vida media de los xenobióticos se altera con la edad debido a:

- (1) que las reacciones de la fase I de biotransformación son más lentas, y
- (2) que disminuye la disponibilidad del GSH para formar conjugados (Fase II),

hechos ambos que conducen a una disminución en la eliminación de fármacos.

Las investigaciones incluidas en la presente Memoria incluyen resultados que bien podrían ser extrapolados a humanos, si se considera que el daño oxidativo al DNA producido por los radicales libres, se estima en un orden de magnitud superior en los roedores que en el hombre. (Fraga *et al*, 1990). También hay que tener en cuenta que en murinos las cantidades de citocromo P-450 son 10 veces menores que en humanos, y que ambos poseen las mismas cantidades de FAD monooxigenasa (Rodrigues, 1994).

Este estudio, además, abre un amplio campo de gran interés para investigar la administración de fármacos o medicamentos hepatotóxicos conjuntamente con antioxidantes conocidos. Entre estos antioxidantes hay que destacar los β -carotenos, la asociación de la vitamina C y la vitamina E o la melatonina. Esta última posee una actividad antioxidante más potente que el propio glutatión por su independencia de interacción con receptores y su efecto en todos los compartimentos subcelulares (Reiter, 1995). Estas asociaciones podrían remitir las reacciones adversas que se producen en personas de edades avanzadas, las cuales sufren alteraciones en el equilibrio oxidativo, que pueden determinar una disfuncionalidad del sistema inmune, pérdida de la integridad funcional de los lípidos de membrana, de las proteínas celulares y de los ácidos nucleicos que controlan la traducción y expresión génica celular (Meydani *et al*, 1995).

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1.- La capacidad de respuesta del hígado de rata frente a la agresión tóxica de la tioacetamida está alterada con la edad. Así, el daño hepático inducido muestra un retraso en la aparición de la lesión en animales de 6 a 30 meses y un incremento, tanto en su severidad como en la extensión de la zona necrosada en los de 6 y 12 meses. El retraso en la recuperación del perfil normal es muy acusado en las ratas senescentes.

2.- La severidad de la lesión depende de la actividad del sistema microsómico implicado en la biotransformación de la tioacetamida, la FAD monooxigenasa. En comparación con los animales adultos, las ratas viejas muestran una menor actividad del sistema monooxigenasa y en consecuencia una lesión menos severa. En todas las edades este sistema presentan una respuesta bifásica frente al hepatotóxico.

3.- La depleción del glutatión observada en la máxima necrosis se recupera en todas las edades estudiadas excepto en los animales senescentes. Del mismo modo, la oxidación de los grupos tiólicos proteicos y el incremento en la peroxidación lipídica se mantiene en ratas viejas durante un período de tiempo superior.

4.- Las actividades de la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que forman parte del sistema de defensa antioxidante, sufren incrementos paulatinos y notorios a medida que transcurre la edad. Frente a la agresión tóxica, la respuesta de la glutatión peroxidasa antecede a la de los otros dos enzimas; aunque hay que destacar que en ratas senescentes los cambios en estas actividades no se verifican de manera paralela.

5.- Las actividades de las dos isoformas de la superóxido dismutasa y de la catalasa se elevan notablemente por efecto de la edad. Respecto al proceso de intoxicación, los descensos significativos en estas enzimas, coincidentes con la necrosis, se deben a su ubicación selectiva en la región perivenosa del acino, que es la que resulta lesionada. Durante la regeneración hepatocelular se induce paralelamente la actividad y la expresión de los mismos hasta alcanzar el valor inicial en todas las edades, excepto en los animales senescentes.

6.- Por efecto de la edad, el DNA genómico muestra una tendencia hacia la poliploidización y una hipodiploidía, que se inicia a los 12 meses y se eleva en edades más avanzadas. Durante la necrosis y regeneración, los perfiles de DNA muestran la desaparición de las poblaciones poliploides, y en animales senescentes una pérdida de la capacidad proliferativa.

7.- El estudio del suero de ratas después de la administración de tioacetamida demuestra que los factores de crecimiento y citoquinas se liberan al suero a las 24 horas de la intoxicación, alcanzando el máximo durante la regeneración. Los valores más elevados se registran en suero de animales de 6 y 12 meses, son menores a los 18 meses y mínimos a los 30 meses.

8.- Los problemas más importantes de la senescencia frente a la hepatotoxicidad, que se deducen de estos resultados son, la disminución en la eliminación de xenobióticos y el retraso en la regeneración hepatocelular y la restauración de la funcionalidad hepática. Por ello, la conclusión a nivel clínico y farmacológico es que las dosis administradas a pacientes de avanzada edad han de ser cuidadosamente controladas por presentar estos una mayor susceptibilidad a situaciones de estrés oxidativo.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arci RJ, Kramer R, Guidotti G y Cantrello HF. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 312-316 (1993).
- Aebi H. Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase (EC 1.11.1.6.). En: *Methods of Enzymatic Analysis.* (ed HU Bergmeyer). 3rd edn. Vol III. pp 273-282. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Agarwal S y Sohal RS. Relationship between ageing and susceptibility to protein oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1203-1206 (1993).
- Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ y Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* **263**, G579-G585 (1992).
- Albina JE, Cui S, Mateo RB y Reichmer JS. Nitric-oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**, 5080-5085 (1993).
- Amasino RM. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* **152**, 304-307 (1986).
- Ames BN, Shigenaga MK y Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**, 165-170 (1995).
- Amimoto T, Matsura T, Koyoma SY, Naknishi T, Yamada K y Kajiyama G. Acetaminophen-induced hepatic injury in mice: the role of lipid peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q₁₀ and alpha-tocopherol. *Free Radical Biol. Med.* **19**, 169-176 (1995).
- Andus T, Bauer J y Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology.* **13**, 364-375 (1991).
- Arber N y Zajicek G. The streaming liver IV Streaming intrahepatic bile ducts. *Liver.* **10**, 137-140 (1990).
- Asami O, Ihara I, Shimidzu N, Shimidzu S, Tomita Y, Ichihara A y Nakamura T. Purification and characterization of hepatocyte growth factor from injured liver of carbon tetrachloride-treated rats. *J. Biochem. Tokyo.* **109**, 8-13 (1991).
- Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalynaraman B y Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 168-178 (1993).

- Ayrton AD, Ioannides C y Parke DV. Induction of the cytochrome P450 I and IV families and peroxisomal proliferation in the liver of rats treated with Benoxaprofen. Possible implications in its hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 109-115 (1991).
- Bagglioni M, Hirsch JG y Duve C. *J. Cell Biol.* **45**, 586-591 (1970).
- Barja G, Pérez-Campo R y López-Torres M. Antioxidant defenses and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem. J.* **272**, 247-250 (1990).
- Barja G. Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad de crecimiento. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* **31**, 153-161 (1996).
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menéndez-Pelaez A, Chen LD y Peoggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* (1996).
- Baron J. In situ sites for xenobiotic activation and detoxification: implications for the differential susceptibility of cells to the toxic actions of environmental chemicals. En: *Histo- and Cytochemistry Fischer.* **23**. pp. 32-34. Verlag. Stuttgart, New York (1991).
- Bars RG y Elcombe CR. Dose-dependent acinar induction of cytochromes P-450 in rat liver. *Biochem. J.* **277**, 577-580 (1991).
- Becker FF. Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 553-557 (1983).
- Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P y Orrenius S. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 4412-4416 (1992).
- Bennett AM y Williams GM. Reduction of rat liver endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and mobilization of hepatic intracellular calcium by cyprofibrate, a peroxisome proliferator. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 595-605 (1992).
- Berridge MJ y Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* **312**, 315-321 (1984).
- Berry MN, Halls HJ y Grivell MB. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocytes suspensions. *Life Sci.* **51**, 1-16 (1992).
- Beyer HS, Sherman R y Zieve L. Aging is associated with reduced liver regeneration and diminished thymidine kinase mRNA content and enzyme activity in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **117**, 101-108 (1991).
- Bezzoujen CF. Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism - A review. *Mech. Ageing Dev.* **25**, 1-22 (1984).

- Birnboim H. DNA strand breakage in human leucocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate. *Science*. **215**, 1247-1249 (1982).
- Boelsterli UA. Specific targets of covalent drug-protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug-induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* **25**, 395-451 (1993).
- Bohr VA y Anson RM. Mutation Research DNAGING genetic instability and aging. *Mutat. Res.* **338**, 25-34 (1995).
- Bolzan AD, Brown AO, Goya RG y Bianchi MS. Hormonal modulation of antioxidant enzyme activities in young and old rats. *Exp. Gerontol.* **30**, 169-175 (1995).
- Bourne HR y De Franco AL. Signal transduction and intra-cellular messengers. En: *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer*. (ed RA Weinberg). pp 97-124. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989).
- Bradford MM. 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).
- Breen AP y Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol. Med.* **18**, 1033-1077 (1995).
- Bucher NLR. Liver regeneration: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 615-624 (1991).
- Bucher NLR. Liver regeneration. Then and now. En: *Liver Regeneration and Carcinogenesis*. (ed RL Jirtle). pp 1-25. Academic Press. San Diego, California (1995).
- Bucher NLR y Strain AJ. Regulatory mechanisms in hepatic regeneration. En: *Wright's Liver and Biliary Disease*. (eds GH Millward-Sadler, R Wright y MJP Arthur). 3rd ed. pp 258-274. Saunders, London (1992).
- Bursch W, Oberhammer F y Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *TIPS*. **13**, 245-251 (1992).
- Camplejohn RS. Flow cytometry in clinical pathology. En: *Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach*. (eds CS Herrington y O'D McGee). Vol I. pp 239-258. University Press, Oxford (1992).
- Cascales M y Martín-Sanz P. Regeneración Hepática. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias Vol. 13*, pp 129-146, CSIC. Madrid (1990a).
- Cascales M, Martín-Sanz P y Cascales C. Liver functionality and enzymes related to peroxidation in experimental hyper-plastic noduligenesis. *3 Hepatologische Symp. Friedrich-Schiller Univ. Jena*. pp 185-196 (1990b).

- Cascales M, Martín-Sanz P, Craciunescu DG, Mayo I, Aguilar A, Robles-Chillida EM y Cascales C. Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis*. **12**, 233-240 (1991).
- Cascales M, Martín-Sanz P, Alvarez A, Sánchez-Pérez M, Díez-Fernández C y Boscá L. Isoenzyme of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis. *Hepatology*. **16**, 232-240 (1992a).
- Cascales M, Martín-Sanz P y Boscá L. Phorbol esters, bombesin and insulin elicit differential responses on phospho-fructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphate system in primary cultures of foetal and adult hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **207**, 391-397 (1992b).
- Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L. Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology*. **20**, 992-1001 (1994).
- Castro L, Rodríguez M Y Raid R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 29409-29415 (1994).
- Chanda S, Mangipudy RS, Warbritton A, Bucci TJ y Mehendale HM. Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality. *Hepatology*. **21**, 477-486 (1995).
- Chen GP y Ziegler DM. Liver microsome and flavin-containing monooxygenase catalyzed oxidation of organic selenium compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 566-572 (1994).
- Chieli E y Mavaldi G. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology*. **31**, 41-52 (1984).
- Cholerton S, Daly AK y Idle R. The role of individual human cytochromes P-450 in drug metabolism and clinical response. *TIPS*. **13**, 434-439 (1992).
- Chomozynski K y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- Christon R, Halovi RB y Durand G. Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver. *J. Nutr.* **125**, 3062-3070 (1995).
- Corcoran GB, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA y Buttyan R. Contemporary issues in toxicology. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**, 169-181 (1994).
- Cornell RP. Acute phase responses after acute liver injury by partial hepatectomy in rats as indicators of cytokine release. *Hepatology*. **11**, 923-931 (1990a).

- Cornell RP, Liljequist BL y Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology*. **11**, 916-922 (1990b).
- Cotgreave IA, Moldeus P y Orrenius S. Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **28**, 189-212 (1988).
- Cressman DY, Diamond RH y Taub R. Rapid activation of Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*. **21**, 1443-1449 (1995).
- Crissman HA, Stevenson AP, Kissane RJ y Tobey RA. Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometric analysis. En: *Flow Cytometric and Sorting*. (eds MR Melamed, PF Mullaney, ML Mendelsohn). pp 243-261. John Wiley and Sons, New York (1979).
- Cunha FQ, Moncada S y Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of NOS by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **182**, 1155-1159 (1992).
- Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG y Simmons RL. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann. Surg.* **212**, 426-471 (1990).
- Dallas CE y Evans DL. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature*. **345**, 557-558 (1990).
- De AK y Darad R. Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats. *Mech. Ageing Dev.* **59**, 123-128 (1991).
- De la Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J y Viña J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* **10**, 333-338 (1996).
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192**, 245-261 (1990).
- Del Maestro RF, McDonald W y Anderson R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in experimental and human brain tumors. En: *Oxy radicals and their scavenger systems*. (eds R Greenwald y G Cohen). Vol 2, pp 28-33. Elsevier. New York (1983).
- Dennis PA y Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor β requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 580-584 (1991).
- Desmet VJ. The hepatocyte: Structural specialization and functional integration. En: *Systematic and Quantitative Hepatology. Pathophysiological and methodological aspects*. (eds G Molino y P Avagnina). pp 43-50. Masson, Milano (1990).

- Desmet VJ. Modulation of the liver in cholestasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 313-323 (1992).
- Deutsch J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. D-Glucose-6-phosphate: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed HU 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*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. pp 1-184. Madrid (1992).
- Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M. Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology*. **18**, 912-918 (1993).
- Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M. Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca²⁺ dependent enzymes. *J. Hepatol.* **24**, 460-467 (1996a).
- Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1159-1163 (1996b).
- Di Monte D, Bellomo G, Thor H, Nicotera P y Orrenius S. Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 2390-2392 (1984).
- Ding AM, Nathan CF, Granger J, Derynch R, Stuehr DJ y Srimal S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors β_1 , β_2 and β_3 inhibit induction on macrophages nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J. Immunol.* **145**, 940-944 (1990).
- DuBois RN, Hunter EB y Russell WE. Molecular aspects of hepatic regeneration. En: *Mol. Basis Med.* (eds CV Dang y AM Felman) (1994).
- Duthie G y Arthur JR. Free radicals and calcium homeostasis. *Free Radical Biol. Med.* **14**, 435-442 (1993).
- Dyroff MC y Neal RA. Studies of the mechanism of metabolism of thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **23**, 219-227 (1983).
- El Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW y Vogelstein B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G₁ arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**, 1169-1174 (1994).
- Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* **16**, 99-109 (1994).

- Evans MJ, Shami SG y Wells JR. Quantitative techniques for morphological evaluation. En: *Handbook Toxicol. Pathol.* (eds MH Wanda y CG Rousseaux). pp 37-48. Academic Press, Inc (1991).
- Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Hu Z y Thorgeirsson S. Expression of transforming growth factor alfa in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Mol. Carcinogen.* **5**, 25-31 (1992).
- Fairman MP. DNA polymerase d/PCNA: actions and interactions. *J. Cell Sci.* **95**, 1-4 (1990).
- Fausto N y Mead JE. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. *Lab. Invest.* **60**, 4-13 (1989).
- Fausto N. Hepatic Regeneration. En: *Hepatology, A textbook of Liver Disease*. 2nd ed. (eds D Zakim y TD Boyer). pp 49-65. WB Saunders Co, Philadelphia (1990).
- Fausto N. Liver regeneration: models and mechanisms. En: *Liver regeneration*. (eds D Bernuau y G Feldmann). pp 1-6. John Libbey. Eurotext, Paris (1992).
- Fausto N y Webber E. Mechanisms of growth regulation in liver regeneration and hepatic carcinogenesis. En: *Progress in Liver diseases*. Vol XI. pp 115-138. WB Saunders, Philadelphia (1993).
- Fausto N y Webber E. Liver regeneration. En: *The liver biology and pathology*. pp 1059-1084. Raven press Ltd, New York (1994).
- Fawcett DW. *Tratado de Histología*. **11**, ed Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid (1987).
- Feingold KR, Barker M, Jones AL y Grunfeld C. Localization of tumor necrosis factor-stimulated DNA synthesis in the liver. *Hepatology*. **13**, 773-779 (1991).
- Fernández-Checa JC, Ookhtens M y Kaplowitz N. Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of glutathione and organic anions in rat liver canalicular membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **268**, 10836-10841 (1993).
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park J, Degan P y Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4355-4537 (1990).
- Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Sciascia C, Coetza ML, Pellici R y Todo S. Different response to epidermal growth factor of hepatocytes in culture isolated from male and female rat liver: inhibitor effect of estrogen on binding and mitogenic effect of epidermal growth factor. *Gastroenterology*. **93**, 597-605 (1987).
- Gadaleta MN. Aging and mitochondrial genome. *Aging Clin. Exp. Res.* **7**, 469 (1995).

- García del Moral R, O'Valle F y Masseroli M. Técnicas de análisis de imágenes en morfología microscópica. En: *Laboratorio de Anatomía Patológica*. pp 405-425. Interamericana. McGraw-Hill (1993).
- Gascó P. Hepatotoxicidad inducida por cocaína en ratón. Alteraciones funcionales bioquímicas y morfológicas durante la necrosis y regeneración hepáticas. *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. pp 1-225. Madrid (1993).
- Geerts A, Schuppan D, Lazeroms S, De Zanger R y Wisse E. Collagen type I y III occur together in hybrid fibrils in the space of Disse of normal rat liver. *Hepatology*. **12**, 233-241 (1990).
- Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmins RL y Billar TR. Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 522-526 (1993).
- Gerber MA y Thung SN. Liver stem cells and development. *Lab. Invest.* **68**, 253-254 (1993).
- Gerlung P, Grotmol T, Erikstein B, Stokke T y Seglen PO. Reduced proliferative activity of polyploid cells in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. **13**, 1795-1801 (1992).
- Gerlynk P, Abyholm A, Grotmos T, Erikstein B, Huitfieldt HS, Stokke T y Seglen PO. Binucleation and polyploidization pattern in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Proliferat.* **26**, 557-565 (1993).
- Gilbert HF. Biological disulfides: The third messenger?. *J. Biol. Chem.* **257**, 12086-12091 (1982).
- Goldberg DM y Spooner RJ. Glutathion Reductase. NAD(P)H: oxidiced glutathione oxidoreductase, EC 1.6.4.2.. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed HU Bergmeyer). 3rd edn. Vol III. pp 258-265. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- González FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *TIPS*, **13**, 346-352 (1992).
- Green LC, Wagner DA y Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138 (1982).
- Grewal KK y Racz WJ. Intracellular calcium disruption as a secondary event in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 26-33 (1993).
- Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212 (1980).

- Groot M. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterol.* **41**, 328-332 (1994).
- Gruppusso PA. Expression of hepatic transforming growth factor receptor during late gestation in the foetal rat. *Endocrinology.* **125**, 3037-3043 (1989).
- Gruppusso PA, Mead JE y Fausto N. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* **50**, 1464-1469 (1990).
- Gu Y, Turck CW y Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature.* **366**, 707-710 (1993).
- Guengerich FP. Polymorphism of cytochrome P-450 in humans. *TIPS.* **10**, 107-109 (1989).
- Günzler WA, Kramers H y Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. *Klin Chem. Klin Biochem.* **12**, 444-452 (1974).
- Habig WH, Pabst MJ y Jakoby WB. Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).
- Halliwell B. Oxidant and human disease: some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358-364 (1987).
- Handler JA, Genell CA y Goldstein RS. Hepatobiliary function in senescent male sprague-dawley rats. *Hepatology.* **19**, 1496-1503 (1994).
- Harmon D. Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* **257**, 257-266 (1992).
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K y Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **75**, 805-816 (1993).
- Hauschildt S, Luckhoff A, Mulsch A, Kohler J, Bessler W y Busse R. Induction and activity of NO synthase in bone-marrow derived macrophages are independent of Ca²⁺. *Biochem. J.* **270**, 351-356 (1990).
- Hodson E y Levi PE. The flavin-containing monooxygenase as a sulfur oxidase. En: *Metabolism of xenobiotic.* (eds JW Gorrod, H Oelchlaeger y J Caldwe). pp 81-88. London, Taylor and Francis, (1988).
- Holtzman JL. The role of the stimulation of NADPH-cytochrome P-450 reductase activity in hepatic microsomal mixed function oxidase activity. *Pharmacol. Therapeut.* **4**, 601-627 (1979).
- Hortelano S, Genaro AM y Boscá L. Phorbol esters induce oxide synthase activity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 24937-25940 (1992).

- Horbach GJM, Van Asten JG, Reijnders IMCM, Kremers P y Van Bezooijer CFA. The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P-450. *Xenobiotica* **22**, 515-522 (1992).
- Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJM y Boscá L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology*. **21**, 776-786 (1995).
- Huang N, Wang D y Heppel LA. Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6 and A431 cells and acts synergistically with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 7904-7908 (1989).
- Hue L, Feliú JE y Hers HG. 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).
- Hunter T. Braking the cycle. *Cell*. **75**, 839-841 (1993).
- Inoue M. Protective mechanism against reactive oxygen species. En: *The liver: biology and pathobiology*. (eds IM Arias, JL Boyer, N Fausto, WB Jakoby, DA Schachter y PA Shafritz), 3th ed, pp 443-459. Raven Press. New York (1994).
- Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *TIBS*. **17**, 463-468 (1992).
- Itoh T, Suzuki M y Mitsui Y. Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary culture of rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **192**, 1011-1015 (1993).
- Jakoby WB y Ziegler DM. The enzymes of detoxification. *J. Biol. Chem.* **2**, 321-324 (1990).
- Jamso JO, Ekberg S, Hoath SB, Beamer WG y Frohman LA. Growth hormone enhances hepatic epidermal growth factor receptor concentration in mice. *J. Clin. Invest.* **82**, 1871-1876 (1988).
- Jeffery EH. Biochemical basis of toxicity. En: *Handbook of Toxicologic Pathology*. (ed WM Haschek y CG Rousseaux). pp 49-70. Academic Press. Inc (1991).
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S y Smith MT. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science*. **217**, 1257-1259 (1982).
- Jirtle RL, Carr BI y Scott CD. Modulation of insulin-like growth factor 2/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor- β 1 during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **266**, 22444-22450 (1991).

- Jones AL. Anatomy of the normal liver. En: *Hepatology. A textbook of Liver Disease*. (eds D Zakim y TD Boyer). Vol. 1. 2nd edn. pp 3-30. WB Saunders Company, Philadelphia (1990).
- Jungermann K y Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*. **2**, 385-395 (1982).
- Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ y Warnke RA. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am. J. Pathol.* **138**, 1471-1477 (1991).
- Kan M, Huang JS, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B y McKeehan WL. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor) a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 7432-7436 (1989).
- Kaplowitz N, Aw TY y Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 715-744 (1985).
- Karasik A y Kahn CR. Dexamethasone-induced changes in phosphorylation of the insulin and epidermal growth factor receptor and their substrates in intact rat hepatocytes. *Endocrinology*. **123**, 2214-2222 (1988).
- Katz N y Jungermann K. Metabolic heterogeneity of the liver. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology*. (eds N Tavoloni y PD Berk). pp 55-70. Raven Press, New York (1993).
- Kayano K, Mitsuru Y, Kubota M, Takenaka K, Mori K, Yamashita A, Kubo Y, Sakaida I, Okita K y Sanuki K. Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. *Liver*. **12**, 132-136 (1992).
- Kelly RB, Cozzrelli NR, Deutscher MP, Lehman JR y Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polimesase at a single strand break. *J. Biol. Chem.* **245**, 39-45 (1970).
- Kera Y, Sippel HW, Penttila KE y Lindros KO. Acinar distribution of glutathione-dependent detoxifying enzymes. Low glutathione peroxidase activity in perovenous hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2003-2006 (1987).
- Kitani K. Drugs and the ageing liver. *Life Chem. Reports*. **6**, 143-230 (1988).
- Kitani K. Liver and aging. *Gastroenterología Japónica*. **27**, 276-285 (1992).
- Koss G, Losekam M, Schüler E y Schreiber I. The hepatic glutathione content and glutathione S-transferase activity in the pike (*Esox lucius* L.) and rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B** (2), 257-258 (1991).

- Krebs HA, Cornell NE, Lund P y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism* (eds F Lundsquist y N Tygstrup). pp 726-750. Copenhagen, Munksgaard (1974).
- Kuma SI, Inaba M, Ogata H, Inaba K, Okumura T, Saito K y Yamamoto M. Effect of human recombinant interleukin-6 on the proliferation of mouse hepatocytes in the primary culture. *Immunobiol.* **180**, 235-242 (1990).
- Kyle ME, Nakae D, Sakaida I, Serroni A y Farber JL. Protein thiol depletion and the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3797-3805 (1989).
- Kyle ME y Farber JL. Biochemical mechanism of toxic cell injury. En: *Handbook of Toxicologic Pathology*. (ed WM Haschek y CG Rousseaux). pp 71-89. Academic Press, Inc (1991).
- LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am. J. Gastroenterol.* **89**, S86-S96 (1994).
- Lanahan A, Williams JB, Sanders LK y Nathan D. Growth factor-induced delayed early responses genes. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3919-3929 (1992).
- Lauterburg BH. Early disturbance of calcium translocation across the plasma membrane in toxic liver injury. *Hepatology.* **7**, 1179-1183 (1987).
- Lemasters JJ, DiGiuseppi J, Nieminen AL y Herman B. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature.* **325**, 78-81 (1987).
- Lezza AMS, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P y Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **205**, 772-779 (1994).
- Li R, Wage S, Hannon CJ, Beach D y Stillmann B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature.* **371**, 534-537 (1994).
- Liu J y Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech. Ageing Develop.* **71**, 23-30 (1993).
- Lowenstein CJ y Snyder SH. Nitric oxide a novel messenger. *Cell.* **70**, 705-707 (1992).
- Lu SC, Ge JL, Huang HY, Kuhlenkamp J y Kaplowitz N. Thiol-disulfide effects on hepatic glutathione transport. Studies in culture rat hepatocytes in perfused livers. *J. Clin. Invest.* **92**, 1188-1197 (1993).

- Maloney AG, Schmucker DL, Vessey DS y Wang RK. The effects of aging on the hepatic microsomal mixed-function oxidase system of male and female monkeys. *Hepatology*. **6**, 282-287 (1986).
- Mangipudy RS, Chanda S y Mehendale HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ. Health Persp.* **103**, 260-267 (1995).
- McConkey DJ y Orrenius S. Cellular signaling in thymocyte apoptosis. En: *Apoptosis: The molecular basis of cell death*. (eds LD Tomei y FO Cope). pp 227-246. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York (1991).
- Mead JE, Braun L, Martin DA y Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res.* **50**, 7023-7030 (1990).
- Mehendale HM. Role of hepatocellular regeneration and hepatolobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1155-1162 (1991).
- Meister A y Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760 (1983).
- Meydani SN, Wu D, Santos MS y Hayek MG. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1462S-1476S (1995).
- Michalopoulos GK. Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J.* **4**, 176-187 (1990).
- Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor. *Hepatology*. **15**, 149-155 (1992).
- Mihara K y Sato R. Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. En: *Methods in Enzymology*. pp 102-108. Academic Press. New York, San Francisco, London (1978).
- Minotti G y Aust SD. Redox Cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*. **27**, 219-226 (1992).
- Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N y Nakayama T. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **163**, 967-973 (1989).
- Mochida S, Masaki N, Ohta Y, Itsuro M, Ogata I y Fujwara K. In situ detection of oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Pathol.* **167**, 83-89 (1992).
- Molero C, Benito M y Lorenzo M. Glucose 6-phosphate dehydrogenase gene expression in fetal hepatocyte cultures under non-proliferative and proliferative conditions. *Exp. Cell Res.* **210**, 26-32 (1994).
- Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142 (1991).

- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T y Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*. **67**, 901-908 (1991).
- Mossin L, Blankson H, Huitfeldt H y Seglen PO. Ploidy-dependent growth and binucleation in cultured rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **214**, 551-560 (1994).
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A y Tashiro K. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. **342**, 440-443 (1989).
- Nathan C y Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 65 (1991).
- Nicotera P, Moore M, Mirabelli F, Bellomo G y Orrenius S. Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Lett.* **181**, 149-153 (1985).
- Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svensson SA, Bellomo G y Orrenius S. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. *J. Biol. Chem.* **261**, 14628-14635 (1986).
- Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S. The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 484-494 (1990).
- Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **82**, 449-470 (1992).
- Niehaus WG, Samuelsson Jr y Wills ED. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem. J.* **113**, 315-341 (1969).
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM y Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**, 90-98 (1994).
- Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Tanoguchi S y Nakamura T. Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers as revealed by in situ hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **173**, 42-47 (1990).
- Norwood TH y Gray M. The role of DNA damage in cellular aging: is it time for a reassessment?. *Exp. Gerontol.* **31**, 61-68 (1996).
- Ohtsubo M y Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*. **259**, 1908-1912 (1993).
- 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, McConkey DJ, Jone DP y Nicotera P. Ca^{2+} activated mechanisms in toxicity and programmed cell death. *ISI Atlas Sci. Pharmacol.* **1**, 319-324 (1988).
- Osada J, Aylagas H, Miró-Obradors MJ y Palacios-Alaiz E. Alterations in lipid characteristics of lysosomes are involved in liver necrosis induced by thioacetamide. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **374**, 129-132 (1993).
- Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M y Barja G. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanism. Ageing Develop.* **86**, 53-66 (1996).
- Pessayre D. Mécanismes des hépatites médicamenteuses. *Med. Sci.* **2**, 373-379 (1987).
- Peter M y Herskowitz I. Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell.* **79**, 181-184 (1994).
- Picket CB y Lu AYH. Glutathion S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 743-764 (1989).
- Pieri C, Moroni F, Marra M, Marcheselli F y Reccegioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch. Gerontol. Geriatrics.* **20**, 159-165 (1995).
- Pierrefiche G y Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp. Gerontol.* **30**, 213-227 (1995).
- Pines J. Arresting developments in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 143-145 (1994).
- Popp JA y Cattley RC. Hepatobiliary System. En: *Handbook of Toxicologic Pathology.* (ed WM Haschek y CG Rousseaux). pp 279-314. Academic Press. Inc (1991).
- Porter TD y Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472 (1991).
- Presta M, Statuto M, Rusnati M, Dell'Era P y Ragnotti G. Characterization of Mr 25,000 basic fibroblasts growth factor form in adult, regenerating, and foetal rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **164**, 1182-1189 (1989).
- Principe P, Wilson GD, Riley PA y Slater TF. Flow cytometric analysis of protein thiol groups in relation to the cell cycle and the intracellular content of glutathione in rat hepatocytes. *Cytometry.* **10**, 750-761 (1989).
- Pufahl RA, Nanajappan PG, Woodard RW y Marletta MA. Mechanistic probes of n-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. *Biochemistry.* **31**, 6822-6828 (1992).

- Rajpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, Robinson TW, Groffen J, Heisterkamp N y Forman HJ. Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 56-62 (1992).
- Redd DJ. Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 495-502 (1990).
- Reid LM. Stem cell biology, hormone/matrix synergies and liver differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 121-130 (1990).
- Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* **16**, 383-415 (1995).
- Rej R y Horder M. Aspartate aminotransferase. L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1. Routine UV method. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed HU Bergmeyer). 3rd edn. Vol III. pp 416-424. Verlag Chemie, Weinheim (1984).
- Remvikos Y, Jouve M, Beuzeboc P, Magdelenat H y Pouillart P. Cell cycle modifications of breast cancers during neoadjuvant chemotherapy: a flow cytometry study of fine needle aspirates. *Eur. J. Cancer.* **29A**, 1843-1848 (1993).
- Richter C, Godvadze V, Schapbach R, Schweizer M y Schlegel J. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **205**, 539-541 (1994).
- Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 647-653 (1995).
- Rikans LE. Influence of aging on chemically induced hepatotoxicity. Role of age-related changes in metabolism. *Drug Metab. Rev.* **20**, 87-110 (1989).
- Rikans LE, Moore DR y Snowden CD. Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1074**, 195-200 (1991).
- Rikans LE, Cai Y, Kosanke SD y Venkataraman PS. Redox cycling and hepatotoxicity of diquat in aging male fischer 344 rats. *Drug Matab. Dispos.* **21**, 605-610 (1993).
- Rock CS y Lowry SF. Tumor necrosis factor- α . *J. Surg. Res.* **51**, 434-445 (1991).
- Rodrigues AD. Use of *in vitro* human metabolism studies in drug development. An industrial prespective. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 2147-2156 (1994).
- Rosa JL, Ventura F, Carreras J y Bartrons R. Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase during liver regeneration. *Biochem. J.* **270**, 645-649 (1990).

- Roskhams T y Van den Oord JJ. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am. J. Pathol.* **137**, 1019-1025 (1990).
- Rubin JS, Chan AML, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW y Aaronson SA. A broad spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 415-419 (1991).
- Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, Juul N, Pettersen EO y Seglen PO. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis.* **9**, 939-945 (1988).
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press.* Cold Spring Harbour, New York (1989).
- Sandberg AA. The chromosomes and the cell cycle. En: *Diagnostic Cytology.* LG Koss, JB Lippincott. 4^a ed. Vol I. pp 154-179. Company, Philadelphia (1992).
- Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL y Degen JL. Complete Hepatic Regeneration after Somatic Deletion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell.* **66**, 245-256 (1991).
- Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis.* **16**, 1585-1593. (1995).
- Sanz N, Díez-Fernández C, Varvelde AM, Lorenzo M, Benito M y Cascales M. Malic enzyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase gene expression increases in rat liver cirrhogenesis. *British J. Cancer.* (en prensa) (1996a).
- Sanz N, Díez-Fernández C y Cascales M. Variations of hepatic antioxidant systems and DNA ploidy in rats aged 2 to 8 months. *Biochim. Biophys. Acta.* **1315**, 123-130 (1996b).
- Satoh M y Masatoshi Y. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor β and interleukine 6. *J. Cell Physiol.* **150**, 134-139 (1992).
- Scarce LM, Lee J, Naji L, Greenbaum L, Cressman DE y Taub R. Rapid activation of latent transcription factor complexes reflects initiating signals in liver regeneration. *Cell Death Differen.* **3**, 47-55 (1996).
- Schenkman JB. The effect of temperature and substrates on component reactions of the hepatic microsomal mixed function. *Mol. Pharmacol.* **8**, 178-188 (1972).
- Scheuer PJ. The normal liver. En: *Liver Biopsy Interpretation.* 3^a ed. pp 15-26. Bailliere Tindall, London (1980).

- Schmidt HW, Warner TD, Nakane M, Förstermann M y Murad F. Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol.* **41**, 615-624, (1992).
- Schmucker DL y Wang RK. Effects of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug metabolizing system. *Mech. Aging Develop.* **15**, 189-202 (1981).
- Schmucker DL. Aging and drug disposition. En: *Review of biological research in aging.* (ed M Rothstein). Vol II. pp 465-501, Alan L Liss, New York (1985).
- Schuler E y Salvi R. Pattern of hepatocyte renewal in regenerated rat liver. Evidence against streaming mechanism (abstract) *Hepatology.* **14**, 102A (1991).
- Scoazec JY. Liver stem cells: myth or reality?. En: *Liver Regeneration.* (eds D Bernuau y G Feldman). pp 17-27. John Libbey Eurotext, Paris (1993).
- Sell S. Is there a liver stem cell?. *Cancer Res.* **50**, 3811-3815 (1991).
- Sellinger M, Barrett C, Malle P, Gordon ER y Boyer JL. Cryptic Na⁺, K⁺ -ATPase activity in rat liver canalicular plasma membranes: Evidence for its basolateral origin. *Hepatology.* **11**, 223-229 (1990).
- Shapiro HM. Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113**, 591-597 (1989).
- Shigenaga MK, Hagen TM y Ames B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10771-10778 (1994).
- Sies H. En: *Glutathione storage, transport and turnover in mammals.* pp.63-88 Japan Sci Press, Tokio/VNU Science Press, Utrech (1992).
- Sies H. Oxidative stress. Introductory remarks. En: *Oxidative Stress.* (ed H Sies). pp 1-7. Academic Press, London (1985).
- Simpson JA, Narita S, Giese S, Gebicki S, Gebicki M y Dean RT. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem. J.* **282**, 621-624 (1992).
- Simpson JF, Dutt PL y Page DL. Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas. *Hum. Pathol.* **26**, 608-611 (1992).
- Sirica AE y Mathis GA. Isolation, culture and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology.* **58**, 44-64 (1990).
- Slack JM. Peptide regulatory factors in embryonic development. *Lancet.* **1**, 1312-1315 (1989).
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**, 1-15 (1984).

- Smyser BP y Hodgson E. Metabolic of phosphorous-containing compounds by pig liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1145-1150 (1985).
- Sohal RS, Ku H, Agarwal S, Forster MJ y Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechan. Ageing Develop.* **74**, 121-133 (1994).
- Sohal RS, Agarwal S y Sohal BH. Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mechan. Ageing Develop.* **81**, 15-25 (1995).
- Spearman ME y Leibman LS. Aging selectively alters glutathione-S-transferase isoenzyme concentration in liver and lung cytosol. *Drug Metab. Dispos.* **12**, 661-671 (1984).
- Sporn MB y Roberts AB. TGF β : problems and prospects. *Cell Regul.* **1**, 875-882 (1990).
- Spyrtos F. DNA content and cycle analysis by flow cytometry in clinical samples: Application in breast cancer. *Biol. Cell.* **78**, 69-72 (1993).
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science.* **257**, 1220-1224 (1992).
- Stein GH, Beeson M y Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science.* **249**, 666-668 (1990).
- Sum CY y Kasper CB. Mixed-function amine oxidase of the rat hepatocyte nuclear envelope. Demonstration and effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 69-72 (1982).
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK y Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 3343-3347 (1990).
- Suzuki M, Itoh T, Suzuki T, Koga N, Kato K, Saito T y Mitsui Y. Identification of the hepatocyte mitogen in bovine spleen as heparin-binding growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **186**, 1192-1200 (1992).
- Tamura J, Tanaka J, Fujita KI, Yoshida M, Kasamatsu T, Arai S y Tobe T. Cell kinetics of regenerating liver after 70% hepatectomy in rats. 2-color flow cytometric analysis. *HPB Surg.* **5**, 103-114 (1992).
- Tang DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC y Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* **1**, 57-60.
- Taub R. Transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J.* **10**, 413-427 (1996).
- Terada T y Nakanuma Y. Development of human intrahepatic peribiliary glands. *Lab. Invest.* **68**, 261-269 (1993).

- Tilly JL y Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*. **136**, 242-252 (1995).
- Travis J. The search for liver stem cells picks up. *Science*. **259**, 1829 (1993).
- Vielh P, Magdelénat H, Remvikos Y y Dutrillaux B. Analysis of DNA content. En: *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Flow Cytometric*. (ed P Vielh). pp 21-57. Igaku-Shoin, New York-Tokyo (1991).
- Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry*. **3**, 323-327 (1983).
- Vos RME y Bladeren PJP. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interactions*. **75**, 241-265 (1990).
- Wahlefeld AW y Bergmeyer HU. γ - glutamil transferase. Routine method. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed HU Bergmeyer). 3rd edn. Vol III. pp 352-356. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Waxman DJ y Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J*. **281**, 577-592 (1992).
- Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL y Brenner DA. Elevation of jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J. Clin. Invest*. **95**, 803-810 (1995).
- White RE y Coon JJ. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem*. **49**, 315-356 (1980).
- Wyllie AH. En: *Cell Death in Biology and Pathology*. (eds ID Bowen y RA Lockskin). pp 9-34. Chapman y Hall (1981).
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R y Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. **366**, 701-704 (1993).
- Yu BP. Antioxidant action of dietary restriction in the aging process. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. **39**, S75-S83 (1993).
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev*. **74**, 139-162 (1994).
- Yu BP. A new outlook for anti-oxidant defense system. *Aging Clin. Exp. Res*. **7**, 338-339 (1995).
- Yuen GJ. Altered pharmacokinetics in the elderly. *Clin. Geriatric. Med*. **6**, 257-267 (1990).

- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Ohkawa S, Ohnishi K, Teras S y Kawai C. Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* **266**, 3369-3371 (1991).
- Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab. Rev.* **19**, 1-32 (1988).
- Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2**, 321-324 (1990).
- Ziegler DM. Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 171-191 (1993).
- Zimmerman BJ, Grisham MB y Granger DN. Role of oxidant in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am. J. Physiol.* **258**, G185-G190 (1990).