



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DEL CCl_4 "

(Trabajo Monográfico)

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MARIA ELENA TORRES SILVA

MEXICO, 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
<u>CAPITULO I.</u>	
Introducción	2
Uso del CCl_4	3
<u>CAPITULO II.</u>	
Anatomía y fisiología del hígado	6
<u>CAPITULO III.</u>	
Hepatotoxicidad del CCl_4	16
Alteraciones en los constituyentes químicos del hígado debido al CCl_4 .	18
Necrosis	24
<u>CAPITULO IV.</u>	
Mecanismos de acción del CCl_4	31
<u>CAPITULO V.</u>	
Metabolismo de fármacos	38
Antecedentes	38
<u>CAPITULO VI.</u>	
Efectos del CCl_4 sobre el metabolismo de fármacos . . .	45
Alteraciones del metabolismo cuando existe daño hepático	45
Algunos fármacos estudiados en ratas con lesión hepática inducida por CCl_4 .	47
Ejemplo de tres fármacos investigados en humano con hígado enfermo.	49

CAPITULO VII.

Pág.

Discusión	52
Conclusiones	55

CAPITULO VIII.

Bibliografía	56
Abreviaturas	65

CAPÍTULO I

INTRODUCCION Y OBJETIVO

INTRODUCCION

Existen en la literatura numerosos reportes en los que se hace referencia a la hepatotoxicidad que producen diversas sustancias^(1,2) que varían desde las toxinas de origen vegetal, los compuestos sintéticos usados con fines terapéuticos y los disolventes de uso industrial. Dentro de este último grupo destacan por su importancia los hidrocarburos halógenados, los cuales han pasado a ser constituyentes de nuestro ambiente durante los últimos 50 años. A la fecha se encuentran presentes en cantidades pequeñas en el aire, en el agua y en los alimentos. La exposición de los humanos a los hidrocarburos halogenados puede ser intensa y/o prolongada bajo ciertas circunstancias tales como sitios de manufactura, lugares de uso en la industria, en el comercio o en la casa, o cuando se administran con propósitos médicos.

Además, algunos hidrocarburos halogenados provocan respuestas en los constituyentes hepatocelulares, pudiendo sinergizar las acciones tóxicas de otros compuestos. Entre las respuestas potencialmente sinérgicas se incluyen la inducción del sistema de oxidación de función mixta que activa un amplio espectro de agentes químicos⁽³⁾.

Algunas propiedades físico-químicas de los hidrocarburos halogenados tales como volatilidad a temperatura ambiente, y alto coeficiente de partición lípido/H₂O así como su metabolismo hepático determi

nan su extensa capacitación por la célula y sitios subcelulares, mientras que la polimerización molecular, impedimento estérico y la fuerza relativa del enlace C-Cl determinan la facilidad de ruptura del mismo, influyendo así en la formación de radicales libres⁽¹⁴⁾.

Los hidrocarburos halogenados son muy cotizados tanto a nivel industrial como de laboratorio debido a que representan excelentes propiedades como disolventes y baja inflamabilidad, siendo el tetracloruro de carbono (CCl_4) el compuesto más empleado.

USOS DEL CCl_4

El CCl_4 se preparó por primera vez en 1849, siendo el primer hidrocarburo halogenado producido a gran escala. A partir de 1914 se produjeron aproximadamente 10 millones de libras por año en E.U.A., para ser utilizadas como agente limpiador en seco y como disolvente industrial⁽⁵⁾. Sin embargo, existen en la literatura reportes en los que se menciona que en el pasado⁽⁶⁾, fue utilizado con otros fines entre los cuales destacan, shampoo en seco para el cabello, antihelmíntico, quita manchas en general, así como anestésico.

Estos usos se han descartado por su gran toxicidad y por el advenimiento de sustancias más efectivas y menos tóxicas.

Actualmente se utiliza en la industria para la extracción de grasas, como disolvente de caucho y en la manufactura de la laca.

El CCl_4 impresiono como veneno industrial a la generación médica del Siglo XIX y principios del Siglo XX. En 1921 se descubrieron las propiedades antihelmínticas del CCl_4 por vía oral, sin embargo presentaba efectos tóxicos.

El tetracloruro de carbono es uno de los agentes hepatotóxicos que en los animales produce cirrosis o hepatitis muy semejante a la presentada en el humano. Este agente se puede utilizar como una herramienta valiosa para entender y controlar la patogénesis de esta enfermedad. En los primeros 25 años del presente siglo, los estudios estuvieron dirigidos hacia las condiciones dietéticas que aumentaban o disminuían los efectos tóxicos. Muy pocos trabajos se realizaron para conocer los mecanismos involucrados en el proceso tóxico.

En 1944, se presentaron una gran cantidad de datos referentes al estudio de la acumulación hepática del CCl_4 y se llevaron a cabo estudios con el fin de descubrir cual era el proceso fisiológico que se veía alterado y no fue hasta 1960 cuando quedaron establecidas las bases fisiopatológicas de la infiltración de grasa.

A partir de entonces se iniciaron los estudios relativos a observar la regeneración hepática que se presenta después de la intoxicación con el CCl_4 ⁽⁷⁾.

En base a lo anteriormente mencionado, se desarrolló el presente trabajo con el siguiente objetivo: realizar una recopilación bibliográfica de los usos y acción toxicológica del CCl_4 así como de sus aplicaciones más importantes en la investigación.

CAPÍTULO II

ANATOMIA Y FISILOGIA DEL HIGADO

CAPÍTULO II

ANATOMIA Y FISILOGIA DEL HIGADO

El hígado es el órgano más grande del organismo, pesa aproximadamente 1.5 kgs. y se encuentra situado en la cavidad abdominal debajo del diafragma. Recibe la mayor parte de sangre de la vena porta (aproximadamente el 70%) y una porción menor a través de la arteria hepática. Este órgano pardo rojizo está cubierto de una cápsula de tejido conectivo llamada cápsula de Gilsson. En la cara inferior (superficie visceral), existe un surco transversal profundo llamado hilio, a este nivel el tejido conectivo de soporte penetra al parénquima del hígado⁽⁸⁾.

Este tejido conectivo se ramifica repetidamente y cada ramificación va acompañada de otras tantas de la vena porta, arteria hepática, el conducto hepático, y uno o varios vasos linfáticos por donde entran y salen las sustancias.

Por la vena porta llega al hígado todo el material absorbido de los intestinos, a excepción de los lípidos, los cuales son transportados por vía linfática. En virtud de estas circunstancias, el órgano está en posición privilegiada de metabolizar y acumular metabolitos y además neutralizar y eliminar las sustancias tóxicas absorbidas. Esta eliminación se hace por la bilis, que es una secreción exocrina de la célula hepática y es importante en la digestión de los lípidos.

El hígado humano está constituido por una masa de células parenquimatosas dispuestas en laminas de una célula de espesor, que se agrupan en placas, las que se anastomosan entre sí formando unidades morfológicas llamadas lobulillos hepáticos. Cada lobulillo es una masa prismática poligonal de tejido hepático de más o menos 0.7 x 2 mm de tamaño.

En el lobulillo, las células hepáticas o hepatocitos se disponen en placas orientadas radialmente. Cada placa se encuentra constituida por células dispuestas en una sola capa. Estas células están perforadas y se anastomosan frecuentemente en el trayecto de la periferia hacia el centro del lobulillo hepático, resultando un laberinto complejo que confiere al lobulillo hepático un aspecto esponjoso (Fig. 1). El espacio existente entre las placas de células hepáticas está ocupado por capilares especializados llamados sinusoides hepáticos. El diámetro de los sinusoides depende de la cantidad de sangre que contiene y difiere de otros capilares en su permeabilidad a macromoléculas, en especial a las proteínas. A lo largo de las paredes de los sinusoides se distinguen dos tipos de células:

1. Células endoteliales típicas de los capilares sanguíneos.
2. Células fagocitarias que en éste órgano se llaman células de Kupffer. Estas células presentan un citoplasma estrellado, con gran núcleo oval y nucleólo evidente. Se admite que en ellas ocurre la fagocitosis de glóbulos rojos en vías de desintegración con la consiguiente digestión de la hemoglobina y la producción de bilirrubina.

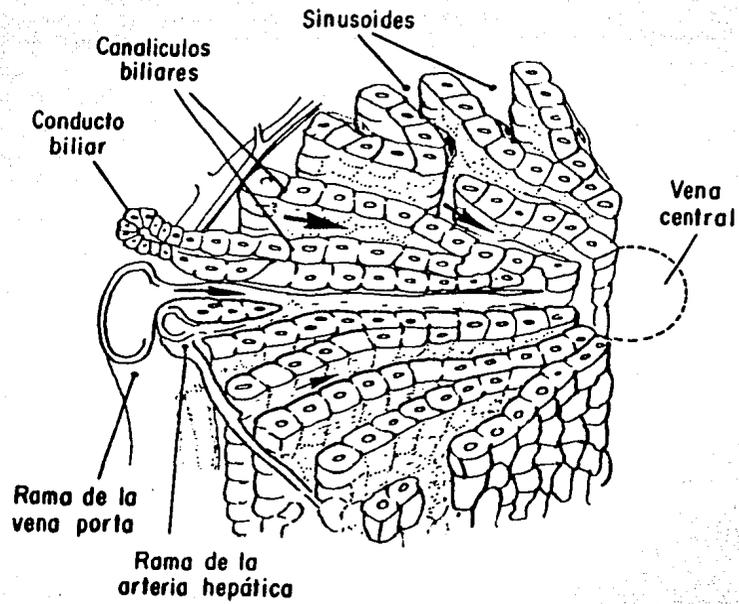


Fig. 1 Representación esquemática del lobulillo hepático.

El capilar sinusoidal hepático posee la característica de estar envuelto por un delicado armazón de fibras reticulares. Existe un estrecho espacio entre células de revestimiento y las células parenquimatosas, conocido como espacio de Disse que también ayuda al paso de sustancias y productos de desecho de los hepatocitos a la sangre. La célula hepática o hepatocito presenta un núcleo (a veces dos) central y redondo con uno o dos nucleolos bien diferenciados. El organelo más evidente es el retículo endoplásmico, tanto en su forma granular como en la lisa. El retículo endoplásmico rugoso aparece en la célula hepática en forma de acumulos dispersos en el citoplasma formando los cuerpos basófilos. En este organelo es en donde se realiza la síntesis de diversas proteínas entre las que se incluyen, la albúmina y el fibrinógeno de la sangre.

En el retículo endoplásmico liso el cual se encuentra distribuido difusamente por toda la célula ocurren varios procesos de importancia entre los que podemos citar: la síntesis de glucógeno y los procesos de conjugación, así como la unión de varios compuestos a los radicales sulfato y glucuronato.

Esta conjugación es de gran importancia ya que interviene en procesos de metabolismo o activación y detoxificación de varios componentes de nuestro organismo.

Actualmente se sabe que la administración de ciertos fármacos provoca en animales de laboratorio un gran aumento del retículo endoplásmico liso de la célula hepática. Estudios bioquímicos han demostrado

que con este incremento crece paralelamente la actividad de las enzimas que metabolizan al fármaco empleado.

Otro componente típico de la célula hepática es el glucógeno, el cual se encuentra frecuentemente acumulado en la zona del retículo endoplásmico liso.

El glucógeno funciona como un depósito, que la célula hepática moviliza cuando disminuye la glucosa en la sangre circulante (hipoglucemia).

El hepatocito posee numerosas mitocondrias esféricas o alargadas dispersas en el citoplasma en cantidad regular, que presentan escasas crestas mitocondriales en su interior. Sin duda el hepatocito es, la célula de mayor versatilidad funcional del organismo, ya que presenta funciones glandulares endocrinas y exocrinas simultáneamente; además de sintetizar y almacenar diversos compuestos neutraliza otros y transporta colorantes. Esta multiplicidad funcional le ha proporcionado una gran diversidad morfológica (Fig. 2).

En resumen, dentro de las funciones más importantes del hígado destacan las siguientes (Fig. 3):

Metabolismo de proteínas: Síntesis de proteínas plasmáticas (albúminas, globulinas, fibrinógeno, protombina) ácido úrico (como etapa final del metabolismo de nitrógeno) y aminoácidos no esenciales.

Metabolismo de grasas:	síntesis de ácidos grasos, colesterol y metabolismo de los esteroides.
Metabolismo de carbohidratos:	fabricación de glucógeno a partir de monosacáridos (glucogénesis) y otras fuentes (gluconeogénesis) así como la conversión de glucógeno almacenado en glucosa (glucólisis) y su liberación a la sangre; esta es probablemente la función aislada más importante del hígado.
Almacenamiento:	glucógeno, hierro, vitaminas A, D, E, K y B ₁₂ , ácido fólico.
Detoxificación:	metabolismo de algunas sustancias extrañas.
Formación de bilis:	elaboración de líquido alcalino que contiene sales biliares, pigmento biliar, fosfatasa alcalina y colesterol.
Metabolismo de la bilirrubina (pigmento biliar):	actividad fagocítica de los sinusoides por las células Kupffer.

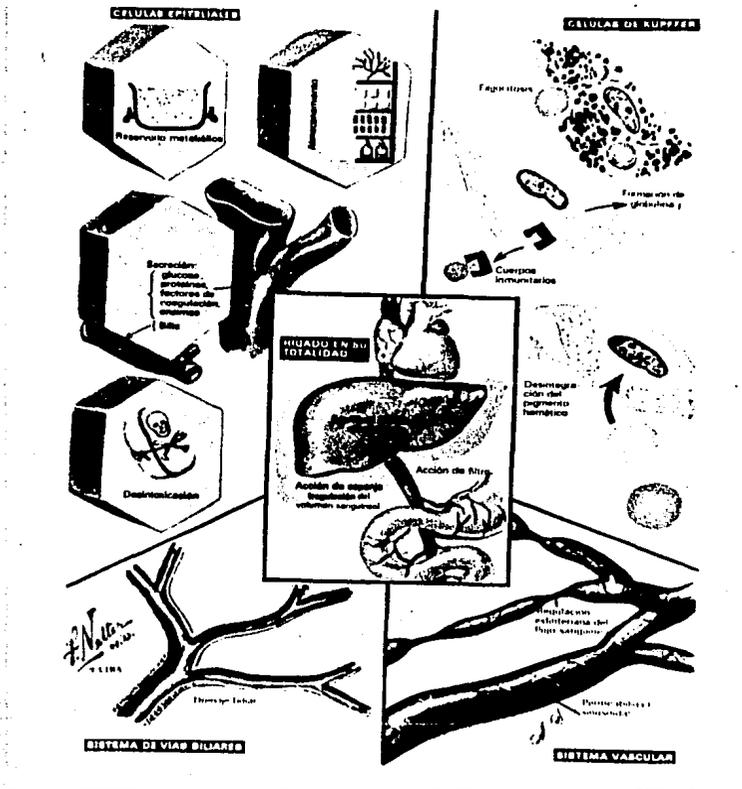


Fig. 3.- Funciones más importantes del hígado.

CAPÍTULO III

HEPATOTOXICIDAD DEL CCL₄

CAPÍTULO III

HEPATOTOXICIDAD DEL CCl_4

Cuando el CCl_4 es inhalado se encuentran altas concentraciones del mismo en cerebro, médula ósea, corazón e hígado⁽⁹⁾ sin embargo el hígado es el órgano más afectado; sus efectos tóxicos pueden describirse en el animal íntegro a dosis tan bajas como 0.01. mg./kg. En la literatura se encuentran una gran cantidad de reportes de intoxicaciones hepáticas presentadas en humanos los cuales están expuestos a sus vapores.⁽⁸⁾

Las lesiones hepáticas producidas por el CCl_4 fueron estudiadas en animales de laboratorio durante los primeros 40 años del presente siglo.

El daño hepático no es una entidad simple, ya que la lesión observada depende no sólo del agente químico involucrado, sino también del período de exposición, después de una exposición aguda se observa acumulación de grasa en los hepatocitos, necrosis celular y lesión hepatobiliar, mientras la exposición crónica produce cirrosis.

Reynolds y Thiers⁽¹⁰⁾ sugirieron que el CCl_4 producía toxicidad simplemente por ser un disolvente de los lípidos de las membranas celulares. Sin embargo el CCl_4 reacciona con el citocromo P-450 de los microsomas hepáticos,⁽¹¹⁾ el cual forma parte del sistema -- oxidadas de función mixta (FMO) del retículo endoplásmico liso he-

pático. No obstante, este sistema se encuentra también en otros órganos, como el riñón y existen en la literatura numerosos reportes que hacen referencia a la nefrotoxicidad del CCl_4 en varias especies. Cuando el CCl_4 se metaboliza, produce un daño en el retículo endoplásmico, que conduce a defectos funcionales del hepatocito y a manifestaciones bioquímicas de daño hepático.^(9,12) De acuerdo con Recknagel⁽¹³⁾ y Slater⁽¹⁴⁾ una característica relevante de la hepatotoxicidad potencial del CCl_4 es la baja energía de asociación del enlace C-Cl.

En base a lo anterior se puede observar que el CCl_4 ha sido uno de los agentes hepatotóxicos que más ha llamado la atención de los investigadores ya que existen ciertas ventajas al estudiar una sustancia simple, capaz de producir efectos devastadores y muerte celular inmediata.⁽¹⁵⁾ A principios del presente siglo los estudios se dirigen a analizar las condiciones dietéticas que aumentan o disminuyen los efectos tóxicos del CCl_4 ^(16, 17) y se realizaron algunos trabajos para conocer los mecanismos involucrados en el proceso tóxico del CCl_4 . Sin embargo, a partir de 1944, se presentaron gran cantidad de datos referentes al estudio de la influencia de este compuesto en la acumulación lipídica hepática.⁽¹⁸⁾

No fue hasta 1960 cuando quedaron establecidas las bases fisiopatológicas de la infiltración de grasa y desde esta fecha se ha progresado en el estudio de los mecanismos celulares enzimáticos. También a partir de entonces comenzaron los estudios relativos a la regeneración hepática que sigue a la intoxicación del CCl_4 , em-

pleando técnicas bioquímicas y farmacológicas. (19)

Alteraciones en los constituyentes químicos del hígado debido al CCl_4 .

Además de producir elevación en la actividad de algunas enzimas séricas y alteraciones en los procesos de transporte del hepatocito, los agentes hepatotóxicos pueden producir cambios en los constituyentes estructurales y funcionales del hepatocito, los cuales han sido utilizados para cuantificar y detectar el daño producido al hepatocito, al igual que para dilucidar los mecanismos involucrados en la producción de lesiones.

Entre estos cambios, destacan por su importancia los siguientes: esteatosis, en la cuál se presentan alteraciones en el contenido de lípidos hepáticos. Los lípidos que se acumulan son predominantemente triglicéricos (TG's) y pueden ser el resultado de un desbalance entre el grado de síntesis y el grado de liberación de TG's por las células parenquimatosas hacia el sistema circulatorio.

Algunos agentes que producen daño hepático también causan acumulación de cantidades anormales de grasa en las células parenquimatosas.

Dianzani⁽²⁰⁾ ha resumido algunos de los aspectos bioquímicos del metabolismo del CCl_4 y su relación con la producción de ácidos grasos no esterificados (AGNE) los cuales son removidos de la circulación o sintetizados endógenamente y procesados a través de las siguientes vías en el hígado: a) β oxidación mitocondrial y b) incorporación a complejos lipídicos.

De acuerdo con Díazant una vez sintetizados los complejos lipídicos pueden entrar en dos vías metabólicas principales: esto es, los lípidos pueden usarse en la producción de membranas celulares (lípidos estructurales) o bien, pueden ser secretados continuamente del hígado hacia la sangre. Esta última vía parece ser de gran interés en la acumulación de TG's observados en el hígado graso.

En años recientes varios investigadores han demostrado que un bloqueo de la secreción de TG's hepáticos hacia el plasma es el mecanismo básico fundamental que induce el hígado graso en la rata por la intoxicación con CCl_4 y otros agentes hepatotóxicos^(20,23). Es importante el hecho de que cuando los TG's hepáticos son secretados hacia el plasma no son liberados como tales, sino como un complejo de lipoproteína. La fracción de lipoproteína de muy baja densidad (LMBD) es el principal vehículo de transporte de TG's y existen algunas evidencias que indican que el CCl_4 y la etionina producen una disminución en el nivel circulante de lipoproteína, principalmente LMBD.

A este respecto, Lombardi y Ugazio⁽²⁴⁾ demostraron que el desarrollo de esteatosis hepática producida por la intoxicación con CCl_4 parece ser una consecuencia de una falla en el movimiento TG's como LMBD del hígado a la circulación.

Alternativamente, el CCl_4 puede inducir defectos en el sistema de secreción de lipoproteínas⁽³⁷⁾. Aunque el(los) mecanismo(s) exacto(s) por el(los) cual(es) las lipoproteínas son secretadas de la célula no ha sido completamente detallado, trabajos recientes sugieren que los microtúbulos podrían tener un papel preponderante en este proceso.*

Recknagel y Glende⁽⁴²⁾ han establecido que la síntesis defectuosa de LMBD puede ser el resultado de la destrucción del sitio celular de la síntesis proteica (RER y sus ribosomas) o el resultado de la introducción de una lesión bioquímica selectiva en cualquiera de los pasos de la síntesis proteica. Zimmerman⁽²⁷⁾ conceptualizada el desarrollo de esteatosis (acumulación de grasa) de acuerdo a la Fig. 4 en la cual se destacan los posibles sitios de interferencia en el metabolismo de los lípidos por el CCl_4 . Nótese que el transporte (T) alterado de los lípidos como LMBD y las alteraciones en la síntesis proteica (X) conducen a una salida (S) defectuosa de lípidos y que el incremento en la movilización de lípidos de los depósitos periféricos también contribuye.⁽⁴²⁾ A este respecto, varios investigadores han establecido que el incremento en la movilización de los lípidos de los depósitos periféricos parece contribuir a la patogénesis de la esteatosis, aunque en un menor grado que la salida defectuosa de lípidos del hepatocito.⁽⁴²⁾

Brody y Col^(43,44) atribuyen el aumento en la concentración de lípidos en el hígado a la excesiva movilización de ácidos grasos libres (AGL) de los depósitos periféricos, inducida por los efectos lipolíticos del aumento en el nivel de catecolaminas circulantes. Asimismo, la necrosis centrilobular la atribuyen a que las catecolaminas inducen disminución del flujo sanguíneo hepático.

Sin embargo, Larson y Plaa⁽⁴⁵⁾ demuestran que la respuesta anatómica permite la expresión de la toxicidad del CCl_4 y que la descarga automática no es determinante para la hepatotoxicidad. En la Fig. 4 se aprecia que los AGL pueden provenir de la dieta o de síntesis --

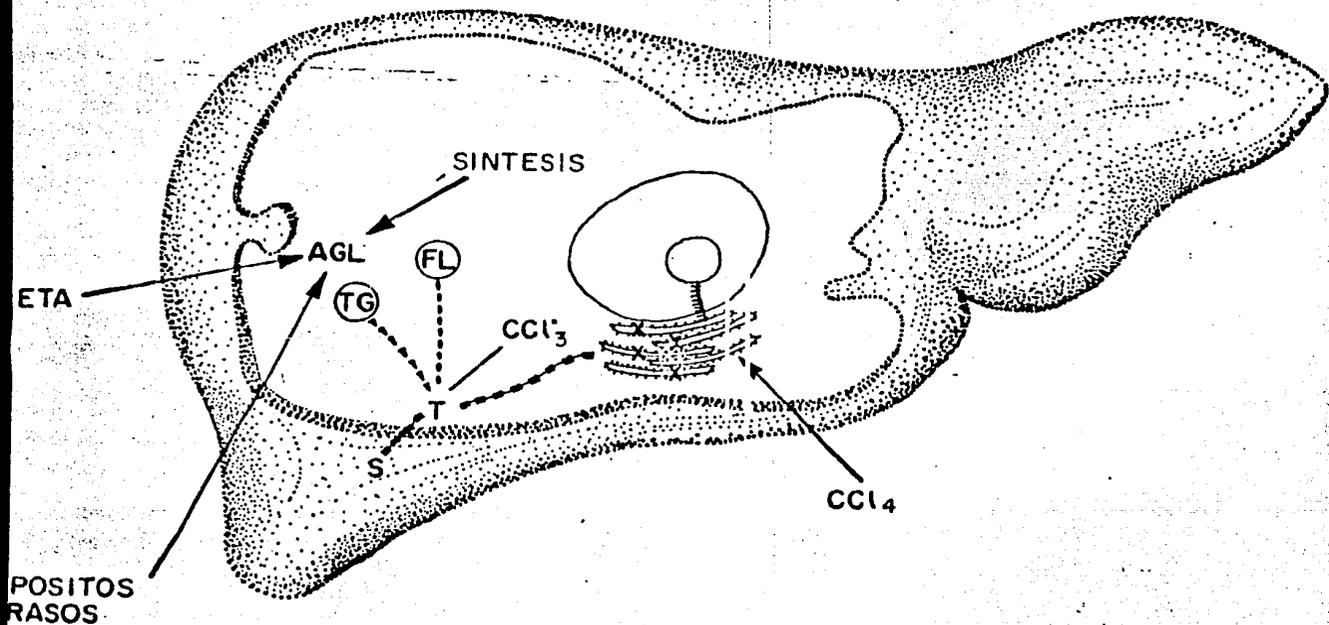


Fig. 4. Origen de los ácidos grasos libres (AGL) y posibles sitios de interferencia producidos por el CCl_4 en el metabolismo de los lípidos.

endógena y que el radical $\dot{C}Cl_3$ interfiere en la unión de TG's y FL's a las lipoproteínas para formas LMBD.

Una representación esquemática de los conceptos de Zimmerman⁽²⁷⁾ puede apreciarse en la figura 5.

El sistema microtubular podría ser el blanco de los agentes hepato tóxicos que producen hígado graso por inhibición de la secreción de lipoproteínas. Aunque esta hipótesis no ha sido ampliamente comprobada, Gabriel y Col⁽³⁸⁾ han proporcionado algunas evidencias indirectas que sugieren que los aldehídos (producidos en el hígado durante la lipoperoxidación producida por el CCl_4 ^(39,40) puedan alterar la funcionalidad de los microtúbulos. También es posible que el aumento de los TG's sea el resultado de un incremento en el grado de síntesis, ya que existen evidencias de que el grado de síntesis es directamente proporcional a la concentración del sustrato presente AGNE y gliceroalfósforo. El aumento de AGNE podría resultar de un decremento en la oxidación, aumento en la síntesis o aumento en la movilización de los depósitos periféricos.

Existen muy pocas evidencias en apoyo a la idea de que la síntesis de ácidos grasos esté involucrada en el desarrollo de hígado graso.

En el caso del etanol, este induce hígado graso por interferir en la oxidación mitocondrial de AGNE⁽⁴¹⁾, debido a un corrimiento en el potencial de óxido-reducción (aumento en la producción $NADH/NAD^+$), -- aunque esto puede estar acompañado de otras anomalías.

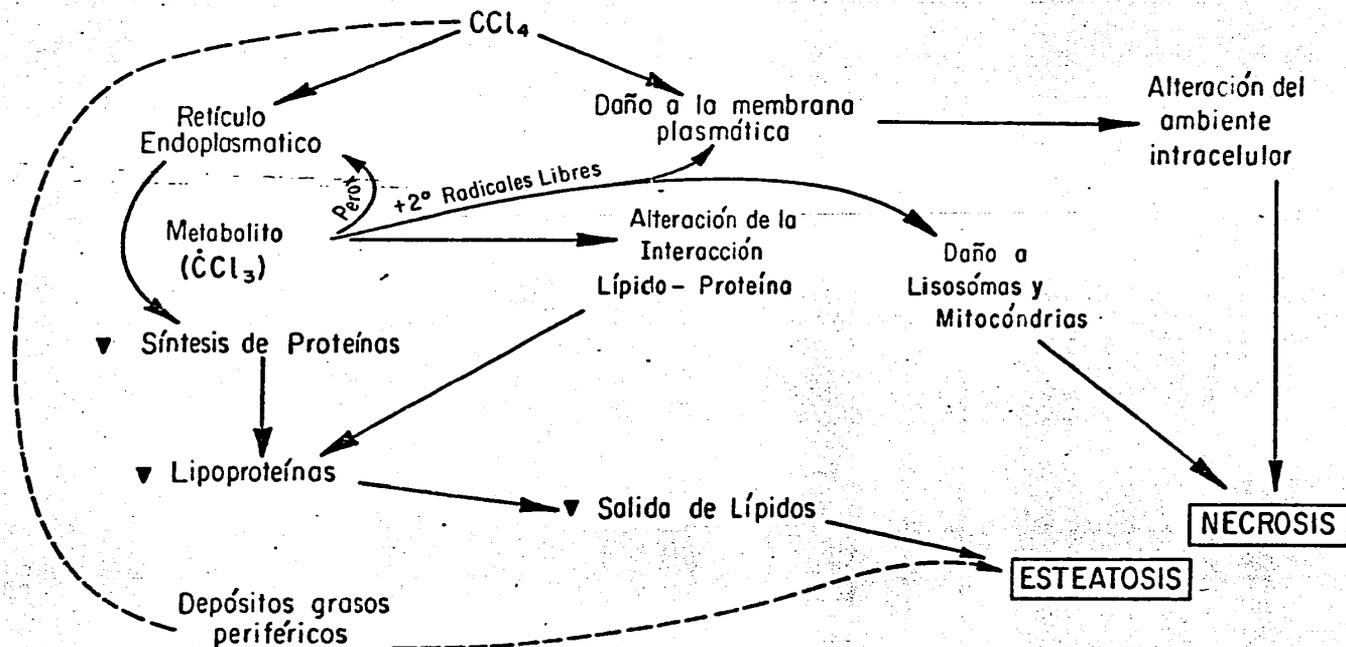


Fig. 5. Desarrollo de esteatosis y necrosis hepáticas de acuerdo con lo establecido por Zimmerman (27).

Necrosis.

La necrosis conjuntamente con la esteatosis son dos de los principales efectos que caracterizan el daño celular hepático producido por la administración de CCl_4 . La consecuencia precisa de eventos que siguen a la intoxicación con CCl_4 y que conduce finalmente al desarrollo de necrosis no es bien conocida. Sin embargo, algunos autores han propuesto que puede ser el resultado del daño a las membranas celulares debido a un aumento en el grado de lipoperoxidación. Zimmerman⁽²⁷⁾ ha establecido que el radical libre CCl_3 es el principal agente causal del desarrollo de necrosis, debido a que inicia el proceso de lipoperoxidación en las membranas celulares.

El daño a las membranas celulares conduce a un caos bioquímico intracelular que trae como consecuencia la disminución de los agentes energéticos necesarios para mantener la integridad celular. Farber y El-Mofty⁽⁴⁶⁾ han propuesto una alteración de la membrana plasmática como el evento necrogénico inicial. Esta alteración conduce a una pérdida tanto de K^+ intracelular, como de proteínas (incluyendo enzimas citoplásmicas) y coenzimas así como una acumulación intracelular de agua y calcio.

En la membrana mitocondrial el aumento en la concentración citoplasmática de calcio produce un efecto adverso, que finalmente conduce a una pérdida de enzimas y coenzimas mitocondriales, así como de su funcionalidad⁽⁴⁶⁾. Asimismo, Slater⁽⁴⁷⁾ apoya el hecho de que el componente peroxidativo del daño inducido por CCl_4 es un evento primario importante pero no el único, ya que existen evidencias experimentales propuestas por otros autores⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾ en el sentido de que el CCl_4 , en sí ejerce parte de sus efectos hepatotóxicos por ser un potente disolvente de lípidos, por lo cual presenta un efecto adverso sobre las membranas del hepatocito, principalmente la plasmática⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ donde ejerce un efecto dañino inmediato, que puede conducir a la pérdida de enzimas y electrolitos intracelulares y a la entrada de iones provenientes del ambiente extracelular (como el calcio). En el siguiente esquema (Fig. 6) propuesto por Zimmerman⁽²⁷⁾ se establece el mecanismo hipotético por el cual el CCl_4 conduce finalmente al desarrollo de necrosis.

El daño sobre la membrana plasmática y las membranas del RE y de otros organelos por el radical $\text{CCl}_3\cdot$ al igual, que el producido por el CCl_4 inalterado, conduce a la pérdida de electrolitos, enzimas y coenzimas, así como la entrada de calcio y otros iones y finalmente a necrosis. Casi simultáneamente con este inicio de la alteración del ambiente intracelular hay una rápida conversión del CCl_4 al metabolito dañino $\text{CCl}_3\cdot$ en el RE (donde hay una gran concentración de este metabolito), el cual produce alteración y daño en la membrana conduciendo a la disociación del sistema de transporte de lipoproteínas, y a la alteración de la síntesis de lipoproteínas, conduciendo finalmente al desarrollo de esteatosis.

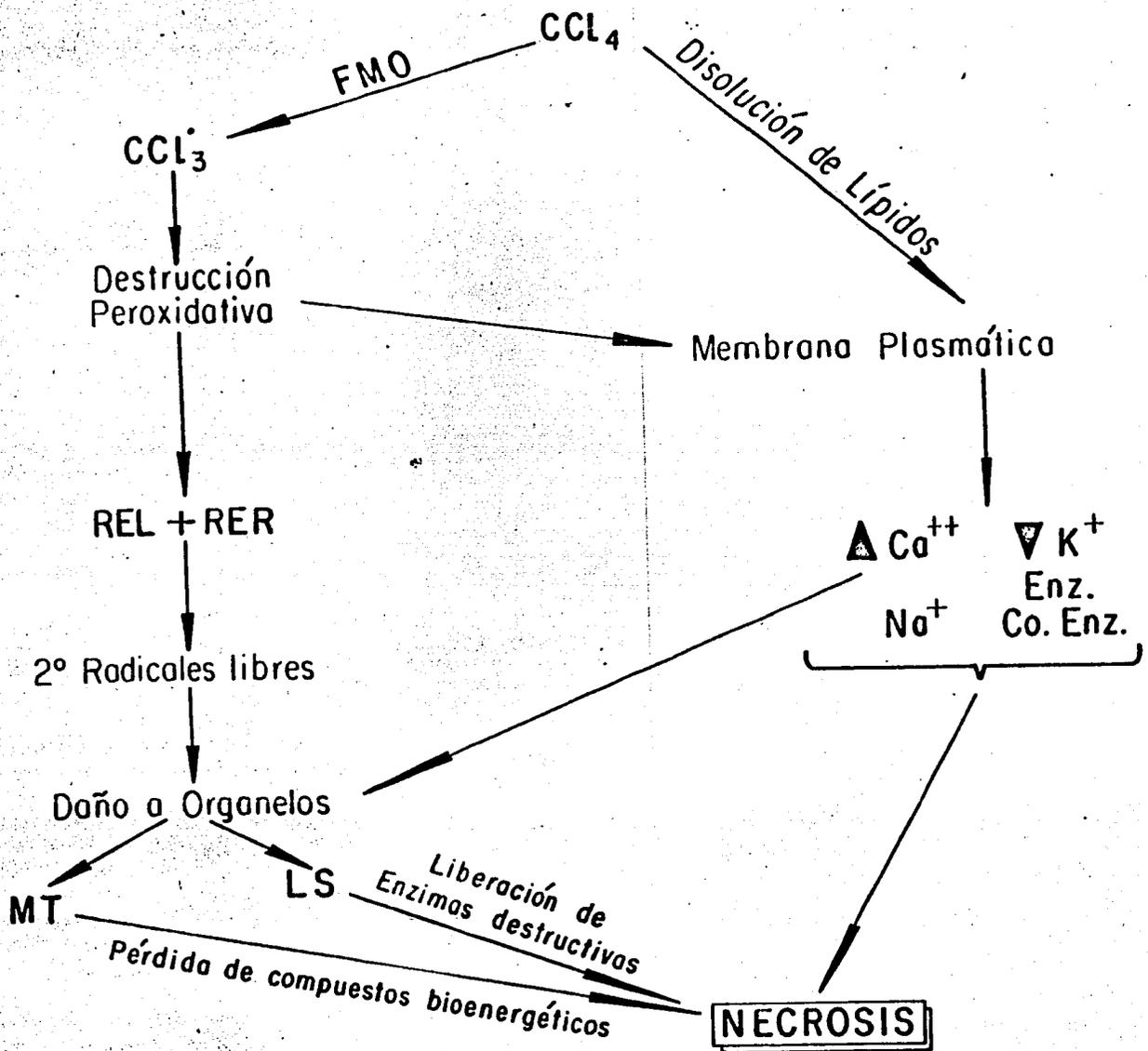


Fig. 6. Desarrollo de necrosis, de acuerdo a lo establecido por Zimmerman (27).

Subsecuentemente, como el metabolito se acumula, los radicales libres secundarios aumentan el daño peroxidativo de las membranas plasmática, mitocondrial y lisosomal conduciendo al desarrollo de necrosis.

De acuerdo con Moore⁽⁵³⁾ el calcio se considera como un mediador potencial de daño celular que puede conducir al desarrollo de necrosis, ya que alguna alteración en su concentración celular parece ser una de las primeras consecuencias en el envenenamiento con el CCl_4 .

La concentración citosólica de calcio es controlada por tres organelos celulares: 1) la mitocondria, 2) el R.E. y, 3) la membrana plasmática. Diferentes autores^(54, 56) han demostrado que al llevarse a cabo la lipoperoxidación en las membranas microsomales, la capacidad secuestrante de calcio del R.E. se encuentra reducida, debido al efecto del radical CCl_3 sobre este organelo. A este respecto Bruker y Col⁽⁵⁷⁾ demostraron que la inhibición de la actividad de la ATPasa parece ser un mecanismo común por el cual el CCl_4 y otras hepatotoxinas disminuyen la capacidad microsomal secuestrante de calcio. Se cree que el calcio juega un papel activo en la mantención de homeostasis en el hepatocito, y la inhibición de la ATPasa dependiente de calcio y/o magnesio provocada por el CCl_4 puede producir una lesión bioquímica inicial que dispara una secuencia de eventos que pueden culminar con la muerte celular^(58, 59)

El impacto de este evento sobre la distribución del calcio y su concentración no es clara, pero parece ser posible que la pérdida de la capa

cidad secuestrante de calcio del R.E. y de las mitocondrias⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ y su liberación de los almacenes de calcio hacia el citoplasma, podría tener serias consecuencias patológicas para el hepatocito, ya que su concentración se vería seriamente aumentada.

De esta manera, la lipoperoxidación reflejaría un daño primario reversible, que iniciaría una serie de eventos subsecuentes parcialmente reversibles. Sin embargo, la destrucción de la bomba microsomal de calcio conduciría a una acumulación intracelular de calcio⁽⁵⁹⁾ que producirá un daño celular irreversible, ya que afecta a una gran variedad de procesos celulares, culminando con la muerte celular.

Es importante resaltar que la lipoperoxidación de las membranas lisosomales conduce a la liberación de enzimas hidrolíticas, las cuales pueden potenciar el efecto necrogénico inicial por otros eventos celulares.

En la Fig. 7, se esquematiza la secuencia de eventos que conducen a la muerte celular después de la lipoperoxidación:

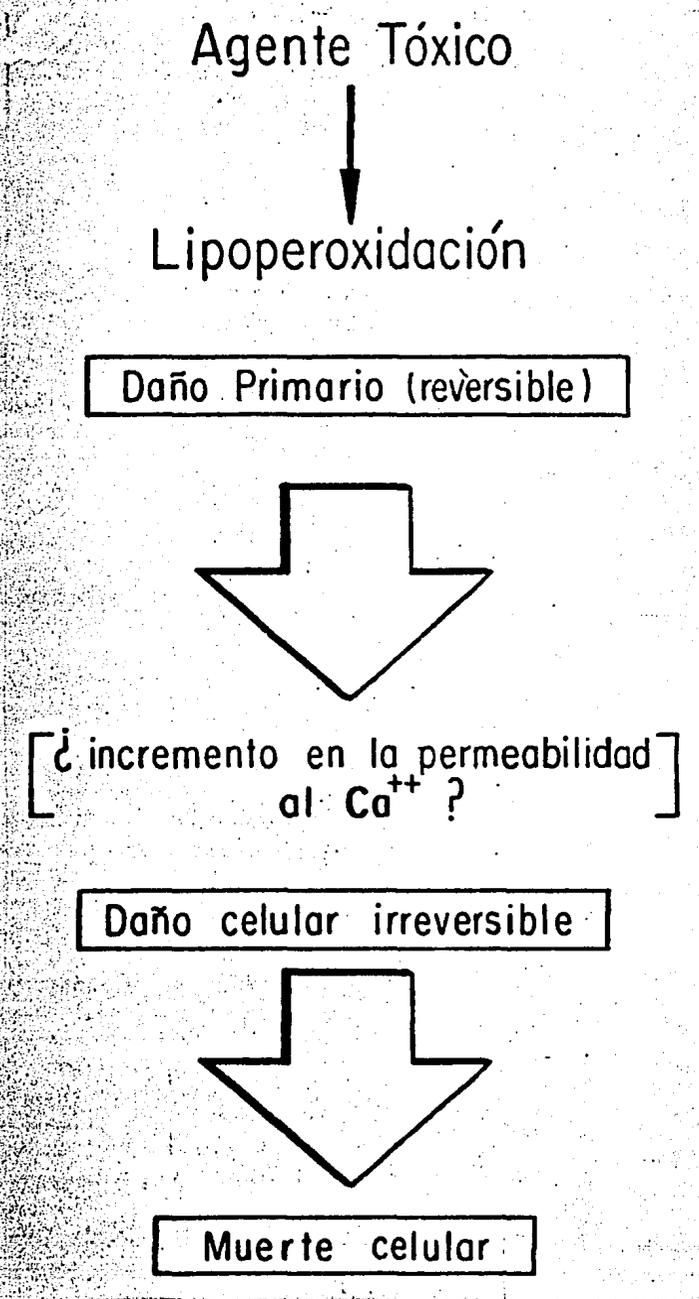


Fig. 7. Secuencia de eventos que conducen a la muerte celular después de la intoxicación con CCl_4 .

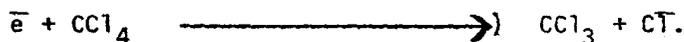
CAPÍTULO IV

MECANISMOS DE ACCION DEL CCl_4

Butler⁽⁶³⁾ reconoció que los radicales libres postulados como los productos inmediatos de la fisión homolítica inicial son poderosos agentes alquilantes de grupos -SH. De esta manera, una característica importante de la hipótesis original de Butler fue la idea de que los efectos hepatotóxicos del CCl_4 in vivo se entendería en términos de un ataque directo por radicales libres sobre las enzimas del hepatocito.

Writschafter y Cronyn⁽⁶⁴⁾ comprobaron que el CCl_4 sufría ruptura homolítica en el hígado, con lo cual se producía el radical libre CCl_3 y el anión Cl^- .

De acuerdo con Musgrave Lowry y Richardson,^(65,66) el factor físico-químico básico en la ruptura del enlace C-Cl para obtener el radical libre CCl_3 es la energía de disociación del mismo, y por lo tanto puede reaccionar en el organismo de la siguiente manera.



Dicho autor puntualizó que la reacción requiere de la pérdida de un electrón por el CCl_4 para que se pueda formar el CCl_3 .

Es importante destacar que las evidencias de que el CCl_4 sufre una ruptura, son indirectas, ya que sólo existen pruebas experimentales que demuestran que se forman hexacloroetano ($\text{Cl}_3\text{C}-\text{CCl}_3$), posiblemente --

(68)
por una reacción de condensación entre dos radicales CCl_3 .

HIPOTESIS DE LA LIPOPEROXIDACION

Los estudios descritos con anterioridad, complementados con los conocimientos de la protección proporcionada por los antioxidantes como la vitamina E⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ llevaron a Reckagel y Gloschal a proponer la hipótesis de la lipoperoxidación. Este hipótesis, complementada con hallazgos descubiertos posteriormente por Recknagel⁽⁷²⁾ demuestran que la toxicidad del CCl_4 dependen del metabolismo realizado por un sistema-enzimático complejo que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico liso (REL) conocido como oxidasas de función mixta (FMO)⁽⁷³⁾ el cual consta de un conjunto de enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos.

En el caso del CCl_3 este radical libre ataca la estructura y función de las macromoléculas lipídicas y proteínicas, disminuye la síntesis de proteínas in vivo⁽⁷⁵⁾ produce desactivación de los componentes selectivos del sistema FMO⁽⁷⁶⁾ y además inicia una serie de reacciones autocatalíticas en cadena de los ácidos grasos polinsaturados que componen los lípidos que integran las membranas del REL, produciéndose la descomposición peroxidativa de los mismos. Este evento engendra serias consecuencias para el hepatocito,⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾ tales como esteatosis hepáticas, glucogenólisis⁽⁸⁰⁾ liberación de enzimas celulares hacia el torrente sanguíneo⁽⁸¹⁻⁸³⁾ necrosis, hinchazón y desintegración mitocondrial⁽⁸⁴⁻⁸⁹⁾ así como la desintegración lisosomal⁽⁹⁰⁻⁹⁶⁾ debido a la descomposición peroxidativa de los lípidos de la membrana lisosomal.

Por lo tanto, la hipótesis de la lipoperoxidación explica los efectos tóxicos del CCl_4 tomando como base la formación del metabolito CCl_3 . Un hecho notable de la hipótesis de la lipoperoxidación es el efecto multiplicativo de la misma, ya que durante este proceso se generan muchos radicales libres nuevos por cada CCl_3 formado.

En la figura 8 se puede observar el metabolismo del CCl_4 y el inicio del proceso de la lipoperoxidación destructiva: una vez que el CCl_4 es metabolizado por el citocromo p-450^(13, 14 91). En esta figura se aprecia que el radical CCl_3 sustrae hidrógenos de los grupos metílicos adyacentes a carbonos con dobles enlaces, presentes en las cadenas polinsaturadas de los lípidos de las membranas del R.E. dando lugar a la formación de cloroformo (CHCl_3) y el radical libre orgánico reacciona ya sea inmediatamente o después de la deslocalización del electrón del radical libre por resonancia, formándose rápidamente el radical peróxido (R-OO) y eventualmente el peróxido orgánico. (93, 62)

CAPÍTULO V

METABOLISMO DE FARMACOS

CAPÍTULO V

METABOLISMO DE FARMACOS

Es el proceso por el cual los fármacos administrados son modificados por el organismo⁽⁹⁷⁾. No es correcto pensar en el metabolismo de fármacos estrictamente como un proceso de detoxificación, ya que algunos se transforman en compuestos más tóxicos o bien pueden presentar una mayor actividad que el fármaco original.

ANTECEDENTES:

La biotransformación de una gran cantidad de fármacos se lleva a cabo en el hígado por un sistema multienzimático complejo denominado "oxidasas de Función Mixta", el cual es dependiente del citocromo P-450.

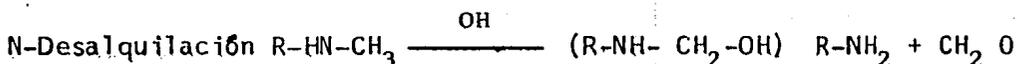
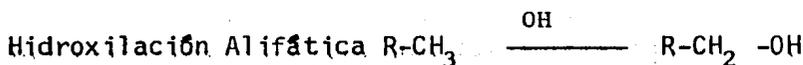
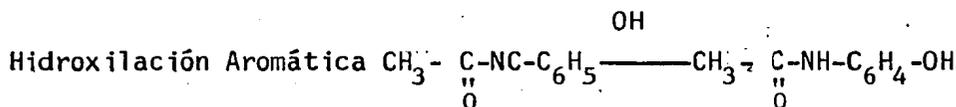
Axelrod en 1955, demostró que la mayor parte de estas transformaciones ocurren en el retículo endoplásmico de los hepatocitos.

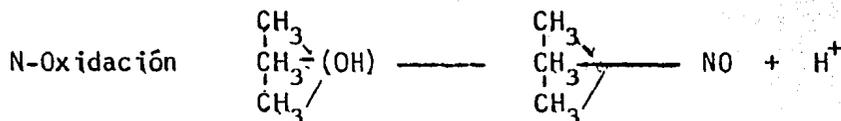
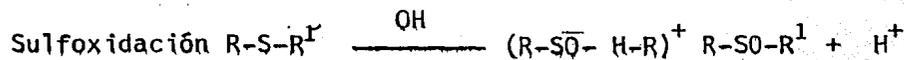
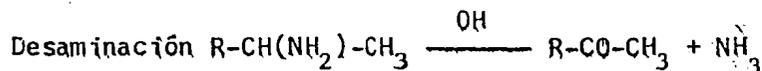
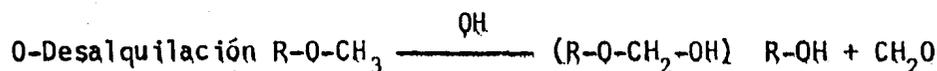
Los primeros estudios sobre el metabolismo microsomal de un compuesto fueron realizados por Mueller y Miller en 1953⁽⁹⁸⁾. Ellos demostraron que los microsomas hepáticos catalizaban la ruptura de un enlace azo y la n-desmetilación oxidativa de algunos colorantes y que estas reacciones enzimáticas requieren NADP y oxígeno molecular. En 1955 Bro

die y colaboradores⁽⁹⁹⁾ reportaron también que el mismo sistema enzimático localizado en los microsomas hepáticos, era el responsable del metabolismo de muchos fármacos.

Para poder llevar a cabo las reacciones metabólicas se trató de reconstruir el sistema observándose la necesidad de contar con una fracción microsomal y una fracción soluble. La fracción soluble se podía sustituir por un sistema generador de NADPH, es decir NADP, glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ó simplemente añadiendo NADPH. Los iones de magnesio⁽⁹⁹⁾ participan como cofactores en las reacciones. El requerimiento de un agente reductor y de oxígeno molecular situó la reacción enzimática dentro de la clasificación de Masson⁽¹⁰⁰⁾ como oxidasas de función mixta, o en monooxigenasas tal como ha sido propuesto por Hayaishi. Operacionalmente esto significa que estas enzimas catalizan el consumo de una molécula de oxígeno por cada molécula de substrato formado.

Investigaciones subsecuentes han demostrado la complejidad de este sistema enzimático microsomal en el se pueden efectuar una gran variedad de reacciones entre las cuales se pueden citar,⁽⁴²⁾





Para Propósitos descriptivos, el metabolismo de algunos compuestos químicos frecuentemente se divide en dos fases, las reacciones de la fase I y las reacciones de la fase II. La reacción de la Fase I comprende las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis.

Las reacciones de la fase II comprenden las reacciones de conjugación, donde el agente conjugante generalmente es un carbohidrato, un aminoácido o una sustancia derivada de los nutrientes. La tendencia de un compuesto particular a combinarse con un agente conjugante depende de la presencia de un grupo apropiado al "Centro de Conjugación" (101) como son los grupos:

- COOH carboxilo.
- OH hidroxilo
- NH₂amino.
- SH sulfidrilo

El citocromo P-450 es el acarreador terminal de los electrones en las reacciones de óxido-reducción que sufren muchos compuestos químicos en los microsomas hepáticos. En 1969 Lu y Coon⁽¹⁰²⁾ solubilizaron las membranas microsomales y dividieron el sistema enzimático en tres componentes esenciales:

- 1.- Un componente de hemoproteínas del tipo b, denominadas colectivamente citocromo P-450, las cuales difieren en sus propiedades catalíticas, espectrales e inmunológicas^(103,104). Estas hemoproteínas han sido encontradas en los microsomas de varios tejidos animales.
- 2.- Una reductasa del citocromo P-450 dependiente del NADPH. Se supone que una molécula de reductasa reacciona aproximadamente con 12 moléculas de citocromo⁽¹⁰⁵⁾.
- 3.- Una fracción lipídica termoestable identificada como fosfatidilcolinas que parece ser esencial para que se efectue la transferencia de electrones.

Además de los tres componentes ya descritos, existe una segunda cadena transportadora de electrones que consta de la hemoproteína citocromo b_5 que funciona como un acarreador intermediario de electrones y una flavoproteína dependiente del NADPH, capaz de reducir al citocromo b_5 .

Como se puede ver en la figura 9, el citocromo P-450 se une con el sustrato formando un complejo que posteriormente sufre dos pasos reductivos. El primer electrón es proporcionado por la reductasa del citocromo P-450 dependiente del NADPH. El segundo electrón es utilizado pa

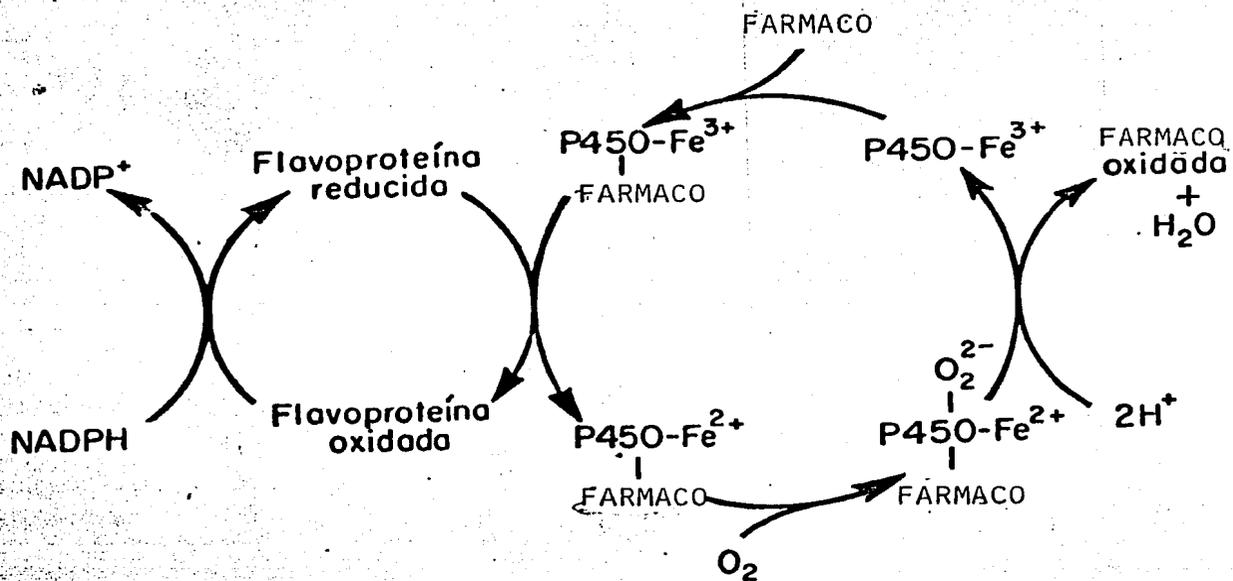


Fig. Sistema de transferencia de electrones que involucra a citocromo P-450.

ra la unión del oxígeno al complejo. El complejo totalmente reducido libera el producto oxidado y el citocromo es capaz de recombinarse con otra molécula de sustrato. El citocromo b_5 participa únicamente como acarreador intermediario de electrones. En las reacciones de la fase II se incluyen las modificaciones postoxidativas de los productos del metabolismo dependientes del citocromo P-450. Estas reacciones generalmente involucran la conjugación de los metabolitos provenientes de la fase I con ligandos polares como glutatión, el ácido glucurónico y el sulfato, aumentando así la hidrosolubilidad de los compuestos. La biosíntesis de los glucuronidos es catalizada por las transferasas de los grupos glucurónidos localizados en el retículo endoplasmático y en la membrana celular; mientras que las conjugaciones con sulfato y glutatión son mediadas por transferasas solubles presentes en el citoplasma.

CAPÍTULO VI

EFFECTOS DEL CCl_4 SOBRE EL METABOLISMO DE FARMACOS

CAPÍTULO VI

EFECTO DEL CCl_4 SOBRE EL METABOLISMO DE FARMACOSAlteraciones del metabolismo cuando existe daño hepático.

La alteración del metabolismo de algún determinado fármaco es un problema clínico importante, sobre todo en pacientes con disfunción hepática, lo cual implica un reto importante para el investigador con el fin de identificar si las diferencias en el metabolismo son debidas a daño hepático o a factores externos; es importante mencionar que los factores externos han contribuido a obtener resultados poco claros en las investigaciones realizadas en los años 1950 a 1960.

Los estudios experimentales se intensificaron y se enfocaron, principalmente a investigar a pacientes con daño hepático en los años mencionados anteriormente con resultados contradictorios por ejemplo:

Sessions⁽¹⁰⁶⁾ determinó el rango y duración del pentobarbital sin encontrar ninguna alteración significativa en pacientes con disfunción hepática crónica y/o severa.

Hammar y Prellwitz⁽¹⁰⁷⁾ determinaron el metabolismo del acetanilida en pacientes con disfunción hepática crónica y/o severa sin encontrar alteraciones.

Moroever y Brodie⁽¹⁰⁸⁾ determinaron las enzimas metabolizantes de fenilbutazona, aminopirina, ácido salicílico, dicumarol y antipirina concluyendo que las enzimas metabolizantes de los fármacos no son afectadas en cirrosis.

Recientemente se ha investigado detalladamente el metabolismo de varios fármacos en pacientes con hepatitis crónica y cirrosis. Shoene, Fleischmann y Remmer⁽¹⁰⁹⁾ determinaron que el contenido de el citocromo P-450, la aminopirina N-desmetilasa y P-nitroanisol-O-desmetilasa, se encontraban significativamente disminuídas en las biopsias hepáticas de experimentación.

Moroever⁽¹¹⁰⁾ determinó la actividad de la cumarin hidroxilasa en hepatitis y cirrosis encontrando una marcada disminución en su actividad. Wallace y M.V. Brodie⁽¹¹¹⁾ determinaron el grado de unión de diferentes fármacos y proteínas plásmáticas encontrando que la fenilbutazona, sulfadiazina y salicilatos presentaban una marcada reducción en el grado de unión a las proteínas en pacientes con hepatitis crónica y cirrosis.

El CCl_4 puede ser un buen modelo para producir daño hepático con el fin de determinar si el metabolismo de fármacos se ve afectado en caso de cirrosis.

De acuerdo con Farrel, C.G.⁽¹¹³⁾ el estudio de la función hepatocelular es el punto más importante y determinante para cuantificar el cambio en el metabolismo de fármacos en pacientes con disfunción hepática, por lo que cuando se desea cuantificar la capacidad hepática después de la ingestión del CCl_4 el investigador deberá determinar si el estudio se realizara in "vivo" o in "vitro" y esta elección dependerá del fármaco en estudio.

Algunos fármacos estudiados en ratas con lesión hepática
inducida por CCl₄.

Desmond y Jawes⁽¹¹⁴⁾ encontraron que en ratas, el CCl₄ causa una reducción en la eliminación de diazepam, clordiazepoxido, oxazepam y lorazepam.

Determinaron que esta reducción se debe a que las preparaciones de enzimas microsomales presentan una marcada disminución en la concentración del citocromo P-450. En la siguiente tabla se resumen los valores y actividad microsomal en ratas tratadas con CCl₄.

Tabla 1.- Actividad microsomal en ratas tratadas con CCl₄.

CITOCROMO (nmoles -mg.proteínas- min.)	CONTROL 0.92 ± 0.11	RATAS TRATADAS CON CCl ₄ 0.34 ± 0.05
NADPH-Citocromo reductasa (nmoles mg. proteína- min)	124±31	85±22
p-Nitroanisol-O- desmetilasa (n-moles -mg.proteí na- min. -1).	0.72±0.15	0.1±0.04 0.11±0.04
Hidroxilación de Anilina (n-moles -mg.proteí na- min. -1).	0.83±0.17	0.06±0.05
Glucuronación de O-nitrofenol (n-moles -mg. proteí nas- min. -1)	4.5±1.3	6.7±1.4

El pretratamiento de CCl₄ fue 0.8 ml/kg. en solución al 25% durante 24 horas.

Así mismo, estos autores encontraron que al administrar ^{14}C -Aminopirina a ratas, se presentaba una marcada reducción en el valor de ^{14}CO en el aliento.

Dingell y Heimber⁽¹¹⁵⁾ determinaron que al administrar el CCl_4 la concentración máxima en hígado se obtenía a las dos horas. En la siguiente tabla (2) se presentan los valores obtenidos por estos autores.

Tabla 2. Concentración de CCl_4 en células de hígado de rata.

FRACCIÓN CELULAR	CCl_4 mg./g. de Hígado					
	1 Hr.	2 Hrs.	3 Hrs.	6 Hrs.	12 Hrs.	24 Hrs
Homogenado	544 [±] 147	663 [±] 80	484 [±] 207	440 [±] 82	253 [±] 216	71 [±] 29
Microsomas	88 [±] 34	99 [±] 13	97 [±] 22	30 [±] 18	15 [±] 12	4 [±] 6
Fracción Soluble	129 [±] 29	137 [±] 24	126 [±] 17	76 [±] 9	32 [±] 18	21 [±] 16

Valores de CCl_4 (mg./g.) obtenido después de la administración de una dosis de 2.5 ml/kg. Los resultados se expresan como la medida \pm S.D. (n=3).

Además estos mismos autores encontraron que la duración del hexobarbital se prolonga en presencia del CCl_4 (Tabla 3).

Metabolismo de hexobarbital. - El metabolismo de hexobarbital en hígado se reduce en ratas pretratadas con CCl_4 . Además se obtie-

ne un aumento en el volumen de el hígado y una disminución en la concentración de proteínas microsomales. Esta concentración depende directamente de la dosis de CCl_4 .

Tabla 3. Efecto de la intoxicación del CCl_4 en la acción y duración de hexobarbital.

TRATAMIENTO	HEXOBARBITAL (mg./kg.)	TIEMPO DE ACCION (min.)
I Experimento		
"A"		
Control	100	18 [±] 3
CCl_4 0.5 hrs.	100	48 [±] 19
CCl_4 1.0 hrs.	100	44 [±] 14
II Experimento		
"B"		
Control	50	5 [±] 6
CCl_4 2.0 hrs.	50	75 [±] 20
CCl_4 4.0 hrs.	50	83 [±] 42

Ejemplo de tres fármacos investigados en humano con hígado enfermo.

Wallace y Brodie⁽⁴³⁾ determinaron la capacidad metabolizante del hígado humano en sesenta pacientes con daño hepático proveniente de diferentes causas como ingestión alcohólica y presencia viral.

Los fármacos administrados fueron; fenilbutazona, salicilatos y sulfadiazina encontrando los siguientes resultados: la concentración plasmática de la fenilbutazona se encontró disminuida en todos los

casos. Los niveles plasmáticos de la sulfadiazina se encontraron reducidos en pacientes presentaban daño hepático, y en el caso de los salicilatos los niveles se redujeron notablemente.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Discusión:

En el siglo XIX se tenían antecedentes de que el CCl_4 era un veneno industrial, principalmente en aquellas personas que por sus ocupaciones se veían expuestas a este solvente con diversos grados de intensidad. En la actualidad se han implementado reglas de seguridad para aquellas personas que por su trabajo tienen que exponerse inevitablemente a dicho disolvente. Al ser inhalado se encuentran altas concentraciones en cerebro, médula ósea, corazón e hígado, en donde el hígado es el órgano más afectado observándose disfunción hepática en humano; ⁽⁷⁻⁹⁾ lo cual hace la toxicología del CCl_4 así como de las sustancias que puedan ingerirse después de la exposición a este tóxico un importante motivo de investigación.

En el caso del CCl_4 , después de una intoxicación aguda, se observa una acumulación de grasa en los hepatocitos, necrosis centrilobular y disfunción hepatobiliar, mientras que en la exposición crónica se presenta cirrosis hepática.

Durante muchos años se ha mencionado que el hígado enfermo es incapaz de metabolizar eficazmente cualquier tipo de fármacos y no se

cuentan con suficientes datos cuantitativos acerca de la razón por la cual la capacidad metabólica se ve disminuida. Algunos autores presentaban las siguientes hipótesis:

Se toma en cuenta que el citocromo P-450 y los sistemas enzimáticos encargados de la biotransformación de la mayoría de los fármacos se encuentra en los microsomas hepáticos, ésto podría explicar que la capacidad del hígado se encuentre disminuida. Existen reportes publicados por diferentes autores, en los cuales se ha establecido que el citocromo P-450 presenta un papel determinante en la toxicidad del CCl_4 , ya que su metabolito primario, el radical libre triclorometilo (CCl_3), altamente reactivo inicia el proceso de lipoperoxidación destructiva por sí mismo y por la formación de radicales libres secundarios. El daño hepático producido por el CCl_4 en dosis únicas se caracteriza a nivel histopatológico por la rápida producción de necrosis centrizonal y acumulación de grasa.

Existen en la literatura pocos reportes que correlacionan directamente la severidad del daño hepático con una disminución en la capacidad hepática de metabolizar fármacos. Aunque se ha reportado que la biodisponibilidad de muchos fármacos se ve modificada en pacientes cirróticos, estos hallazgos necesariamente están relacionados con la capacidad metabólica del hepatocito.

A pesar de que la insuficiencia hepática es un rasgo muy prominentemente de la intoxicación con CCl_4 , la insuficiencia renal es la causa más común de muerte, de tal manera que aunque los signos o síntomas pueden asociarse al deterioro funcional del hígado, no hay que perder de vista que también produce oliguria y anuria.

El CCl_4 es usado a nivel industrial y de laboratorio debido a que presenta características excelentes como disolvente. En investigaciones utilizado como un modelo ideal para producir en los animales de laboratorio hepatitis o cirrosis similar a la presentada en hepatitis o cirrosis en el humano, con lo cual se puede estudiar las alteraciones metabólicas de fármacos en casos de disfunción hepática.

Conclusiones:

1. El tetracloruro de carbono (CCl_4) es un agente hepatotóxico, el cual después de una administración aguda causa lesiones generalizadas en el tejido hepático y después de la administración crónica produce cirrosis.
2. En humanos cuando es inhalado se encuentran altas concentraciones en cerebro, médula ósea, corazón e hígado, siendo el hígado el órgano más afectado. Los efectos tóxicos se han encontrado experimentalmente en el animal íntegro a dosis tan bajas como 0.01 mg./kg.
3. Produce oliguria y anuria; la insuficiencia renal es la causa más común de muerte.
4. Los efectos más severos se observan a nivel del citocromo P-450 del retículo endoplásmico de los hepatocitos; por lo que se pueden esperar efectos y alteraciones significativas en la fase I o fase II del metabolismo al administrar los fármacos en pacientes con disfunción hepática.
5. El CCl_4 es el modelo más apropiado para producir hepatitis a cirrosis experimental similar a la que se presenta en el humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Browman, W.C. y Rand, M. J.: Farmacología: bases bioquímicas y patológicas, Ed. Interamericana, p. 26-29, México, D. F., 1984.
2. Miners, J. O., Drew, R. and Berkett, D. J.: Mechanism of action of paracetamol agents in mice "in vivo". Biochem. Pharmacol. 33: 2995-3000, 1984.
3. Conney, A. H., and Burns, J. J.: Metabolic interations among environmental chemical and drugs. Science 178:576-586, 1972.
4. Farber, E., Fisher, M. M.: In: Toxic injury of the liver, Part B (marcel Dekker, Inc.), p.547-549, New York, 1980.
5. Hunter, D.: In: the diseases of occupation. The English Universities. Press, LTD, p. 557-558, London, 1975.
6. Goodman, A., Gilman, A.: Bases Farmacológicas de la Terapeútica. Ed. Panamericana p. 1601-1602, 1982.
7. Forbes, J. R.: Carbon tetrachloride nephrosis. The Lancet 2:590-592, 1944.
8. Junqueira, L. C. y Carneiro, J. Aparato., Histología Básica. Sexta Edición, Ed. Salvat. pág. 287-296, 1979.
9. Von Oettingen, W. F.: The halogenated hydrocarbons. Industrial and toxicological importance. Elsevier, New York, 1964.
10. Reynolds, E. S., Thiers, R.E. and Vallee, B. L.: Mitochondrial function and metal concept in CCl₄ poisoning. J. Biol. Chem. 237:3546, 1962
11. Hardin, B. L. Jr.: Carbon tetrachloride poisoning review. Industr. Med. Surg. 23:93, 1954.
12. Reynolds, E. S.: Comparison of early injury to liver endoplasmic reticulum by halomethanes, hexachloroethane benzene, toluene, bromobenzene, ethionine, thioacetamide and dimethylnitrosamine. Biochem. Pharmacol. 21:2255, 1972.
13. Recknagel, R. O. and Glende, E. A.: In: carbon tetrachloride hepatotoxicity. An example of lethal cleavage. Critical Reviews Toxicol. 2:263, 1972.
14. Slater, T. F.: Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation. Nature (London) 209:36, 1966.

15. Drill, U.A.: Pharmacology of hepatotoxic agents. Gastroenterol. 38:786-787, 1960.
16. Drill, V.A.: Hepatotoxic agents: Mechanism of action and dietary interrelations. Pharmacol. Rev. 4:1-42, 1952.
17. Sewright, A., McLean, A.: The effect of diet on carbon tetrachloride metabolism. Biochem. J. 105:1055, 1967. J. Lipid Res. 8: 417-428, 1967.
18. Stetten, D. J. and Salcedo, J.: The source of extraliver fat in various types of fatty liver. J. Biol. Chem. 156:27-32, 1944.
19. Balazs, T., Murray, T.K., McLaughlan, J.M. and Grice, H.C. Hepatic test in toxicity studies on rats. Toxicol, Appl. Pharmacol. 3:71-79, 1961.
20. Dianzani, M.U.: Biochemical aspects of fatty liver. In: Biochemical mechanisms of liver injury. Edited by T.F.Slater, p. 45-96, Academic Press, New York, 1978.
21. Hoyumpa, A.M.; Greene, H.L.; Dunn, G. D. and Schenker; S.: Fatty liver: Biochemical and clinical consierations. Digest. Dis. 20: 1142-1170, 1975.
22. Lombardi, B.: Consideration of the pathogenesis of fatty liver. Lab. Invest. 15:1-20, 1966.
23. Rhelms, B.M. and Hu, C.H.: Carbon tetrachloride poisoning. J. Amer. Med. Assoc. 92:1254-1256, 1924.
24. Lombardi, B. and Ugazio. G.: Serum lipoproteins in rats with carbon tetrachloride induced fatty liver. J. Lipid Res. 6:498-505, 1965.
25. Bishop, D.G. and Stumpf, P.K.: Fatty acid metabolism. In: Biochemistry and methodology of lipids. Johnson, A.R. and Davenport, J.B. Eds. Wiley Interscience, New York, p. 361, 1971.
26. Hamilton, R. L.; Regen, D. M.; Gray, M.E. and Le Quire, V.S.: Lipid transport in liver. I. Electron microscopic identification of VLDL in perfused rat liver. Lab. Invest. 16:305, 1967.
27. Zimmerman, H.V.: Hepatotoxicity, Appleton-Century-Crofts, p. 97-106, 200-210, New York, 1978.
28. Mooney, R.A. and Lane, M.D.: Formation and turnover of trigliceriderich vesicles in the chick liver cell. J. Biol. Chem. 256:11724-22733, 1981.

29. Pencil, S.D.; Glende, E.A. Jr.; Recknagel, R.O.: CCl₄ induced inhibition of lipid secretion by isolated hepatocytes is not dependent on extracellular calcium. Fed. Proc. 41:1053, 1982.
30. Pencil, S.D.; Bratten, W.J.; Jr. Glende, E.A. Jr. And Recknagel, R.O.: Evidence against involvement of calcium in CCl₄ dependent inhibition of lipid secretion by isolated hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 33:2425-2429, 1984.
31. Pencil, S.D.; Bratten, W.J. Jr.; Glende, E.A. Jr. and Recknagel, R.O.: CCl₄ dependent inhibition of lipid secretion by isolated hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 33:2419-2423, 1984.
32. Jackson, R.L. Morrisett, J.D. and Gotto, A.M. Jr.: Lipoprotein structure and metabolism. Physiol. Rev. 56:259-316, 1976.
33. Trinder, P.: Rapid determination of salicylate in biological fluids. Biochem. J. 57:302-303, 1954.
34. Farber, E.; Shull, K.H.; Villa-Treviño, S.; Lombardi, B. and Thomas, M.: Biochemical Pathology of acute hepatic adenosin-triphosphate deficiency. Nature (London), 203:34-40, 1964.
35. Robinson, D.S. and Seakins, A.: The development in the rat of fatty livers associated with reduced plasma-lipoprotein synthesis. Biochem. Biophys. Acta 62:163-165, 1962.
36. Smuckler, E. A.; Iseri, O.A.; and Benditt, M.D.: An intracellular defect in protein synthesis induced by CCl₄. J. Esp. Med. 116: 55-72, 1962.
37. Bedford, C.A.; Cummings, A.J. and Martín, B.K.: A kinetic study of the elimination of salicylate in man. Brit J. Pharmacol. 24:418, 1965.
38. Gabriel, L.; Bonelli, G. and Dianzani, M.U.: Inhibition of colchicine binding to rat liver tubuline by aldehydes and by linoleic acid hydroperoxide. Chem. Biol. Interact. 19:101-109, 1977.
39. Dianzani, M.U. In:Free Radicals. Lipid peroxidation and cancer. p. 129, London, 1982.
40. Benedetti, A., Fulceri, R., Ferradi, M., Ciccoli, L.: Detection of carbonyl functions in phospholipids of liver microsomes in CCl₄ and BrCCl₃ -poisoned rat. Biochem. Biophys. Acta 712:628-638, 1982.
41. Schachter, D. and Manis, J.G.: Salicylate and salicyl conjugates: fluorometric estimation, biosynthesis and renal excretion in man. J. Clin. Invest. 37:800-807, 1958.

42. La Du, M.D., Mandel, H.G., Way, E.L.: Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. Ed. Williams Q. and Williams. p. 187-204, 1971.
43. Calvert, D.N. and Brody, T.M.: Role of the sympathetic nervous system in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Am J. Physiol. 198:669, 1960.
44. Brody, T.M., Calvert, D.N. Schneider, A.I.: Alterations of carbon tetrachloride-induced pathological changes in the rat by spinal transection, adrenalectomy and adrenergic blocking agents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 131:341, 1961.
45. Larson, R.E. and Plaa, G.L.: A correlation of the effects of cervical cordotomy hypothermia and catecholamines on carbon tetrachloride induced hepatic necrosis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 147:103, 1965.
46. Farber, J.L. and El-Mofty, S.K.: The Biochemical pathology of liver cell necrosis. Am. J. Pathol. 81:237, 1975.
48. Zimmerman, H.J.: The spectrum of hepatotoxicity. Perspectives Biol. and Med. 12:135, 1969.
49. Le Page, R.N. and Dorling, P.R.: Plasma membranes in acute liver injury. Biochemical changes induced by carbon tetrachloride. Aust. J. Exp. Biol. 49:345, 1971.
50. Darling, P.R. and Le Page, R.N.: Studies on "in vitro" treatment of rat liver plasma membranes with carbon tetrachloride. Biochem. Pharmacol. 21:2139, 1972.
51. Rufer, U. and Fimmer, M.: Inhibition by polyhalogenated hydrocarbons (PHHC) of ATPases in plasma membranes of parenchymal liver cells. Arch. Pharmacol. 293:187, 1976.
52. Christie, G.S. and Judah, V.D.: Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 142:241, 1954.
53. Judah, J. D., McLean, A.E.M. and McLean, E.K.: Biochemical mechanisms of drug injury. Am. J. Med. 49:609, 1970.
54. Borle, AA.: Control modulation and regulation of cell calcium. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 90:13-81, 1981.
55. Rasmussen, H.: Calcium and AMPc as synanchic messengers, John Wiley, New York, 1981.
56. Waller, R.L., Glende, E.A. Jr. Andr Recknagel, R.D.: CCl₄ and BrCCl₃ toxicity. Biochem. Pharmacol. 32:1613-1617, 1983.

57. Bruckner, J.V.: Effects of CCl_4 and 1,1-dichloro-ethylene on rat hepatic microsomal calcium and for magnesium-simulated ATPase. Biochem. Pharmacol. 33: 3295-3298, 1984.
58. Schanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E. and Farber, J.L.: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. Science 206:700-702, 1979.
59. Farber, J.L.: The role of calcium in cell death. Life Sci. 29:1289-1295, 1981.
60. Kröner, H.: The intracellular distribution of liver cell calcium in normal rats and one hour after administration of CCl_4 . Biochem. Pharmacol. 31: 1069-1073, 1982.
61. Borle, A.A. and Studer, R.: Effects of calcium ionophores on the transport and distribution of calcium in isolated cells and in liver and kidney slices. J. Memb. Biol. 58:51-72, 1978.
62. Blackmore, P.F., Brumley, F.T., Marks, J.L. and Exton, J.H.: Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output. J. Biol. Chem. 253:4851-4858, 1978.
63. Butter, T.C.: Reduction of CCl_4 "in vivo" and reduction of CCl_4 and $CHCl_3$ "in vitro" by tissues and tissue homogenates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 134:311, 1961.
64. Wirtschafter, Z.T. and Cronyn, M.W.: Relative hepatotoxicity. Arch. Environ. Health 9:180, 1964.
65. Musgrave, W.K.R.: Carbon tetrachloride metabolism. Encyclopedia Británica Macropaedia 13: 682, 1974.
66. Lowry, T.H. and Richardson, K.S.: In: Mechanism and theory in organic chemistry. Harpes and Row, New York, p. 473, 1976.
67. Gregory, N.L.: CCl_4 toxicity and electron capture. Nature 212:1460, 1966.
68. Fowler, J.S.L.: Carbon tetrachloride metabolism in the rabbit. Br. J. Pharmacol. 37:733, 1969.
69. Gallagher, C.H.: The effect of antioxidants on poisoning by CCl_4 . Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40:241, 1962.
70. Hove, E.L.: Interrelation between α -tocopherol and protein metabolism. III. The protective effect of vitamin E and certain nitrogenous compounds against CCl_4 poisoning in rats. Arch. Biochem. 17:467, 1948.
71. Bernheim, F.: Biochemical implications of pro-oxidants and oxidants. Radiat. Res. (Suppl. 3), p. 17, 1963.

72. Recknagel, R.O. and Glende, E.A. Jr.: Lipid peroxidation: A specific form of cellular injury, in D.H.K. Lee, H.L. Falk, S.D. Murphy and S.R. Geiger (eds.). Handbook of Physiology. Reactions to Environmental Agents, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. p. 591, 1977.
73. Mason, H.S., North, J.C. and Vanneste, M.: Mirosomal mixed function oxidations. The metabolis of xenobiotics. Fed. Proc. 24:1172, 1965.
74. Wirtschafter, Z.T. and Cronyn, M.W.: Free radical mechanism for solvent toxicity. Arch. Environ. Health 9:186, 1964.
75. Reynolds, E.S. and Ree, H.S.: Liver parenchymal cell injury VII. Membrane denaturation following carbon tetrachloride. Lab. Invest. 25:269-278, 1971.
76. Tappel, A.L.: Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitamins Hormones 20:493 - 510, 1962.
77. Alfin-Slater, R.B. and Morris, R.S.: Vitamin E and lipid metabolism. Adv. Lipid Res. 1:183, 1963.
78. Tappel, A.L.: Vitamin E and selenium as inhibitors "in vivo" lipid peroxidation. In: lipids and their oxidation. Ed. gy H.W. Schultz, p. 367-386, The A.V.I. Publishing. Co., Westport, Conn., 1962..
79. Hickenbottom, R. S. and Hornbroock, K. R.: Effects of CCl₄ on the metabolism of liver glucogen in the rat. J. Pharmac. Exp. Ther. 178:383-394, 1971.
80. Zimmerman, H.J., Kodera, Y. and West, M.: Rate of increase in plasma level of citoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental CCl₄ hepatotoxicity. J. Lab. Clin. Med. 66:315-323, 1965.
81. Rees, K.R. and Sinha, K.P.: Blood enzymes in liver injury. J. Pathol. Bacteriol. 80:297-307, 1960.
82. Dinman, B.D., Fox, C.F., Frajola, W. J. and Rubor, A.: Serum enzyme and B₁₂ changes in CCl₄ hepatotoxicity. Arch. Environ. Healt 4:50-64, 1962.
83. Cumming, A.J., Martin, B.J. and Renton, R.: The elimination of salicylic acid in man: serum concentrations and urinary excretion rates. Brit. J. Pharmacol. 26:461-467, 1966.
84. Hoffsten, P.E., Hunter, F.E. Jr., Gebiki, J.M. and Weinstein, J.: Formation of "lipid peroxide" under conditions which lead to swelling and lysis of rat liver mitochondria. Biochem Biophys. Res. Commun. 7:276, 1962.

85. Hunter, F.E. Jr., Scott, A., Hoffste, P.E., Guerra, F.: Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. J. Biol. Chem. 239:609, 1964.
86. Hunter, F.E., Scott, A., Weinstein, J. and Scheneider, A.: Effects of phosphate, arsenate and other substances on swelling and lipid peroxide formation when mitochondria are treated with oxized and reduced glutathione. J. Biol. Chem 239:622, 1964.
87. Artizzu, M., Baccino, F.M. and Dianzani, M.U.: The action of CCl₄ on mitochondria "in vitro". Biochem. Biophys Acta 78:1, 1963.
88. Desai, I.D., Samant, P.L. and Tappel, A. L.: Peroxidative and radiation damage to isolated lysosomes. Biochem. Biophys. Acta 86:277, 1964.
89. Wills, E.D. and. Wilkinson, A.E.: Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzymes release. Biochem. J. 99:657, 1966.
90. Artizzu, M. Pani, Satta, G. and Dianzani, M.U.: The action of CCl₄ on mitochondia "in vitro". Biochem. Biophys. Acta 78:1, 1963.
91. Sipes, I.G., Krishna, G. and Gillete, J.R.: Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of citochrome P-450. Life Sci. 20:1541-1548, 1977.
92. Rao, K.S. and Recknagel, R.O.: Early incorporation of carbon labeled carbon tetrachloride into rat liver particulare lipids and proteins. Exp. Mol. Pathol. 10:219, 1969.
93. McMillan, G.R. and Calvert, J.G.: Gas phase, hoto-oxidation. Oxidation Combustion Rev. 1:84-135, 1965.
94. Holman, R.T.: Autoxidation of fats and related substances. In: Progress in the chemistry of fats and other lipids. Vol.2. Edited by R.T. Holman, W.O. Liendberg and T. Malkin, p. 51-98, Pergamon Press, London, 1954.
95. Gardner, H.W.: Descomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymatic. J. Agric. Food Chem. 23:129-236, 1975.
96. Schovenstein, E.: Autoxication of polynsaturated esters in water: Chemical structure and biological activity the products. J. Lipid, Res 8:417-428, 1967.

97. Cho, A.K.: Metabolismo de los fármacos. Capítulo 3. Fundamentos de Farmacología. J.A. Bevan, segunda edición. Editorial Harla, p. 19-24, 1976.
98. Müller, G.C. and Miller, J.A.: The metabolism of methylated amino azodyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. J. Biol. Chem. 202:579, 1953.
99. Brodie, B.B., Axelrod, J., Cooper, J.R., Guadette, L., La Du, B. N. Mitona, C. and Udenfriend, S. Detoxification somes. Science 121:603, 1955.
100. Mason. H.S.:Oxidases. Ann. Rev. Biochem. 34:595, 1965.
101. Levine, R. Ruth.: Pharmacology: Drug actions and reactions. Cap. eight. p. 150-173.
102. Lu, A.Y.H., Junk, K.W. and Coon, M.J.: Resolution of the cytochrome P-450 containing w-hydroxylation system of liver microsomes in three components. J. Biol. Chem. 244:3714, 1969.
103. Jafcote, C.R., Gaylor, J.L. y Calabrese, R.L.: Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. Biochemistry 8:3455, 1969.
104. Thomas, P., Lu, A.Y., Ryan, D., West, S., Kawalek, J. and Levine W.: Immunochemical evidence for six forms of rat liver cytochrome P-450 obtained using antibodies against purified rat liver cytochrome P-450 and P-488. Mol. Pharmacology 12:746, 1976.
105. Eastbrook, R.W., Baron, J., Peterson, J., Ishimura, Y.: Oxygenated cytochrome P-450 as an intermeate in hydroxylation reactions. In: Biological Hydroxylation Mechanisms. Eds. G.S. R.M.S. Smellie, Vol. 159:185, 1972.
106. Sessions, J. T. Minkel, H.P., Bullard, J. C. & Ingelfinger, F. J. (1954). Clin Invest., 33,1116.
107. Hammar, C. H. & Prellwitz W. (1966). Klin. Wschrs., 44;1010.
108. Brodie, B.B., Burns, J.J. y Weiner Moreover, 1959, Med. Exp. 1, 290.
109. Schoene, B., Fleischmann, R.A. & Remmer, H. 1972, (1972) Eur. J. Clin. Pharmac. 4, 65.
110. Brodie, B.B. & Mitchell, J. R. (1973). In Biological Effects of Drugs in Relation to their plasma concentration, Editors: Davies, D. S. y Prichard B.N.C. p.1 London: MacMillan.

111. Wallace and M.J. Brodie: Decreased drug binding in serum from patients with chronic hepatic disease. J. Clin Pharmacol, 9:429-432, 1976.
112. Plan and Larson: Carbon Tetrachloride induced liver damage. Arch Environm. 9: 536-543, 1954.
113. Farrel C. G. Hart, M. Sc. and L.W., Powell. Drug Metabolism in liver disease. Gastroenterology
114. Desmond V. Paul, James Robert: Preservation of glucuronidation in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in the rat. Biochemical. Pharmacology Vol. 30 No. 9, p. 993, 999, 1981.
115. Dingell V. James y Heimberg Murray. The effects of apliphatic halogenated hydrocarbons on hepatic drug metabolism. Biochemical Pharmacology, Vol. 17. p. 1269-1278, 1968.
116. Christie, J. D. Judah: Mechanis of action of carbon tetrachloride onliver cell proc. Roy. So Sr. B. 142, 241-257, 1954.

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
RE	Retículo Endoplásmico
FMO	Oxidasa de función mixta
TG (s)	Triglicéridos
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
LMBD	Lipoproteína de muy baja densidad
RER	Retículo endoplásmico rugoso
AGL	Ácidos grasos libres
CCl ₃	Radical libre triclorometilo
FL's	Fosfolípido
REL	Retículo endoplásmico liso
NADP	Nicotín adenin dinucleótido fosfato