

03081

6 2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FILOSOFIA CELULAR

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE PROTECCION
POR LA ADENOSINA DEL DAÑO HEPATICO
CRONICO INDUCIDO POR LA ADMINISTRA-
CION DE TETRACLORURO DE CARBONO
EN RATA.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a

Rolando Efraín Hernández Muñoz

México, D. F.

1 9 9 0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	COMENTARIO GENERAL AL MANUSCRITO.....	18
IV.	METODOS.....	20
V.	RESULTADOS.....	24
VI.	DISCUSION.....	29
VII.	REFERENCIAS.....	35
VIII.	TABLAS I - V.....	42
IX.	PIES DE FIGURA.....	47
X.	FIGURAS 1 - 5	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CCl_4	-	Tetracloruro de carbono
IGF- β	-	Factor de crecimiento β
HClO_4	-	Acido perclórico
$\Delta \psi$	-	Potencial eléctrico de la membrana
ΔpH	-	Gradiente de pH a través de la membrana
K_2CO_3	-	Carbonato de potasio
LDH	-	Deshidrogenasa láctica
β -HBDH	-	Deshidrogenasa del β -hidroxibutirato
$\Delta \mu \text{H}^+$	-	Potencial electroquímico del protón
GSH	-	Glutati6n reducido
GSSG	-	Glutati6n oxidado

ABSTRACT

Adenosine administration to chronically carbon tetrachloride (CCl₄) intoxicated rats partially prevented the hepato and splenomegalies, induced by the hepatotoxin. This nucleoside effect was accompanied by a noteworthy amelioration in the liver function and decrease by almost by half of collagen deposition promoted by the CCl₄, as well as a partial block of the CCl₄-induced alterations in the accumulated collagen.

On the other hand, adenosine maintained high levels of collagenase activity and, perhaps the most important, the nucleoside preserved the cell energy availability in CCl₄-treated rats. All these effects were observed even in the presence of an active CCl₄ metabolism, ruling out the possibility that adenosine is blocking the CCl₄ metabolism in the liver cell.

The CCl₄-treated animals showed a deficient mitochondrial oxidation for either, sites I and II substrates when mitochondrial oxygen consumption was stimulated by ADP addition; this fact elicited low respiratory controls and the ADP/O ratio was affected mainly using site I substrates. These alterations were accompanied by a deficient re-oxidation of cytosol reducing equivalents and, therefore, by the presence of a reduced REDOX state in both, cytoplasm and mitochondria. Adenosine prevented the mitochondrial alterations and maintained normal levels of glutathione, which were decreased by the CCl₄ administration.

Adenosine effects seem to contribute that in adenosine-treated rats, the recovery of liver fibrosis, assessed by collagen accumulation, was more rapid since adenosine

administration decreased collagen synthesis and increased collagenase activity in animals treated with CCl₄ by 8 weeks prior adenosine treatment.

In conclusion, adenosine administration in CCl₄-treated rats, partially prevented liver fibrosis and allowed a better recovery of the liver, when fibrosis had been developed previously. These effects, which might be related to conserve the mitochondrial function and the energy availability, could led to a more successful response of the liver cell against the injury represented by the CCl₄ administration.

RESUMEN

La administración de adenosina a ratas intoxicadas crónicamente con tetracloruro de carbono (CCl_4) previno parcialmente la hepato y esplenomegalias, inducidas por el tóxico. Este efecto del nucleósido se acompañó de una notable mejoría en las pruebas de funcionamiento hepático y en una reducción de casi la mitad de la acumulación de colágena hepática promovida por el CCl_4 , así como un bloqueo parcial de las alteraciones que indujo el CCl_4 en las características de la colágena acumulada.

Por otro lado, el nucleósido mantuvo niveles elevados de actividad colagenolítica y, tal vez lo más importante, la adenosina mantuvo la disponibilidad de energía celular intacta en animales tratados con la hepatotóxina. Todos estos efectos de la adenosina se presentaron aún en presencia de un metabolismo activo del CCl_4 , descartando la posibilidad de un bloqueo en el catabolismo del tóxico, mediado por la adenosina.

Los animales tratados con CCl_4 mostraron una oxidación deficiente de sustratos por la mitocondria, tanto en sitio I como en sitio II cuando la respiración mitocondrial se estimuló con la adición de ADP; esto produjo cocientes respiratorios bajos y la ADP/O se afectó predominantemente con sustratos de sitio I. Estas alteraciones se acompañaron de una re-oxidación deficiente de los equivalentes reductores citoplásmicos y, por ende, de la presencia de un estado REDOX reducido tanto en citoplasma como en mitocondria. La administración de adenosina bloqueó las alteraciones mitocondriales casi en su totalidad, así como mantuvo niveles normales de glutatión, disminuidos por la administración

de CCl_4 .

Todos estos efectos del nucleósido parecen contribuir a que en animales tratados con adenosina, la recuperación de la fibrosis hepática, evaluada por la cantidad de colágena hepática depositada, fuera más rápida en función del tiempo; dado que la administración del nucleósido disminuyó la síntesis de colágena e incrementó la actividad de la colagenasa en animales previamente tratados con CCl_4 por 8 semanas.

En conclusión, la administración de adenosina en animales tratados con CCl_4 crónicamente, impidió parcialmente la fibrosis hepática y permitió una mayor recuperación del hígado cuando el proceso fibrogénico se había instalado previamente. Estos efectos, que pueden depender de conservar la función mitocondrial intacta y, por lo tanto, la disponibilidad de energía celular, pudieron permitir que la célula hepática respondiera más exitosamente a la agresión constituida por la administración del CCl_4 .

INTRODUCCION

El estudio de los mecanismos de producción de hepatopatía inducida por fármacos ha cobrado gran importancia en la actualidad. Las formas de prevención y reversión de las lesiones tempranas o los cambios degenerativos de carácter irreversible del hígado, son líneas de estudio que continúan recibiendo mucho impulso, dado que desde varios puntos de vista, este campo en la investigación biomédica básica reviste mucha importancia en su aplicabilidad a la clínica.

El uso de varios fármacos ha constituido un arma en el estudio de la hepatotoxicidad: desde aquellos que producen inhibición en la síntesis de proteínas o incrementan la producción de grasa neutra induciendo entonces un hígado graso, hasta los que producen necrosis masiva del órgano y en función del tiempo generan un cuadro de fibrosis hepática.

Uno de los modelos más empleados para conseguir un cuadro de degeneración hepática que semeja en mayor o menor grado la cirrosis hepática humana, es la administración crónica de tetracloruro de carbono (CCl_4). La administración aguda (dosis única) de este tóxico conlleva a una serie de cambios membranales que culminan con la muerte celular; por otro lado, la intoxicación crónica produce una acumulación gradual de tejido fibroso que distorsiona la arquitectura normal de las poblaciones celulares presentes en hígado, comprometiendo la función hepática global. Si bien no ha sido completamente dilucidado el mecanismo por medio del cual la administración de CCl_4 resulta en una fibrosis hepática en varios modelos animales, la posibilidad de una

disminución crónica de energía celular promovida por las alteraciones que el tóxico puede causar en organelos como la mitocondria, pudiera desempeñar un papel muy importante en la fisiopatología de la fibrosis hepática (vide infra).

La administración de adenosina en ratas macho in vivo como arma en el estudio de la regulación metabólica hepática, ha sido de utilidad en la investigación de la hepatotoxicidad inducida por varios fármacos. Su empleo permite prevenir, revertir o retardar cuadros de lesión hepática tempranos inducidos por algunos hepatotóxicos, entre los cuales se incluye el CCl_4 .

Entre los efectos del nucleósido sobre los mecanismos de producción de la hepatotoxicidad aguda, podemos mencionar un incremento de más del 40% en la poza hepática del ATP, hallazgo importante, dado que algunos hepatotóxicos disminuyen la disponibilidad celular de energía química. El empleo de adenosina en la administración aguda de CCl_4 , ha revelado acciones del nucleósido capaces de modificar el cuadro de intoxicación inducido por este tóxico. Estos aspectos se revisarán en esta introducción y constituyen los antecedentes directos del presente trabajo.

De acuerdo con estas consideraciones, esta introducción puede dividirse en tres secciones:

- 1) El hígado normal y los cambios que ocurren durante el desarrollo de la fibrosis hepática.
- 2) Mecanismos por medios de los cuales el CCl_4 ejerce su acción tóxica.
- 3) Efectos metabólicos hepáticos producidos por la administración de adenosina, sus implicaciones en la intoxicación crónica con

el CCl₄.

1) EL HIGADO NORMAL Y LOS CAMBIOS QUE OCURREN DURANTE EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS HEPATICA.

En el tejido hepático normal existen varios tipos celulares los que en conjunto le confieren sus características (hepatocitos, células de Kupfer, células endoteliales y epiteliales, así como células de Ito o "Fat storing cells"). De estos tipos celulares, los hepatocitos constituyen un 70% de la población celular y aproximadamente un 80% del volumen total del órgano (1).

El resto del tejido está constituido por la matriz extracelular y los espacios que conectan diferentes porciones del hígado entre sí o con el resto del organismo (espacios vasculares, linfáticos, biliares y de Disse).

El principal componente de la matriz extracelular está constituido por la colágena, que en la rata es aproximadamente de 1 mg/g tejido fresco. Esta colágena a su vez, corresponde a diversos tipos genéticos que en hígados normales se han identificado como tipos I, III, IV, V, y más recientemente se ha descrito un tipo VI cuya función es aún desconocida (2). Sin embargo, aproximadamente el 45% de las colágenas existentes corresponden a la del tipo I y el otro 45% a la variedad de tipo III, siendo el otro mayor componente el tipo de colágena V (3).

Otros componentes de la matriz extracelular (no colagenosos) comprenden la fibronectina (4), la laminina (2) y una variedad de proteoaminoglicanos (5); la fibronectina es una glucoproteína de superficie que involucra la adhesión de las células a la matriz

extracelular (6). Entre los componentes de los glucosaminoglicanos, tenemos al ácido hialurónico y al heparán sulfato. Este último componente es uno de los más importantes en la membrana celular, pues constituye parte de una glucoproteína con una región hidrofóbica que le permite insertarse en la bicapa de fosfolípidos (7)

Cada uno de estos componentes de la matriz extracelular guarda una distribución específica que permite mantener una relación constante en el número y tipo de células que constituye el tejido hepático (8).

CAMBIOS HEPATICOS DURANTE LA GENERACION DE LA FIBROSIS.

La fibrosis hepática no es un proceso uniforme y más bien se caracteriza por su heterogeneidad, tanto a nivel molecular como por sus cambios histológicos. Sin embargo, se puede considerar que la fibrosis (cirrosis) hepática comprende varios eventos (9); es un proceso que involucra prácticamente todo el hígado, pero no necesariamente a nivel de cada lóbulo hepático; se asocia a necrosis celular en algún momento de la enfermedad y se acompaña de nódulos de regeneración del parénquima, los cuales son generalmente rodeados por bandas de tejido conectivo que se extienden de los espacios portaes hacia las venas centrales.

A nivel molecular en el hígado cirrótico e independientemente de su etiología, la fibrogénesis resulta en un aumento de varias veces en la cantidad de colágena (10); este incremento comprende los diferentes tipos de colágenas y ocurre en una forma aparentemente coordinada. A pesar de que el incremento en colágena es indispensable para que ocurra la fibrosis hepática,

no es la única alteración que tiene lugar en el hígado. Las proteínas no colagénicas que forman parte de la matriz extracelular pueden actuar como moduladores de la función celular (11). Durante la fibrogénesis, la fibronectina se acumula precediendo al incremento de otras proteínas de la matriz extracelular, tal vez modulando la composición y calidad del resto de dicha matriz (2).

Es interesante mencionar que durante la regeneración hepática, la fibronectina no cambia en cantidad (12) y no se desarrolla fibrosis a pesar del aumento en la producción de colágena (3). Además, se ha sugerido que las proteínas no colagénicas de la matriz extracelular pudieran ser claves durante la fibrogénesis, ya sea uniéndose a la colágena o evitando así su degradación, o actuando como agentes quimiotáxicos para células inflamatorias (13).

Frecuentemente la fibrogénesis se asocia con necrosis hepatocelular e inflamación. Dado que algunas monocinas y linfocinas estimulan la proliferación celular y la producción de colágena in vitro (14), éste podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales los procesos inflamatorios inducen una acumulación de colágena hepática.

La cantidad de colágena en un tejido está determinada por un balance entre los procesos de síntesis y degradación (15). Existen varios niveles moleculares en los cuales la síntesis de colágena puede ser regulada, incluyendo la transcripción de los genes que codifican para la procolágena, la estabilidad de los correspondientes RNA mensajeros, la eficiencia en la traducción de las procolágenas y sus modificaciones post-traduccionales que

modifican a la procolágena hasta su forma nativa final, esto es, la molécula de colágena.

Se sabe que los niveles de RNA mensajeros para procolágena se elevan en tratamientos crónicos con etanol (16) o con la administración de CCl_4 (17). Debido a que estos cambios preceden u ocurren paralelamente al aumento de colágena en el tejido, se ha sugerido una relación directa entre la transcripción de los genes para las procolágenas y la patogénesis de la fibrosis hepática. En este contexto, se ha descubierto recientemente que el gene de la procolágena tipo I posee dos sitios de regulación transcripcional, los cuales son susceptibles de interactuar con factores activadores, que son proteínas capaces de unirse al DNA en la vecindad de los sitios de regulación (18). Se han descrito al menos tres factores que probablemente incrementan la transcripción de RNA mensajeros para procolágena. Uno es un factor "fibrogénico" aislado de hígado de rata sujeto a la inducción de fibrosis (19). El acetaldehído, primer metabolito en la oxidación del etanol, es capaz de estimular la transcripción del gene en fibroblastos humanos, siendo este metabolito directamente fibrogénico en la cirrosis alcohólica, aún en ausencia de un proceso inflamatorio (20-22). El último factor reportado corresponde al factor de crecimiento (transforming growth factor, TGF- β), que induce fibrogénesis tisular en animales de experimentación (23) y puede desempeñar un papel importante en la fibrosis hepática (24).

Después de la transcripción y traducción, las procolágenas sufren modificaciones post-traduccionales (25); sin embargo, se acepta que las enzimas que llevan a cabo estas modificaciones no

son pasos limitantes para la síntesis de colágena. Por lo tanto no se han descrito mecanismos que lleven a cabo una regulación post-traducciona1 y que permitan un incremento de colágena y favorezcan la fibrosis hepática.

Por otra parte, se ha estudiado la participación de la collagenasa en el desarrollo de la fibrosis hepática. Existen pruebas de que la degradación completa de colágena se puede obtener in vivo (26) y que ésta se lleva a cabo en tres pasos enzimáticos: primero la despolimerización de la molécula se lleva a cabo por enzimas probablemente relacionadas con la elastasa; el segundo paso es el del rompimiento del arreglo helicoidal de cada molécula de colágena con la formación de dos o más fragmentos. Dicha acción es llevada a cabo por collagenasas específicas, que al desnaturalizar a la colágena facilitan el tercer paso, que es su degradación a pequeños fragmentos realizado por proteasas inespecíficas.

Las collagenasas son entonces definidas como una familia de enzimas de localización principalmente extracelular, capaces de romper el arreglo helicoidal de la colágena nativa bajo condiciones fisiológicas de pH, temperatura y fuerza iónica (27).

La degradación de procolágena puede ocurrir antes o después de que la molécula es secretada desde la célula a la matriz extracelular. De hecho, parte de la colágena recién sintetizada puede ser degradada intracelularmente (aproximadamente un 15%) in vivo (28) y en teoría, la interrupción de este proceso daría un incremento neto de un 15% en el depósito de la colágena extracelular. Análogamente, una falla en la degradación extracelular de esta molécula traería como consecuencia un incremento neto en

la cantidad de colágena. Sin embargo, estudios realizados in vitro han demostrado que en los animales tratados con CCl_4 la actividad colagenolítica es normal o está ligeramente aumentada (29); en la esquistosomiasis murina, la actividad colagenolítica se incrementa en forma paralela al aumento en la síntesis de colágena y disminuye después de la octava semana de post-infección (30). Esta actividad colagenolítica puede incrementarse cuando los animales reciben un tratamiento con concanavalina A, y también se ha establecido que en animales que reciben etanol en forma crónica su actividad colagenolítica aumenta en los estados iniciales de la enfermedad y disminuye cuando la cirrosis hepática se encuentra completamente establecida (31). Estos datos concuerdan con lo reportado, de que en estadios avanzados de fibrosis hepática inducida por el CCl_4 , la colagenasa no es detectable con anticuerpos, lo que ha sido interpretado como una disminución en la producción de esta enzima (32). Por lo tanto, la actividad colagenolítica es el resultado de un complejo balance entre inhibidores y activadores. Se sabe que el TGF- β es capaz de bloquear la inducción de colagenasa por otros factores de crecimiento in vitro (33) y que este efecto podría contribuir a un incremento neto en la producción de colágena.

Otro mecanismo involucrado en la producción de fibrosis hepática puede radicar en un incremento en las células productoras de colágena. Factores tales como el TGF- β y el factor de crecimiento plaquetario pueden estimular la producción de fibroblastos (34) y tal vez puedan tener las mismas acciones a nivel de las células hepáticas como lipocitos y miofibroblastos.

Así mismo, la respuesta inflamatoria que puede ser inducida

por leucotrienos (35). puede estimular la producción de otros factores estimulantes de la proliferación de fibroblastos, tales como la interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral provenientes de monocitos activados (36). De tal manera, y debido principalmente a la complejidad de las interacciones que estos factores poseen, resulta difícil el predecir cuales son los efectos netos de estas citocinas sobre la producción de proteínas del tejido conectivo.

2) MECANISMOS POR MEDIO DE LOS CUALES EL CCl₄ EJERCE SU ACCION TOXICA.

El CCl₄ ha sido usado ampliamente como modelo de toxicidad hepática. Después de su administración, el CCl₄ se concentra en el hígado alcanzando un nivel máximo a los 90 minutos en el tejido y decayendo lentamente después de alcanzar este pico de concentración (37). El hígado es el principal blanco en su toxicidad, a pesar de que también se producen alteraciones de los ríñones proximales en el riñón y alteraciones focales en el pulmón. Con la dosis estándar que se emplea (2.5 ml/Kg de peso) muere aproximadamente una tercera parte de la población de hepatocitos, evento que ocurre en las primeras 24 horas de su administración. A las 72 horas del tratamiento, se puede observar una compensación regeneratoria de hepatocitos (38); y a las 96 horas, solo se pueden detectar escasas mitosis y el tejido retorna a su aspecto normal.

Estudios previos han mostrado que después del metabolismo del CCl₄, existe una rápida desaparición de la actividad del citocromo P-450. Lo anterior sugirió que el metabolismo del CCl₄

es llevado a cabo en el retículo endoplásmico por la acción de un sistema de oxidasas de función mixta (39). Esta sugerencia fue apoyada por el hecho bien conocido de que existe sinergismo entre el efecto del etanol y la toxicidad del CCl_4 (40,41).

Trabajos recientes han demostrado que la lipoperoxidación inducida por el CCl_4 depende de una forma de citocromo P-450 (P-450 IIIa) que es una forma de citocromo inducible por el consumo de alcohol (42). Sin embargo, el catabolismo del CCl_4 destruye varias formas del citocromo P-450, lo cual ocurre en todo el lóbulo hepático; esto de hecho no significa que la desaparición del citocromo P-450 se asocia con células destinadas a morir por la acción del tóxico (43), sino que más bien en regiones donde se encuentre determinado tipo de citocromo P-450, la acción del CCl_4 puede ser más tóxica, especialmente si se suma a otras situaciones tales como una baja en la oxigenación de esa porción tisular. De tal manera, que existen una serie de factores que facilitan que la principal acción tóxica del CCl_4 tenga como blanco la región centrolobulillar hepática. Especialmente esta región comprende una gran concentración de citocromo P-450 inducible por alcohol, bajos niveles de glutatión reducido y bajas tensiones de oxígeno (44,45), lo que la predispone a ser el sitio inicial del daño por administración de CCl_4 .

Otro aspecto importante, es la naturaleza de los productos formados a partir del catabolismo del CCl_4 . El CCl_4 puede ser metabolizado en primera instancia hacia radicales como el triclorometil o el peroxitriclorometil (46,47), los cuales pueden atacar dobles ligaduras como las de los ácidos grasos y producir un daño en la molécula durante el proceso de la lipoperoxidación.

La lipoperoxidación ocurre en los primeros minutos posteriores a la intoxicación, siendo entre los fosfolípidos, la fosfatidilserina, la más afectada por este proceso (48). La destrucción de ácidos grasos también muestra cierta selectividad a la acción del tóxico; primeramente el linolénico y el oleico son afectados, destruyéndose posteriormente el araquidónico (49). Otra alteración temprana que ocurre con el tetracloruro de carbono involucra las uniones intercelulares "laxas".

En un principio, el tóxico parece disminuir este tipo de uniones, sin que ocurran cambios en las uniones intercelulares firmes, y de hecho se ha demostrado que posteriormente el CCl_4 es capaz de estimular la proliferación de uniones más fuertes entre células (50). En otras palabras, este doble efecto del CCl_4 promueve que la comunicación intercelular se distorsione, lo que aísla in situ poblaciones de hepatocitos sanos de sus vecinos en proceso de necrosis.

En lo que se refiere a la síntesis de proteínas, desde hace tiempo se sabe que la desgranulación del sistema del retículo endoplásmico se acompaña de una disminución en la síntesis de proteínas. A estas observaciones básicas se le ha añadido el descubrimiento de que en ribosomas provenientes de animales sometidos a tratamiento con CCl_4 muestran una gran capacidad (mayor que en ribosomas de animales controles) para unir el tRNA de fenilalanina y un poli(U) sintético, lo que demuestra que existen uniones anormales tanto para los mRNAs así como para los de transferencia, lo cual puede traducirse en un deficiente control de la síntesis de proteínas (51).

Estudios recientes han demostrado que la síntesis proteica

deficiente coincide con un defecto substancial en la metilación del RNA ribosomal (51). El defecto en metilación fue específico para la posición 2'-O-ribosa. Si estos ribosomas provenientes de animales tratados con CCl_4 son remetilados in vitro, se restaura la función, lo que ha hecho suponer que el defecto en metilación se debe a la estimulación de desmetilasas, las cuales son inducidas por el incremento en el calcio citoplásmico consecuencia de la administración de CCl_4 .

El CCl_4 es capaz de alterar la homeostasis del calcio citoplásmico a través de alteraciones en los tres mecanismos que mantienen la concentración citoplásmica de calcio en alrededor de $0.2 \mu\text{M}$. El bombeo de calcio a través de la membrana plasmática se altera por la administración de CCl_4 , ya que el tóxico cambia la permeabilidad de esta membrana al modificar su composición (52); así en el citoplasma ocurre una acumulación de calcio coincidiendo con el pico de concentración del CCl_4 en la célula (37). La actividad de una ATPasa para calcio se inhibe reversiblemente por el CCl_4 (53). El segundo mecanismo corresponde a la mitocondria, en presencia de CCl_4 existen pérdidas de calcio por parte de la mitocondria, contribuyendo así a su incremento en citoplasma (54). Finalmente, se ha demostrado que el sistema de secuestro de calcio que lleva a cabo una ATPasa calcio-dependiente del retículo endoplásmico, se altera en gran medida en presencia de CCl_4 . Todas estas situaciones dan como resultado un incremento en calcio citoplásmico, que con todas las alteraciones metabólicas que acarrea, puede constituir un mecanismo muy importante en la toxicidad del CCl_4 (55,56).

Los efectos del CCl_4 sobre la función mitocondrial han sido

un t3pico de estudio reciente. Jikko et al. demostraron una disminuci3n de la carga energ3tica en h3gados de ratas cirr3ticas despu3s del tratamiento con CCl₄, efecto debido principalmente a una disminuci3n en la concentraci3n de ATP; estos efectos se acompaaron de una menor cantidad de citocromo oxidasa en mitocondrias aisladas de los mismos animales (57). Recientemente se ha demostrado que en mitocondrias de animales cirr3ticos, tratados con fenobarbital y CCl₄, el consumo de ox3geno y algunas actividades enzim3ticas se encuentran disminuidas. A pesar de que estas mitocondrias responden en la misma magnitud que las controles a inhibidores tales como el atractil3sido, dinitrofenol y oligomicina, el consumo de ox3geno con sustratos de sitio I, fue menor en mitocondrias de los animales cirr3ticos que en sus respectivos controles (58). Por otro lado, las mitocondrias de animales cirr3ticos son mas sensibles a efectos de hipoxia, de tal manera que sus mitocondrias no se recuperan despu3s de ser sometidas a breves per3odos de hipoxia (59).

Otros efectos cr3nicos del CCl₄ se comentan en el manuscrito incluido en esta tesis.

3) EFECTOS METABOLICOS HEPATICOS PRODUCIDOS POR LA ADMINISTRACION DE ADENOSINA.

La administraci3n de adenosina (200 mg/Kg) a animales en ayuno produce modificaciones metab3licas que mimetizan el patr3n metab3lico de un animal alimentado ad libitum. El nucle3sido induce incremento en la poza de ATP y en la carga energ3tica in vivo (60). No obstante que el mecanismo involucrado en este

efecto de la adenosina no ha sido completamente dilucidado, el aumento en el ATP puede determinar el comportamiento metabólico del animal tratados con adenosina. Otro efecto es el aumento en la actividad glucogénica. El nucleósido estimula en trece veces la incorporación de ^{14}C -glucosa a glucógeno (61), lo que se relaciona con un aumento en ocho veces de la actividad de la glucógeno sintetasa (62). La incorporación de ^{14}C -lactato a glucosa también se incrementa después de la administración de adenosina, sugiriendo un aumento en la actividad gluconeogénica (63). También se ha demostrado un efecto antilipolítico del nucleósido (64) que junto con su acción sobre la actividad de la acil CoA sintetasa modifica la disponibilidad del acil CoA derivados en el tejido hepático (65).

Dos efectos más, un aumento en la lipogénesis del tejido adiposo (61) y una disminución en la lipogénesis hepática (66), aunados a los efectos ya mencionados, señalan a la adenosina como un arma útil en el estudio de la hepatotoxicidad, ya que en esta última predominan los procesos catabólicos sobre los biosintéticos (67).

La administración adenosina evita totalmente la producción de hígado graso inducido por la cicloheximida (68); en este modelo el nucleósido impide el incremento en la incorporación de ácidos grasos al hígado, inducido por el tóxico, y bloquea la acumulación de grasa neutra.

El nucleósido evita parcialmente la formación de hígado graso inducido por el etanol (69), manteniendo una adecuada relación NAD/NADH citoplásmica, disminuida por el etanol, e incrementando la desaparición del alcohol en la sangre.

Además la adenosina es capaz de modificar el metabolismo mitocondrial. El nucleósido estimula la reoxidación de equivalentes reductores citoplásmicos por medio de la actividad de la lanzadera del malato-aspartato, en animales tratados con alcohol, manteniendo así un estado más oxidado en citoplasma e incrementando la oxidación de etanol por hepatocitos (70).

ANTECEDENTES DIRECTOS. IMPLICACIONES EN LA INTOXICACION CRONICA CON CCl₄.

La administración de adenosina retarda la aparición de hígado graso y necrosis celular inducidas por la administración aguda de CCl₄. Esta acción del nucleósido ocurre sin afectar la inhibición en la síntesis de proteínas y la liberación de triglicéridos hepáticos que induce el tóxico. El nucleósido produjo un efecto antilipolítico y también redujo la incorporación de palmitato radioactivo a triglicéridos hepáticos; otro de los principales efectos de la adenosina en este modelo experimental fue la disminución en los niveles de cuerpos cetónicos. Finalmente, se encontró un efecto de anti-lipoperoxidación que se acompañó de un retardo en la liberación de enzimas de escape (71).

Este retardo en la acción del CCl₄ promovido por la adenosina, sugiere que el hígado en presencia de adenosina, produce una respuesta celular diferente a la acción de la hepatotoxina, lo cual puede promover una recuperación mas exitosa de la célula al cesar la acción del tóxico.

Estos antecedentes fueron los que llevaron a explorar la

posible acción protectora de la adenosina sobre el daño hepático crónico producido por el tratamiento continuo con CCl_4 .

COMENTARIO GENERAL AL MANUSCRITO.

La administración de adenosina a ratas intoxicadas crónicamente con CCl_4 , evita la hepatomegalia y esplenomegalia inducidas por el tóxico, efecto probablemente relacionado a un bloqueo parcial o mejoramiento de la hipertensión portal, que se puede presentar en estos animales (Tabla 1).

Este efecto de la adenosina sobre el incremento en el tamaño del hígado se acompañó de una importante corrección en las pruebas de funcionamiento hepático (Tabla 2), reducción de la cantidad de colágena por gramo de hígado (Figura 1) y bloqueo parcial de las alteraciones que induce el CCl_4 en las características de la colágena acumulada.

El nucleósido mantuvo niveles altos de actividad colagenolítica (Tabla 3) mecanismo que puede ser uno de los principales para reducir la fibrogenesis inducida por el tóxico, y tal vez lo más importante, la adenosina mantuvo la disponibilidad de energía celular intacta en animales tratados con CCl_4 (Tabla 4).

A pesar de que se desconoce si existe una relación directa entre el metabolismo energético hepático y el desarrollo de fibrosis hepática, el hallazgo de que la administración conjunta de adenosina a animales tratados crónicamente con CCl_4 mantiene una adecuada disponibilidad de energía celular y reduce el grado de fibrosis tisular, nos llevó a explorar el metabolismo mitocondrial y el estado de óxido-reducción de la célula hepática en

nuestro modelo experimental y evaluar si los efectos que produce la adenosina, evitando parcialmente la fibrosis hepática y mejorando la función del tejido, pudieran extenderse a lograr una reversión del proceso fibrótico, cuando la adenosina es administrada después de que el cuadro fibrótico se ha desarrollado previamente por el tratamiento con CCl_4 . Estos estudios constituyen la segunda parte de la presente tesis.

DEPARTMENT OF MEDICINE
TELEPHONE (213) 226-7341



March 19, 1990

Dr. Victoria Chagoya de Sanchez
Departamento de Bioenergetica
Instituto de Fisiologia Celular
Universidad Nacional Autonoma
de Mexico, Apartado postal 70-600
Mexico 04510, D.F.
MEXICO

RE: MANUSCRIPT 89140 "PARTIAL PREVENTION WITH ADENOSINE OF THE LIVER
CIRRHOSIS INDUCED BY CARBON TETRACHLORIDE IN RATS"

Dear Dr. Chagoya de Sanchez:

Your manuscript has been accepted, and has been forwarded to the San Antonio office.

Sincerely,

Neil Kaplowitz (bb)

Neil Kaplowitz, M.D.
Associate Editor
Hepatology

NR/bb

Running title page.

Short title: Prevention of CCl₄-induced cirrhosis by adenosine.

Number of Pages: 24

Number of tables: 5

Number of figures: 0

Author to whom correspondence should be sent:

Victoria Chageva de Sanchez, PhD
Departamento de Bioenergetica
Instituto de Fisiologia Celular
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apdo. Postal 70-600
Mexico 04510, D.F. Mexico
Telephone: (525) 550-5215 ext. 4946

**ADENOSINE PARTIALLY PREVENTS LIVER CIRRHOSIS INDUCED BY CARBON
TETRACHLORIDE IN KATS.**

**Rolando Hernandez-Muñoz. Mauricio Diaz-Muñoz. Jorge Suárez and Victoria
Chagova de Sanchez.**

**Departamento de Bioenergética. Instituto de Fisiología Celular. Universidad
Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-600. México 04510 D.F. MEXICO.**

ABSTRACT

Adenosine administration was tested in the carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis. The nucleoside was capable of partially preventing the enlargement of liver and spleen size, induced by the toxin. This amelioration of the hepatomegaly was accompanied by a reduction by half of the liver collagen deposition and preservation of content of glycoaminoglycans. A stimulated hepatic collagenase activity seems to be the mechanism for reduction of collagen accumulation; these effects were associated with a striking improvement of the liver functions. Adenosine treatment did not modify the late hepatotoxic effect of the carbon tetrachloride; however, the stimulatory effect of the nucleoside on energy state, appeared to counteract the drastic decreases in adenine nucleotides, ATP, ATP/ADP ratio and energy charge elicited by the hepatotoxin. Moreover, a possible role of enhanced hepatic oxygenation due to the vasodilator properties of adenosine on its beneficial action cannot be ruled out. Regardless of the mechanism, adenosine seems to change the cellular response to the injury induced by the hepatotoxin.

In liver injury, cellular energy decreases due to a drop in cell ATP content (1-3); moreover liver damage induced by a variety of toxins (4-7), including alcohol (8,9), is associated with changes in cell energy state, which are believed to contribute to cellular death. Specifically, it has been suggested that a decrease in energy charge may be responsible for the decreased serum albumin level found in the cirrhotic rat (5). Indeed, chronic CCl4 administration produces hepatic mitochondrial dysfunction, which is unable to maintain an adequate energy availability (7,10,11).

On the other hand, adenosine has been tested as a hepatoprotector after acute intoxication with ethanol (12), or cycloheximide (13); the nucleoside also delays fat accumulation, hepatic necrosis, and the early lipoperoxidation elicited by CCl4 (14). Furthermore, we have shown that adenosine administration produced an enhancement in the hepatic energy charge in vivo (15). This finding was confirmed in vitro using perfused rat liver (16) and isolated hepatocytes (17).

This study was undertaken to investigate if a liver injury, such as that produced by prolonged CCl4 administration, could be affected by concomitant adenosine administration. Our experimental approach was to evaluate the effect of the nucleoside on alterations of the hepatic function, changes in structure, and on the metabolism of collagen and on energy metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Materials

L-(U-14C)-proline with a specific activity of 275 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ was obtained from Amersham Radiochemical Center (U.K.); CCl_4 was purchased from Merck Mexico, S.A. (Mexico), all other reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Animal Procedures

The experiments were performed in male Wistar rats (85 - 95 g of initial body weight) fed with Chow-diet and water ad libitum. They were divided in 4 groups, according to the substances injected intraperitoneally 3 times a week for 4 or 8 weeks: a) one group received doses of 0.025 ml of CCl_4 diluted 1:6 in peanut oil plus a second injection of saline; b) a second group received the peanut oil plus a second injection of adenosine (200 mg/kg of body weight) suspended in saline, pH 7.4; c) a third group received the same doses of CCl_4 and adenosine, and d) a fourth group (controls) received the only vehicles, namely, peanut oil and saline. Those treatments were discontinued at least two days before the tests. After an overnight fast, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 40 mg/kg of sodium pentobarbital, a liver lobe was freeze-clamped with liquid nitrogen, and the rat was decapitated to collect the blood from the neck. Then, the remainder of the liver, the spleen, and kidneys were removed, weighed and used for the analytic procedures described below.

At 4 and 8 weeks of treatment, collagen biosynthesis was assessed in vivo in 10 rats of each group, administering 15 μCi of L-(U-14C) proline intraperitoneally in 3 spaced doses of 5 μCi each, during the 24 hours preceding the sacrifice.

Analytical Procedures

Serum albumin was determined by the method of Gornall et al (18); total bilirubin, according to Cole and Lathe (19); serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT, EC 2.6.1.2), glutamic-oxalacetic transaminase (SGOT, EC 2.6.1.1), and glutamic dehydrogenase (SGDH, EC 1.4.1.3) activities were determined as previously reported (14); alkaline phosphatase (ALK. PH. EC 3.1.3.1) by the assay of Bessev et al. (20) and serum ornithine carbonyl transferase (SOCT, EC 2.1.3.3) according to Reichard's technique (21).

Slices of hepatic tissue were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin for histological assessment. Preparations were stained with hematoxylin-eosin and Mason's trichrome technique to obtain a better staining of the collagen fibers.

Liver samples were washed with absolute ethanol and TRIS-NaCl buffer, pH 7.4, to eliminate the soluble protein. Collagen was extracted with 0.25 M acetic acid after limited pepsin digestion and dialyzed against 0.02 M Na₂HPO₄ as described by Rojkins et al. (22). Using this procedure, around 85% of the total collagen was solubilized. Collagen was hydrolyzed in 6 N HCl at 110°C for 24 hours and both content and radioactivity of proline and hydroxyproline were measured by the method of Rojkins and Gonzalez (23).

Collagen content was calculated assuming that 100 residues of hydroxyproline are present in a collagen chain of 100,000 daltons (24). Free-proline contents and radioactivity were measured in toluene extracts of the 6% HClO₄ supernatants, as described by Rojkins (25).

Total glycosaminoglycans (GAG) were extracted as reported by Galambos and Shapira (26) and measured by either their content of hyaluronic acid by the method of Greiling (27) or determined by the presence of sialic acid, according to the "direct Ehrlich reaction" described by Whitehouse and

Zilliken (28).

Collagenase activity was assayed using liver homogenate as enzyme source and skin collagen as substrate in the presence of 10 mM CaCl₂, pH 7.4, and inhibitors of non-specific proteases as described by Maruyama et al. (29), with the only difference that the substrate was not radiolabelled. Collagen degradation products, were measured by their hydroxyproline content, after sedimentation of undigested collagen. Values of collagenase activity are expressed as μg of collagen degraded per hour per μg of protein. The incubation of the homogenate alone in the experimental assay conditions produced non detectable hydroxyproline. The trypsin and EDTA controls gave 0.22 and 0.47 nmoles of degraded collagen/ μmg protein respectively. Therefore collagenase activity was corrected subtracting the value obtained in the presence of 10 mM EDTA. Liver protein was measured by the biuret method (18).

In freeze-clamped samples, ATP was measured enzymatically using the technique of Lamprecht and Trautschold (30). ADP and AMP, according to the method of Adas (31), and the inorganic phosphate was quantified using the Ames assay (32). Hepatic DNA was measured by the diphenylamine reaction as reported by Burton (33).

Statistics

All results were expressed by their mean \pm the standard error of the mean (SE). The significance of the differences and their interactions were tested by two-way analysis of variance (ANOVA) and, in the case of significance, a Newman Keul's test was also applied (34). Selected results were also analyzed by 3-way ANOVA, adding the duration of treatment as a third factor.

RESULTS

After 4 and 8 weeks of administration of either CCl₄ or adenosine, rats had reached a similar body weight as controls. However, the weight of the liver increased in the CCl₄-treated rats, becoming 31% heavier than those of controls at 4 weeks and 46% at 8 weeks of treatment (Table 1). The changes in the weight of the spleen were even more striking, becoming 56% heavier than those of control rats after 4 weeks and 103% after 8 weeks of CCl₄ administration (Table 1). Despite the histological lesion of the kidney (such as inflammation and distortion of the glomerula areas), the weight of this organ did not change significantly. By itself, adenosine produced no changes in organ weights. However, it decreased the CCl₄-induced enlargement of the liver, which became only 5% heavier than those of group B (given adenosine only) after 4 weeks of CCl₄ administration and 16% after 8 weeks. Similarly, adenosine diminished the enlargement of the spleen, which became only 15% and 12% heavier than those of controls after 4 and 8 weeks of CCl₄ administration, respectively (Table 1).

The liver of the groups of rats treated with CCl₄ for 4 weeks presented necrosis, inflammation, and development of fibrous septa evidenced in the histological evaluation. These lesions were associated with serum changes, usually reflecting liver injury (Table 2A). Except for the levels of serum albumin, which were not significantly affected after 4 weeks of CCl₄ administration, the level of bilirubin and the activity of the serum enzymes increased significantly. The concomitant administration of adenosine decreased the magnitude of these alterations to values similar or only slightly higher than in controls. At four weeks of treatment, there were no significant changes in the total DNA content of the liver (data not shown).

After 8 weeks, a micronodular cirrhosis had developed. Necrotic and

inflammatory lesions were less prominent. This was associated with an elevation of serum enzyme activities and bilirubin of a lesser magnitude than at 4 weeks, and the effects of the simultaneous administration of adenosine on these changes were more variable (Table 2B). At this time, serum albumin levels became significantly decreased by CCl₄ administration; these changes were greatly attenuated by the concomitant administration of adenosine. After 8 weeks of CCl₄ administration, liver DNA also decreased significantly (1.42 ± 0.03 mg/g vs 1.75 ± 0.06 , in controls; $p < 0.05$), an effect also prevented by adenosine (1.89 ± 0.11 mg/g).

The possibility that adenosine is reducing acutely the chronic insult, through blocking the metabolism of CCl₄, was tested. In the animals (100 g body weight) that received a single dose of CCl₄ - saline or CCl₄ - adenosine, serum transaminase activities were quantified 12 hours after treatment. After this time, both groups showed a 6-fold increase in the activities of SGOT and SGPT over the control group receiving peanut oil; no difference was observed in the animals receiving CCl₄ alone or those receiving CCl₄ - adenosine.

Moreover, in an other set of experiments with liver homogenates, *CO₂ production from ¹⁴C-CCl₄ was not affected in vitro by increasing adenosine concentrations to correspond to those found after in vivo injection (unpublished data).

Development of fibrosis, following chronic administration of CCl₄, was associated with progressive accumulation of collagen. Its concentration doubled at 4 weeks and tripled at 8 weeks of treatment (Fig. 1), and the nucleoside administration again prevented by about half the CCl₄-induced accumulation of hepatic collagen. Furthermore, the increase of GAG content, evaluated by the content of hyaluronic acid and induced by CCl₄ administration (72 ± 9 vs 33 ± 3 μ g/g liver in controls; $p < 0.001$), was also partially

prevented by adenosine (45 ± 5 p < 0.01); similar results were obtained regarding the content of sialic acid in these livers.

After 4 weeks of CCl₄ treatment, incorporation of radioactive proline into collagen-bound hydroxyproline was 4 times higher than in controls, despite the increase in free proline, which decreased the specific activity of the precursor amino acid (Table 3A). This apparent increase in collagen synthesis was even more marked after 8 weeks (Table 3B); at this time, free proline specific activity was not affected. Simultaneous treatment with adenosine tended to prevent the effect of CCl₄ in proline incorporation into collagen-bound hydroxyproline, without reaching statistically significant effect.

In addition, administration of the nucleoside to the CCl₄-treated animals resulted in enhanced collagenase activity, contrasting with a tendency for a diminution in CCl₄-treated rats not given adenosine. Adenosine administration alone had no effect on collagenase activity.

CCl₄ administration produced drastic changes on hepatic adenine nucleotides content and energy parameters. After 4 weeks of treatment, the hepatotoxin induced a drop in the ATP content without affecting significantly ADP, AMP, or inorganic phosphate (Table 4A), as a consequence, ATP/ADP ratio was lowered and the energy charge was moderately diminished. After 8 weeks of CCl₄ administration, the total amount of liver adenine nucleotides was also decreased (Table 4B). Adenosine alone was able to modify the hepatic energy parameters: the ATP content, ATP/ADP ratio, and the phosphorylation potential changed significantly, suggesting that the nucleoside enhances the availability of energy; the simultaneous administration of adenosine and CCl₄ counteracted all of the alterations on adenine nucleotides elicited by the hepatotoxin (Table 4).

DISCUSSION

An important point to consider is the fact that the hepatotoxic action of CCl₄ is not diminished by the presence of adenosine. After twelve hours of treatment, the necrogenic effect of the toxin, evaluated by serum transaminases, was very similar in CCl₄- and CCl₄-adenosine treated animals. The dilatatory effect of adenosine after acute CCl₄ administration, previously reported (14) lasted four hours, time required for adenosine to be metabolized, after this time the magnitude of the toxic response to CCl₄ was of the same magnitude in the presence or absence of the nucleoside (14). Furthermore, adenosine is not able to modify the ¹⁴C-CCl₄ metabolism to CO₂ in vitro (unpublished results). However, the role of the effect of the nucleoside, delaying the early lipoperoxidation induced by the toxin, is difficult to assess from its actions here described.

The first evidence of the beneficial effect of the nucleoside became apparent by the decrease of the liver and spleen (35,36) enlargements (Table 1) caused by CCl₄; although we did not measure portal hypertension. Probably the nucleoside is able to prevent or delay the development of portal hypertension, most likely due to the effect of adenosine on the development of the CCl₄-induced hepatic fibrosis. The body weight either at four or eight weeks of treatment did not change significantly among the different groups, contrasting with the results of other authors (10), perhaps because of the low CCl₄ dose used.

The effect of adenosine was also associated to a striking improvement of the liver function that had been deteriorated by the toxin (Table 2): a prominent effect of CCl₄ was the liver cell necrosis, reflected by enhanced plasma activities of liver cytosol and mitochondrial enzyme markers as well as hyperbilirubinemia (Table 2). The blocking action of adenosine upon this

effect was clearly shown at four weeks but not at eight, suggesting a delay of the necrogenic effect of the toxin in the presence of the nucleoside. Moreover, the hepatic function of albumin synthesis, evaluated by the serum level of albumin, is decreased at eight weeks of CCl₄ treatment but was maintained within normal range in the presence of the nucleoside (Table 2) in agreement with this statement is the fact that adenosine administration partially prevented the early and late fibrosis as evaluated by the collagen content (Fig. 1), moreover it favoured the maintenance of the characteristics of normal collagen preventing the increase in GAG induced by the toxin (26).

To investigate the mechanism by which adenosine decreases by half the hepatic collagen accumulation produced by chronic CCl₄ administration, we studied collagen metabolism. According to previous findings, in which an increase in the size of the liver pool of proline has been associated with a high rate of fibrogenesis (37), in our experimental animals, either at 4 or 8 weeks of CCl₄ treatment, there was an increase in the liver pool of proline accompanied with an enhanced collagen synthesis (Table 3), as evidenced by the elevated radiolabelled proline and hydroxyproline found in the collagen from their livers. Adenosine attenuated all these changes, but it did not have significant effects, suggesting that the nucleoside did not modify the stimulated rate of collagen synthesis induced by the toxin (Table 3). Thus, the role of collagenase activity became relevant in the action of adenosine on hepatic fibrosis: the stimulatory effect of the nucleoside on the diminished collagenase activity of the CCl₄-treated rats possibly produces a prominent reduction of collagen accumulation, even in the presence of stimulated fibrous biosynthesis. However, this does not appear to be a direct stimulatory effect of the nucleoside on this enzyme, since adenosine did not

affect collagenase activity by itself. A more likely explanation is that the animals treated concomitantly with CCl₄ and adenosine were at earlier stages of fibrosis development, than those produced after 4 weeks of CCl₄ treatment, in which an increase in collagenase activity was apparent rather than the diminution observed at more advanced stages (29,38,39). The decreased fibrosis may be secondary to a general improvement in the function of the hepatocytes, as manifested by the less altered tests of liver function (Table 2).

The role of the energy state of the liver cell in liver fibrosis has not been elucidated; there is a report suggesting that a decrease in serum-albumin level in CCl₄-made cirrhotic rats could be due to a decrease in energy charge (5). Recently, it has been shown that the rate of ATP production is significantly decreased in mitochondria from tetrachloride-induced cirrhotic rats (11). In our experiments, we found marked alterations of liver adenine nucleotides in early and late fibrosis, induced by CCl₄ chronic treatment (Table 4), that were counteracted by the administration of adenosine. Nevertheless, the mechanism through which the nucleoside is capable to increase the hepatic energy state is not fully elucidated. This action of adenosine could be relevant in the prevention or delay of chronically CCl₄-induced liver damage. Indeed, hypoxia has been involved in the acute hepatotoxicity of CCl₄ (40) and hyperbaric oxygen can protect rat livers against acute CCl₄ toxicity (41). Adenosine, a potent vasodilator, which is considered to be one of the main regulators of hepatic arterial flow (42), could increase hepatic oxygenation during each administration and during the time it takes to be metabolized. It could have an important effect, particularly in centrilobular regions of the liver, which are normally poorly oxygenated and are the main regions affected by CCl₄-induced damage (43), thus contributing to improve liver cells response to injury.

Regardless of the mechanism involved in the effects of adenosine on liver cirrhosis, induced by CCl₄ in rats, the maintenance of the energy parameters of the liver cell during a chronic insult could be relevant to preserve liver function and to delay the fibrogenic effect of the toxin. Whether larger doses of the nucleoside or a different schedule of administration may result in a more complete prevention or reversion of induced liver cirrhosis remains to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS.

Supported by Grants from CONACYT # PCSABNA 022497 and Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo J. Zevada". The expert technical assistance of Ms. S. Vidrio is gratefully acknowledged. The authors want to express their gratitude to Dr. Enrique Barona and Ms. Ingrid Mascher for their thorough revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Gaja G, Ferrero E, Piccoletti R, Bernelli-Zazzera A. Phosphorylation and redox states in ischemic liver. *Exp Mol Path* 1973; 19: 248-256.
2. Hirasawa H, Chaudry IH, Baue AE. Improved hepatic function and survival with adenosine triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery* 1978; 83: 655-662.
3. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980; 30: 294-296.
4. Farber E, Shull KH, Villa-Treviño S, Lombardi E, Thomas M. Biochemical pathology of acute hepatic ATP deficiency. *Nature* 1964; 203: 34-40.
5. Jikko A, Taki Y, Nakamura N, et al. Adenylate energy charge and cytochrome a (-a3) in the cirrhotic rat liver. *J Surg Res* 1984; 37:361-368.
6. Tanaka A, Morimoto I, Taki Y et al. The influence of hemodilution in normal and cirrhotic rats in relation to hepatic energy metabolism. *Am J Med Sci* 1987; 20:319-316.
7. Wakashiro S, Shimahara Y, Ikai I et al. Influence of hypoxia on mitochondrial function and energy status in CCl4-induced cirrhotic rat liver. *Res Exp Med* 1989; 189:153-151.
8. Gordon ER. Mitochondrial functions in an ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 1973; 248:8271-8280.
9. Miyamoto K, French SW. Hepatic adenine nucleotides metabolism measured in vivo in rats fed ethanol and a high fat-low protein diet. *Hepatology* 1988;

8:53-60.

10. Ma X-L, Baraona E, Hernández-Muñoz R, Lieber CS. High levels of acetaldehyde in non-alcoholic injury after threonine or alcohol administration. *Hepatology* 1989; in press.
11. Krahenbuhl S, Stucki J and Reichen J. Mitochondrial function in tetrachloride-induced cirrhosis in the rat. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1583-1589.
12. Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sáinz JA, Piña E, Chagoya de Sánchez V. On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch Biochem Biophys* 1978; 190:155-162.
13. García-Sáinz JA, Hernández-Muñoz R, Santamaría A, Chagoya de Sánchez V. Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. *Biochem Pharmacol* 1979; 28:1409-1413.
14. Hernández-Muñoz R, Glender W, Diaz-Muñoz M, García-Sáinz JA, Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:2599-2604.
15. Chagoya de Sánchez V, Brunner A, Piña E. *In vivo* modification of the energy charge in the liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46:1441-1445.
16. Wilkening J, Nowack J, Decker K. The dependence of glucose formation from lactate on the adenosine triphosphate content in the isolated perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1975; 392:299-309.
17. Lund P, Cornell NW, Krebs HA. Effects of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem J* 1975; 152:593-599.

18. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177:751-766.
19. Cole PG, Lathe GH. The separation of serum pigments giving the direct and indirect Van der Bergh reaction. *J Clin Path* 1953; 6:99-107.
20. Bessey GA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164:321-329.
21. Reichard H. Determination of ornithine carbamyl transferase in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1957; 9:311-316.
22. Rojkind M, Giambone MA, Biessica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979; 76:710-719
23. Rojkind M, Gonzalez E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-³H and hydroxyproline ³C in collagen and non-collagenous proteins. *Anal Biochem* 1974; 57:1-7.
24. Gallop PM, Paz MA. Posttranslational protein modifications with special attention to collagen and elastin. *Physiol Rev* 1978; 58:418-497
25. Rojkind M. Inhibition of liver fatresis by L-azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 1973; 52:2451-2456.
26. Galambos JT, Shapira P. Natural history of alcoholic hepatitis. IV glycoasminoglycuronans and collagen in the hepatic connective tissue. *J Clin Invest* 1973; 52:2952-2962
27. Greiling H. Hyaluronic acid. Colorimetric method. in Bergmeyer H.U. ed.

Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York and London 1965: 90-92.

28. Whitehouse MW, Zilliken F. Isolation and determination of neuraminic (sialic) acid. Meth Biochim Anal 1960; 8:199-220.

29. Maruyama K, Feinman L, Fainsilber Z, Nakano M, Okasaki I, Lieber CS. Mammalian collagenase increases in early alcoholic liver disease with cirrhosis. Life Sci 1982; 30: 1379-1384.

30. Leaprecht W, Trentschoeld I. Adenosine triphosphate. Determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York and London, 1965: 246-252.

31. Adam H. Adenosine 5'-diphosphate and adenosine 5'-monophosphate. In Bergmeyer HU ed. Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York and London, 1965: 573-577.

32. Ames L. Analysis of phosphate in a lipid sample from animal tissue. J. Biol. Chem. 1960; 235: 769-775.

33. Burton, K. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxy-ribonucleic acid. Biochem. J. 1965; 62: 315-322.

34. Snedecor G W, Cochran W G. Statistical Methods. 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1980.

35. Risteli, J, Kivirikko K I. Activities of prolyl hydroxylase, lysyl hydroxylase, collagen galactosyltransferase and collagen glucosyl transferase in the liver of rats with hepatic injury. Biochem. J. 1974; 144: 115-122.

36. Akshori A, Masui M, Kagawa K, Enomoto M, Saito H. Time course of biochemical and histological alterations following a single feeding of carbon tetrachloride in mice. *Japan J Exp. Med.* 1983; 53: 199-209
37. Kershenobich D, Fierro FJ, Folkind M. The relationship between the free pool of proline and collagen content in human liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1970; 49: 2246-2249.
38. Okasaki I, Maruyama K. Collagenase activity in experimental hepatic cirrhosis. *Nature* 1974; 252: 49-50.
39. Montfort I, Pérez-Tamayo B. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of rat liver. *Am J Pathol* 1978; 92: 411-418.
40. Shen ES, Barry WF, Anders MW. Effect of hypoxia on carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3787-3793.
41. Burk LF, Lane JM, Patel K, Retier R. Rationale for using hyperbaric O2 to treat CCl4 ingestion. *Hepatology* 1984; 4: 1083 (abstract).
42. Lantz WW, Legare DJ, D'Almeida MS. Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* 1985; 248:H331-H338.
43. Clauson GA. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol Immunopathol Res* 1989; 8: 194-112.

TABLE 1. Effects of CCl₄ and adenosine on body and organ weights.

	SALINE	ADENOSINE	CCl ₄	CCl ₄ + ADENOSINE
A. FOUR WEEKS TREATMENT (n=18 per group)				
Body weight (g)	222 ± 11	217 ± 11	210 ± 8	222 ± 11
Liver/Body weight x 100	3.32±0.11	3.52±0.11	4.44±0.18*	3.75±0.16
Spleen/Body weight x 100	0.23±0.01	0.25±0.01	0.36±0.02*	0.30±0.02
Kidney/Body weight x 100	0.35±0.02	0.34±0.03	0.36±0.04	0.35±0.03
B. EIGHT WEEKS TREATMENT (n=18 per group)				
Body weight (g)	264 ± 13	288 ± 15	264 ± 13	248 ± 16
Liver/Body weight x 100	3.29±0.14	3.45±0.16	4.98±0.23*	4.03±0.15*..**
Spleen/Body weight x 100	0.26±0.02	0.26±0.02	0.54±0.05*	0.28±0.02**
Kidney/Body weight x 100	0.36±0.03	0.33±0.02	0.37±0.03	0.34±0.03

The statistical significance of the differences was tested by two-way analysis of variance (ANOVA); * p < 0.01 vs controls, ** p < 0.01 vs CCl₄ + saline.

TABLE 2. Effects of CCl₄ and adenosine on serum parameters of cellular injury.

	SALINE	ADENOSINE	CCl ₄	CCl ₄ + ADENOSINE
A. FOUR WEEKS TREATMENT (n=10 per group)				
Albumin (g/dl)	3.0 ± 0.3	2.8 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.4
Bilirubin(mg/dl)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.9 ± 0.5*	0.8 ± 0.1**
SGPT (U/L)	46 ± 5	44 ± 3	522 ± 83*	107 ± 14**
SGOT (U/L)	195 ± 10	196 ± 10	626 ± 97*	298 ± 38**
SOCT (U/L)	166 ± 14	200 ± 16	547 ± 76*	250 ± 28**
SGDH (U/L)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1*	0.5 ± 0.1
Alk.Ph. (U/L)	41 ± 2	42 ± 3	77 ± 10*	53 ± 6
B. EIGHT WEEKS TREATMENT (n=10 per group)				
Albumin (g/dl)	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2*	2.2 ± 0.2**
Bilirubin(mg/dl)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2*	1.0 ± 0.2*
SGPT (U/L)	50 ± 4	52 ± 4	243 ± 37*	200 ± 28*
SGOT (U/L)	197 ± 10	194 ± 10	335 ± 48*	336 ± 47*
SOCT (U/L)	175 ± 15	190 ± 17	429 ± 55*	318 ± 45*
SGDH (U/L)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.1
Alk.Ph. (U/L)	46 ± 2	44 ± 2	51 ± 6	50 ± 7

Two-way ANOVA: *p < 0.01 vs controls. ** p < 0.01 vs CCl₄ + saline.
The effect of of treatment duration was also significant for albumin.
by three-way ANOVA.

TABLE 3. Effects of CCl₄ and adenosine on hepatic collagen synthesis and collagenase activity.

	SALINE	ADENOSINE	CCl ₄	CCl ₄ ADENOSINE
A. FOUR WEEKS TREATMENT (n=10 per group)				
Free PRO ($\mu\text{mol}/\text{g}$ liver)	0.34 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.52 \pm 0.05*	0.43 \pm 0.03**
(dpm $\times 10^3$ / μmol PRO)	8.2 \pm 0.57	7.78 \pm 0.50	6.08 \pm 0.47*	6.87 \pm 0.50
Collagen-bound Pro ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	0.50 \pm 0.06	0.57 \pm 0.05	2.00 \pm 0.27*	1.28 \pm 0.13*
Collagen bound Hyp ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	0.11 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.58 \pm 0.08*	0.35 \pm 0.04*
Collagenase activity	1.36 \pm 0.14	1.61 \pm 0.16	0.99 \pm 0.08	2.09 \pm 0.17**
B. EIGHT WEEKS TREATMENT (n=10 per group)				
Free PRO ($\mu\text{mol}/\text{g}$ liver)	0.34 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.50 \pm 0.04*	0.36 \pm 0.02**
(dpm $\times 10^3$ / μmol PRO)	7.60 \pm 0.52	7.68 \pm 0.58	7.60 \pm 0.58	6.99 \pm 0.50
Collagen bound Pro ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	0.61 \pm 0.09	0.62 \pm 0.10	3.20 \pm 0.43*	2.45 \pm 0.23*
Collagen bound Hyp ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.69 \pm 0.09*	0.51 \pm 0.04*
Collagenase activity	1.51 \pm 0.17	1.44 \pm 0.17	0.84 \pm 0.07	1.84 \pm 0.23**

Proline and hydroxyproline collagen bound were calculated according to the specific activity of the precursor amino acid in each case. Collagenase activity is expressed as μg of degraded collagen/h/mg of liver protein. Two-Way ANOVA: *p < 0.01 vs controls ** p < 0.01 vs CCl₄ + saline group.

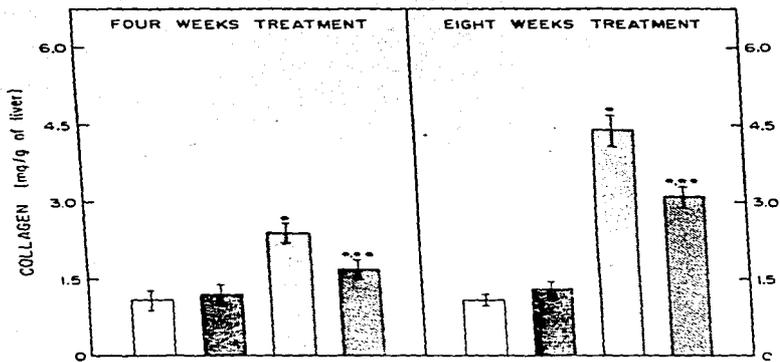
TABLE 4. Effects of CCl₄ and adenosine on hepatic energy parameters.

	SALINE	ADENOSINE	CCl ₄	CCl ₄ + ADENOSINE
A. FOUR WEEKS TREATMENT (n=10)				
ATP(μmol/g w.t.)	3.04±0.08	3.56±0.24	2.46±0.28*	2.95±0.30**
ADP	0.89±0.02	0.83±0.08	0.84±0.06	0.92±0.06
AMP	0.19±0.01	0.22±0.03	0.24±0.02	0.24±0.02
Pi	3.64±0.12	3.50±0.21	3.16±0.33	3.59±0.33
Nucleotides	4.12±0.09	4.63±0.32	3.54±0.35	4.11±0.37
ATP/ADP	3.44±0.09	4.50±0.41*	2.88±0.13*	3.17±0.10**
Energy Charge	0.85±0.01	0.86±0.01	0.81±0.01*	0.83±0.01**
Phosphorylation potential	1588±66	2211±238	1624±125	1694±126
B. EIGHT WEEKS TREATMENT (n=10)				
ATP(μmol/g w.t.)	2.93±0.05	3.43±0.27	2.32±0.18*	2.86±0.13**
ADP	0.86±0.02	0.84±0.08	0.89±0.06	0.78±0.07
AMP	0.20±0.01	0.23±0.01	0.21±0.02	0.24±0.02
Pi	3.56±0.07	3.32±0.18	3.02±0.27	3.70±0.16
Nucleotides	3.99±0.07	4.49±0.33	3.42±0.24*	3.86±0.20**
ATP/ADP	3.40±0.08	4.30±0.42*	2.61±0.13*	3.92±0.21**
Energy Charge	0.84±0.01	0.86±0.01*	0.81±0.01*	0.84±0.01**
Phosphorylation potential	1606±62	2183±203*	1529±121	1786±117
Two-way ANOVA: * p < 0.01 vs controls, ** p < 0.01 vs CCl ₄ + saline.				
Energy Charge = ATP / 2 ADP / ATP + ADP + AMP; Phosphorylation potential = ATP / ADP x Pi.				

Figure Legend

Figure 1. Effects of CCl₄ and Adenosine on Hepatic Fibrogenesis.

The levels of liver collagen for the saline [] , adenosine [] , CCl₄ [] and CCl₄ + adenosine groups [] , are expressed as mean \pm S.E.M. for 10 animals per group. Two-way ANOVA = *p < 0.01 vs. controls, ** p < 0.01 vs CCl₄ + saline.



MÉTODOS.

Tratamiento de animales. Para los experimentos con mitocondrias aisladas, se integraron cuatro grupos experimentales semejantes a los descritos en el manuscrito. Estos animales recibieron el CCl_4 y la adenosina, simultáneamente a las dosis ya señaladas, por un período de 8 semanas.

Los experimentos de reversión consistieron en que, después de finalizar el tratamiento con CCl_4 por 8 semanas, la mitad de los animales fueron tratados con solución salina y la otra mitad con adenosina a las dosis previamente señaladas, en la forma de una inyección cada tercer día por un período de 20 días (10 dosis) o por 40 días (20 dosis). Dos días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados.

Preparación de mitocondrias. Las mitocondrias fueron preparadas esencialmente de acuerdo a lo reportado por Schneider y Hogeboom (72) y la proteína mitocondrial se midió por medio de la reacción del biuret (73). Las mitocondrias fueron resuspendidas en un medio conteniendo sacarosa 0.25 M, TRIS-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7.4.

Las determinaciones del consumo de oxígeno se llevaron a cabo de acuerdo a Estabrook (74), usando malato 1 mM y glutamato 10 mM como sustratos de sitio I, así como succinato 10 mM como sustrato de sitio II. El estado III mitocondrial (+ ADP) se inició con la adición de ADP a una concentración final de 266 μM .

Reconstitución de la lanzadera del malato-aspartato. La actividad de esta lanzadera se midió esencialmente de acuerdo al

método de Cederbaum et al. (75) con las modificaciones implementadas por Tobin et al. (76). Las mitocondrias se incubaron en un medio basal en la presencia de NADH 5 mM y ADP 5 mM y la actividad endógena de este ciclo fue monitoreada por la aparición de NAD en el medio después de incubar la preparación por 20 min a 37°C antes de la adición de HClO₄ (concentración final, 6%).

Conociendo la actividad endógena de la lanzadera, los experimentos de reconstitución se llevaron a cabo manteniendo la formación mitocondrial de 2-oxoglutarato como el paso limitante de la vía. Las adiciones fueron aspartato 2 mM, glutamato 5 mM, malato 1 mM, 25 unidades de malato-deshidrogenasa y 2 unidades de transaminasa glutámico-oxalacética. Las mezclas fueron incubadas por 20 min. a 37°C, desproteinizadas por la adición de HClO₄ (6%) y el NAD determinado por la reacción de la deshidrogenasa alcohólica (77).

Potencial eléctrico ($\Delta\psi$) y ΔpH en mitocondrias aisladas. El potencial eléctrico de las membranas mitocondriales se determinó por medio del uso de la safranina de acuerdo con la técnica de Akerman (78).

El pH a través de la membrana interna mitocondrial se calculó por la siguiente ecuación donde $\Delta\text{pH} = \log [\text{glutamato}]_m / [\text{glutamato}]_c$ de acuerdo a lo publicado por Kauppinen et al. (79), donde m y c se refieren a los espacios mitocondriales y citosólicos respectivamente. El glutamato fue determinado enzimáticamente (80). Una vez conocidos el $\Delta\psi$ y el ΔpH de nuestras preparaciones, el $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\psi - 2.3 R T/F \times \Delta\text{pH}$$

REDOX citoplásmico y mitocondrial. Manteniendo a los animales bajo anestesia general, se obtuvo un fragmento de hígado que se congeló y homogenizó rápidamente en 6% HClO₄. Las muestras se centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 10 min. y los sobrenadantes se neutralizaron con 4 M K₂CO₃. El lactato se midió en estos sobrenadantes de acuerdo al método de Hohorst (81) y el piruvato por la técnica de Bucher et al (82), como marcadores de REDOX citoplásmico. Como marcadores del REDOX mitocondrial, la pareja de β -hidroxibutirato y acetoacetato fue determinada enzimáticamente por los métodos de Mellamby y Williamson (83) y Williamson y Mellamby (84), respectivamente.

La relación citoplásmica NAD/NADH, se calculó a partir de la siguiente ecuación: $NAD/NADH = 1/K_{eq} LDH \times [piruvato]/[lactato]$, asumiendo el valor de $1.1 \times 10^{-4}M$ para la K_{eq} de la lactato-deshidrogenasa (LDH) (85). La relación mitocondrial NAD/NADH fue calculada a partir de $NAD/NADH = 1/K_{eq} \beta\text{-HBDH} \times [acetoacetato]/[\beta\text{-hidroxibutirato}]$, asumiendo que la K_{eq} para la β -hidroxibutirato-deshidrogenasa (β -HBDH) es de 4.93×10^{-2} (85).

Colágena y colagenasa. Los niveles de colágena hepáticos y la actividad colagenolítica en los animales en fase de reversión, se determinaron de acuerdo a lo que se describe en el manuscrito anexo.

Síntesis de colágena in vitro. Un gramo de rebanadas de hígado fue suspendido en 2 ml de medio Krebs-Ringer, conteniendo glucosa 5 mM, y mantenido en oxigenación y agitación constantes. Después de un breve período de equilibrio con la temperatura (37°C), se añadieron 2 μ Ci de ¹⁴C-U-L-prolina y la incubación se continuó

por espacio de dos horas. Al final de la incubación, se introdujo a través del tapón de hule 0.2 ml de hidróxido de hiamina para cuantificar la cantidad de prolina oxidada hasta CO_2 . El matraz se incubó en hielo por 30 min y el medio se descartó por filtración y lavados sucesivos de las rebanadas de hígado para eliminar la marca adherida al tejido. Posteriormente las rebanadas fueron homogenizadas en un buffer de TRIS 0.1 M, pH 7.4 y se obtuvo tejido no colagénico y colágena para la cuantificación de radioactividad como se describió en el manuscrito anexo.

RESULTADOS.

Cuando se usaron sustratos del sitio I, tales como glutamato y malato (FIGURA 1), la administración crónica de CCl_4 produjo alteraciones en todos los parámetros mitocondriales. El CCl_4 afectó la respuesta de las mitocondrias al ADP y disminuyó el grado de acoplamiento de estos organelos. Incluso la capacidad de fosforilación de estas mitocondrias se vió disminuida por el CCl_4 , como se refleja en un valor más bajo para la relación ADP/O. La administración conjunta de adenosina confirió una protección completa contra las alteraciones inducidas por el tóxico (FIGURA 1).

Cuando la respiración mitocondrial se ensayó con succinato, un sustrato de sitio II, fue claro que el CCl_4 afectó también la respuesta al ADP, induciendo un cociente respiratorio menor en estas mitocondrias (FIGURA 2); sin embargo, la ADP/O no fue significativamente afectada en este caso. La administración de adenosina nuevamente corrigió las alteraciones producidas por el hepatotóxico (FIGURA 2).

Las mitocondrias de animales tratados con CCl_4 fueron también incapaces de movilizar y oxidar adecuadamente a los equivalentes reductores extra-mitocondriales (NADH). En la FIGURA 3 se muestra la actividad, tanto endógena como reconstituida, de la lanzadera del malato-aspartato, principal vía hepática de reoxidación de equivalentes reductores citoplásmicos. La actividad endógena de esta lanzadera fue significativamente disminuida por el tratamiento con el tóxico; la adición de los componentes citosólicos de esta vía incremento su actividad en 5-6 veces

(actividad reconstituida). A pesar de las adiciones, la actividad de la lanzadera en las mitocondrias de animales tratados con CCl_4 fue netamente inferior al control. El tratamiento conjunto con adenosina evitó parcialmente la disminución en la actividad endógena inducida por el CCl_4 , y en la forma reconstituida la protección fue total (FIGURA 3).

Esta disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial inducida por el CCl_4 , se acompañó de un decremento en el potencial eléctrico de la membrana cuando se midió por la técnica de la safranina, en presencia de succinato (TABLA I). El tratamiento con CCl_4 redujo en 20 mV a el potencial eléctrico mitocondrial; como respuesta a esta disminución, hubo un incremento en el gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial; sin embargo, no fue suficiente para mantener un potencial electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) semejante al control. La administración de adenosina tiende a mantener el potencial eléctrico de la membrana mitocondrial, corrigiendo parcialmente los cambios en el $\Delta\mu\text{H}^+$ que induce el tóxico (TABLA I).

Los datos obtenidos acerca de una deficiente capacidad oxidativa mitocondrial en los organelos aislados de animales tratados con CCl_4 , se reflejaron también en alteraciones in vivo del estado REDOX, tanto el citoplásmico como el mitocondrial.

La administración de CCl_4 promovió un incremento en el nivel de lactato hepático, acompañado de una disminución en la concentración de piruvato; ambas alteraciones causaron un moderado desplazamiento de la relación NAD/NADH citoplásmica hacia el estado reducido (TABLA II). La administración de adenosina

mantiene el estado REDOX citoplásmico a expensas de corregir las alteraciones sobre el lactato y piruvato inducidas por el tóxico (TABLA II).

Más evidentes fueron las alteraciones del estado REDOX mitocondrial en presencia de CCl_4 (TABLA III). El drástico aumento del β -hidroxibutirato y la disminución del acetoacetato indican una relación NAD/NADH mitocondrial muy disminuida por la acción del tóxico. Esta reducción en la mitocondria, que correlaciona con la pobre oxidación acoplada de sustratos, inducida por el CCl_4 , fue completamente bloqueada por la acción del nucleósido (TABLA III).

Esta tendencia del CCl_4 a alterar el estado redox celular se vio también reflejada en la pareja de glutatión oxidado y reducido. El tóxico promovió una disminución significativa en el glutatión reducido, alterando la relación GSH/GSSG (TABLA IV). La administración de adenosina per se tuvo el efecto de aumentar la cantidad total de glutatión, especialmente el oxidado, lo que disminuye la relación GSH/GSSG. Una observación interesante fue que la administración conjunta de CCl_4 más adenosina mantiene los niveles de glutatión reducido y deja la relación GSH/GSSG en un valor intermedio entre el grupo control y los animales tratados solamente con CCl_4 (TABLA IV).

Esta protección completa de la función mitocondrial por la adenosina durante la fibrogénesis inducida por el CCl_4 , así como el mantenimiento de una adecuada disponibilidad de energía celular (ver tabla 4 del manuscrito), nos llevó a preguntarnos si en el hígado fibrótico la corrección de estos parámetros energéticos, por medio de la administración de adenosina, permitirían

una reversión más exitosa del proceso fibrótico.

Para responder a esta pregunta, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que después de que la fibrosis hepática se había instalado por un tratamiento con CCl_4 durante 8 semanas, se estudió la evolución del tejido fibroso en animales controles y en aquellos que recibieron adenosina por un período de 20 o 40 días.

La FIGURA 4 muestra la cantidad de colágena por gramo de hígado en función de los días posteriores al tratamiento. A los dos días de finalizar el tratamiento con CCl_4 , las ratas mostraron un aumento de 4 veces en la concentración de colágena hepática; mientras que en los animales que sólo recibieron solución salina no hubo una reversión aparente de la fibrosis, excepto por una leve caída en la cantidad de colágena a los 40 días, en los animales tratados con adenosina fue evidente una recuperación o reversión del proceso tanto en función del tiempo como del número de dosis del nucleósido que se administraron (FIGURA 4).

En un intento por dilucidar el mecanismo involucrado en la reversión de la fibrosis inducida por la adenosina, se midió la síntesis de colágena in vitro y la actividad colagenolítica en estos animales.

A los 20 días después de interrumpir la administración de CCl_4 , los animales que solo recibieron solución salina mostraron una disminución en la oxidación de prolina a CO_2 , la cual se acompañó de un incremento en la incorporación de prolina preferencialmente a colágena ya que en las proteínas no colagénicas, la radioactividad fue semejante al control (TABLA V). A los 40

días de recuperación se restauró la capacidad de oxidar prolina y la síntesis de colágena apareció normal al compararla a la de los animales controles. Por otro lado, en los animales que recibieron adenosina se observó que mientras que la oxidación de prolina a CO_2 fue semejante al control, hubo una marcada tendencia a disminuir la incorporación del amino ácido tanto a proteínas colagénicas como a colágena (TABLA V). La actividad de la colagenasa reveló hechos también interesantes: mientras que al finalizar el tratamiento con CCl_4 la actividad de esta enzima fue muy baja (FIGURA 5), durante la recuperación se observó un incremento gradual en su actividad, siendo ésta máxima en los animales que recibieron adenosina durante la fase de reversión, de tal manera que a los 40 días de recuperación existió un incremento significativo de la actividad en los animales que recibieron adenosina cuando se comparan con aquellos que sólo recibieron solución salina por el mismo espacio de tiempo (FIGURA 5).

DISCUSION

La pregunta que surge es, cómo la administración del nucleósido puede reducir la fibrogénesis inducida por el CCl_4 al mismo tiempo que preserva la función hepática, dado que como se demuestra en el presente trabajo, la adenosina fue incapaz de bloquear el metabolismo del tóxico, y de hecho el retardo que la adenosina ejerce sobre los efectos primarios del CCl_4 sólo están confinados al tiempo que tarda en metabolizarse la dosis de adenosina empleada.

El papel del estado energético del hígado durante la generación de la fibrosis hepática no se ha dilucidado todavía; sin embargo, al menos existe un reporte donde se establece que una disminución en la carga energética en ratas cirróticas es la responsable de una deficiente síntesis de albúmina en estos animales (57). Dado que la cantidad de ATP en un momento determinado es el resultado de un balance entre su síntesis y la reacciones consumidoras de energía, resulta interesante que recientemente se han demostrado profundas alteraciones de la función mitocondrial por la acción del CCl_4 . Se han reportado alteraciones tales como disminución del consumo de oxígeno (preferencialmente con sustratos del sitio 1), disminución del control respiratorio que habla de un deficiente acoplamiento mitocondrial y decrementos en la producción de ATP (58), así como una alta susceptibilidad al daño en mitocondrias de animales cirróticos expuestas a breves períodos de hipoxia (59). Todos estos antecedentes hacen pensar que en animales tratados con CCl_4 , los mecanismos de síntesis de ATP se encuentran alterados

y pueden ser responsables en una gran proporción de la caída en la carga energética encontrada en el presente trabajo.

En nuestras condiciones, los animales tratados con CCl_4 tuvieron una deficiente oxidación de sustratos tanto del sitio I como del sitio II, cuando la respiración fue estimulada por la adición de ADP. Esto produjo una disminución en los cocientes respiratorios tanto para glutamato-malato como para succinato, de acuerdo con publicaciones previas (58), la ADP/O solo se afectó con sustratos de sitio I, corroborando que este sitio mitocondrial es el más lábil a la acción de los tóxicos, como también ha sido reportado en la intoxicación crónica con etanol (86,87), (FIGURAS 1,2).

Estas alteraciones fueron acompañadas de un transporte deficiente, a través de la membrana mitocondrial, de los equivalentes reductores generados en citoplasma (FIGURA 3). La actividad de la lanzadera del malato-aspartato tanto endógena como reconstituida fue disminuida por el CCl_4 , lo cual indica un efecto primario en estas mitocondrias, que puede estar localizado a nivel de la membrana mitocondrial, especialmente teniendo en mente que el CCl_4 durante su metabolismo es susceptible de generar radicales capaces de atacar membranas biológicas.

La protección casi completa que ofreció la adenosina sobre los parámetros mitocondriales correlaciona bien con su acción manteniendo una adecuada carga energética y niveles de ATP hepáticos que permitan a la célula ofrecer otra respuesta a la agresión que representa la intoxicación con CCl_4 . A este respecto, hemos sugerido en comunicaciones previas (70) que el nucleósido puede ofrecer una protección estabilizando a las membranas

celulares contra los ataques de otros tóxicos tales como el etanol.

Relacionado con esta afirmación fue el hallazgo de que las alteraciones que produce el CCl_4 en parámetros tales como el potencial eléctrico de membrana, así como el potencial electroquímico del protón, sean casi completamente revertidas por la acción del nucleósido (TABLA I).

En conclusión, a pesar de que la adenosina no bloquea el efecto tóxico del CCl_4 , su acción podría ser a nivel de mantener una adecuada función mitocondrial y permitir una recuperación más eficiente de la célula. En concordancia con esto, se encuentra el hecho de que las células de animales tratados con CCl_4 mantienen un estado REDOX más reducido, tanto citoplásmico como mitocondrial, lo cual debe cambiar el patrón metabólico de estas células al interferir con las vías de oxidación que requieren NAD como coenzima (TABLAS II, III), o bien pueden promover alteraciones del metabolismo de precursores de la colágena, como es el caso de la prolina y la actividad de la prolil-hidroxilasa (88,89). En cambio, el animal tratado conjuntamente con adenosina presentó un estado REDOX similar al control, lo que posibilita corregir las alteraciones que el CCl_4 pueda llevar a cabo desplazando el equilibrio de óxido-reducción. Se ha reportado que el glutatión reducido es capaz de mejorar ciertas alteraciones del CCl_4 , tales como el hígado graso (90), la inhibición de la síntesis de proteínas (91) o incluso la supervivencia de los animales a una dosis aguda de CCl_4 (92). De esta manera, los niveles de glutatión reducido representan una defensa celular al ataque de algunos tóxicos (94,95). En nuestros

animales, el tratamiento continuo con el CCl_4 disminuyó la concentración del tripéptido y alteró la relación GSH/GSSG, probablemente disminuyendo la capacidad de defensa de este sistema a la intoxicación. Los animales que recibieron adenosina, a pesar de que el metabolismo del CCl_4 no fue bloqueado, mostraron valores normales o ligeramente aumentados de estos metabolitos lo que podría contribuir a la protección de la célula contra el CCl_4 (TABLA IV).

La otra cuestión se refiere a que si la protección en la función mitocondrial, inducida por la adenosina, permite la reversión o la recuperación de la fibrogénesis generada por el CCl_4 . Durante 20 o 40 días después de suspender el tratamiento con CCl_4 , el grupo que recibió sólo solución salina tuvo una escasa reversión espontánea de la fibrosis (FIGURA 4). En cambio el grupo que recibió adenosina por el mismo período de tiempo, presentó una desaparición gradual de la colágena acumulada, siendo significativa la diferencia entre ambos grupos a los 20 y 40 días de recuperación.

En varias especies animales cuando se llevan a cabo tratamientos con CCl_4 por un período de tiempo de 1 a 3 meses, se ha encontrado que después de suspender la administración del tóxico, siempre existe cierto margen de reversibilidad de la fibrosis hepática en función del tiempo, siendo esta reversibilidad completa o parcial (95,96). Pero se ha establecido que esta reversibilidad ocurre en una etapa que se le denomina temprana, para diferenciarla de otra (avanzada), donde el proceso de fibrosis hepática parece ser irreversible o muy lentamente reversible (97). En nuestras condiciones, la administración de

adenosina logró una reversibilidad significativa del proceso fibrótico en un período de tiempo relativamente corto (FIGURA 4). El mecanismo por medio del cual la adenosina revierte o permite la recuperación de la fibrosis hepática esta sujeto a estudio: en el presente trabajo se exploraron tanto la síntesis como la degradación de colágena en animales sujetos a recuperación de la fibrosis hepática. En los animales tratados sólo con solución salina, y después de 20 días de recuperación, persiste un estímulo en la síntesis de colágena hepática, cuando se compara con los animales controles (que recibieron aceite vegetal por el mismo espacio de tiempo); esta incrementada síntesis de colágena, que persiste después de suspender el tratamiento con el tóxico se ha encontrado por otros autores (98); este hecho tal vez se desprenda de la alta disponibilidad del precursor (prolina), dado que estos hígados fueron deficientes para oxidarla, probablemente debido a un efecto en la prolil oxidasa la cual se ha mostrado ser sensible al tratamiento crónico con CCl_4 (99). A los 40 días estos defectos se han corregido y la cantidad de colágena en el hígado tendió a bajar, sin ser significativa su reducción (TABLA V, FIGURA 4). En los animales con adenosina, por alguna razón, existió una corrección mucho más temprana de estas anomalías metabólicas, lo que favoreció que desde los 20 días tuvieramos una reducción neta de tejido fibroso; A los 40 días existió una actividad colagenolítica incrementada en ambos grupos (FIGURA 5), pero dicha actividad pareció ser más efectiva en el grupo de adenosina donde tuvimos una reducción mayor de la colágena hepática. La pregunta a contestar es, ¿por qué la actividad de colagenasa es alta en los animales tratados con salina, y

la remoción del tejido colagenoso ocurre tan lentamente?. Aunque carecemos de datos experimentales para contestar a esta pregunta, una posibilidad a ser explorada es si el tratamiento de adenosina al corregir parcialmente las alteraciones en la colágena, que induce el tóxico (e.g. el incremento en glucosaminoglicanos), pudiera permitir una más adecuada unión entre el sustrato (colágena) y la enzima (colagenasa), favoreciendo así la degradación de molécula en un espacio de tiempo más corto. Sin embargo, esta posibilidad sigue siendo solo especulación.

En conclusión, la administración de adenosina en animales tratados crónicamente con CCl_4 , evita parcialmente la fibrosis hepática y permite una mayor recuperación del hígado cuando el proceso fibrogénico se ha instalado previamente. Estos efectos pueden ser el resultado de un mantenimiento de la función mitocondrial, y por ende la disponibilidad de energía que conserve las funciones metabólicas normales de los hepatocitos y les permita responder de una forma más exitosa a las alteraciones que induce el hepatotóxico.

El uso de la adenosina en las intoxicaciones crónicas con CCl_4 , que facilitan el desarrollo de cuadros degenerativos del hígado como la fibrosis hepática, se viene a sumar al número de armas farmacológicas que se pueden emplear para dilucidar los mecanismos de lesión crónica del hígado, así como su posible prevención y reversión. Esto le confiere al nucleósido la posibilidad de implicaciones clínicas como un recurso terapéutico en pacientes que sufren cirrosis.

REFERENCIAS.

- 1) Rojkind M. y Ponce-Noyola P (1982). Collagen Rel. Res. 2:152-175.
- 2) Martínez-Hernández A. (1985). Lab. Invest. 53: 166-186.
- 3) Rojkind M., Rojkind M.H., Cordero-Hernandez J. (1983). Collagen Rel. Res. 3: 335-347.
- 4) Clement B., Grimaud J.A., Campion J.P. et al. (1986). Hepatology 6: 225-234.
- 5) Arenson D.M., Bissell R. (1987). Gastroenterology 92:536-538.
- 6) Mc Donald J.A., Quade B.J., Broekelman T.J. et al. (1987). J. Biol. Chem. 262: 2957-2967.
- 7) Norling B., Glimelius B., Wasteson A. (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 1265-1272.
- 8) Chojkier M., Brenner D.A. (1988). Hepatology 8: 176-182.
- 9) Seyer J.M., Hutchenson E.T., Kang A.H. (1977). J. Clin. Invest. 59: 241-248.
- 10) Pérez-Tamayo R. (1979). Pathol. Ann. 14: 183-213.
- 11) Holderbaum D., Ehrhart L.A. (1985). J. Cell. Physiol. 126: 216-224.
- 12) Carlsson R., Engvall E., Freeman A. et al. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2403-2406.
- 13) Ruoslahti E., Engvall E., Hayman E.G. (1981). Collagen Rel. Res. 1: 95-128.
- 14) Krane S.M., Dayer J.-M., Simons L.S. et al. (1985). Collagen Rel. Res. 5: 99-117.
- 15) Harkness R.D., Mark A.M., Muir H.M., Neuberger A. (1954). Biochem. J. 56: 558-569.

- 16) Zern M.A., Leo M.A., Giambrone M.-A. et al. (1985). *Gastroenterology* 89: 1123-1131.
- 17) Panduro A., Shalaby F., Weiner F.R. et al. (1986). *Biochemistry* 25: 1414-1420.
- 18) Rossi P., Crombrughe B. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5590-5594.
- 19) Raghov R., Gossage D., Seyer J.M. et al. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 12718-12723.
- 20) Brenner D.A., Chojkier M. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 17690-17695.
- 21) Popper H., Lieber C.S. (1980). *Am. J. Pathol.* 98: 695-716.
- 22) Nakano M., Werner T.M., Lieber C.S. (1982). *Gastroenterology* 83: 777-785.
- 23) Roberts A.B., Sporn M.B., Assoian R.K. et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4167-4171.
- 24) Czaja M.J., Weiner F.R., Giambrone M.-A. (1987). *Hepatology* 7: 1028 (abstract).
- 25) Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L. et al. (1979). *N. England J. Med.* 301: 13-23.
- 26) Weiss J.B. (1976). *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 7: 101-125.
- 27) Gross J. (1970) in *Chemistry and molecular biology of the intracellular matrix*. New York, Academic Press, vol 3, p. 1623-1636.
- 28) McNulty R.J., Laurent G.J. (1987). *Collagen Rel. Res.* 7: 93-104.
- 29) Rojkind M., Giambrone M.-A., Takahashi S. (1982). *J. UOEH, Japan*, 4 Suppl 157-168.

- 30) Takahashi S., Dunn M.A. (1980). Gastroenterology 78: 1425-1431.
- 31) Maruyama K., Feinman L., Fainsilber Z. et al. (1982). Life Sci. 30: 1379-1384.
- 32) Monfort I., Pérez-Tamayo R. (1978). Am. J. Pathol. 92: 411-418.
- 33) Edwards D.R., Murphy G., Reynolds J.J. et al. (1987). EMBO J. 6: 1899-1904.
- 34) Senior R.M., Huang J.S., Griffin G.L. et al. (1985). J. Cell Biol. 100: 351-356.
- 35) Keppler D., Hagmann W., Rapps S. et al. (1985). Hepatology 5: 883-891.
- 36) Nathan C.F. (1987). J. Clin. Invest. 79: 319-326.
- 37) Recknagel R., Litteria M. (1960). Am. J. Path. 36: 521-532.
- 38) Smuckler E., Koplitz M., Sell S. (1976) Cancer Res. 36: 4558-4561.
- 39) Castro J., Sasama H., Sussman H., Bullette P. (1968). Life Sci. 7: 129-136.
- 40) Traiger G., Plaa G. (1971). Toxicol. Appl. Pharmacol 20: 105-112.
- 41) Ueng T., Moore L., Elves R., Alvares A. (1983). Toxicol. appl. Pharmacol. 71: 204-214.
- 42) Johansson I., Ingelman-Sundberg M. (1985). FEBS Lett. 183: 265-269.
- 43) Moody D., Taylor L., Smuckler E. (1986). Drug Metab. Disposit. 14: 709-713.
- 44) Recknagel R., Glende E. (1973) CRC crit. Rev. Toxicol. 2:

263-297.

- 45) Burk R., Lane J., Patel K. (1984). *J. Clin. Invest.* 74: 1996-2001.
- 46) McCay P., Lai E., Poyer J., Dubose C., Janzen E. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 2135-2143.
- 47) Trudell J., Bosterling E., Trevor A. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2678-2682.
- 48) James J., Moody D., Chan C., Smuckler E. (1982). *Biochem J.* 206: 203-210.
- 49) Moody D., James J., Clawson G., Smuckler E. (1981). *Molec. Pharmacol.* 20: 685-693.
- 50) Robenek H., Themann H., Ott K. (1979). *Eur. J. Cell Biol* 20: 62-70.
- 51) Clawson G., MacDonald J., Woo C. (1987). *J. Cell Biol.* 105: 705-711.
- 52) Thiers R., Reynolds E., Vallee B. (1960). *J. Biol. Chem.* 235: 2130-2133.
- 53) Izutsu K., Smuckler E. (1978). *Am. J. Path.* 90: 145-148.
- 54) Brattin W., Waller R. (1984). *Life Sci.* 35: 1231-1240.
- 55) Moore L. (1980). *Biochem. Pharmacol.* 29: 2505-2511.
- 56) Lowery G., Glende E., Recknagel R. (1981). *Toxicol. appl. Pharmacol.* 59: 389-394.
- 57) Jikko A., Taki Y., Nakamura N., et al. (1984). *J. Surg. Res.* 37: 361-368.
- 58) Krahenbuhl S., Stucki J., Reichen J. (1989). *Biochem. Pharmacol.* 38: 1583-1588.
- 59) Wakashiro S., Shimahara Y., Ikai I., et al. (1989). *Res. Exp.*

Med. 189: 153-161.

- 60) Chagoya de Sánchez V., Brunner A., Piña E. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 1441-1445.
- 61) Chagoya de Sánchez V., Piña E. (1972). FEBS Lett. 19: 31-34.
- 62) Chagoya de Sánchez V., Brunner A., Sánchez M.E., López C., Piña E. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 169: 364-367.
- 63) Yañez Maldonado L. (1982). Efecto de la adenosina en la gluconeogenesis hepática in vivo, papel de la energía, estado redox y oxidación de ácidos grasos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Químicas. UNAM.
- 64) Dole V.P. (1962). J. Biol. Chem. 237: 2758-2762.
- 65) Chagoya de Sánchez V., Alvarez P., Jiménez B., Villalobos-M. R., Piña E. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 804-812.
- 66) Harris R.A., Yount R.A. (1976). Lipids 10: 673-680.
- 67) Chagoya de Sánchez V., Santamaría A., Hernández-Muñoz R., García-Sáinz J.A. (1978). en Temas Bioquímicos de Actualidad (ed UNAM) p. 31-40, Mexico D.F.
- 68) García-Sáinz J.A., Hernández-Muñoz R., Santamaría A., Chagoya de Sánchez V. (1979). Biochem. Pharmacol. 28: 1409-1413.
- 69) Hernández-Muñoz R., Santamaría A., García-Sáinz J.A., Piña E., Chagoya de Sánchez V. (1978). Arch. Biochem. Biophys. 190: 155-162.
- 70) Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M., Chagoya de Sánchez V. (1987). Biochim. Biophys. Acta 930: 254-263.
- 71) Hernández-Muñoz R., Glender W., Díaz-Muñoz M., García-Sáinz J.A., Chagoya de Sánchez V. (1984). Biochem. Pharmacol. 33: 2599-2604.

- 72) Schneider W.C., Hogeboom G.G. (1950). J. Biol. Chem. 183: 123-128.
- 73) Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. (1949). J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- 74) Estabrook R.W. (1967). Methods Enzymol. 10: 41-47.
- 75) Cederbaum A.I., Lieber C.S., Beattie D.S., Rubin E. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 158: 736-781.
- 76) Tobin R.B., Berdanier C.D., Ecklund R.E. (1980). J. Environ. Pathol. Toxicol. 3: 307-314.
- 77) Klingerberg M. (1965) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed), pp. 528-530, Academic Press, New York.
- 78) Akerman K.E., Wikstrom M.K. (1976). FEBS Lett. 68: 191-197.
- 79) Kauppinen R.A., Kalervo-Hiltunen J., Hassinen I.E. (1983). Biochim. Biophys. Acta 725: 425-433.
- 80) Hughey R.P., Rankin B.B., Curthoys N.P. (1980). Am. J. Physiol. 238: F199-F-204.
- 81) Hohorst H.J. (1965). in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed), pp. 266-270, Academic Press, New York.
- 82) Bucher T., Czok R., Lamprecht W., Latzko E. (1965). in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed), pp. 253-259, Academic Press, New York.
- 83) Mellamby J., Williamson D.H. (1974). In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed.) pp. 1840-1844., Academic Press, New York.
- 84) Williamson D.H., Mellamby J. (1965). In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed.) pp. 1836-1839., Academic Press, New York.

- 85) Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A. (1967). *Biochem. J.* 103: 514-527.
- 86) Cederbaum A.I., Lieber C.S., Rubin E. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 560-569.
- 87) Bottenus R.E., Spach F.I., Filus S., Cunningham C.C. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 603: 266-277.
- 88) Hakkinen H.M., Kulonen E. (1975). *Biochem. Pharmacol.* 24: 199-208.
- 89) Fellenius E., Carlgren H., Kiessling K. H. (1973). *Life Sci.* 13: 595-601.
- 90) Ciccoli L., Ferrali M., Casini A.F., Comporti M. (1981). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 57: 1463-1466.
- 91) Dianzani M.U., Gabriel L., Gravela E., Paradasi L. (1976). *Pan. Med.* 18: 310-314.
- 92) Di Luzio N.R. (1973). *Fed. Proc.* 32: 1875-1876.
- 93) Pani P., Gravela E., Mazzarino C., Burdino E. (1972). *Exp. Mol. Pathol.* 16: 201-206.
- 94) Clawson C.A. (1989). *Pathol. Immunopathol. Res.* 8: 194-212.
- 95) Quinn F.S., Higginson J. (1965). *Am. J. Pathol.* 47: 353-362.
- 96) Hirayama C., Morotomi I., Hiroshige K. (1970). *Biochem. J.* 118: 229-237.
- 97) Hutterer F., Eisenstadt M., Rubin E. (1970). *Experientia* 26: 244-247.
- 98) Seyer J.M. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 629: 490-498.
- 99) Ehrinpreis M.N., Giambrone M.-A., Rojkind M. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 629: 184-193.

TABLA I

POTENCIAL ELECTRICO Y Δ pH MITOCONDRIALES EN RATAS TRATADAS CON CCl_4 Y ADENOSINA.

Tratamiento	$\Delta \Psi$ (mV, neg. adentro)	Δ pH	$\Delta \mu H^+$
Control	148 \pm 3	0.40 \pm 0.04	172 \pm 5
Adenosina	143 \pm 2	0.43 \pm 0.04	169 \pm 4
CCl_4	128 \pm 2*	0.50 \pm 0.03	158 \pm 4*
CCl_4 + Adenosina	142 \pm 3**	0.37 \pm 0.03	165 \pm 5

Los resultados son promedio \pm E.S. de por lo menos 8 determinaciones individuales. El potencial electroquímico ($\Delta \mu H^+$) se calculó por la ecuación descrita en Métodos. En el caso de la determinación del potencial eléctrico, el medio de reacción consistió en sacarosa 40 mM, KCl 40 mM, EDTA 0.4 mM, $MgCl_2$ 10 mM, TRIS-HCl 50 mM, Fosfato 4.8 mM y safranina 30 μ M; las mitocondrias se incubaron en presencia de succinato 5 mM.

* $p < 0.01$ contra el control

** $p < 0.01$ contra CCl_4

TABLA II

LACTATO, PIRUVATO Y ESTADO REDOX CITOPLASMICO EN HIGADOS DE RATAS
TRATADAS CON CCl₄ Y ADENOSINA.

Tratamiento	Lactato (mM)	Piruvato (mM)	Rel. NAD/NADH
Control	1.70 ± 0.17	0.15 ± 0.02	797 ± 24
Adenosina	1.60 ± 0.10	0.17 ± 0.02	957 ± 115
CCl ₄	2.57 ± 0.43*	0.12 ± 0.01*	436 ± 66*
CCl ₄ + Adenosina	1.85 ± 0.20	0.15 ± 0.02**	714 ± 83**

Los resultados son el promedio ± E.S. de por lo menos 8 determinaciones individuales. La relación NAD/NADH fué calculada como se especifica en la sección de Métodos.

* p < 0.01 contra el control

** p < 0.01 contra el grupo de CCl₄

TABLA III

β -HIDROXIBUTIRATO, ACETOACETATO Y ESTADO REDOX MITOCONDRIAL
HEPÁTICO EN RATAS TRATADAS CON CCl_4 Y ADENOSINA.

Tratamiento	β -hidroxibutirato (mM)	Acetoacetato (mM)	Rel. NAD/NADH
Control	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.03	16.4 ± 2.3
Adenosina	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	19.1 ± 2.3
CCl_4	$0.48 \pm 0.07^*$	$0.13 \pm 0.01^*$	$7.5 \pm 1.1^*$
CCl_4 + Adenosina	$0.25 \pm 0.05^{**}$	$0.22 \pm 0.03^{**}$	$17.2 \pm 1.9^{**}$

Los resultados son el promedio \pm E.S. de por lo menos 8 determinaciones individuales. La relación NAD/NADH se calculó de acuerdo con lo descrito en Métodos.

* $p < 0.01$ contra el control

** $p < 0.01$ contra el CCl_4

TABLA IV

GLUTATION REDUCIDO (GSH) Y OXIDADO (GSSG) EN RATAS TRATADAS CON
CCl₄ Y ADENOSINA

Tratamiento	GSH (mM)	GSSG (mM)	GSH/GSSG
Control	3.74 ± 0.12	0.27 ± 0.01*	13.9 ± 0.5
Adenosina	4.04 ± 0.20	0.36 ± 0.01*	11.2 ± 0.4*
CCl ₄	3.37 ± 0.15*	0.32 ± 0.03	10.5 ± 0.6*
CCl ₄ + Adenosina	3.97 ± 0.16**	0.34 ± 0.02	11.7 ± 0.6*

Los resultados son promedio ± E.S. de por lo menos 8 datos individuales.

* p < 0.01 contra el control

** p < 0.01 contra el CCl₄

TABLA V

EFFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA SINTESIS DE COLAGENA IN VITRO
POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON CCl₄.

Tratamiento	¹⁴ CO ₂ (dpm x 10 ³)	Proteína no colagénica (dpm x 10 ³)	Colágena (dpm x 10 ³)
Control	51.4 ± 4.6	1.81 ± 0.15	0.46 ± 0.04
CCl ₄ (20)	34.9 ± 3.2*	1.69 ± 0.19	0.75 ± 0.09*
CCl ₄ (40)	49.5 ± 5.1	1.74 ± 0.14	0.51 ± 0.04
CCl ₄ + (20) Adenosina	46.9 ± 4.2	1.58 ± 0.13	0.43 ± 0.04**
CCl ₄ + (40) Adenosina	47.2 ± 4.3	1.31 ± 0.11*	0.37 ± 0.03**

Los resultados son promedio ± E.S. de por lo menos 6 determinaciones. En paréntesis se indica el número de días de recuperación después de suspender el CCl₄.

* p < 0.01 contra el control

** p < 0.01 contra el CCl₄

PIES DE FIGURA.

Figura 1. OXIDACION DE SUSTRATOS DEL SITIO I EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE RATAS TRATADAS CON CCl_4 Y ADENOSINA.

Los resultados se expresan como promedio \pm E.S. de por lo menos 7 experimentos individuales. El consumo de oxígeno por mitocondrias obtenidas de animales tratados con aceite vegetal (control) \square , adenosina \square , CCl_4 \square y $\text{CCl}_4 \pm$ adenosina \square , se ensayó con la adición de glutamato 10 mM y malato 1 mM en ausencia de ADP (S IV) o en la presencia de 800 nanomolas de ADP (S III).

Figura 2. OXIDACION DE SUSTRATOS DE SITIO II POR MITOCONDRIAS AISLADAS DE RATAS TRATADAS CON CCl_4 Y ADENOSINA.

Los resultados se expresan como promedio \pm E.S. de por lo menos 7 experimentos individuales. La oxidación de sustratos por el sitio II mitocondrial, se midió con la adición de succinato 10 mM en los organelos de los grupos experimentales descritos en la figura 1.

Figura 3. ACTIVIDAD DE LA LANZADERA DEL MALATO-ASPARTATO EN MITOCONDRIAS DE RATAS TRATADAS CON CCl_4 Y ADENOSINA.

La actividad de la lanzadera del malato-aspartato se midió como se describe en la sección de Métodos, tanto en su forma endógena \square , como después de la reconstitución \square . Los resultados son promedio \pm E.S. del número de experimentos indicados en las figuras anteriores.

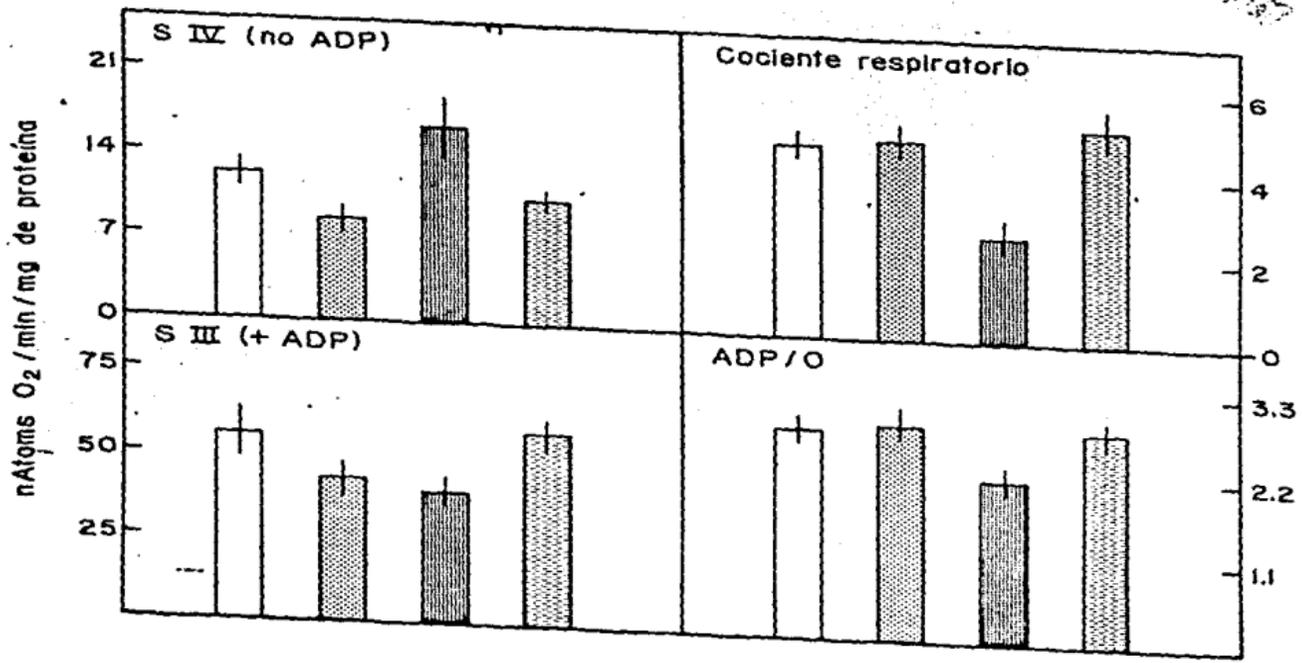
Figura 4. NIVELES HEPATICOS DE COLAGENA DURANTE LA RECUPERACION DE ANIMALES TRATADOS CON CCl₄ Y ADENOSINA.

Los niveles de colágena en animales tratados durante la fase de recuperación (después de suspender la administración de CCl₄), corresponden al promedio \pm E.S. de por lo menos 6 casos individuales en cada grupo.

Figura 5. ACTIVIDAD DE COLAGENASA HEPATICA DURANTE LA RECUPERACION DE RATAS TRATADAS CON CCl₄ Y ADENOSINA.

Los resultados corresponden al promedio \pm E.S. de por lo menos 6 diferentes determinaciones individuales.

FIGURA 1



ESTADO DE LA INVESTIGACION
1967

FIGURA 2

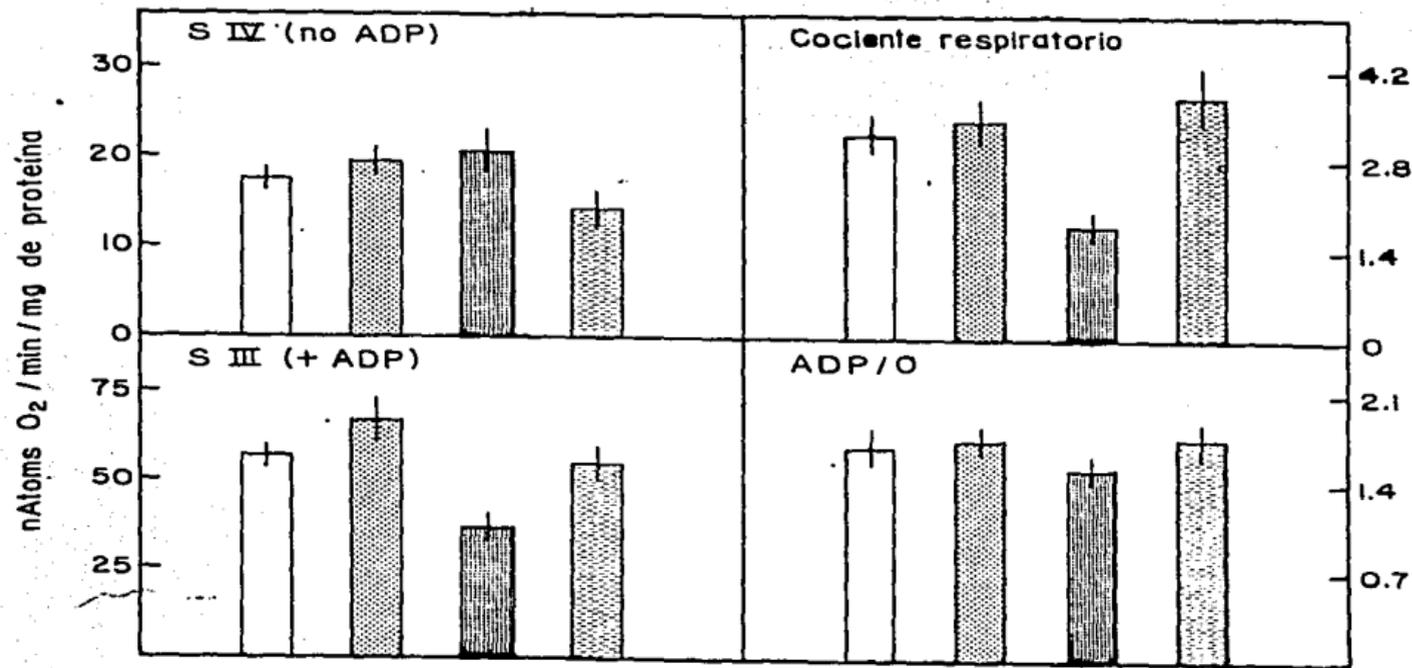


FIGURA 3

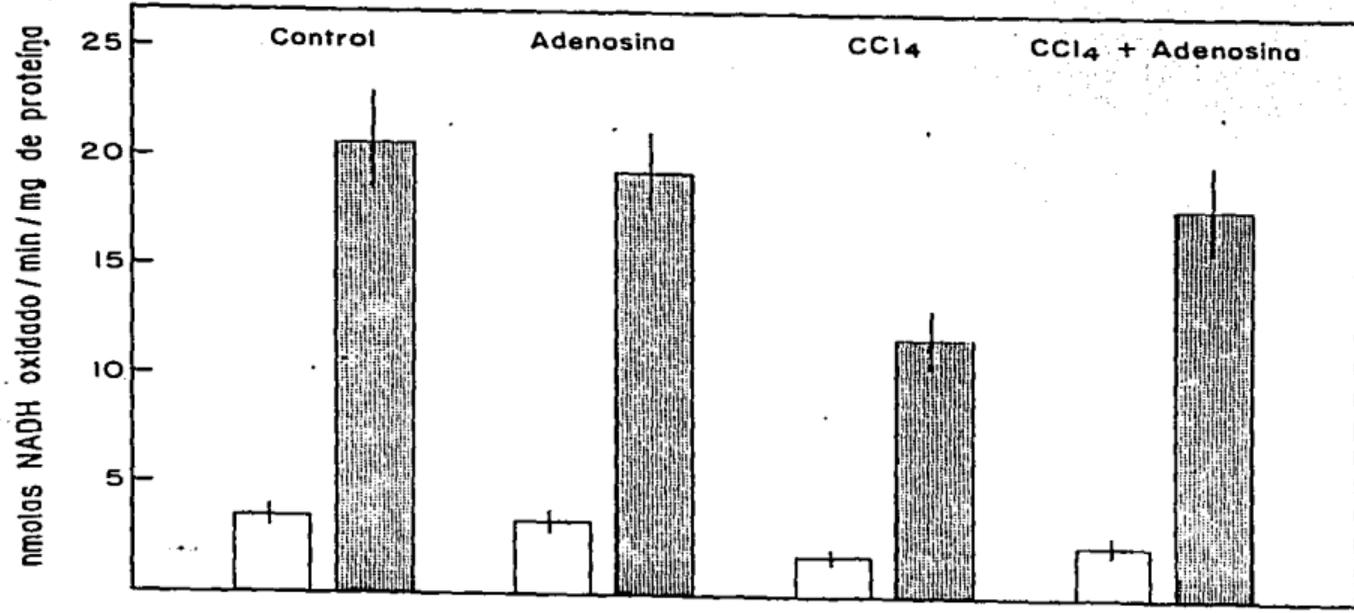


FIGURA 4

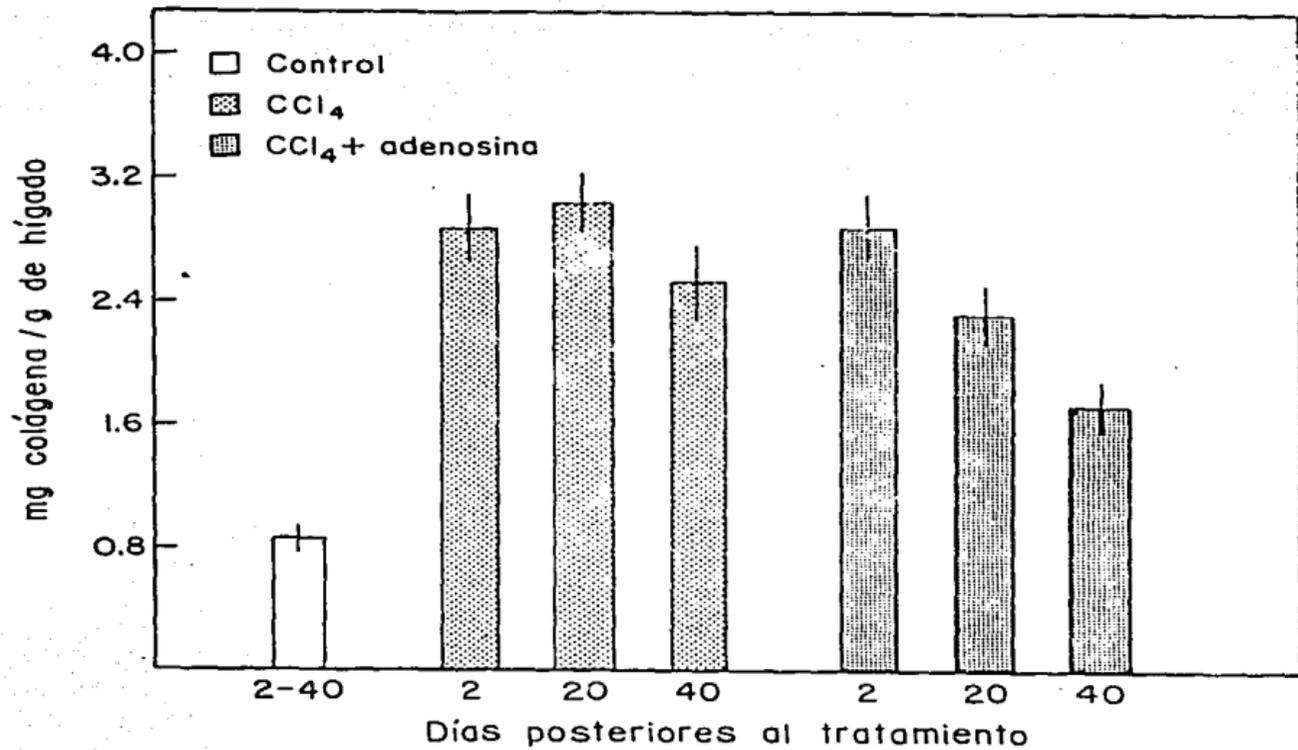


FIGURA 5

