

Reg: 44

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**"ESTUDIO SOBRE LA ACCION DE LA ADENOSINA
EN LA HEPATOTOXICIDAD AGUDA PRODUCIDA POR
TETRACLORURO DE CARBON"**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
P r e s e n t a:

MAURICIO DIAZ MUÑOZ

México, D. F.

1983



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)	Introducción -----	4
	1. - Acciones de la Adenosina -----	4
	a) Neuronales -----	4
	b) Cardiovasculares -----	5
	c) Hormonales -----	5
	d) Citotóxicas -----	6
	e) Varias -----	7
	2. - Adenosina y metabolismo de hígado y de tejido adiposo. -----	7
	3. - Hepatotoxicidad del CCl ₄ -----	12
	a) Antecedentes históricos -----	12
	b) Hipótesis de los fosfolípidos -----	13
	c) Hipótesis mitocondrial -----	14
	d) Hipótesis de las catecolaminas -----	15
	e) Hipótesis de la depresión en la síntesis protéica -----	16
	f) Hipótesis lipoperoxidativa -----	18
III)	Método experimental -----	22
IV)	Resultados -----	28
	1. - Hígado graso -----	28
	2. - Necrosis celular -----	30

3.- Lipoperoxidación	-----	32
4.- Ciclo del glutatión	-----	34
V) Discusión	-----	36
VI) Referencias	-----	45

RESUMEN

Se ha reportado que la adenosina previene el daño hepático generado por el etanol y algunos inhibidores de la síntesis protéica. En esta investigación se explora la acción del nucleósido en la intoxicación hepática aguda por tetracloruro de carbono.

En nuestro modelo el tetracloruro de carbono produjo grandes cambios en el metabolismo lipídico, siendo los principales: una acumulación de triacilglicéridos hepáticos, una disminución en la capacidad de secreción de estas moléculas por parte del hígado, un incremento en el aporte de ácidos grasos libres de los depósitos, acompañado de un aumento en la captación de ácido palmítico marcado por parte del órgano hepático. La Administración de adenosina aminoró los niveles de triacilglicéridos hepáticos, en comparación con los generados por el hepatotóxico, realizando este efecto al impedir la activación de los ácidos grasos en el hígado, hecho que se vió confirmado al observar una disminución de cuerpos cetónicos séricos, en los animales a los que se administró el nucleósido.

Otro parámetro que caracteriza el daño hepático por tetracloruro de carbono es la necrosis celular, en este estudio se observó que la adenosina previene este proceso durante las primeras 4 horas de tratamiento. La acción necrogénica está basada en un efecto primario del metabolismo del tetracloruro de carbono que es

la lipoperoxidación, otra vez, al cuantificar este parámetro la adenosina disminuyó parcialmente al incremento generado por el hepatotóxico. Al tratar de explorar el mecanismo mediante el cual el nucleósido ejercía sus efectos, los experimentos realizados apuntaron que uno de los parámetros claves en la intoxicación por tetracloruro de carbono, es el aumento en la disponibilidad del NADPH, ya que esta coenzima revierte el efecto de la adenosina sobre la lipoperoxidación. Esta suposición se vió reforzada cuando se valoró el ciclo de las pentosas, ya que se observó que el tetracloruro de carbono, induce un incremento en esta ruta metabólica, la cual es la principal fuente del NADPH. Otro camino metabólico que incluye el NADPH, e inactiva a la vez peróxidos celulares, es el ciclo del glutatión; los resultados obtenidos muestran que el tetracloruro de carbono afecta la relación glutatión reducido/glutatión oxidado, significando esto un desbalance en el mencionado ciclo, mientras que la adenosina es capaz de evitar esta acción del hepatotóxico.

En conclusión, en este trabajo se demuestra que la adenosina mejora de manera parcial, los cuadros de hígado graso y necrosis hepática producidos por la administración aguda de tetracloruro de carbono. El nucleósido parece actuar a través de dos vías principales, por un lado, al impedir la activación de los ácidos grasos, aminora el hígado esteático, y por el otro, con su acción anti-lipoperoxidativa previene el proceso necrótico generado por el hepatotóxico. El mecanismo molecular por el cual el nucleósido ejerce sus

acciones, se encuentra actualmente en estudio.

I. Introducción.

La 6-amino-9-BD-ribofuranosil 9-H purina, también conocida como adenosina, es un nucleósido formado de adenina y ribosa; está distribuída a lo largo de la escala filogenética y se encuentra ubicada en casi todos los tejidos de organismos superiores (1).

La adenosina como nucleósido juega un importante papel al ser molécula precursora de nucleótidos como el AMP, ADP y ATP, necesarios en el metabolismo energético y en la constitu--ción de coenzimas y material genético.

Se han reportado varias acciones biológicas de los compuestos de purina, siendo los más usuales el ATP y la adenosina. En este trabajo sólo se mencionarán las acciones y los efectos causados por la adenosina.

a) Efectos neuronales

La existencia de neuronas purinérgicas fue propuesta por Burnstock (2), al observar que en las vesículas de varios neurotransmisores se encontraban compuestos como ATP o adenosina, y que al vaciarse en el espacio sináptico, eran vertidos a la vez la purina y el neurotransmisor. La adenosina y el ATP tienen efectos depresores en el sistema nervioso periférico, además la adenosina posee una fuerte acción depresiva sobre las neuronas de la corteza cerebral y antagoniza los efectos analgésicos de la morfina.

La estimulación de tejido vascular o nervios simpáticos causan la liberación de adenosina y sus metabolitos; la aplicación iontoforética de la adenosina produce hiperpolarización y modulaciones del ruido de membrana. Recientemente se le ha asignado a la adenosina un papel hipnogénico (3).

b) Efectos cardiovasculares

Está bien establecido que en condiciones de hipoxia, el corazón muestra una reducción en la resistencia vascular coronaria asociada con un incremento en la liberación de adenosina (4), correlacionándose este efecto con el consumo de oxígeno del miocardio. La aplicación de adenosina a las aurículas aisladas de rata, produce efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos (5). En el cerebro, la adenosina es un potente dilatador de arteriolas cuando se aplica directamente a la superficie cerebral.

c) Efectos sobre acciones hormonales

La adenosina estimula la esteroidogénesis, en las glándulas adrenales y células de Leyding (4), así como la secreción de glucagón y hormona de crecimiento (4); por el contrario, el nucleósido inhibe la liberación de insulina bajo estímulo de glucosa (6). La adenosina en rebanadas de hipotálamo, incrementa la incorporación de leucina marcada a prolactina (4), así como la eritropoyesis y la secreción de histamina por células cebadas (5). La adenosina con un grupo isopreno adicionado en la posición 6, es base de un grupo

de hormonas vegetales conocidas como citocininas, las cuales promueven división celular (7). La secreción de renina por las células yuxtglomerulares es reducida por la adenosina (4).

d) Efectos citotóxicos y de inmunosupresión

La adenosina impide el crecimiento de células de mamífero en cultivo a concentraciones micromolares, se conocen también acciones bacteriostáticas por parte del nucleósido (4). Los efectos citotóxicos de la adenosina se pueden asignar principalmente a inhibición de la síntesis de pirimidinas, alteraciones en el metabolismo del fosforibosil pirofosfato, impedimento de metilaciones y por lo tanto fallas en la fisiología celular y en la transferencia de información genética (5). Paralelos a los cambios anteriores, se ha observado que la adenosina posee acciones que dificultan o impiden la respuesta inmune, como evitar la transformación de monocito a macrófago, inhibir la linfoblastogénesis mediada por mitógeno y el hecho de una activación de la adenosina deaminasa cada vez que se produce respuesta inmune (5).

e) Efectos varios

La adenosina puede regular el metabolismo del tejido adiposo modulando los niveles de AMPc, a este respecto se han reportado varios sitios receptores de la adenosina, que intervienen en el funcionamiento de la adenilato ciclasa con acciones, tanto inhibitorias como activatorias (5). La adenosina es capaz de incremen

tar la liberación de histamina de células cebadas hasta ocho veces y la aplicación del nucleósido a varias células produce que éstas desarrollen procesos a modo de vellosidades en su superficie, además de alteraciones en la morfología nucleolar, hecho que se correlaciona con la pérdida de la capacidad de sintetizar ribosomas (4).

Algunas de las acciones bioquímicas de la adenosina en el órgano hepático y tejido adiposo son (8):

- a) Aumento del 40% de la poza de ATP, y consecuente elevación de la carga energética de la célula hepática (9).
- b) Aumento de 8 veces de la actividad de la glucógeno sintetasa de hígado de rata (10).
- c) Aumento de 13 veces de la incorporación de glucosa ¹⁴C al glucógeno hepático (glucogénesis) (II).
- d) Aumento de 6 veces la incorporación de alanina al glucógeno hepático (gluconeogénesis - glucogénesis) (12).
- e) Aumento de 5 veces de la lipogénesis en el tejido adiposo del epidídimo (13).
- f) Acción antilipolítica de la adenosina in vitro (14).
- g) Inhibición de la activación y oxidación de los ácidos grasos (15).
- h) Disminución de la lipogénesis hepática (16).

El patrón metabólico que se observa en presencia de la adenosina, se caracteriza por una tendencia a incrementar los pro

cesos anabólicos, como la síntesis de glucógeno y disminuye los catabólicos como la oxidación hepática de ácidos grasos, lo que nos conduce a la conclusión que por un mecanismo todavía no muy claro, la adenosina cambia el patrón metabólico de un animal ayunado a uno de animal saciado. Es probable que el eje alrededor del cual gira este cambio, sea el aumento de la carga energética que se sabe favorece secuencias anabólicas, haciendo lo contrario con las catabólicas.

Las acciones de la adenosina ubicadas en el contexto de este trabajo, se pueden mostrar de una manera clara si tenemos en cuenta el movimiento de las grasas en el organismo, es decir en la dinámica de lípidos (Fig. 1). La adenosina impide que los triacilglicéridos en el tejido periférico, por lo que los depósitos del tejido adiposo tienden a ser estables. En el hígado ocurre una cosa distinta, cuando la adenosina evita la activación de los ácidos grasos, disminuye su oxidación pero también decrementa la formación de triacilglicéridos hepáticos, por lo que el resultado final al integrar todos los efectos, es una inmovilización de las grasas periféricas y una disminución en la síntesis de la grasa hepática.

Cuando un organismo entra en contacto con un agente hepatotóxico, se desencadenan una serie de respuestas metabólicas, que se traducen en una serie de eventos patológicos, que se caracterizan principalmente por darle un sentido catabólico a la fisiología celular. Se pueden integrar estos eventos en una serie lógica de efectos

metabólicos (8):

1. - Contacto con el agente causal.
2. - Disminución de los procesos generadores de energía.
3. - Caída de la carga energética.
4. - Estímulo de los procesos catabólicos: a) glucogenólisis hepática, b) lipólisis periférica y movilización de ácidos grasos al hígado.
5. - Inhibición de los procesos anabólicos: a) biosíntesis de purinas, b) biosíntesis de ácidos nucleicos, c) biosíntesis de proteínas, d) biosíntesis de glucógeno.
6. - Acúmulo de lípidos en el hígado.

La entidad patológica producida al final de la lista se conoce como hígado graso o hepatoesteatosis, en algunos casos puede revertir a la normalidad pero en otros puede degenerar hacia hepatitis y en un momento determinado a cirrosis. Para explicar la acumulación grasa en el hígado, se debe tener en cuenta que el nivel de triacilglicéridos hepáticos es la resultante de varios factores como: a) biosíntesis de grasa, b) utilización para fines energéticos, c) transporte de lípidos de los depósitos al hígado, y d) movilización de lípidos del hígado a los depósitos; por lo tanto, las alteraciones que favorezcan la formación de lípidos en el hígado, disminuyen su utilización, estimulen su movilización de los depósitos o impidan el transporte del hígado a los depósitos, resultarán en una degeneración grasa del hígado.

Al hacer una revista de las acciones de la adenosina en el hígado y en el tejido adiposo y compararlas con las secuelas que produce un hepatotóxico, se concibió la hipótesis de que la adenosina pudiera antagonizar los efectos de acumulación grasa en el hígado, promovida por hepatotóxicos, al evitar movilización lipídica periférica y al disminuir la lipogénesis hepática, así como también al impedir la caída en la carga energética característica de los cuadros de hepatotoxicidad. Un reporte, publicado por Faber y colaboradores (17), en el cual demostraba que la administración de ATP, a dosis considerables, era capaz de prevenir el daño hepático producido por etionina, reforzó la hipótesis de que la adenosina podría asumir, en un momento dado, un importante papel como agente antihepatotóxico. Este hecho fue comprobado cuando la adenosina impidió el daño hepático producido por la administración de etionina, cicloheximida y etanol.

La cicloheximida es un antibiótico inhibidor de la síntesis protéica, su administración a ratas impide la elaboración de lipoproteínas que son los agregados encargados de exportar los triacilglicéridos hepáticos; una dosis de adenosina evita toda acumulación grasa (18).

Ya que el nucleósido previene la entrada de ácidos grasos y aunque la cicloheximida evita la salida de los triacilglicéridos por inhibir la formación de las lipoproteínas, este efecto compensa

la acción de la adenosina, por lo que los triacilglicéridos hepáticos no se acumulan.

La etionina es un hepatotóxico que produce hígado esteatótico al depletar de ATP a la celdilla hepática, generando en forma secundaria una inhibición de la síntesis proteica y por lo tanto, impidiendo la secreción de las lipoproteínas, todo esto hace que los triacilglicéridos hepáticos se eleven 4 veces sobre los niveles basales. Una dosis de adenosina previene totalmente el daño hepático, al evitar la caída en la carga energética, así como al impedir la captación de los ácidos grasos provenientes de los tejidos periféricos (19).

Es bien conocido que la administración de una sola dosis de etanol, produce un cuadro reversible de hígado graso a través de la alteración en el estado redox, causada por la oxidación hepática del fármaco; esto es, que al ser catabolizado por la alcohol deshidrogenasa, genera una gran cantidad de equivalentes reductores (NADH), los cuales desplazan el equilibrio de una serie de enzimas oxidoreductoras citoplásmicas, entre las cuales la alfa glicerofosfato deshidrogenasa está directamente involucrada en la biosíntesis de triacilglicéridos, de tal manera que estos cambios condicionan un incremento de 4 veces la concentración de triacilglicéridos hepáticos.

El nucleósido previene parcialmente esta degeneración grasa, por medio de mecanismos que sugieren una mayor capacidad en la reoxidación de los equivalentes reductores por la mitocondria

(20). Estos mecanismos se hallan en estudio en nuestro laboratorio.

Otro hepatotóxico muy conocido es el tetracloruro de carbono, el cual trataremos con más detalle en este trabajo.

Daño hepático producido por tetracloruro de carbono.

- Antecedentes históricos.

A mediados del siglo pasado, eran utilizados frecuentemente como anestésicos el cloroformo (CHCl_3) y el tetracloruro de carbono (CCl_4), su administración era por vía oral o por inhalación; ambos al poco tiempo de uso producían el cuadro conocido como atrofia amarilla del hígado. A principios de esta centuria, el tetracloruro de carbono fue popularizándose en las industrias y en la década de los veinte se le asignó un papel como poderoso agente antihelmíntico. De manera paralela fue creciendo la incidencia de enfermedades hepáticas producidas por el tetracloruro de carbono, lo que originó que la atención de los hombres de ciencia se avocara hacia ese problema. En la primera mitad de este siglo, los avances en este sentido fueron: caracterizar los signos de la intoxicación aguda y crónica por este hepatotóxico y determinar las condiciones dietéticas que exacerban o aminoran el daño hepático; de esta manera, se concluyó que la administración aguda de tetracloruro de carbono producía hígado esteático o graso y que la administración crónica del hepatotóxico degeneraba de tal manera el órgano hepático, que

desembocaba en un cuadro muy similar al de cirrosis, ambas entidades patológicas cursan o implican procesos de necrosis celular.

La tendencia desde la segunda mitad del siglo hasta la actualidad, es la de tratar de responder a las siguientes preguntas: ¿Por qué se afecta particularmente al hígado?, ¿Qué es la lesión inicial?, ¿Cuáles estructuras celulares son atacadas en primera instancia, y de qué manera son atacadas?, ¿En qué se basa la infiltración grasa?, ¿Cuál es la base de la necrosis hepatocelular tan extensa? En el esfuerzo de dar solución a tales cuestiones se han ido sucediendo una serie de hipótesis de trabajo a lo largo del tiempo, edificándose una estructura de conocimiento que tiende cada vez más a una visión cabal del mecanismo de acción por el que el tetracloruro ejerce su acción tóxica. Las principales hipótesis han sido:

Hipótesis de los fosfolípidos. - Hasta 1948 se pensaba que los ácidos grasos de cadena larga, eran transportados de un órgano a otro en la fase acuosa del plasma en unión éster, con derivados del ácido fosfatídico, como fosfolípidos, por lo que cualquier tratamiento que afectara la síntesis de los fosfolípidos, como la deficiencia de colina, tendría que repercutir en el metabolismo de los ácidos grasos, favoreciendo su incorporación a triacilglicéridos y originando así el hígado esteático. Los estudios posteriores demostraron que el hígado era el único órgano capacitado para remover y elaborar los fosfolípidos plasmáticos y que en el "stress" se lleva a ca

bo una gran actividad lipolítica que desemboca en la producción de glicerol y ácidos grasos por los tejidos periféricos; la integración de los dos reportes, refutó la hipótesis de los fosfolípidos en su forma original, pero actualmente el metabolismo y movilización de los fosfolípidos ha recobrado importancia en relación con las lipoproteínas, las cuales funcionan como medio de transporte de triacilglicéridos en la sangre (21).

Hipótesis mitocondrial. - El trabajo sobre hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono en la década de 1950 a 1960, se rigió por la creencia de que el hígado graso producido por este hepatotóxico era esencialmente una "enfermedad mitocondrial". Este nuevo enfoque fue posible gracias al desarrollo de técnicas como la homogenización y la centrifugación diferencial, acopladas con el conocimiento de funciones bioquímicas de los compartimientos subcelulares. Por ese tiempo se reportó que el tetracloruro de carbono alteraba el ciclo del ácido tricarbóxico en mitocondria aisladas y en ratas íntegras después de 12 horas; se observó también un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo cual llevó a sugerir que la acumulación grasa podría, tal vez ser, una falla en la oxidación de los ácidos grasos por una deficiencia en el aporte de ATP, necesario para su activación. Otras alteraciones mitocondriales reportadas eran el hinchamiento que el tetracloruro de carbono producía en estos organelos, así como también, la pérdida del control respiratorio

y activación de la ATPasa, pero éstas y las anteriores secuelas se producen muy tarde en el proceso temporal del daño hepático, por lo que, sin negar estos efectos mitocondriales, se empezó a dudar que en ese organelo se llevara a cabo la lesión inicial del hepatotóxico. Actualmente está abierta la posibilidad de que el daño mitocondrial pudiera estar implicado en los procesos de necrosis celular, que es uno de los signos característicos del daño producido por tetracloruro de carbono, aunque de aparición temporal más tardía. En el año de 1959 el campo sufrió una bifurcación, por un lado un grupo de trabajo se preocupó por los cambios que ocurrían en el ergastoplasma a tiempos muy tempranos y paralelamente otra línea de trabajo intentó entender el hígado graso y la necrosis producida por el tetracloruro de carbono como una manifestación de descarga masiva de catecolaminas. Revisaremos primero ésta última (21).

Hipótesis de catecolaminas. - Esta hipótesis se basa en el postulado de que el tetracloruro de carbono origina una descarga de catecolaminas, así como una activación persistente del sistema nervioso simpático, el primer efecto implica un aporte aumentado de ácidos grasos provenientes de los tejidos periféricos, lo que incidiría en el establecimiento de un hígado graso, el segundo efecto causaría una disminución en el flujo sanguíneo hepático, asociado con hipoxia centrilobular la cual produciría necrosis celular. Al explorar la primera posibilidad de manera más completa,

se tuvo que considerar un cuadro de dinámica de lípidos, el cual implicaba conocer la captación de ácidos grasos sanguíneos por parte del hígado, el catabolismo y anabolismo de las grasas en ese órgano, así como la exportación de triacilglicéridos desde el hígado; los resultados en este sentido demostraron que, aunque se observaba un incremento en los niveles de ácidos grasos séricos, éste no correlacionaba con el aumento de triacilglicéridos hepáticos y que un efecto más notable era la supresión de la secreción de triacilglicéridos del hígado, lo que llevó a la caracterización de las clases de lipoproteínas, que es la manera por la que viajan las grasas por la sangre, así como los organelos o las estructuras celulares que permitían la síntesis y la movilización de dichas macromoléculas. Al poco tiempo de emitida esta hipótesis, tuvo un serio revés cuando se comprobó que las catecolaminas no se incrementaban después del tratamiento con tetracloruro de carbono, por lo que la gente de ciencia, enfocó sus investigaciones a la acción del hepatotóxico sobre las lipoproteínas; por un lado se decía que el efecto del tetracloruro sobre la síntesis protéica impedía la síntesis de las lipoproteínas y por el otro se decía que el efecto era sobre el sistema microsomal, responsable de la exportación de las mismas, este punto se analizará con más detalle (21).

Hipótesis de la depresión en la síntesis protéica. - El tetracloruro de carbono, ejerce una fuerte acción depresora sobre

la síntesis de proteínas en el hígado, ha sido demostrado que una hora después de su administración, escinde ribosomas y disminuye la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas, por lo que varias investigaciones adoptaron como línea de trabajo suponer que el efecto de tetracloruro de carbono sobre la síntesis proteica, era el causante de la infiltración grasa, así como de las acciones necróticas del hepatotóxico. Sobre este último punto, los reportes de que la etionina y la actinomicina D suprimen la síntesis proteica, pero sin causar necrosis, hace pensar que estos dos parámetros no necesariamente están unidos. Respecto del primer punto, varios reportes han verificado que la parte proteica de la lipoproteína, la glicoproteína conocida como apoproteína aceptora de lípidos, tiene una vida media larga y su captura rápida del hígado, permite la secreción de lipoproteínas sin necesidad de síntesis de novo de esa proteína, por lo que un impedimento en la síntesis proteica no debería evitar la presencia de lipoproteínas en la sangre, sino hasta 3 o 4 horas después de iniciado el efecto. El tetracloruro de carbono ejerce su acción depresora de la exportación de lipoproteínas, casi de inmediato a su administración, por lo que debemos pensar que este hepatotóxico ejerce su acción primaria en el acoplamiento de la apoproteína con su grupo prostético graso o como parece más probable afectando la movilización de las lipoproteínas intracelularmente, al dañar el sistema membranoso microsomal, como lo sugiere la siguiente hipótesis (21).

Hipótesis Lipoperoxidativa. - Muchos reportes publicados hace algunos años, contenían información sobre efectos tempranos que producía el tetracloruro de carbono en el retículo endoplásmico. Los principales eran: A nivel microscópico era posible observar que a los pocos minutos de administrado el tetracloruro, se producían hinchamientos y disgregaciones en los sistemas membranosos del retículo endoplásmico liso y en el retículo endoplásmico rugoso se observó desprendimiento de ribosomas; a nivel bioquímico, se constataba que las actividades enzimáticas propias de retículo endoplásmico liso, como la glucosa 6 fosfatasa y las metilasa e hidroxilasas del sistema microsomal que actúa contra xenobióticos, se perdían a los pocos minutos del tratamiento con el tóxico. Para explicar los resultados anteriores, los investigadores avocaron sus estudios hacia el metabolismo del tetracloruro de carbono, siendo uno de los principales hallazgos descubrir que al poco tiempo que el hepatotóxico hacía contacto con el hígado, era posible detectar la presencia de radicales libres, $\text{Cl}\cdot$ y $\text{CCl}_3\cdot$, los cuales promueven reacciones en cadena conocidas como peroxidativas. La génesis de los radicales libres, se explicó como una acción del sistema microsomal de transporte de electrones no fosforilante, caracterizado por la presencia del citocromo P-450, sobre el tetracloruro de carbono, produciéndose una escisión homolítica de esta molécula. Los radicales libres así formados son muy reactivos teniendo afinidad

muy marcada por los electrones pi de las dobles ligaduras de las moléculas orgánicas, por lo que interaccionan con proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos insaturados, etc.; si hacemos referencia a la interacción de los radicales libres y el tejido graso, nos ubicaremos en un terreno que ha sido muy útil para estudiar este tipo de fenómenos conocidos como lipoperoxidación (21).

La degradación peroxidativa de ácidos grasos poliinsaturados implica: a) una reacción inicial que guía a la formación de un radical libre del ácido graso poliinsaturado; b) la subsecuente reacción de este radical libre con oxígeno para producir un radical peroxi; c) la reacción de este radical con otra molécula de ácido graso poliinsaturado, para formar un hidroperóxido y otro radical libre del ácido graso que reaccionará de nuevo con el O_2 ; d) Los hidroperóxidos reaccionan y dependiendo de la región del ácido graso donde se formaron, producirán aldehídos, cetonas o hidrocarburos, fraccionando los ácidos grasos y terminando así la cadena de reacciones de este proceso (22) (Fig. 1).

En el caso de intoxicación con tetracloruro de carbono, los radicales libres producidos por la acción del citocromo P-450, son los que inician la serie en cadena del proceso lipoperoxidativo. La degradación peroxidativa de ácidos grasos poliinsaturados, tienen como consecuencia una severa destrucción de estructuras celulares, altamente organizadas como son las membranas biológicas,

lo que acarrea una serie de disturbios en importantes actividades metabólicas (Fig. 2).

La actividad lipoperoxidativa se presenta de manera natural en todas las células y se considera como una forma de toxicidad del oxígeno, evolutivamente han aparecido ciertos mecanismos de seguridad, que modulan las concentraciones de las diversas clases de oxígeno reactivo, siendo los principales la superóxido dismutasa y el sistema de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, éste último es más trascendente con el contexto en el que estamos situados, ya que los peróxidos generados por los radicales $Cl\cdot$ y $CCl_3\cdot$, van a ser procesados por la glutatión peroxidasa, empezando una serie de reacciones que se conocen con el nombre de ciclo de glutatión (23) (Fig. 3).

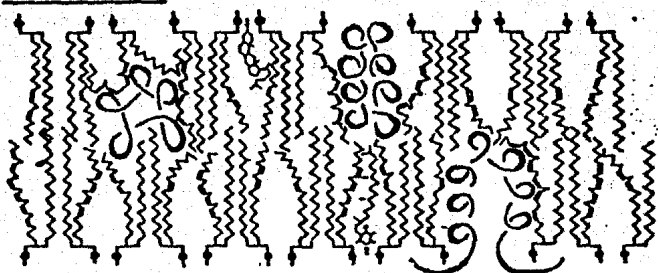
La glutatión peroxidasa es una enzima que necesita selenio para su funcionamiento, cuando reacciona con el peróxido lo inactiva y al hacerlo, transforma el tripéptido glutatión de su forma reducida a la oxidada, la otra enzima, la glutatión reductasa, que es una flavoproteína, regenera el glutatión a su forma reducida para lo cual necesita NADPH, que se convertirá en la forma oxidada NADP, finalizando el ciclo. Visto de manera íntegra, el ciclo del glutatión va a ser modulado por la concentración de peróxidos y por el estado redox, dado por la relación NADP/NADPH.

Los cambios en la organización celular que produce

la lipoperoxidación generada por CCl_4 , implican la imposibilidad del hepatocito para llevar a cabo una adecuada secreción de triacilglicéridos a la sangre, ya que el organelo que se encarga del ensamble de las lipoproteínas, está siendo severamente afectado en los primeros estadios de la intoxicación con tetracloruro de carbono, por lo que la hipótesis lipoperoxidativa aclara el establecimiento del hígado graso generado por tetracloruro de carbono; por otra parte la persistencia de la actividad lipoperoxidativa que causa daños a las membranas celulares genera a mediano plazo, procesos de muerte celular o necrosis que son característicos en un cuadro producido por tetracloruro de carbono (24).

Con base en los antecedentes mencionados, la hipótesis que motivó este trabajo, es verificar si la adenosina puede funcionar como un fármaco, capaz de evitar la patología generada por la administración aguda de tetracloruro de carbono, para lo cual se midieron parámetros implicados en el hígado esteásico o graso, como son concentraciones hepáticas y séricas de triacilglicéridos, niveles en sangre y captación hepática de ácidos grasos, anabolismo de estas moléculas en el hígado y parámetros implicados en la necrosis celular, como son niveles séricos de transaminasas y actividad lipoperoxidativa, y en este contexto evaluar los metabolitos y enzimas del ciclo de glutatión, así como la actividad de la ruta metabólica conocida como ciclo de las pentosas, como indicadora de la relación NADP/NADPH .

NORMAL



CCl₄

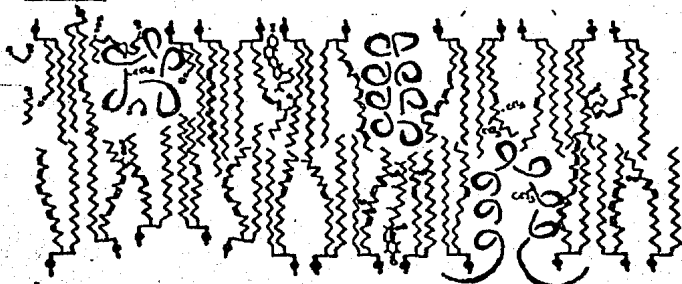


FIGURA No. 2

Disturbios en la estructura de la membrana
producidos por el tetracloruro de
carbono.

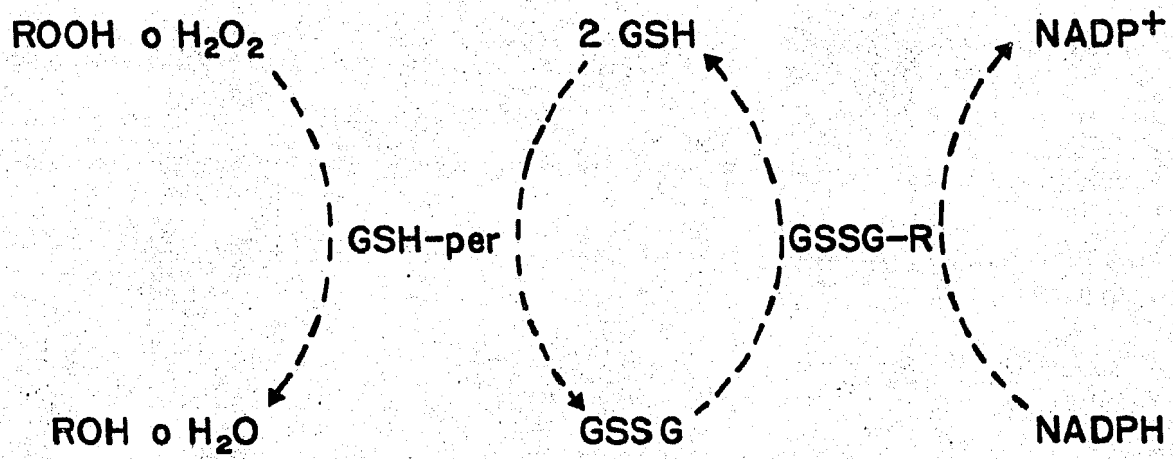


FIGURA No. 3

CICLO DEL GLUTATION.

II. Método Experimental.

Los experimentos se realizaron con ratas macho ayunadas de la cepa Wistar, que pesaron en promedio 180gs. Las ratas se dividieron en 4 grupos y se les dieron los siguientes tratamientos: al grupo I se le administró aceite de cártamo por medio de una sonda intragástrica y solución salina al 0.8% intraperitonealmente, ambos compuestos se aplicaron a razón de 1 ml. por cada 100 gs. de peso corporal; al grupo II también se le dio aceite mineral intragástricamente, pero se le aplicó una dosis de adenosina intraperitoneal de 200 mg/Kg. de peso corporal; al grupo experimental III, se le administró tetracloruro de carbono en forma directa al estómago, a una dosis de 2.5 ml/Kg. de peso corporal diluido con aceite vegetal, más una aplicación intraperitoneal de solución salina; al grupo IV se le trató con tetracloruro de carbono intragástrico y adenosina intraperitoneal.

Los grupos experimentales así planteados permiten constatar los efectos producidos por la sola aplicación de adenosina (grupo II), los efectos originados por la administración de tetracloruro de carbono (grupo III) y las posibles acciones o efectos que pudiera tener la adenosina en esta situación (grupo IV), comparando todos ellos con un grupo testigo o control (grupo I).

Los parámetros experimentales explorados y las técnicas que se emplearon para ello son las siguientes:

1. - Cuantificación de triacilglicéridos. - Se realizó por el método de Butler (25), que brevemente consiste en extraer los lípidos en cloroformo, separar los lípidos neutros con zeolita activada, saponificarlos con potasa alcohólica, estabilizarlos con peryodato de sodio y colorearlos, a altas temperaturas, en presencia de ácido cromotrópico; la lectura final se verifica a 570nm. Las muestras biológicas ensayadas fueron hígado y sangre.

2. - Cuantificación de ácidos grasos. - El método de Dole y Meinertz (26), se reduce a realizar una titulación de los ácidos grasos extraídos del plasma con azul de nilo en presencia de hidróxido de sodio. Los resultados se reportan como microequivalentes por litro.

3. - Cuantificación de cuerpos cetónicos. - Los cuerpos cetónicos, acetoacetato y beta-hidroxibutirato, se midieron como métodos enzimáticos (27), los cuales consisten en seguir los cambios del estado de oxidoreducción de la coenzima nicotinamín-piridín nucleótido, hacia un estado u otro según sea el caso, siguiendo la reacción con lecturas a 340 nm. Los niveles de estos metabolitos se obtuvieron en sangre.

4. - Incorporación de ^{14}C -Acido palmítico. - Los experimentos para determinar incorporación hepática de ácidos grasos circulantes, se llevaron a cabo administrando ácido palmítico marcado, con anterioridad a los tratamientos usuales, y después del sacrificio

de los animales se cuantificó radioactividad en los lípidos hepáticos, para lo cual se realizó una extracción por el método de Folch y colaboradores (28). La radioactividad se contó en un espectrómetro de centelleo líquido (5 g. de PPO y 0.1 g de dimetil-POPOP en 1,000 ml. de tolueno).

5. - Cuantificación de transaminasas. - Las dos enzimas, transaminasa glutámico-pirúvica y la transaminasa glutámico-oxaloacética, se midieron en sangre utilizando métodos enzimáticos, en la primera se cuantificó el piruvato formado a partir de alanina, al hacerlo reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio alcalino, la lectura del complejo colorido final se hace a 505 nm; la segunda enzima se cuantifica al medir el complejo colorido formado por el oxaloacetato con la 2,4-dinitrofenilhidrazina a 525 nm (29).

6. - Cuantificación de actividad lipoperoxidativa. - Los niveles de peróxidos dependen principalmente de la presencia de oxígeno activado, así como de cofactores como NADPH y ADP. La actividad lipoperoxidativa implica formación de hidroperóxidos en las dobles ligaduras de los ácidos grasos de los fosfolípidos, al reaccionar con dobles ligaduras en la posición 3 omega, el producto de escisión formado es el dialdehído malónico el cual se cuantifica por el método del ácido tiobarbitúrico (30), con el que forma un complejo colorido que se extrae en una solución de butanol: piridina y es leído a 532 nm. La actividad lipoperoxidativa medida en ausencia de cofactores, nos infor

ma de la concentración basal de éstos, y se llama lipoperoxidación endógena. Si al ensayo se le adiciona algún cofactor, como NADPH, ADP o iones ferrosos, la lipoperoxidación se considerará suplementada; respecto al último cofactor mencionado, hay que hacer notar que los iones ferrosos no son fisiológicos y su utilización nos informa sobre la capacidad lipoperoxidativa máxima del sistema, además del grado de insaturación de los ácidos grasos presentes.

7. - Determinación de los niveles de glutatión. - La gama-glutamilcisteinilglicina se puede encontrar en dos formas principales, como monómero, también conocido como glutatión reducido (GSH) o como dímero formado por la oxidación de la forma reducida, por lo que se conoce como glutatión oxidado (GSSG). La cuantificación del GSH se llevó a cabo enzimáticamente (31); los extractos perclóricos obtenidos de los hígados de animales tratados, se hicieron reaccionar de la siguiente manera: en presencia de la enzima glioxilasa I se formó un complejo entre el glutatión reducido y el metilglioxal que fue medido en un espectrofotómetro a 240 nm. El glutatión oxidado se cuantificó al reducirlo a GSH en presencia de NADPH y glutatión reductada observándose un decremento en densidad óptica a 340 nm.

8. - Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-per). - La actividad de esta enzima se midió mediante una reacción enzimática acoplada (32), la cual se lleva a cabo de la siguiente manera:

se hace un homogenado de hígado en sacarosa isotónica, que servirá como fuente de enzima, y se pone una cantidad conocida con la siguiente mezcla de reacción, un buffer de fosfato a un pH y concentración adecuados, azida de sodio (Na_3N), GSH, glutatión reductasa y NADPH; la reacción se inicia con un sustrato secundario de la enzima como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la enzima GSH-per descompone el peróxido y en el proceso convierte el GSH en GSSG, que a su vez sirve de sustrato a la glutatión reductasa para que en presencia de NADPH, que se oxida, reduzca el GSSG, por lo que la reacción se observa en un espectrofotómetro a 340 nm. La azida de sodio inactiva la catalasa, por lo que la única enzima que maneja el H_2O_2 de la reacción es la GSH-per.

9. - Actividad de glutatión reductasa (GSSG-R). - Esta enzima se cuantificó siguiendo el método de Bergmayer (31) en el que tomándose un homogenado de hígado como fuente enzimática, se le pone en contacto con su sustrato GSSG en un buffer de fosfato y en presencia de NADPH se verifica la reacción que implica oxidación de la coenzima y por lo tanto un medio de seguir la reacción a 340 nm.

10. - Actividad del Ciclo de las Pentosas. - Este camino metabólico se estudió por el método de Gumaá (33), el cual consiste en medir la conversión de glucosa marcada en el carbón uno en bióxido de carbono, el proceso se llevó a cabo en rebanadas de hígado incubadas un par de horas en un ringer Krebs-bicarbonato, el CO_2

marcado se atrapó en hiamina y se cuantificó en un espectrómetro de centelleo líquido (5 g de PPO y 0.1 g de dimetil-POPOP) en 1,000 ml de tolueno.

Los datos que se presentan a continuación como resultados, son el promedio de por lo menos cinco experimentos, indicándose el error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de "t" con un nivel de probabilidad de 0.05.

III. - Resultados

La secuencia de resultados que se exponen a continuación, se debe al desarrollo de las siguientes consideraciones: en primera instancia se exploró el efecto de la adenosina en el cuadro de hígado esteático producido por tetracloruro de carbono; a continuación se valoró la acción de la adenosina en otra secuela característica de la intoxicación por tetracloruro de carbono, como es la necrosis celular. Con los resultados obtenidos hasta ese punto, se generó la necesidad de cuantificar uno de los fenómenos más tempranos de la intoxicación por tetracloruro de carbono como es la lipoperoxidación, así como evaluar la influencia de la adenosina en este parámetro y por último se realizó una exploración tendiente a determinar el mecanismo mediante el cual la adenosina afecta la actividad lipoperoxidativa generada por tetracloruro de carbono.

A).- Hígado graso.

El hígado graso es una entidad patológica que se caracteriza por un disturbio en la dinámica de lípidos corporales, que guía a una acumulación de triacilglicéridos en el órgano hepático; el hígado graso generado por tetracloruro de carbono es uno de los más severos, a continuación se reportan los efectos de la adenosina sobre la acumulación de triacilglicéridos en hígado, así como en la dinámica de lípidos de los animales infectados con el tóxico.

1. - Triacilglicéridos. - La administración de tetracloruro de carbono incrementa la cantidad de triacilglicéridos hepáticos (Figura 4), la administración simultánea de la adenosina aminora este efecto. La diferencia entre el grupo tratado con tetracloruro de carbono más salina y los animales tratados con tetracloruro de carbono más adenosina fue estadísticamente significativa a las 4, 6 y 8 horas de tratamiento. La adenosina sola no cambia el contenido hepático de triacilglicéridos.

2. - Dinámica de lípidos. - El incremento de triacilglicéridos generado por tetracloruro de carbono, implica un aumento en el aporte de ácidos grasos desde los tejidos periféricos, por lo que se exploró el posible efecto de la adenosina sobre este parámetro, ya que el nucleósido es un potente inhibidor de la lipólisis en tejido adiposo. Los resultados se presentan en la tabla 1. El tetracloruro de carbono incrementó los niveles de ácidos grasos circulantes 8 horas después de su administración, pero la adenosina fue incapaz de bloquear este efecto, a ese tiempo.

Otro posible mecanismo para prevenir el incremento de triacilglicéridos en hígado producido por tetracloruro de carbono, es incrementar la liberación de estas moléculas por el órgano hepático, por lo que se cuantificaron los niveles de triacilglicéridos séricos (Tabla 1). El tetracloruro de carbono impidió de una manera muy marcada (60%), la secreción de triacilglicéridos hepáticos, y

la adenosina, otra vez, no alteró esta acción del tóxico.

Se sabe que la adenosina inhibe el paso inicial del metabolismo de los ácidos grasos en el hígado, o sea, la formación del aciltioéster, por lo que se exploró la posibilidad de que el nucleósido pudiera afectar la captación o el metabolismo de estas moléculas. En la Tabla 2, se observa que el tetracloruro de carbono incrementa significativamente la captación de ácido palmítico marcado ($1-^{14}C$) por el hígado; la adenosina evitó este efecto una hora después de su aplicación, pero a tiempos posteriores fue difícil detectar esta acción. De manera consistente con la inhibición por la adenosina de la captación de ácidos grasos por el hígado, se observó que el nucleósido reduce significativamente la oxidación de los ácidos grasos, visto esto, como un dramático descenso en los niveles séricos de cuerpos cetónicos (Figura 5) (14).

La adenosina previene el hígado esteático o grado mediante un proceso que se sugiere como el de evitar la síntesis de triacilglicéridos, por su acción inhibitoria en la activación de los ácidos grasos, según los resultados de la Tabla 2 y la Figura 5 y basadas en la referencia 15.

B) Necrosis celular.

La muerte celular y la destrucción de la organización hepática que lleva consigo, es otro de los signos de una intoxicación aguda por tetracloruro de carbono. La disgregación celular que

produce este fenómeno, se refleja por un aumento en el torrente -- sanguíneo de una serie de metabolitos de localización estrictamente intracelular, los cuales sirven como parámetros para cuantificar este daño celular. En este sentido, es ya tradicional medir como índice de muerte celular y daño hepático, los niveles en sangre de dos enzimas con actividad de transaminasa, como son la transaminasa glutámico-pirúvica y la transaminasa glutámico-oxaloacética, por lo que en este estudio se evaluó este parámetro y la influencia que la adenosina ejerce en él.

Transaminasas. - La adenosina demostró ser eficaz en prevenir la necrosis hepatocelular inducida por el tetracloruro de carbono, durante las primeras 4 horas después del tratamiento. La necrosis celular se cuantificó con los niveles séricos de las enzimas, transaminasa glutámico-oxalacética y transaminasa glutámico-pirúvica, como se muestra en la figura 6. A tiempos tardíos los animales tratados con el hepatotóxico y el nucleósido presentan un aumento en los niveles de las transaminasas circulantes, pero siempre manteniéndose a un nivel inferior que el grupo de tetracloruro de carbono más solución salina.

La adenosina protege la integridad del hepatocito, evitando la necrosis, mediante un procedimiento paralelo a la reвенción del hígado graso, ya que existe una correlación evidente entre ambos eventos ($r = 0.997$ entre triacilglicéridos hepáticos y actividad de la

transaminasa glutámico-pirúvica y $r = 0.997$ entre triacilglicéridos y actividad de las transaminas glutámico-oxaloacética); por lo que la adenosina debe actuar durante la fase temprana de la intoxicación por tetracloruro de carbono.

C) Lipoperoxidación.

Uno de los efectos primarios en la infección aguda por tetracloruro de carbono, es un aumento en la actividad lipoperoxidativa. Este incremento se debe al ataque que efectúan los radicales libres, sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas del hepatocito; los radicales libres son producidos al escindirse homolíticamente la molécula de tetracloruro de carbono por acción del citocromo P-450 de localización microsomal. La lipoperoxidación generada de este modo es un proceso autocatalítico y, a la larga determina daños irreversibles en la célula hepática que se traducen en muerte celular. Los resultados de los incisos anteriores motivó explorar la acción de la adenosina sobre este parámetro.

1 - Lipoperoxidación basal. - La adenosina aminoró la lipoperoxidación endógena máxima inducida por tetracloruro de carbono, la cual se presenta a los 15 minutos de tratamiento (Figura 7). Se observó un pequeño, pero consistente incremento en la actividad lipoperoxidativa en los grupos controles, tratados con aceite vegetal y salina o adenosina, comparándolos con animales no tratados, pro-

bablemente como resultado del "stress" causado por el tratamiento (Figura 7).

2 - Lipoperoxidación suplementada. - Para explicar el efecto de la adenosina sobre la lipoperoxidación endógena estimulada por tetracloruro de carbono, se realizaron experimentos de lipoperoxidación suplementada, ensayando concentraciones crecientes de los siguientes cofactores: ADP, iones ferrosos y NADPH, observándose los siguientes resultados: en presencia del nucleótido ADP (figura 8), la actividad lipoperoxidativa no sufrió mayores cambios en ninguno de los grupos tratados; con los iones ferrosos (Figura 9), se registró un incremento constante en la lipoperoxidación, pero siendo este aumento similar en todos los grupos experimentales; con la coenzima NADPH (Figura 10), se logró reproducir el efecto protector de la adenosina sobre la actividad lipoperoxidativa a bajas concentraciones del piridín nucleótico, pero al incrementar la concentración del NADPH, el efecto protector se diluyó.

3 - Ciclo de las pentosas. - Un posible medio para incrementar los niveles de NADPH es la activación de la ruta metabólica conocida como ciclo de las pentosas, por lo cual se midió su actividad (Figura 11). El tetracloruro de carbono incrementó el ciclo de las pentosas a los 7.5 minutos de tratamiento de manera significativa, la adenosina previno esta acción, mientras que los otros grupos no mostraron cambio alguno durante 30 minutos.

La adenosina disminuye un evento clave de la intoxicación

ción por tetracloruro de carbono, como es la lipoperoxidación, tal vez, interfiriendo con el funcionamiento del sistema encargado del fraccionamiento del tetracloruro de carbono a radicales libres, que es el citocromo P-450 y compuestos asociados, el cual es dependiente de NADPH.

D) Ciclo del Glutatión.

Uno de los sistemas enzimáticos encargados del procesamiento de los peróxidos formados, fisiológicos o inducidos por el tetracloruro de carbono, es el del llamado ciclo del glutatión, el cual consta de dos enzimas, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y de un metabolito, el glutatión, que puede presentarse en su versión reducida u oxidada. Para que el ciclo del glutatión funcione, se requiere la presencia de NADPH. Por los resultados obtenidos al medir la actividad lipoperoxidativa se consideró conveniente caracterizar el ciclo del glutatión en el presente estudio.

1 - Glutatión reducido y oxidado.- El glutatión reducido (GSH) sufrió un decremento por la acción del tetracloruro de carbono a los 30 minutos de tratamiento, mientras que la adenosina evitó este efecto del tóxico (Figura 12). Los grupos controles no mostraron cambio alguno.

El glutatión oxidado (GSSG) evidenció un incremento promovido por el tetracloruro de carbono, mismo que fue prevenido por

la adenosina (Figura 13); de nuevo no se verificó cambio alguno en los grupos controles.

Los cambios en los niveles de glutatión, tanto reducido como oxidado, pueden ser mejor entendidos si se expresan como variaciones de la relación GSH/GSSG de los diferentes tratamientos en el tiempo. Al hacerlo (Figura 14), se ve que la única relación que varía es la que corresponde al tetracloruro de carbono, siendo el cambio principal a los 30 minutos de tratamiento.

2 - Glutatión peroxidasa y reductasa. - La glutatión peroxidasa (GSH-per) incrementó su actividad en el grupo de tetracloruro de carbono a los 30 minutos; la adenosina sólo previno parcialmente el efecto del tóxico (30%) y a los 60 minutos el grupo de tetracloruro de carbono más adenosina mostró una ligera elevación al compararlo con el grupo de tetracloruro de carbono más salina (Figura 15). La glutatión reductasa (GSSG-R), evidenció cambios únicamente con los animales del grupo de tetracloruro de carbono más adenosina, siendo éste un incremento de actividad a los 30 y 60 minutos de tratamiento (Figura 16).

La adenosina, en presencia de tetracloruro de carbono, es capaz de activar la enzima glutatión reductasa y de esa manera prevenir cambios en la relación GSH/GSSG, la cual es profundamente afectada por el incremento de actividad de la glutatión peroxidasa.

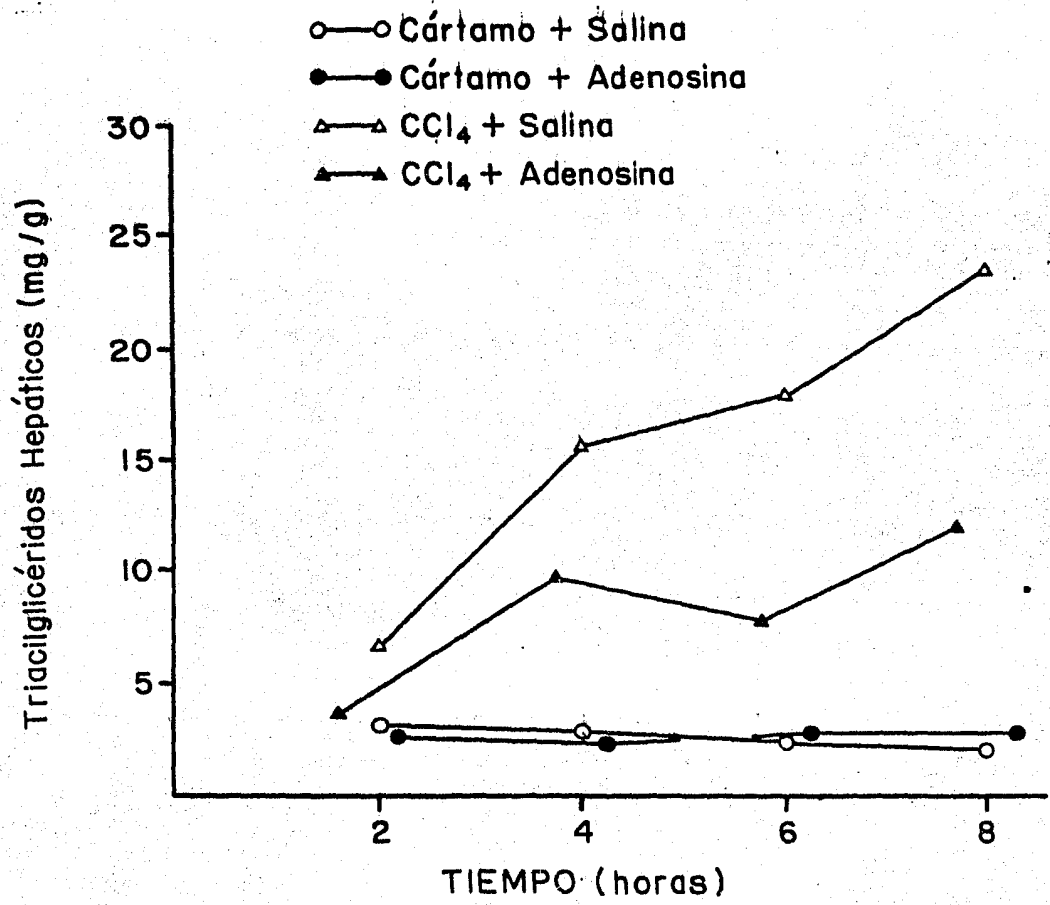


FIGURA No. 4

Tabla 1. Efecto del Tetracloruro de Carbono y Adenosina en los lípidos séricos.

Tratamiento	Tiempo (hrs)	Acidos grasos libres (% del control)	Triacilglicéridos (% del control)
Cártamo + salina	4	100-	100-
Cártamo + adenosina	4	86 ± 16	89 ± 5
CCl ₄ + salina	4	91 ± 12	75 ± 6 ^b
CCl ₄ + adenosina	4	86 ± 11	86 ± 4 ^b
Cártamo + salina	8	100-	100-
Cártamo + adenosina	8	93 ± 7	97 ± 8
CCl ₄ + salina	8	140 ± 13 ^a	54 ± 10 ^b
CCl ₄ + adenosina	9	124 ± 11	39 ± 5 ^b

Los valores controles fueron 444.1 ± 77.3 $\mu\text{mol/l}$ y 79.5 ± 2.4 $\text{mg}/100$ ml para ácidos grasos libres y triacilglicéridos respectivamente. Ninguna diferencia fue observada en los valores controles al comparar 4 y 8 horas. Los resultados mostrados son el promedio \pm error estándar de al menos 5 experimentos diferentes.

a_p 0.05 y b_p 0.02 contra el grupo control (cártamo + salina).

Tabla 2. Efecto del tetracloruro de carbono y adenosina en la incorporación de ($1-^{14}\text{C}$) palmitato en lípidos totales de hígado.

Tratamiento	cpm/g hígado (peso húmedo)	Actividad Específica (cpm/mg de lípido)
cártamo + salina	5109 \pm 382	233 \pm 34
cártamo + adenosina	5370 \pm 862	191 \pm 46
CCl_4 + salina	8678 \pm 793 ^a	267 \pm 19
CCl_4 + adenosina	5114 \pm 1059	171 \pm 34 ^b

Las determinaciones fueron hechas 1 hora después del tratamiento. Los resultados son expresados el promedio \pm error estándar de cinco experimentos independientes.

a_p 0.005 comparado a cártamo + salina

b_p 0.05 comparado a tetracloruro de carbono + salina.

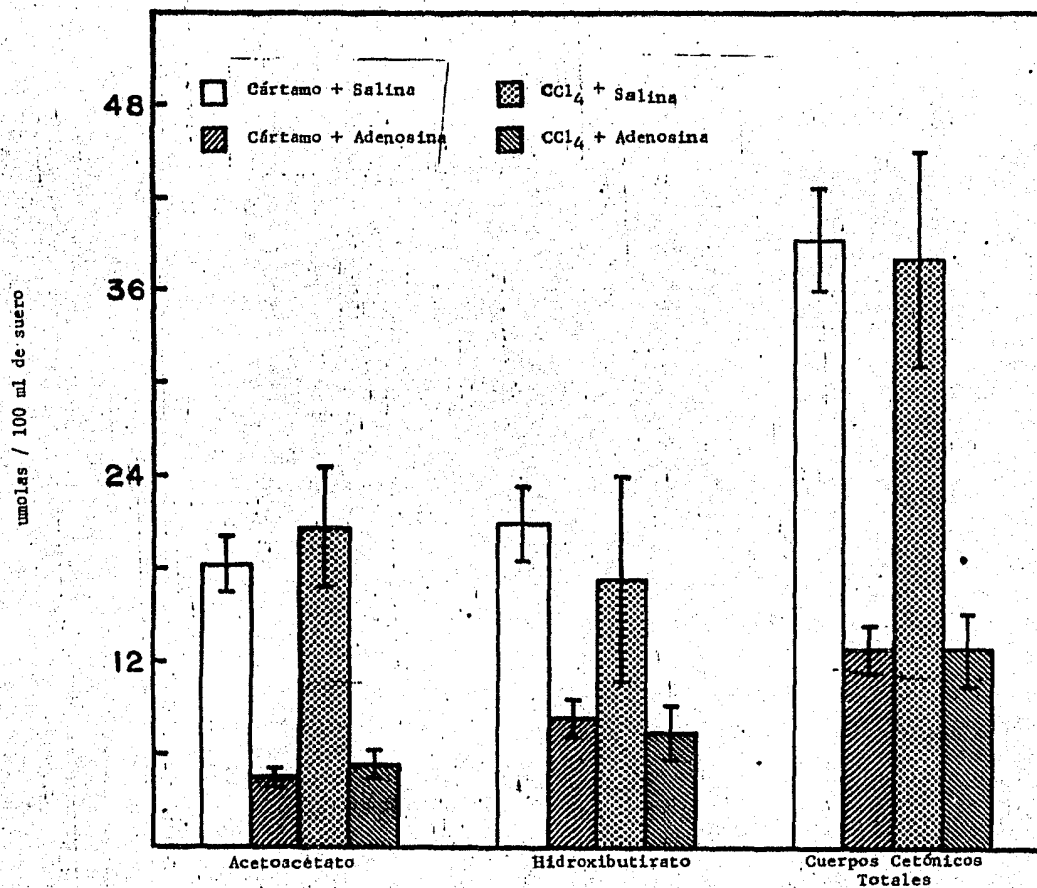
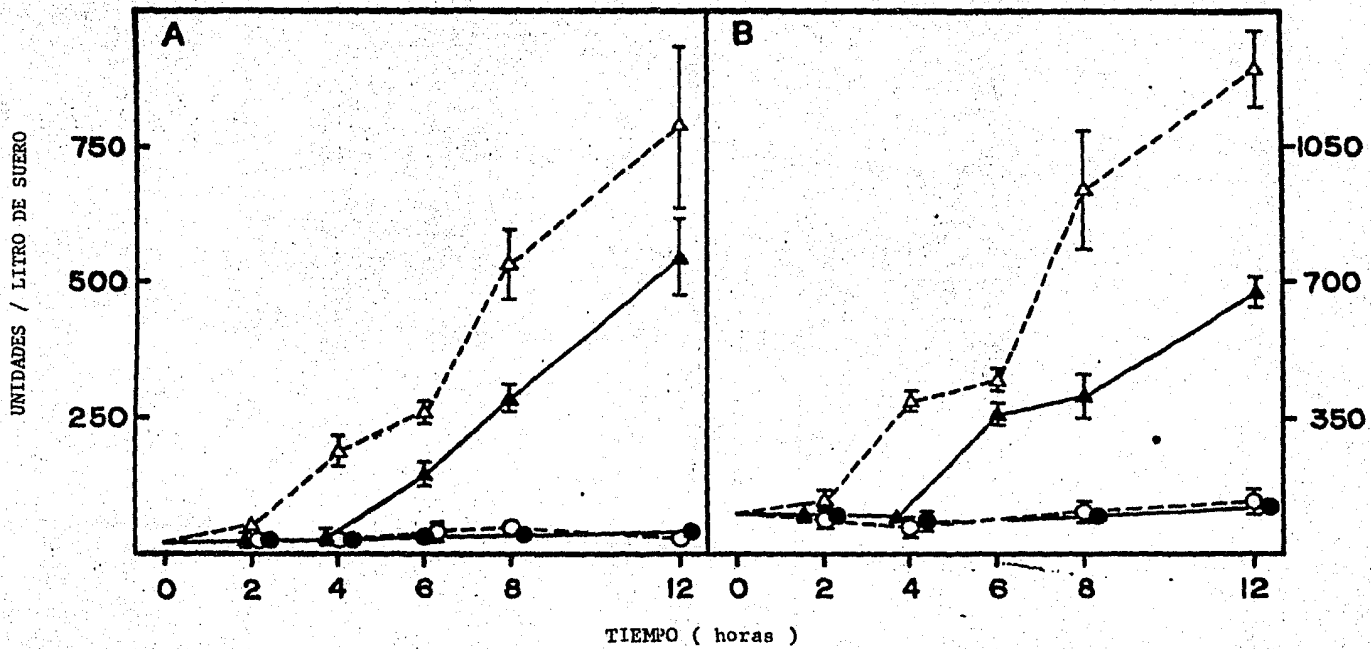


FIGURA No. 5



A.- Transaminasa Glutámico-Pirúvica

B.- Transaminasa Glutámico-Oxaloacética

FIGURA No. 6

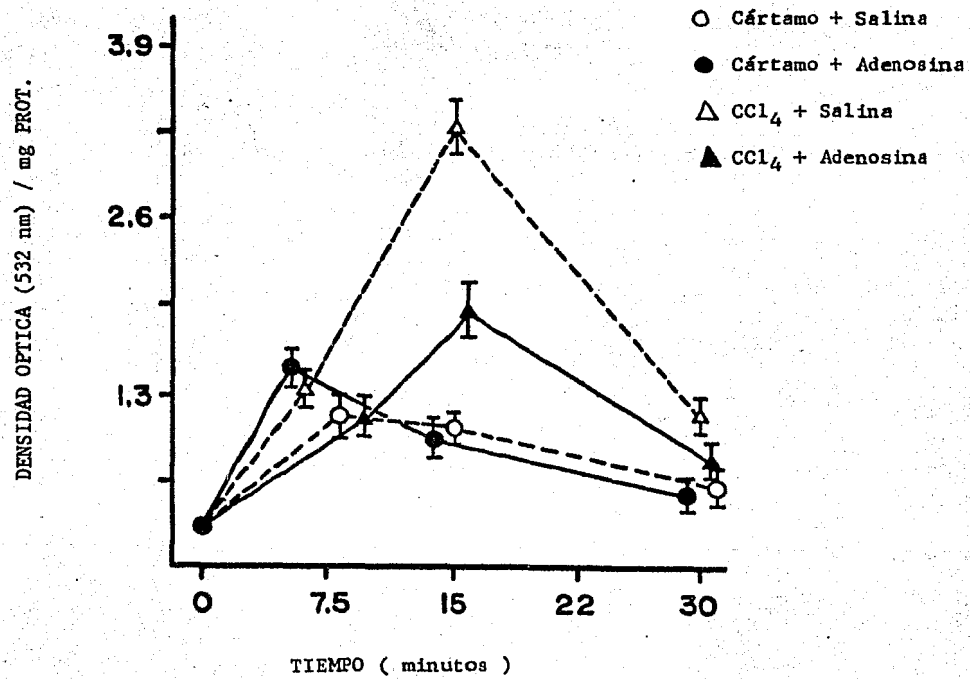


FIGURA No. 7

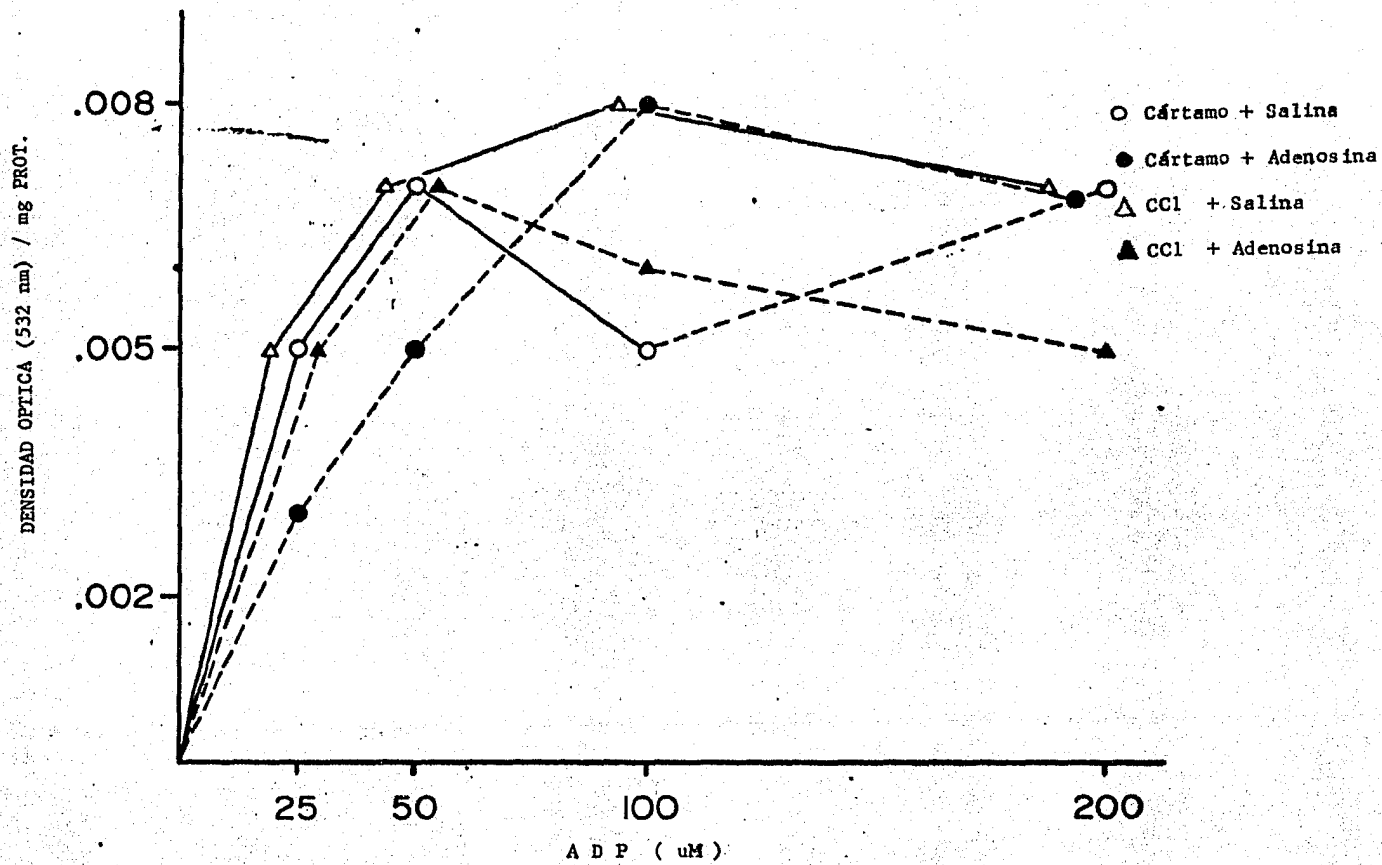


FIGURA No. 8

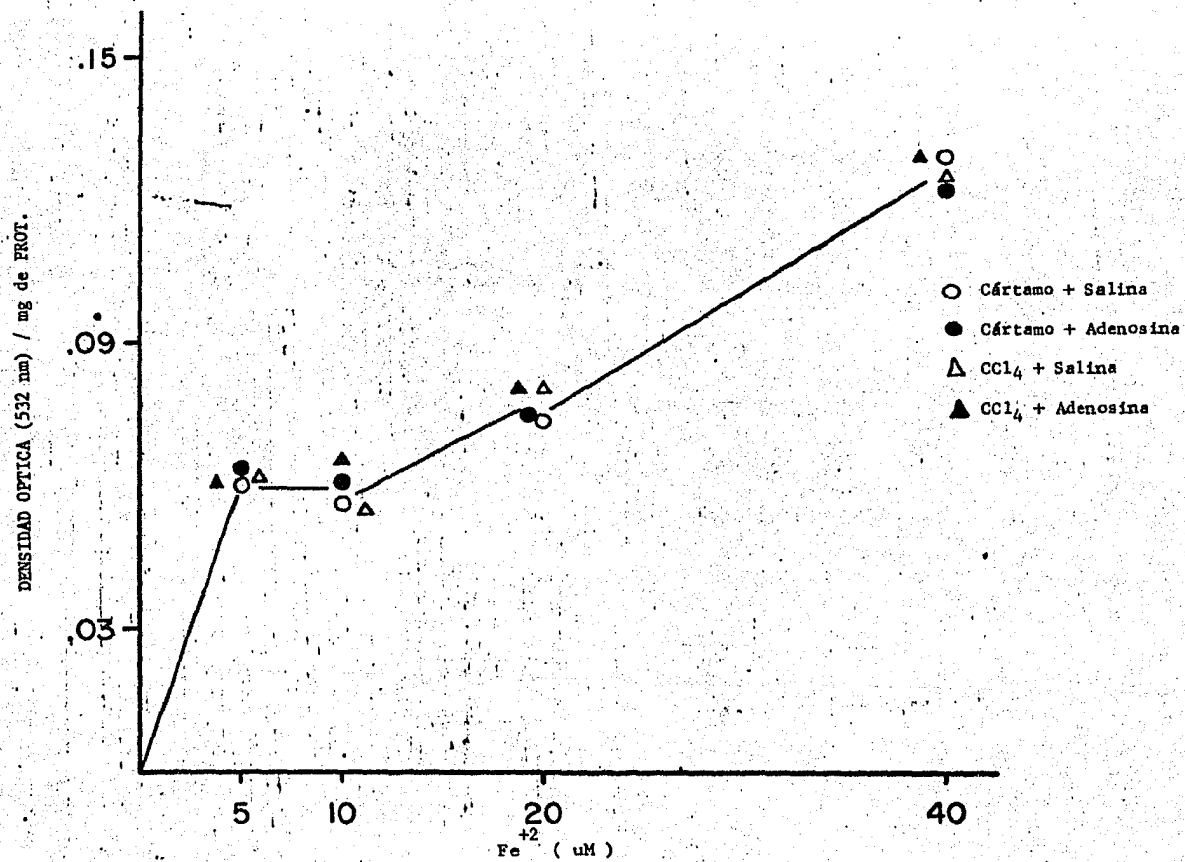


FIGURA No. 9

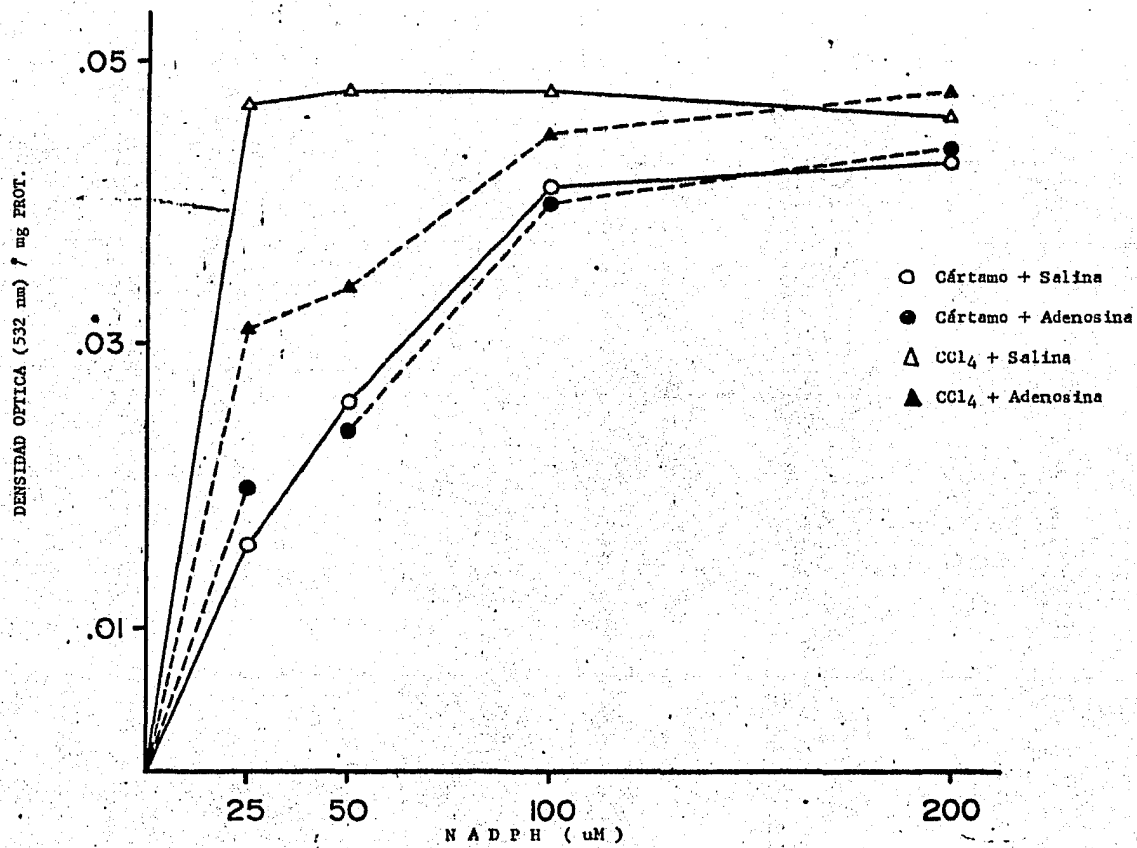


FIGURA No. 10

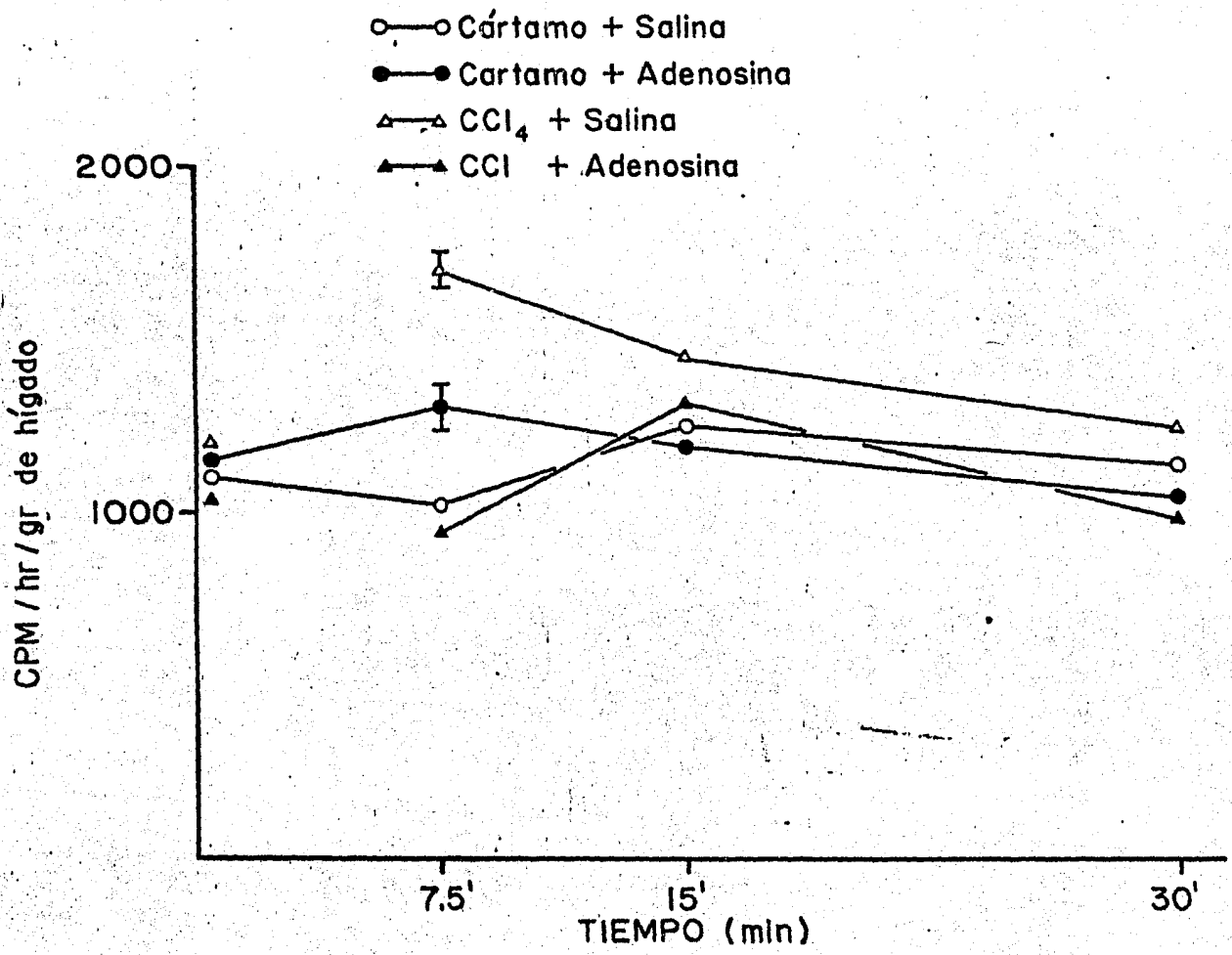


FIGURA No. 11

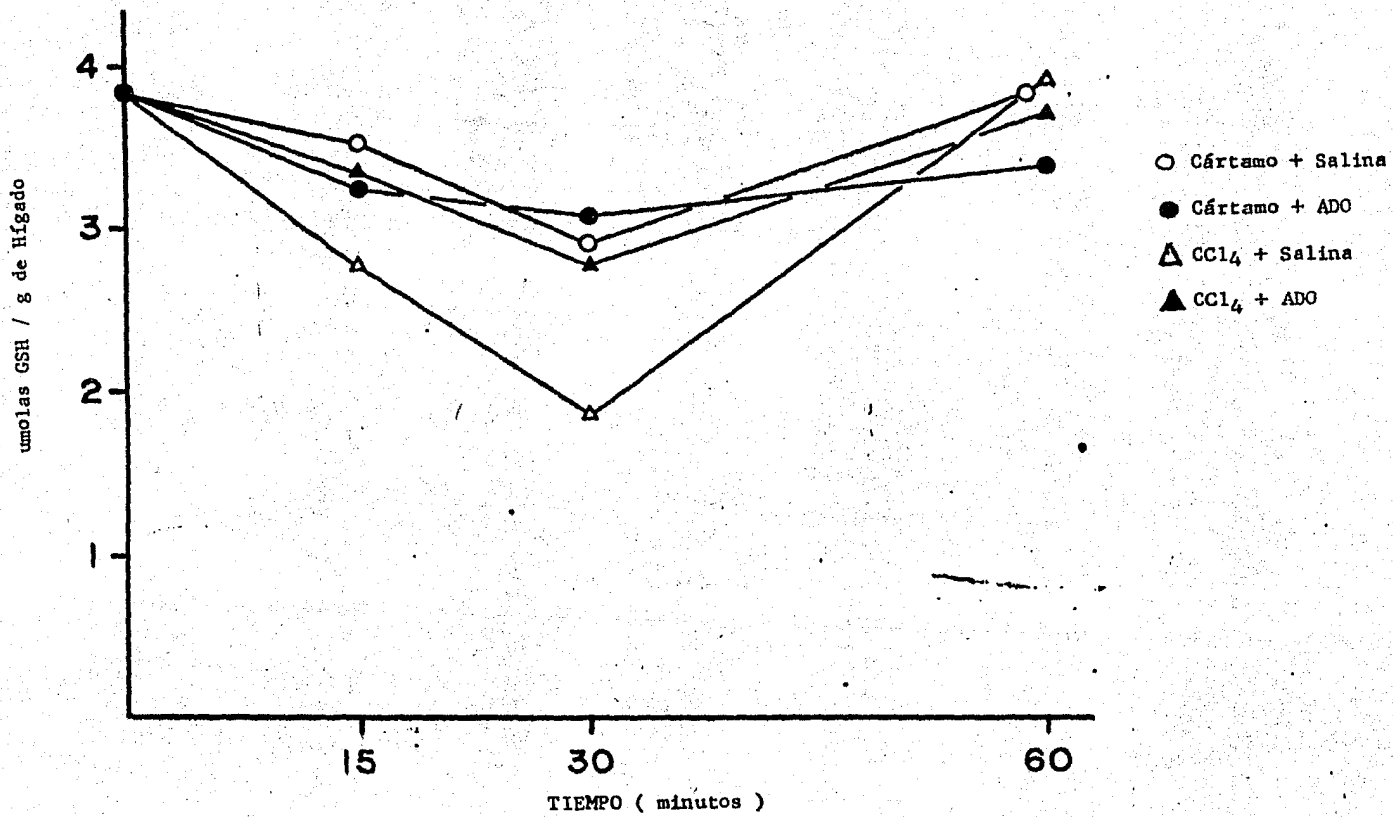


FIGURA No. 12

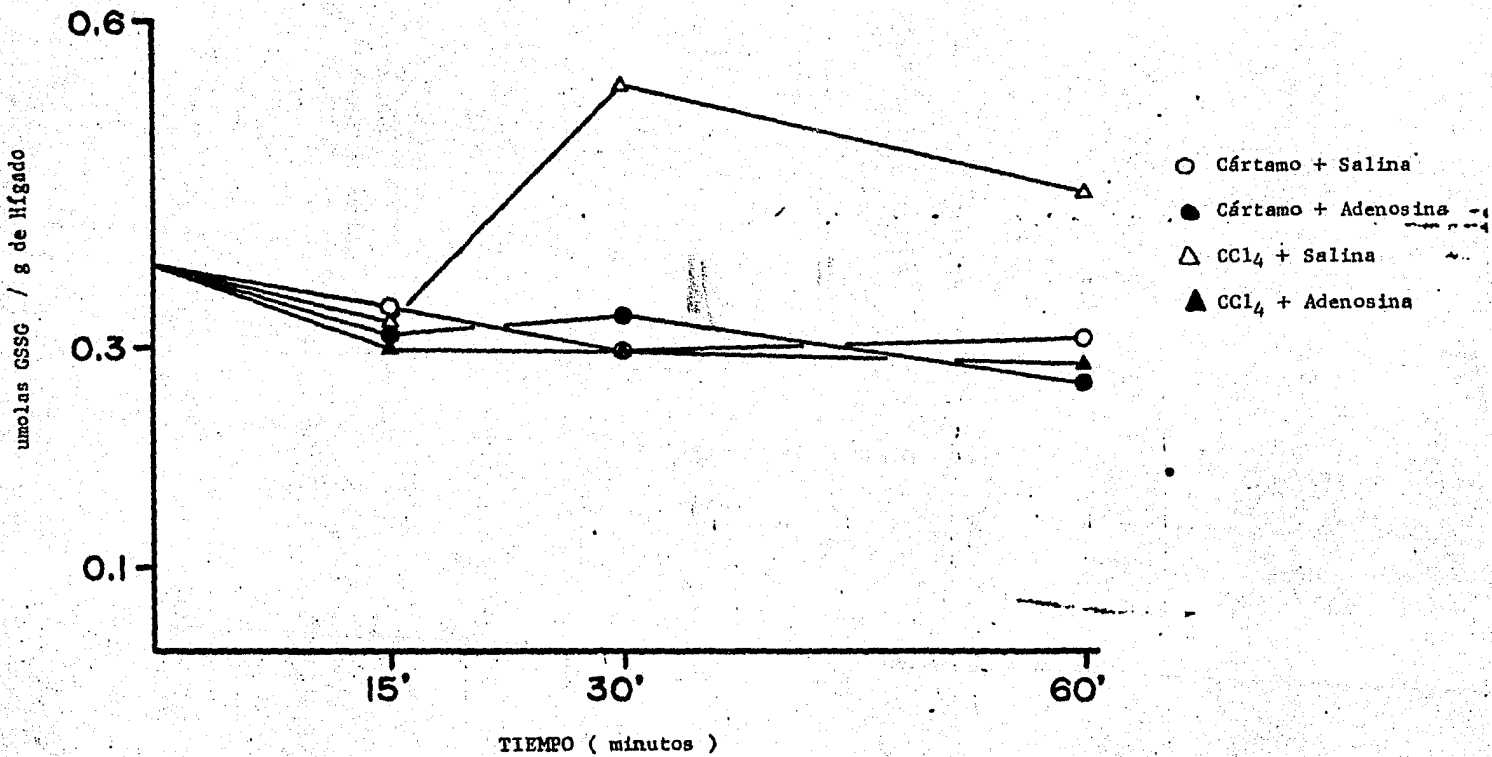


FIGURA No. 13

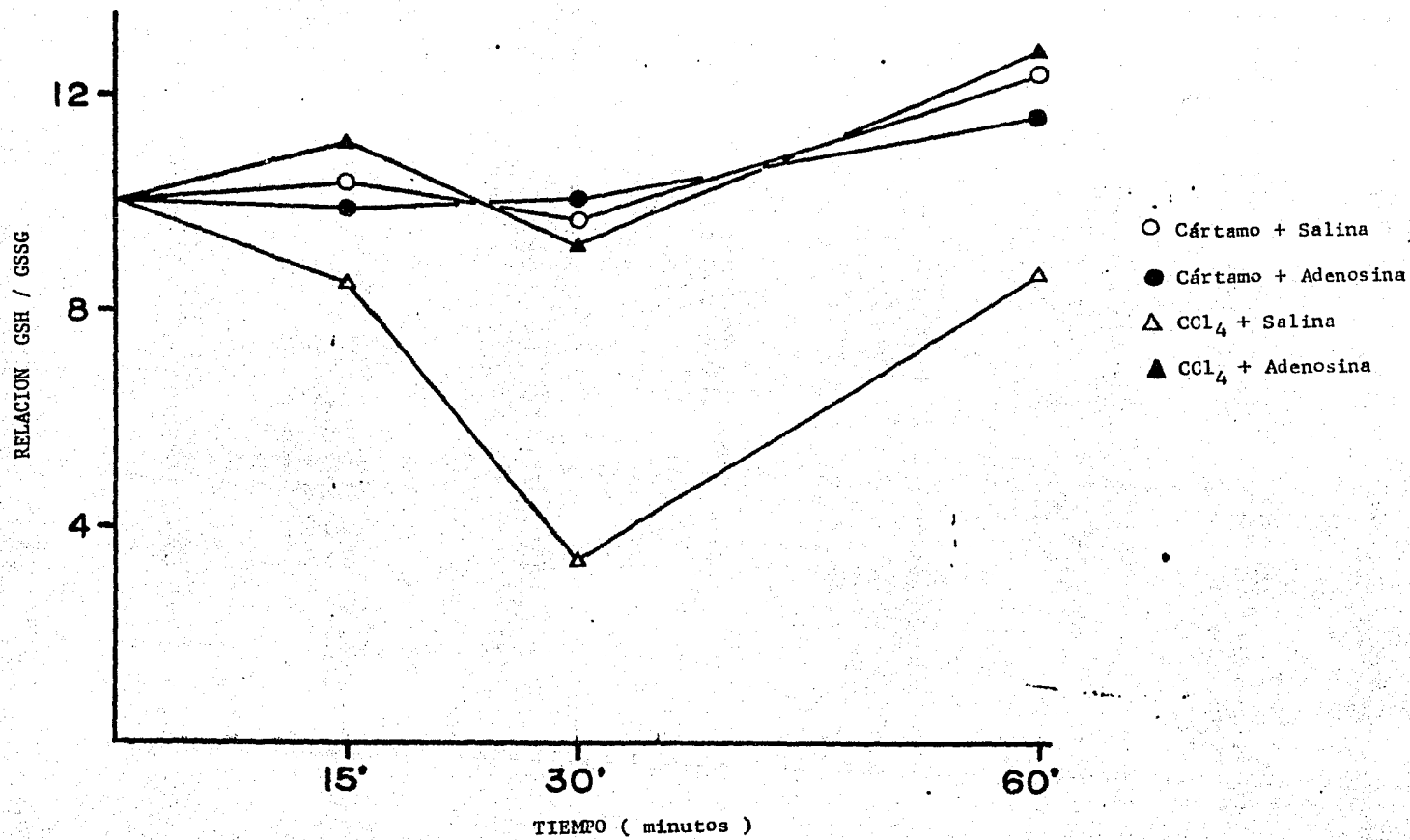


FIGURA No. 14

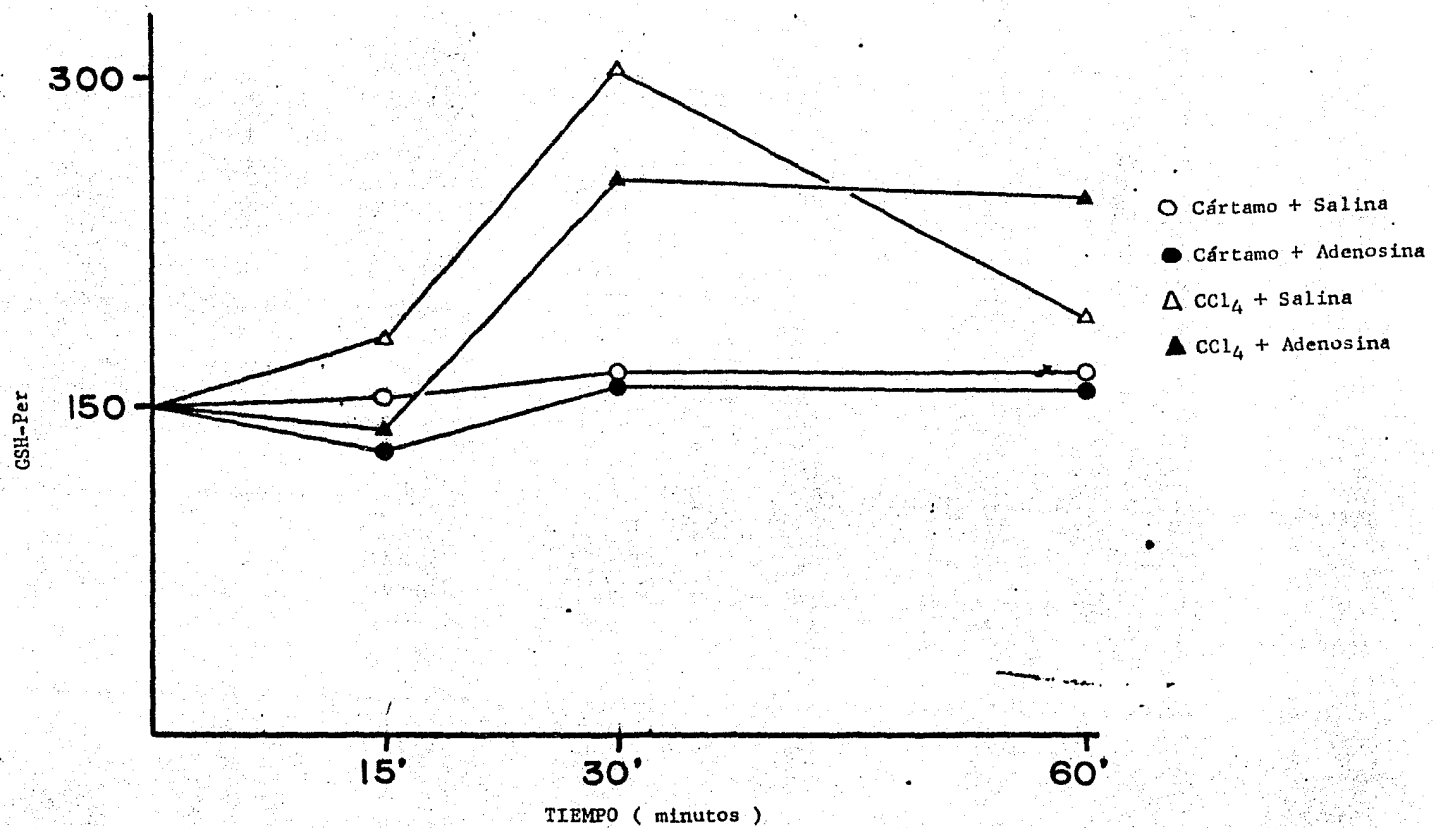


FIGURA No. 15

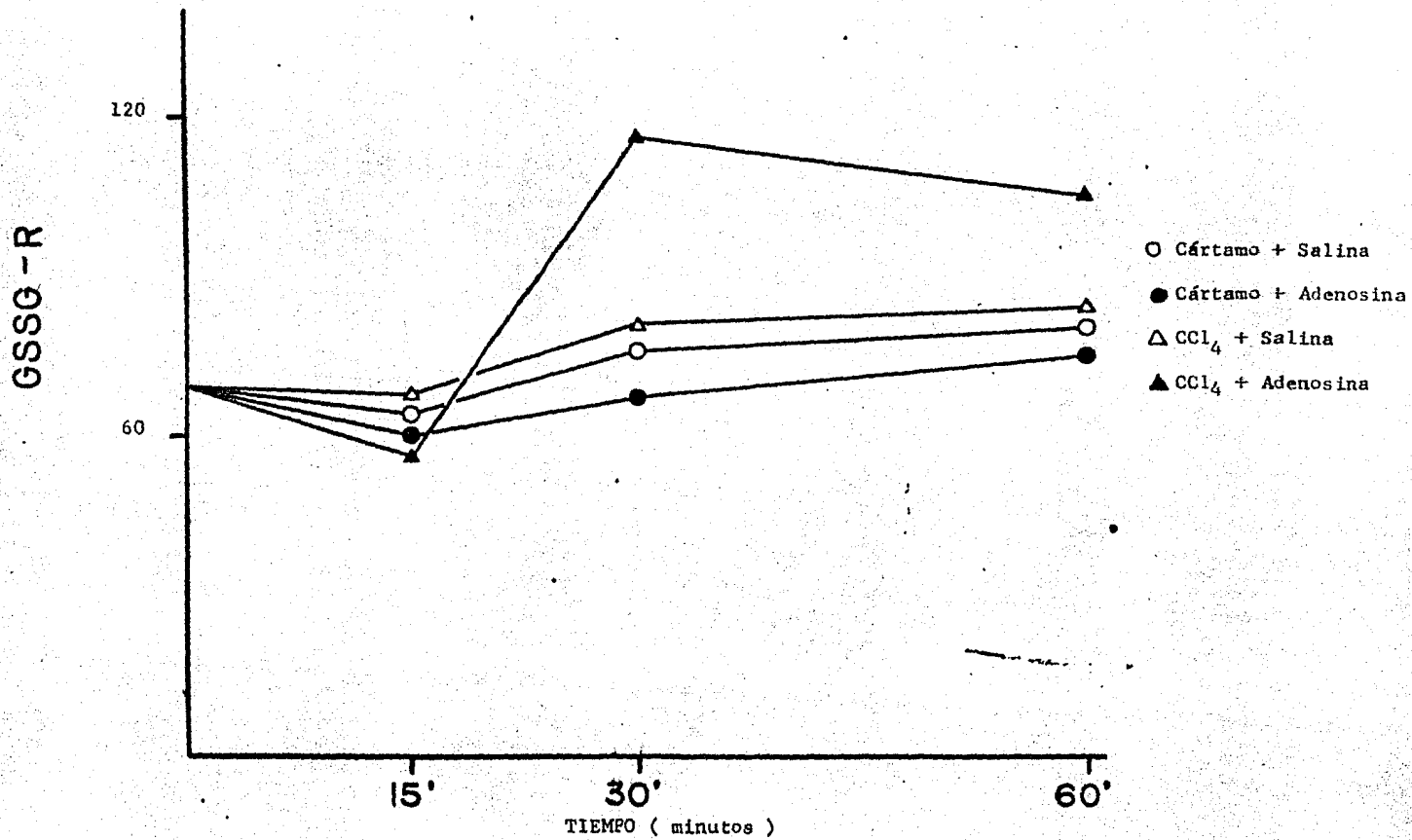


FIGURA No. 16

IV. Discusión

La discusión de los resultados obtenidos en esta investigación, se centrará en la acción de la adenosina sobre la hepatotoxicidad aguda producida por tetracloruro de carbono, siendo el objetivo de esta sección el esbozar la secuencia de eventos metabólicos que hacen posible la acción protectora del nucleósido.

Los efectos que produce la adenosina para evitar la acumulación de triacilglicéridos hepáticos (Figura 4), parecen ubicarse principalmente a nivel del metabolismo de los ácidos grasos, como lo sugieren los datos de lipemia, captación de palmitato radioactivo y los de cuerpos cetónicos séricos.

La adenosina evita el incremento en actividad lipolítica generada por el tetracloruro de carbono, pero sólo a tiempos largos, como indica la Tabla 1, aunque a tiempos cortos como 1 hora, disminuye la captación de ácido palmítico radioactivo, tanto las cuentas totales como la actividad específica (Tabla 2); estos resultados sugieren que el hígado graso producido por tetracloruro de carbono en ese tiempo, no se debe a un aporte incrementado de material lipídico de la periferia al órgano hepático, acepción que se ubicaría en el contexto de la teoría de las catecolaminas y nos sugiere que el efecto principal de la adenosina no es por una acción antilipolítica, sino a través de un efecto en el metabolismo de los ácidos grasos hepáticos, hecho que se confirma con los datos de niveles séri-

cos de cuerpos cetónicos (Figura 5); la baja concentración de estos metabolitos cuando el nucleósido está presente, sugieren fuertemente que la adenosina está impidiendo el proceso lipolítico hepático al evitar la activación de los ácidos grasos.

Es sabido que el tetracloruro de carbono impide la secreción de triacilglicéridos, acción que se confirma con los datos de triacilglicéridos séricos (Tabla 1), es interesante notar que la adenosina no modifica la acción del hepatotóxico, pero este hecho se explica al considerar que el nucleósido al impedir la activación de los ácidos grasos, evita su esterificación a triacilgliceroles, por lo que al no haber grasa en el hígado, ésta no se transporta a la sangre.

Si observamos el efecto de la adenosina en la implantación del hígado graso, salta a la vista que la acción del nucleósido es sólo parcial y transitoria, a diferencia de la prevención total que efectúa la adenosina en los cuadros generados por etionina y etanol (18,20); aún así el efecto principal por el que la adenosina alivia el hígado esteásico en los tres casos, parece radicar en su acción inhibidora de la tiocinasa que evita la formación de nuevas moléculas de triacilglicéridos. Al explorar la acción de la adenosina en el hígado graso y comprobarse que el nucleósido aminora este cuadro, se tuvo la inquietud de cuantificar otro símbolo patológico característico del daño hepático producido por tetracloruro de carbono, siendo este parámetro la necrosis celular. Los resultados al medir enzimas que

se escapan al suero cuando se rompe la célula, otra vez indican que la adenosina actúa retardando el efecto producido por el hepatotóxico (Figura 6).

En este estudio se encontró una correlación muy buena en el curso temporal de la adquisición de hígado graso y del proceso necrogénico, al comparar los niveles de triacilglicéridos hepáticos y los de transaminasas séricas (Figura 1 y 3); el coeficiente de correlación encontrado fue muy cercano a la unidad, presentándose la misma conducta en el grupo de tetracloruro de carbono más salina y en el de tetracloruro de carbono más adenosina. Este hecho nos sugiere que en el caso particular del tetracloruro de carbono ambas entidades patológicas, acumulación grasa y necrosis hepática, se desarrollan de manera paralela, pudiéndose pensar que un efecto temprano del tetracloruro de carbono las desencadena por igual y que, como la adenosina actúa sobre estos daños hepáticos de manera parecida, esto es, suprimiendo al principio y aminorando después, se sugiere fuertemente que el nucleósido posee una acción, total o parcial, sobre este parámetro de acción primaria del tetracloruro de carbono y que la literatura nos indica que es la lipoperoxidación.

En el presente trabajo, logramos reproducir el efecto del tetracloruro de carbono sobre la lipoperoxidación hepática (14), obteniendo un incremento importante a los 15 minutos de tratamiento (Figura 7), el resultado así obtenido correspondió a una lipoperoxidación

basal, sin cofactores, por lo que el contenido endógeno de cada uno de ellos, fue el paso limitante del proceso. La adenosina fue capaz de aminorar el incremento en la actividad lipoperoxidativa, por lo que se continuó el estudio tratando de averiguar por qué medio estaba el nucleósido impidiendo esta acción.

Los experimentos de lipoperoxidación suplementada, mostraron que el nucleótido ADP no influyó, en nuestras condiciones, en la actividad lipoperoxidativa, probablemente por haber utilizado homogenado de tejido en vez de tejido íntegro (Figura 8); los iones ferrosos indujeron un incremento lineal de la actividad lipoperoxidativa (Figura 9), esta conducta fue similar en todos los grupos, lo que significa que la relación de ácidos grasos saturados e insaturados, no se vio afectada por ninguno de los tratamientos. Al ensayar el último cofactor, la coenzima NADPH se observó que se reproducía el efecto de la adenosina a bajas concentraciones de NADPH y que al incrementarlas el efecto del nucleósido desaparecía (Figura 10). Esto parece sugerir que la diferencia en la capacidad lipoperoxidativa entre el grupo de tetracloruro de carbono más salina y del de tetracloruro de carbono más adenosina, reside en una disponibilidad de la coenzima NADPH, que como se dijo es indispensable para la activación del citocromo P-450.

Este dato nos impulsó a explorar un posible efecto del tetracloruro de carbono, sobre el ciclo de las pentosas, que pudiera

explicar los resultados obtenidos al medir la actividad lipoperoxidativa. Los resultados obtenidos indican que el hepatotóxico promovió un incremento en la actividad del ciclo de las pentosas a los 7.5 minutos de tratamiento, no presentándose esta conducta en los animales tratados con el nucleósido (Figura 11). Este efecto del tetracloruro de carbono no es fácil de explicar, pero los reportes en la literatura indican que el ciclo de las pentosas se regula principalmente a nivel de la deshidrogenasa de la glucosa 6 fosfato y que los metabolitos alostéricos de esta enzima son, hasta ahora, el AMP y el glutatión oxidado (34).

Con los datos presentados no es posible determinar con certeza la relación causa-efecto de los procesos lipoperoxidativos y del aumento del ciclo de las pentosas, por lo que tampoco podemos concluir con seguridad si la acción primaria de la adenosina es a través de no permitir un incremento en el ciclo de las pentosas o prevenir la actividad lipoperoxidativa generada por el tetracloruro de carbono. Aunque se puede aventurar que el tetracloruro de carbono ejercería su efecto sobre el ciclo de las pentosas, al aumentar los niveles de glutatión oxidado por acciones que revisaremos posteriormente; por ahora sólo diremos que el incremento en la actividad del ciclo de las pentosas, promovido por el tetracloruro de carbono sugiere que es la fuente de NADPH, cofactor que demostró ser el paso limitante en la actividad lipoperoxidativa, al ac-

tivar al sistema del citocromo p-450. La adenosina al omitir el aumento en el ciclo de las pentosas, evita los niveles incrementados de la coenzima y así la lipoperoxidación resultante sólo se debe a los niveles basales del NADPH. El resultado final es un decremento en la lipoperoxidación generada por el tetracloruro de carbono, por parte de la adenosina que podría explicar el efecto protector del nucleósido sobre la necrosis hepática y el hígado graso de la siguiente manera:

El proceso de necrosis o muerte celular se produce por una pérdida en la estructura de las membranas del hepatocito, esta deficiencia en la integridad celular es debida al proceso de lipoperoxidación, el cual disgrega el ordenamiento de los fosfolípidos de los sistemas membranosos celulares; este daño en los componentes lipídicos de la membrana repercute también en las proteínas intrínsecas de membrana, las cuales pierden su funcionamiento al ver alterados sus grupos prostéticos; esta pérdida en la estructura y funcionamiento celular lleva a la muerte del hepatocito, que al destruir se libera, entre otras muchas cosas, las ya mencionadas enzimas de escape. La adenosina al aminorar la actividad lipoperoxidativa retarda los procesos necrogénicos, explicando así los resultados de la figura 3.

Como vimos, el hígado graso generado por la administración de tetracloruro de carbono, se caracteriza principalmente por

impedir la salida de los triacilglicéridos del órgano hepático (Tabla 1).

Se puede entender la forma en que el tetracloruro de carbono está afectando el proceso entero al incrementar la actividad lipoperoxidativa en el hepatocito y de esa manera atentar contra las endomembranas del mismo, impidiendo por un lado la formación de las lipoproteínas y además evitando la secreción de las mismas al desorganizar el aparato de Golgi. La adenosina alivia el cuadro de hígado esteático, impidiendo la activación de los ácidos grasos, como ya revisamos, pero además al aminorar la lipoperoxidación, preserva las estructuras celulares que serían afectadas por el hepatotóxico. Aunque la adenosina no incrementa o normaliza los niveles de triacilglicéridos séricos (Tabla 1), esto se debe a que no se forman dichas moléculas, y además, los cortes histológicos demuestran que la estructura e integridad del hepatocito se preservan contra el ataque del tetracloruro de carbono, gracias a la administración del nucleósido. (Datos no mostrados).

En esta investigación, se ha puesto de manifiesto la importancia de la disponibilidad de la coenzima NADPH, por lo que además del estudio del ciclo de las pentosas, se hizo necesario caracterizar el ciclo del glutatión, el cual afecta la relación NADP/NADPH y procesa los peróxidos celulares. Los resultados muestran que el tetracloruro de carbono afecta significativamente la relación

GSH/GSSG (Figura 14), a expensas de una reducción en el tripéptido reducido (Figura 12) y un aumento en el oxidado (Figura 13), mientras que el nucleósido evita estos efectos. Las variaciones de la glutatión, tanto reducido como oxidado, promovidas por el tetracloruro de carbono, correlacionan con el aumento en actividad de la glutatión peroxidasa generada por el hepatotóxico (Figura 15); la adenosina no evita el efecto del tetracloruro sobre la glutatión peroxidasa, ya que se presenta cierto aumento en la actividad de esa enzima, pero la relación GSH/GSSG se mantiene estable, ya que el nucleósido produce un incremento en la actividad de la glutatión reductasa (Figura 16), hecho que compensa el efecto de la enzima anterior y que no se presenta en el grupo tratado con tetracloruro de carbono.

Los resultados anteriores sugieren que los peróxidos generados por el tetracloruro de carbono, se presentan en cantidades similares en ambos grupos, aunque no se puede comprobar esta sugerencia, ya que la GSH-per se satura a bajas concentraciones; por otro lado, la actividad incrementada de la glutatión reductasa en el grupo de tetracloruro de carbono más salina, contribuiría a movilizar la coenzima NADPH a la forma oxidada y de esa manera coadyuvar a una disminución en el aporte de esa coenzima al sistema de transporte de electrones microsomal, lo que impediría el funcionamiento del citocromo P-450.

El proyecto desarrollado en este trabajo se continuará con exploraciones más detalladas de la acción de la adenosina sobre el metabolismo del tetracloruro de carbono, para lo cual se administrará esta sustancia marcada radioactivamente y se cuantificará su incorporación a diferentes fracciones hepáticas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; el tetracloruro de carbono incorporado, será el que haya sufrido la escisión homolítica del citocromo P-450 y éste actuaría como radical libre, lo que nos indicará si el nucleósidó está previniendo la generación de los peróxidos o promoviendo su degradación más rápidamente.

V. REFERENCIAS.

1. Bhagavan, N.V. (1974). Biochemistry. Cap. 5, Edt. J.B. Lippincott, U.S.A.
2. Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. Pharmacol. Rev. 24:509-581.
3. Haulica, I. (1973). Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine. Neurochem J. 21:701-702.
4. Fox, Irving, H. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 47:655-686.
5. Berne, R., Rall, T. and Rubio, R. (1983) Regulatory function of adenosine. Martinus Nijhoff Publishers. U.S.A.
6. Campbell, I. (1982). Effects of adenosine on the rat islet function and metabolism. Biochem. J. 204, 689-696.
7. Kefeli, V.I. (1978) Natural plant growth inhibitors and phytohormones The Huger Pub. U.S.A.
8. Chagoya de Sánchez, V. et al (1978). Efecto de la adenosina sobre el hígado graso producido por diversos hepatotóxicos. Temas bioquímicos de actualidad. U.N.A.M.
9. Chagoya de Sánchez, V. et al (1972) Brunner A. and Piña E. In vivo modification of the energy charge in the liver cell. B.B. Res. Comm. 46 (3): 1441-1445.
10. Chagoya de Sánchez, V. et al (1974) Brunner and Piña E. Utili-

zation of Adenosine as a tool in studies on the Regulation of liver glycogen biosynthesis Archives of Biochemistry and Biophysics. 160:145-150.

11. Chagoya de Sánchez V. y Piña, E. (1972) Adenosine, a glucogenic and lipogenic compound. FEBS Letters. 19 (4):331-334.
12. Chagoya de Sánchez, V. (1972) Eight FEBS Meeting, Amsterdam.
13. Chagoya de Sánchez, V. (1972) Effect of Adenosine in the incorporation of Palmitic Acid. Biochem. Pharmacol. 20:346-351.
14. Dale, V.P. and Munneth, H. (1962). Antilipoytic Action of Adenosine In vitro. J. Biol. Chem. 237:2758-2765.
15. Chagoya de Sánchez, V. Alvarez P, Jiménez B, Villalobos R. and Piña E. (1977) Regulation of Fatty Acid Oxidation by Adenosine at the level of its extramitochondrial Activation. Vol. 76. No. 3. Biochem Biophys Res. Comm. 76 (3):804-810.
16. Harris, R.A. Brend, K. and Heingberg M. (1976) Adenosine produces a dismitunion of Tryacylglyceroles hepatics production Lipids. 10 (2):673-681.
17. Farber, E. (1964). Prevention of Fatty liver by administration of adenosine triphosphate. Nature. 203 (34): 781-786.
18. García-Sáinz, J.A. (1979) Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide. Biochem. Pharmacol. 28:1409-1413.
19. García-Sáinz. A. Datos no publicados. Comunicación Personal.
20. Hernández, R. (1978). On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. Archives of Bio-

chemistry and Biophysics. 190 (1): 155-160.

21. Recknagel, R. (1967). Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity
Pharmac Review. 19:145-207.
22. Slatter, T.F. (1975). The role of lipid peroxidation in liver
injury. Ed. D. Keppler. Univ. Park Press. Baltimore. U.S.A.
23. Oshino, N. (1977). Properties of GSH release observed during
reduction of organic hidroperoxide, dimethylation of aminopyri
ne and oxidation of some substance in perfused rat liver. Bio
chem. J. 162: 509-525.
24. Recknagel, R. (1960). Studies of biochemical changes in sub-
cellular particles of rat liver and the relationship to a new
hypothesis regarding the pathogenesis of CCl_4 fat accumula---
tion. J. Biochem. Chem. 236: 1172-1179.
25. Buttler, W.M. (1961). The directic-determination of liver-try
glycerides. 2 (1): 95-96.
26. Dole, V.P. (1960). Method for the determination of free fatty
acids, J. Biol. Chem. 235: 2595-2599.
27. Williamson, D.H. (1965). Methods in Enzimatic Analysis. Ed.
H. U. Bergmeyer. Academic Press. U. S. A.
28. Folch, J. Lees M. and Sloanes G. H. (1957) A simple method
for preparation of total pure lipid-extracts from brain. J. Biol.
Chem. 226: 497-502.
29. - Reitman, S. (1956). A colorimetric method for the determina--

- tion of serum glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Path. 28:36-42.
30. Hunter, F. E. Sato, I. and Davson J. (1963). CCl₄-induced lipoperoxidation of rat liver microsomes in vitro J. Biol. Chem. 238:828-839.
 31. Klotzsch, H. (1965). Methods in Enzymatic Analysis. Ed. H. U. Bergmeyer. Academic Press. U. S. A.
 32. Bumbry, A. (1979) Glutathione peroxidase in erythrocytes. Biochem. Biophys. Acta. 25 (3): 234-239.
 33. Gumaa; K.A. (1969). The activity of the pentose phosphate pathway in several tissues. Biochem. J. 115:1009-1014.
 34. Eggleston, LV. and Krebs, H.A. (1974) Regulation of Pentose Phosphate Cycle. Biochem. J. 128:425-435.