



00361 12
2 ef

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE
INDUCCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA POR LA
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE
TETRACLORURO DE CARBONO. PAPEL DE LA
LIPOPEROXIDACIÓN Y LOS RADICALES LIBRES.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)
P R E S E N T A
MARÍA VERÓNICA LÓPEZ VALENCIA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA Y HAZAS

MÉXICO, D.F.

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNAM, BAJO LA ASESORÍA DE LA INVESTIGADORA EMÉRITA DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ Y DEL DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ COMO COASESOR.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez porque fue el motor principal de este trabajo y gracias a su constante apoyo, entusiasmo y conocimiento me impulsó a llegar al final de este proyecto.

- Al Dr. Rolando Hernández Muñoz porque siempre tuvo la paciencia necesaria para asesorarme y me brindó un incondicional apoyo

- Al Lic. en Nutrición Fernando Lopez Barrera por su invaluable amistad, ayuda y asesoría técnica.

- A la Bióloga Susana Vidrio que fue compañera y amiga.

- Al Sr. Marco Antonio Gallardo por su valiosa colaboración.

- Finalmente quiero agradecer a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo económico recibido

A MIS PADRES.

POR QUE HAN TENIDO LA PACIENCIA Y EL AMOR SUFICIENTES PARA AYUDARME Y ESTAR PRESENTES EN TODOS LOS MOMENTOS IMPORTANTES QUE HE TENIDO.

A ABRAHAM:

CON PROFUNDO AMOR, RESPETO Y ADMIRACIÓN POR QUE HA SABIDO LUCHAR CON ENTEREZA, Y HA PESAR DE SU CORTA EDAD NOS HA ENSEÑADO QUE EL HOMBRE NO NECESITA SER ADULTO PARA SER MADURO.

A CESAR:

POR QUE ES MI MÁS HERMOSO LOGRO Y POR QUE SU GESTACIÓN INICIO JUNTO CON ESTE TRABAJO Y AHORA TENGO AMBOS FRUTOS EN MIS MANOS.

A ARTURO:

MI CONFIDENTE, MI AMIGO, MI ESPOSO. POR QUE CON SU AMOR HA SABIDO MATIZAR EL CLARO - OSCURO DE VIVIDOS COLORES POR QUE DETRAZ DE MI SIEMPRE ESTA. POR QUE CON PACIENCIA Y COMPRENSION ME IMPULSA A CONTINUAR EL CAMINO TRAZADO Y POR QUE JUNIOS CAMINAMOS EL SENDERO DE LA VIDA

Indice

| | |
|--|----|
| RESÚMEN | 13 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| CIRROSIS | |
| CARACTERISTICAS NORMALES DEL TEJIDO HEPÁTICO Y CAMBIOS SUFRIDOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA CIRROSIS | |
| INDUCCIÓN DE CIRROSIS A NIVEL EXPERIMENTAL | |
| MECANISMOS DE ACCIÓN DEL TETRACLORURO DE CARBONO | |
| EFFECTO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN Y LOS RADICALES LIBRES SOBRE DIVERSOS TIPOS DE SUBSTRATOS | |
| SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES | |
| DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y SISTEMAS DE REPARACIÓN | |
| EFFECTO DEL TETRACLORURO DE CARBONO SOBRE EL CONTENIDO DE COLÁGENA EN EL TEJIDO HEPÁTICO | |
| ADENOSINA: ESTUDIO SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN | |
| HIPÓTESIS | 32 |
| OBJETIVOS | |
| <i>Validación del Modelo experimental</i> | |
| <i>Estudiar el papel que juegan los radicales libres en la evolución de la cirrosis experimental inducida con tetracloruro de carbono.</i> | |
| <i>Determinar que importancia tuvo la administración de la adenosina como un agente hepatoprotector</i> | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| MANEJO DE LOS ANIMALES | |
| OBTENCIÓN DE REACTIVOS | |
| DETERMINACIONES EXPERIMENTALES | |
| METODOLOGIA | |
| RESULTADOS | 37 |
| CARACTERIZACION HISTOLOGICA | |
| ANALISIS MORFOLOGICO | |
| CUANTIFICACION DE COLÁGENA | |
| LIPOPEROXIDACION | |
| QUIMIOLUMINISCENCIA | |
| SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES | |
| DISCUSIÓN | 62 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| CCl ₄ | Tetracloruro de Carbono |
| CCl ₃ · | Triclorometil |
| EDTA | Acido etilen diamino tetracético |
| NADPH | Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido |
| CCl ₃ OO· | Triclorometil-peroxiradical |
| OH· | Radical hidroxilo |
| ROO· | Peroxiradical |
| PUFAS | Acidos grasos poliinsaturados |
| MDA | Malondialdehído |
| ROS | Especies oxígeno reactivas |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| Cu | Cobre |
| Zn | Zinc |
| Mn | Manganeso |
| GSH-Per. | Glutación peroxidasa |
| GSSG-Red | Glutación reductasa |
| GSH | Glutation reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| DNA | Acido desoxiribonucléico |
| ADO | Adenosina |
| ADP | Adenosin difosfato |
| HCl | Acido clorhídrico |
| TBA | Acido tiobarbitúrico |
| KCl | Cloruro de potasio |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato dibásico de potasio |
| CoCl ₂ | Cloruro de cobalto |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sodio |
| CuSO ₄ | Sulfato de cobre |
| NaN ₃ | Azida de sodio |

RESUMEN

La administración crónica del CCl_4 en periodos de tiempo que van de dos a cuatro meses induce un proceso fibrogénico. Este proceso puede ser reversible en la primera etapa, pero en la segunda fase se genera un cuadro de cirrosis irreversible muy semejante al observado en los humanos. Uno de los mecanismos más aceptados para explicar el efecto tóxico del CCl_4 sobre el tejido hepático es el relacionado con la presencia de radicales libres, los cuales son generados durante el metabolismo de este agente tóxico en el retículo endoplásmico liso. La existencia de una relación entre la formación de radicales libres producidos durante el proceso metabólico del CCl_4 y el desarrollo fibrogénico, nos indujo a estudiar el papel que juegan en el proceso lipoperoxidativo del tejido hepático.

Utilizando como fundamento de este trabajo los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio en donde se determinó el papel de la adenosina como agente hepatoprotector, decidimos trabajar con diferentes grupos experimentales a los cuales se les administró de manera conjunta CCl_4 y/o adenosina. Esto permitió reforzar el conocimiento que se tenía del importante papel antifibrogénico que desarrolla.

En la primera fase de este trabajo se validó la utilización del modelo de inducción de cirrosis con CCl_4 . Para tal efecto se realizó un análisis a nivel histológico y otro de cuantificación de colágena a diferentes muestras obtenidas del tejido hepático de los animales experimentales. La segunda etapa consistió en valorar la generación y efecto de los radicales libres, al determinar los índices de lipoperoxidación y quimioluminiscencia en muestras de homogenado así como en diferentes fracciones subcelulares.

En esta misma fase también se midieron los parámetros del "ciclo del glutatión", tales como niveles de glutatión oxidado y reducido, la actividad de enzimas como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y el índice de "estres oxidativo", debido a que forman parte importante de las defensas antioxidantes presentes en el tejido hepático.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten decir que los animales tratados con CCl_4 mostraron un alto índice de "estres oxidativo" para ambos periodos del tratamiento (4 y 8 semanas). En los animales tratados con CCl_4 -ADO se observó claramente que los valores registrados para este parámetro fueron inferiores

En lo referente a la lipoperoxidación, el comportamiento observado tanto en el homogenado como en las diversas fracciones subcelulares con las que se trabajó fue de la siguiente manera: la cuantificación del índice de MDA en el homogenado dentro del grupo tratado con CCl₄ fue considerablemente más elevado en ambos periodos de tratamiento que lo registrado para el grupo tratado ADO+CCl₄, diferencia que estadísticamente fue significativa. En lo referente a las fracciones subcelulares de los animales tratados con ambos agentes, diremos que en fracciones como el citosol, la lipoperoxidación se vio incrementada en la primera etapa de tratamiento y disminuida hacia la segunda etapa. En la membrana plasmática este parámetro mostró valores inferiores al CCl₄ en la primera etapa de tratamiento y un alto índice lipoperoxidativo para la segunda fase.

Los núcleos también presentaron valores altos de lipoperoxidación en el grupo tratado con ambos agentes pero aquí se observó en ambos periodos de tratamiento.

Algo importante que debemos mencionar es que los altos índices de lipoperoxidación observados en fracciones como los núcleos, pudieran estar relacionados con otro tipo de fenómenos además del daño celular. La regeneración celular es un evento en el cual la presencia de altos índices de lipoperoxidación sugieren que esta puede estar jugando un importante papel como modulador de la división celular en la regeneración del tejido hepático (89).

Para finalizar diremos que el contenido de este trabajo nos permite concluir que la utilización de la adenosina como agente hepatoprotector fue capaz de reducir el índice de "estrés oxidativo" y la lipoperoxidación promovidos por el CCl₄ durante el proceso cirrótico; de mantener los niveles de actividad fisiológica y los niveles de glutatión del tejido hepático por encima de los reportados para los animales tratados solamente con CCl₄, estimulando la actividad de algunas enzimas como la colagenasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y de inhibir la acumulación de colágena, disminuyendo los dramáticos cambios estructurales observados en el hígado por efecto de la intoxicación crónica con este potente agente hepatotóxico (90). Además habrá que mencionar nuevamente que la presencia de altos niveles de MDA en fracciones como los núcleos y citosol puede estar relacionada con eventos de regeneración y posiblemente la adenosina sea un punto angular en la preservación de la capacidad regenerativa del tejido hepático.

CIRROSIS

El desarrollo de la cirrosis no es un proceso uniforme, se caracteriza más bien por su heterogeneidad tanto histológica como a nivel molecular. La cirrosis es una enfermedad crónica y difusa en la cual se observa daño celular, fibrosis y presencia de nódulos de regeneración con pérdida de la arquitectura lobular y vascular del parénquima hepático (1). A nivel molecular el hígado cirrótico presenta un marcado incremento en el contenido de grasa (esteatosis) y de colágena en sus diferentes tipos. Este incremento en el contenido de colágena se considera que es una característica importante de la fibrogénesis y ocurre de manera coordinada (2). La cirrosis es irreversible debido a que el tejido hepático ha perdido su funcionalidad como consecuencia del incremento de tejido conjuntivo presente en el parénquima hepático.

La etiología de esta enfermedad es multifactorial y entre las causas más comunes de su desarrollo se encuentran las siguientes: 1) la exposición crónica a diferentes tóxicos como serían el etanol; 2) de tipo infeccioso como la hepatitis tipos B y C y la esquistosomiasis; 3) colestasis crónica y 4) enfermedades genéticas y del metabolismo.

CARACTERÍSTICAS NORMALES DEL TEJIDO HEPÁTICO Y CAMBIOS SUFRIDOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA CIRROSIS

El hígado es la glándula de mayor tamaño presente en el organismo; su peso en un individuo adulto puede alcanzar hasta 1500 g. esto equivale al 2.5% del peso corporal (3), y está dividido en tres importantes zonas la zona periportal, la zona centrilobulillar y la zona interlobulillar. Este órgano está constituido por diversos tipos celulares los que en conjunto le confieren características propias (hepatocitos, células de Kupfer, células endoteliales, epiteliales y células de Ito). De estos tipos celulares, los hepatocitos constituyen el 70% de la población celular y aproximadamente un 80% del volumen total del hígado (4). El resto del tejido está constituido por la matriz extracelular que es un complejo macromolecular de estructuras que soportan a las células endoteliales y epiteliales. Dentro de este conjunto de macromoléculas tenemos a la elastina, glicoproteínas, proteoglicanos y como componente principal a la

colágena. En la rata el contenido de colágena es aproximadamente de 1mg/g de tejido; dicha colágena está formada por diversos tipos genéticos como serían del tipo I, III, IV, V y VI (5).

MODELOS EXPERIMENTALES DE CIRROSIS

La utilización de diversas metodologías para inducir un cuadro de cirrosis a nivel experimental es una práctica muy común actualmente. Los métodos como la ligadura del conducto biliar, trauma, alteraciones nutricionales como serían la administración de dietas deficientes en elementos como la colina, metionina y proteínas, daño al sistema inmunológico y la administración de agentes tóxicos son algunos de los más conocidos. Dentro de esta gama el más ampliamente utilizado es la administración crónica de agentes tóxicos, y de manera más específica el modelo desarrollado con CCl₄. Esto se debe a que el CCl₄ es un compuesto altamente nocivo y su metabolismo desencadena la formación de radicales libres que son la fuente principal de daño (6).

Fue utilizado durante por mucho tiempo como un agente anestésico dentro de la medicina humana. La alta incidencia de problemas hepáticos y renales seguidos a la administración del CCl₄ indujeron a dejar de utilizarlo; en cambio, estos problemas dieron la pauta para su utilización como un agente experimental que de acuerdo a la dosis y tiempo de administración provoca daño hepático que puede llegar a ser agudo o crónico (7). En este modelo experimental los resultados obtenidos semejan en gran medida a la cirrosis observada en los humanos. Gracias a los innumerables estudios realizados por diversos investigadores se ha llegado a conocer su potente actividad tóxica sobre diferentes órganos como son el bazo, riñón e hígado; siendo este último el mayormente afectado (8). El CCl₄ es capaz de provocar diversos tipos de lesiones sobre el tejido hepático como son la fibrosis, necrosis hepatocelular y la esteatosis, entre otros. (9,10).

MECANISMOS DE ACCIÓN DEL TETRACLORURO DE CARBONO

Los primeros análisis realizados a nivel bioquímico sobre los mecanismos involucrados en la hepatotoxicidad del CCl₄, están referidos en los trabajos realizados por Christie y Judah hacia la década de los años cincuenta (11). Ellos encontraron que

uno de los eventos primarios ocurridos durante la intoxicación aguda con CCl_4 era la inhibición de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, mismas que habían aislado 20 hrs. después de llevarse a cabo la intoxicación. Sin embargo, esta alteración era difícil de comprobar debido a que a las 12 hrs. de administración el daño y la muerte celular eran muy evidentes. Pocos años después, Calvert y Brody (12) realizaron trabajos experimentales en los cuales administraron EDTA a los animales tratados con CCl_4 , comprobando que este reactivo aunque de manera parcial promovía una cierta protección y las mitocondrias podían funcionar 20 hrs. después de llevarse a cabo la intoxicación, lo que corroboraba los resultados anteriormente mencionados.

Después de esta etapa y en los pasados treinta años se han realizado numerosos estudios cuyo centro de atención se ha basado en los mecanismos básicos de acción del CCl_4 sobre el tejido hepático, aceptándose que el desarrollo de la hepatotoxicidad provocada por este agente tóxico depende de un mecanismo que involucra al sistema enzimático del citocromo P-450 el cual cataliza un evento de deshalogenación que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico de las células hepáticas (13).

El sistema citocromo P-450 participa en el metabolismo de numerosos sustratos endógenos así como también de una gran variedad de drogas, carcinógenos químicos y contaminantes ambientales. En los mamíferos existen 9 diferentes familias genéticas de citocromos P-450 y 18 subfamilias, cada una de las cuales cuenta con 1-10 miembros muy bien caracterizados. Las proteínas P-450 se reconocen por presentar cuatro diferentes tipos de actividades; pueden actuar como monooxigenasas, peroxidasas, reductasas y oxidasas (14).

Su actividad de oxidasa fue descrita hacia 1957 por Gillette et. al. (15) a partir de trabajos realizados con microsomas de células hepáticas. Estos investigadores indujeron un incremento en la oxidación de NADPH y la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en animales tratados con productos como el fenobarbital y la pregnenolona 16α - carbonitrilo, lo que les permitió inferir que los aniones superóxido eran producidos en los microsomas y quien los generaba era un sistema que contenía citocromo P-450 (16)

Después de estas investigaciones se han realizado gran cantidad de trabajos al respecto cuyos resultados indican que el componente P-450 en la cadena de transporte de electrones en los microsomas celulares es el elemento más importante en la producción del peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (17,18). La producción de

aniones superóxido puede ser considerada como una causa potencial de la generación de "estrés oxidativo" en la célula.

Por otro lado tenemos que la presencia de algunos metales como el Fe²⁺ pueden inducir o catalizar reacciones de descomposición de los lipoperóxidos preformados en las etapas iniciales, formando compuestos como los alkoxi o peroxi radicales que forman parte de los principales generadores del daño celular o subcelular (27).

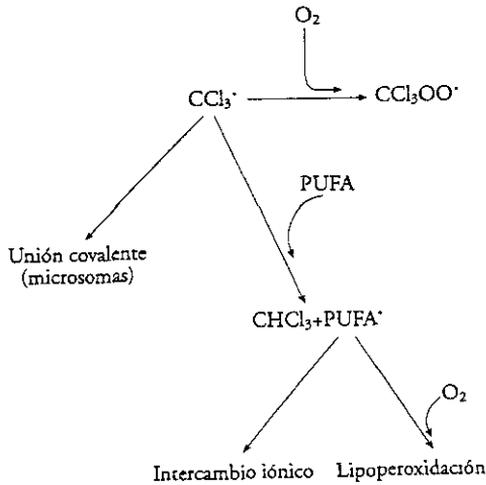
Además de este tipo de moléculas, también se forman otras como el radical hidroxilo (OH[•]) la cual también puede generar en presencia de fierro (vía reacción de Fenton) la formación de especies reactivas capaces de iniciar procesos de lipoperoxidación en las membranas e inhibir la actividad de diversas enzimas como las oxidasas microsomaes (19,20).

La toxicidad del CCl₄ está directamente ligada a su metabolismo, el cual conduce hacia las reacciones responsables tanto de su hepatotoxicidad como de su eliminación a través de las formas de dióxido de carbono (en un medio aerobio) o de cloroformo (en un medio anaerobio) los cuales son producidos muy probablemente y de manera exclusiva a nivel de grupo hemo del citocromo P-450 (21). La primera etapa consiste en una ruptura homolítica de la ligadura carbono-cloro que conduce a la formación de un radical muy reactivo el triclorometil CCl₃ cuya vida media es muy corta, y es el principal iniciador de la cascada de reacciones observadas "in vivo" e "in vitro" durante el desarrollo del daño provocado por el tóxico; el CCl₃ reacciona y se une covalentemente y de manera muy rápida con grupos como el oxígeno molecular dando como resultado la formación de productos como el triclorometil-peroxiradical (CCl₃O[•]) mismos que desencadenan los eventos de lipoperoxidación (13).

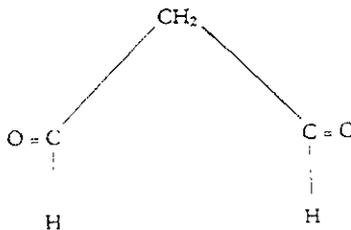
EFEECTO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN Y LOS RADICALES LIBRES SOBRE DIVERSOS TIPOS DE SUBSTRATOS

La presencia de especies reactivas de oxígeno en fenómenos de hepatotoxicidad (como serían las reacciones pro-oxidantes) desencadenan eventos de daño oxidativo en los tejidos celulares durante el proceso de lipoperoxidación, ya que actúan directamente sobre las estructuras celulares (22). Algunas de estas especies no son radicales libres como sería el caso del O₂ y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sin embargo también participan en eventos lipoperoxidativos. El radical hidroxilo (OH[•]) es el más reactivo de todos y su vida media es muy corta, el peroxiradical (ROO[•]) es de

larga vida lo que promueve una difusión en cadena del daño que provoca; estos radicales se forman a partir de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS + oxígeno) resultado del metabolismo de agentes xenobióticos como el CCl_4 , y son potencialmente difundibles del sitio de su formación hacia otros sitios aparentemente inactivos (23,24).



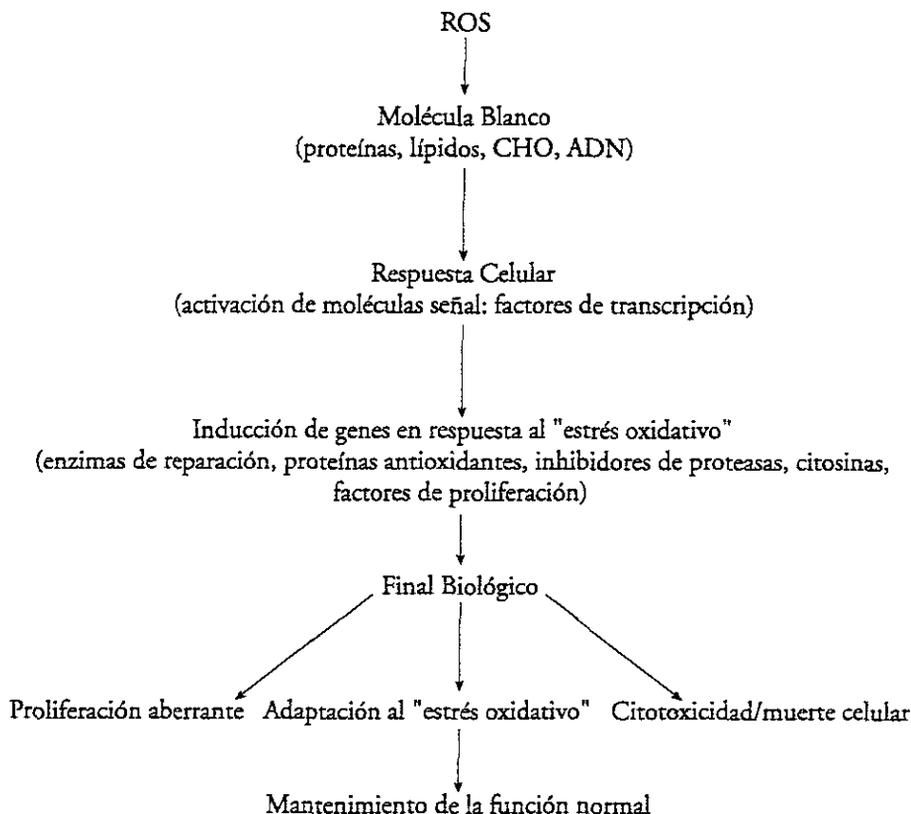
La formación y activación de los radicales libres a partir de productos como el CCl_4 está asociada con la formación de compuestos como los dienos conjugados y el malondialdehído (MDA), los cuales indican que se están llevando a cabo alteraciones peroxidativas en las membranas de los diferentes organelos celulares, por ejemplo un ataque directo sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos (22,25). Otro resultado negativo desencadenado durante el ataque oxidante (consecuencia de las reacciones pro-oxidantes) es que diversos tipos de proteínas se vuelven más susceptibles de ser degradadas por enzimas como las proteasas y las peptidasas (26)



(fórmula desarrollada del MDA Halliwell 1985 (27))

La lipoperoxidación desencadenada durante la intoxicación con CCl_4 es uno de los eventos responsables del daño hepático y, probablemente uno de los más importantes pues da inicio al desarrollo de dicho daño (28). Por otra parte las especies reactivas de oxígeno "ROS" están asociadas a trastornos relacionados con el desarrollo de "estrés oxidativo" a nivel celular (13,19,24).

La peroxidación de fosfolípidos y lípidos insaturados a través de los radicales libres es de capital importancia, pues está relacionada con la patología de las membranas biológicas. Esto se debe a que son componentes integrales de las mismas y la descomposición de estos elementos trae consecuencias devastadoras debido a que destruye violentamente a dichas membranas (29,30).



Los experimentos realizados por investigadores como Masuda y Murano en 1977 (32) con microsomas celulares tanto en "vivo" como "in vitro" apoyan estos conocimientos. Ellos determinaron que la ruptura de la membrana provocada por la peroxidación no solamente producía alteraciones en los componentes lipídicos, si no que además interfería en la actividad de enzimas presentes en la membrana. Debido a que las membranas microsomales son ricas en ácidos grasos insaturados, las hacen mucho más susceptibles a los ataques de la peroxidación (33). El CCl_4 daña las membranas microsomales por conducto del radical CCl_3 el cual se une de manera covalente a los lípidos insaturados iniciando el proceso de lipoperoxidación (23,34).

Los microsomas obtenidos a partir de retículo endoplásmico aislado, son la fracción subcelular que genera de manera importante productos oxidantes como serían el ión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante el transporte de electrones mediado por el citocromo P-450 y la enzima citocromo P-450 reductasa; de aquí que esta fracción sea una de las primeramente afectadas durante la intoxicación con CCl_4 (35).

Otra de las fracciones que se ven gravemente afectadas son las mitocondrias; en éstas el mecanismo responsable del daño está relacionado con el decremento en la capacidad mitocondrial de oxidación de substratos para el sitio I de la cadena respiratoria y de la síntesis de ATP. Esto eventos están ligados con una importante disminución del potencial eléctrico de la membrana mitocondrial. Otro efecto deletéreo paralelo a lo anterior es la deficiente actividad observada en la vía del malato - aspartato que esta relacionada con una distribución anormal de colesterol y fosfolípidos localizados en las membranas mitocondriales. De esta manera se tiene que las mitocondrias sufren daño en estructura y función y los cambios observados contribuyen de manera importante en la muerte celular y son el resultado de la disfunción mitocondrial y su incapacidad para mantener un adecuado estado energético (36-38).

Los radicales libres y las especies oxígeno reactivas derivados de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y subcelulares tales como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peroxiradical (ROO^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) etc., son removidos y metabolizados por un sistema de defensa conformado por enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, y la glutatión peroxidasa entre otras, inhibiendo la producción de radicales libres más activos. Estas enzimas constituyen el principal medio de defensas antioxidantes presente en las células y organelos subcelulares siendo una parte crucial en la protección de los sistemas biológicos (39,40).

El desequilibrio en el balance de las reacciones pro-oxidantes - antioxidantes siempre se lleva a cabo en favor de la parte pro-oxidante, este fenómeno se realiza de manera habitual en cualquier tipo de vida aerobia. Se caracteriza por que de manera constante se forman compuestos de tipo pro-oxidante los cuales son consumidos o degradados por su contraparte formada por el sistema de defensas antioxidantes. El resultado de este juego biológico es el mantenimiento de la homeostasis, indispensable en la continua regeneración de la capacidad antioxidante del sistema (24).

Sin embargo, aún cuando existe este tipo de sistemas de defensas antioxidantes contra el daño oxidativo provocado por los diferentes e innumerables agentes tóxicos existentes, no son 100% efectivos.

SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Aunque se ha mencionado en párrafos anteriores la existencia de mecanismos involucrados en la defensa contra el daño oxidativo, es conveniente hablar un poco más ampliamente acerca de ellos. La precaria naturaleza tanto de los organismos procariontes como de los eucariontes para mantener el equilibrio entre la formación de especies oxígeno reactivas y su degradación, se demuestra en el hecho de que bajo ciertas circunstancias ambientales o fisiológicas pueden alcanzarse concentraciones tóxicas de estos compuestos, provocando un desajuste en el estado normal de los mecanismos de oxido-reducción celular o "estrés oxidativo". Una serie de enzimas y compuestos denominados colectivamente "defensas antioxidantes" están ampliamente estudiadas y están reconocidas como inhibidores de la iniciación o propagación del daño oxidativo hacia diversas biomoléculas. Sin embargo estas defensas no son del todo efectivas y dependiendo de la demanda provocada por los agentes externos los componentes celulares experimentarán diferentes grados de daño oxidativo (41,42).

Entre este grupo se encuentran enzimas como la Superóxido Dismutasa (SOD) que pertenece al grupo de metaloenzimas (que a su vez están constituidas por diferentes tipos de isoenzimas) debido a que contienen en su sitio activo metales como el Cu, Zn y el Mn, y cuya presencia y actividad es críticamente importante en la transformación de los metabolitos derivados del ion superóxido hacia moléculas menos reactivas como el peróxido de hidrógeno y oxígeno (43).

SOD



La glutatión peroxidasa (GSH-Per) y, en algunas células las Catalasas, convierten diversos tipos de peróxidos como sería el caso del peróxido de hidrógeno formado por la SOD, en productos inermes como el agua y el oxígeno basal. Este evento se lleva a cabo a partir de la catalización de la reacción de reducción del H_2O_2 utilizando el glutatión reducido (GSH) como fuente de electrones. Es probable que la enzima GSH-Per. sea la primera línea de defensa durante el inicio del daño inducido por el peróxido de hidrógeno o los productos derivados de la lipoperoxidación sobre diferentes tejidos celulares, además parece ser que es capaz de romper la cadena de reacción autocatalítica de la lipoperoxidación protegiendo a las membranas del daño oxidativo al interrumpir la propagación del mismo. Esta enzima utiliza como sustrato el GSH que es oxidado y vuelto a reducir por la enzima glutatión reductasa (GSSG-Red.)(44-46).

GSH-Px



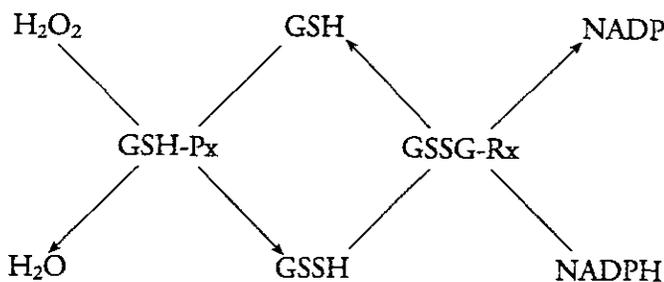
La enzima GSSG-Red. por su parte se encarga de mantener los niveles de glutatión reducido en un rango superior que el de glutatión oxidado(GSSG) siendo esta una relación de 100:1. Esto se debe a la importancia que tiene el GSH como uno de los principales participantes en el sistema de defensa. La enzima GSSG-Red. utiliza NADPH como vía de aporte de equivalentes reductores, el GSSG es su sustrato y el producto principal es el GSH. El NADPH⁺ requerido en este proceso es sintetizado dentro del ciclo de las pentosas y se origina a partir de la fosforilación oxidativa de la glucosa-6-fosfato.

GSSG-Rx



El GSH es un producto metabólico obtenido a partir del ciclo del glutatión y es utilizado en numerosos eventos celulares como el transporte de aminoácidos a través de la membrana, la regulación de la actividad enzimática, la división celular, etc. De manera muy importante actúa como agente reparador de daño tisular y celular, en el metabolismo de agentes tóxicos como el CCl_4 y en la desintoxicación de sus productos derivados; evento que se lleva a cabo a partir de su conjugación con los xenobióticos precursores de productos de excreción denominados ácidos mercaptúricos. El papel del glutatión en la desintoxicación no se limita a su habilidad para formar compuestos conjugados, además previene la formación de peróxidos o su subsecuente reducción a especies no tóxicas (39,40,47).

La presencia de agentes tóxicos en el organismo afecta la concentración hepática de glutatión reduciendo la capacidad del hígado de atrapar y metabolizar especies reactivas como el peróxido de hidrógeno y diversos radicales libres. Aparentemente el glutatión puede reactivar ciertas enzimas que han sido inhibidas por la presencia de altas concentraciones de oxígeno, el cual presumiblemente causa la oxidación de los grupos sulfhidrilo presentes en la estructura de dichas enzimas y son esenciales para su funcionamiento (27).



(ciclo del glutatión)

En los últimos años se le ha dado mucha importancia a los estudios para aportar evidencia sobre la existencia y operación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos de remoción y reparación del daño oxidativo en componentes celulares como proteínas, lípidos e inclusive a nivel de DNA por diversos agentes tóxicos. Es importante hacer notar que en todos los casos la remoción o degradación de las moléculas dañadas antecede a los procesos de reparación.

La extensión del daño y su subsecuente reparación varía de acuerdo al tipo de molécula de que se trate; así por ejemplo, las proteínas requieren de una degradación proteolítica completa de sus componentes hacia aminoácidos libres; en cambio el DNA requiere de una reparación más discreta pues solamente se escinde y repara la parte dañada (23,48,49).

DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y SISTEMAS DE REPARACIÓN

A. Defensas Antioxidantes (previenen la iniciación o propagación del daño)

1.- Enzimas: Superóxido Dismutasas, Glutación Peroxidasas/Reductasas y Catalasas.

2.- Compuestos: Vitamina E, (β -caroteno, Acido Úrico, Vitamina C, Acido Retinóico y Glutación reducido).

B. Sistemas de Reparación (remueven y/o reparan los productos dañados)

1.- Degradación de Proteínas/ Enzimas de Reparación : Proteínasas (M.P.O. mecanismos de oxidación proteica).

2.- Degradación Lipídica/ Enzimas de Reparación : Fosfolipasas, Acil Transferasas, Glutación Peroxidasa/ Transferasa/ Reductasa.

3.- Degradación de DNA / Enzimas de Reparación: Exonucleasas (III), Endonucleasas (III, IV), Glicosilasas, Polimerasas, Ligasas.

La eliminación de los lípidos oxidados de la membrana está considerada como una función de reparación secundaria, esto contrasta con los sistemas antioxidantes los cuales involucran un proceso de prevención en la iniciación y propagación del daño oxidativo. La hidrólisis selectiva de los ácidos grasos oxidados provee dos importantes funciones de protección celular:

La primera es la remoción de especies polares y reactivas como serían los hidroperóxidos, aldehídos, etc. los cuales son generados durante la lipoperoxidación. La generación de estos productos en la matriz hidrofóbica de la membrana crea disturbios en la estructura evidenciados por la pérdida en la fluidez de la misma.

La segunda acción protectora provista por la hidrólisis selectiva de los aci-

dos grasos involucra el metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos por las peroxidases citosólicas. La enzima responsable de la reducción de las especies reactivas como los hidroperóxidos y sus correspondientes alcoholes es la GSH-Per. Esta enzima citosólica despliega una pobre actividad contra los hidroperóxidos embebidos en la membrana, de esta manera toca el turno de actuación a la fosfolipasa A₂, la cual facilita la actividad a la glutatión peroxidasa ya que libera dichos compuestos hacia el citosol quedando de expuestos a las peroxidases ahí presentes. La acción de ambas enzimas es considerada como la iniciación de una importante función de reparación de la membrana (42,50).

Es evidente que la cascada de eventos evocados a partir de los efectos iniciales del metabolismo del CCl₄ son los responsables de las causas patológicas de la disrupción y degeneración de la membrana y por tanto de la muerte celular y tisular que son los eventos finales de este proceso (18,51).

EFFECTO DEL TETRACLORURO DE CARBONO SOBRE EL CONTENIDO DE COLÁGENA EN EL TEJIDO HEPÁTICO

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, el tejido hepático normal está conformado de una gran variedad de grupos celulares y por la matriz extracelular cuya principal proteína constitutiva también mencionada con anterioridad, es la colágena. La colágena con sus diferentes tipos forma una gran familia de proteínas, cada una de las cuales está compuesta de subunidades polipeptídicas con ligeras variaciones en sus secuencias de aminoácidos. Todas ellas forman una triple hélice característica central de las moléculas colagénicas. Hasta ahora se han detectado 13 diferentes tipos de colágena y se sabe que necesitan por lo menos de 25 genes diferentes para su síntesis. Los tipos I, II, III, IV y V son los más abundantes, los tres primeros son los componentes de mayor presencia en el tejido conjuntivo (52). La colágena se sintetiza originalmente en forma de procolágena la cual presenta dos extensiones peptídicas de las que se conocen al menos dos funciones: guiar a la molécula dentro de la célula y prevenir la formación de las fibras de colágena intracelularmente. Estas regiones son removidas una vez que la colágena ha sido secretada al espacio extracelular. En algunas enfermedades la proteólisis de la colágena es incompleta por lo que la formación de las fibras es bloqueada.

El proceso de degradación de la colágena se efectúa por medio de una enzima específica denominada colagenasa. La primera demostración de su existencia fue

hecha por Gross y Lapiere en 1962, purificándola de *Clostridium histolyticum*. Posteriormente se demostró que también se encontraba presente en tejidos de diversas especies animales como los anfibios y mamíferos. Se han descrito 4 clases de proteasas (endopeptidasas) que intervienen en la degradación de la matriz extracelular, dentro de este grupo de enzimas se encuentra la colagenasa (53).

La secreción de la colágena se lleva a cabo a través del aparato de Golgi y es completamente dependiente del complejo microtubular para su excreción a la matriz extracelular. Este sistema está compuesto por microtúbulos formados por la proteína tubulina, la cual se dispone en arreglos helicoidales. Los microtúbulos desempeñan un papel muy importante en diversas actividades celulares como la mitosis, organización de organelos membranales, transporte de vesículas, etc. (54). En los hepatocitos normales los microtúbulos no son muy abundantes; pero en las células del tejido hepático en estado de regeneración el contenido microtubular se incrementa. La tubulina comprende aproximadamente un 1% de la proteína soluble presente en los hepatocitos, y el 40% de ésta se ensambla formando microtúbulos.

La síntesis anormal de ciertos componentes celulares como la colágena son eventos claves en la determinación del efecto provocado por la intoxicación de agentes tóxicos como el CCl_4 , el exceso en la acumulación de colágena en la matriz extracelular del tejido hepático es una característica muy clara en el desarrollo de fibrosis y cirrosis tanto a nivel clínico como experimental (8,55). La etiología y el origen celular de este fenómeno está referido a los hepatocitos, miofibroblastos, células de Ito y fibroblastos los cuales son responsables de la producción de colágena en el hígado. El hígado normal humano contiene aproximadamente 2% de colágena en peso seco pero este porcentaje puede elevarse hasta el 10% en un estado final de cirrosis (51,56,57).

La cantidad de colágena en un tejido esta determinada por un balance entre los procesos de síntesis y degradación; a nivel molecular la fibrogénesis resulta en un aumento de varias veces en la cantidad de colágena, no obstante que el incremento de colágena es indispensable para que ocurra la fibrosis, no es el unico cambio que se lleva a cabo en el hígado. Los diferentes mecanismos de control involucrados en la regulacion de la síntesis de colágena tanto en condiciones normales como en casos de cirrosis, ya sea inducida experimentalmente o por otras vías (cirrosis alcoholica) son diferentes. Esta diferencia esta asociada con un cambio en la expresión fenotípica de las células presentes en el hígado dañado, consecuencia probable de un cambio de población celular bajo circunstancias anormales (58-60).

De acuerdo con los resultados obtenidos en sus trabajos, Takahara y cols. en

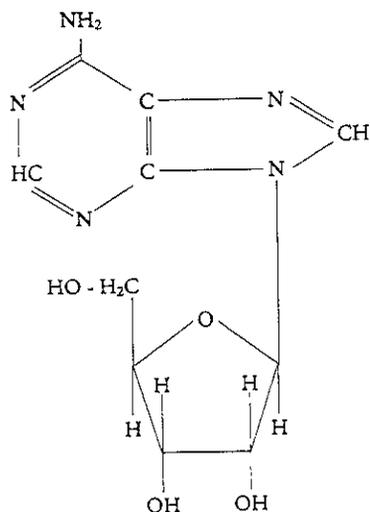
1988 (61) muestran evidencia directa de que los diferentes tipos de colágena formadas durante la intoxicación con CCl_4 son producidos por las Fat-Storing Cells (FSCs) o células de Ito. En la intoxicación crónica con CCl_4 , el incremento de estas células y la presencia de ciertas fibras que presentan una coloración inmunoreactiva muy fuerte característica de materiales de colágena y de prolil-hidroxilasa se observa alrededor del retículo endoplásmico. Estos materiales colagénicos están presentes en el aparato de Golgi y en vesículas cerradas de membrana citoplásmica, estos hechos indican que las FSCs participan de manera importante en el desarrollo de fibrosis después de una intoxicación aguda ó crónica con CCl_4 . Adnani en 1989 (62) realizó una serie de experimentos los cuales muestran que los hepatocitos y los fibroblastos están involucrados en la síntesis de colágena tipo III, especialmente durante el desarrollo de diferentes estadios de cirrosis. Bedossa y cols. en 1994 (55), proponen que en ratas tratadas con CCl_4 las células de Ito en cultivo son estimuladas por los hepatocitos para sintetizar colágena, lo que sugiere que los hepatocitos juegan un importante papel en la regulación del gen para la síntesis de la colágena del tipo α -1 (I).

Desde que se detectó a la cirrosis como una enfermedad se ha tratado de contrarrestar el daño utilizando innumerables métodos. Hasta ahora se han desarrollado una gran cantidad de medicamentos empleados como métodos terapéuticos en el tratamiento de la cirrosis y fibrosis. Por ejemplo se ha intentado interferir en la biosíntesis de la colágena tipo I presente en el tejido fibrótico como principal constituyente; la colchicina ha sido otro agente terapéutico utilizado debido a su acción inhibidora de la polimerización microtubular; la administración de vitamina E es otro mecanismo por medio del cual se ha intentado inhibir la lipoperoxidación desencadenada por los radicales libres, la cual a su vez genera el desarrollo de cuadros patológicos de cirrosis y fibrosis (63,64). Finalmente mencionaremos a la adenosina como otro importante agente utilizado de manera experimental en la prevención del daño hepático causado por tóxicos como el CCl_4 (65).

ADENOSINA: ESTUDIO SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN COMO AGENTE HEPATOPROTECTOR

La adenosina es un compuesto purínico formado ó sintetizado desde las primeras etapas de la evolución. Ciertas condiciones ambientales prevalientes en la tierra primitiva como las altas temperaturas, una atmósfera reductora y la presencia de

energía solar favorecieron la síntesis de compuestos orgánicos como las purinas, entre las que se cuenta la adenina. La adenosina se formó a partir de dos moléculas primarias que fueron la adenina y la α D-ribose (66). La adenosina es una molécula que no ha sufrido cambios a través de la evolución. En las células la adenosina se forma en la ruta metabólica de las purinas que provee a las células de compuestos purínicos y sus nucleótidos y es un producto intermediario en esta ruta.



(Adenosina: fórmula desarrollada)

La primera evidencia de la importancia fisiológica de la adenosina, se remonta hacia el año de 1929 cuando Drury y Szent-Gyorgy (67), reportaron que la adenosina afectaba la función cardíaca, reducía los movimientos intestinales, provocaba hipotermia, sueño y disminuía el flujo sanguíneo en el riñón. Treinta años después la adenosina es propuesta como un regulador del flujo sanguíneo en el corazón; más tarde en cerebro, músculo esquelético e hígado. Algunos efectos metabólicos en el hígado han sido descritos a partir de los años setenta; diferentes reuniones científicas se han encaminado a discurrir sobre la acción fisiológica y farmacológica de la adenosina como una alternativa de acción con buenas perspectivas. Sin embargo, en general las investigaciones se enfocan de manera más directa sobre los efectos de la adenosina en el sistema nervioso actuando como un neuromodulador; en el sistema cardiovascular como un regulador del flujo sanguíneo, como un modulador metabólico y en otras funciones

como un potente agente terapéutico en problemas psiquiátricos y finalmente en desordenes hepáticos (68).

Actualmente estudios realizados por investigadores como Champigneulle y cols.(69), han evaluado la hipótesis de que la adenosina posiblemente participe aminorando las alteraciones hemodinámicas observadas en ratas cirróticas. Actuando como un potente vasodilatador en uno de los mecanismos de mayor importancia en la autorregulación hemodinámica, juega un importante papel en la circulación esplénica en la cirrosis. Se sabe que la hipoxia que es una condición común en los pacientes cirróticos es un mecanismo responsable de la formación de adenosina, dando lugar al incremento del flujo sanguíneo esplénico.

La administración de adenosina de manera experimental en ratas ha sido utilizada como una herramienta importante en estudios de hepatotoxicidad provocada por etanol y CCl₄. El nucleósido es capaz de cambiar el patrón metabólico inducido por la intoxicación aguda de etanol; esto se enclava en los siguientes hechos: la adenosina previene y revierte de manera parcial el hígado graso provocado por la ingesta de alcohol disminuyendo la cantidad del mismo presente en la sangre, estimula el transporte citoplásmico de equivalentes reductores a la mitocondria, principalmente en la vía del malato-aspartato (37,70). Esta acción la cual está localizada a nivel de la membrana mitocondrial se hace evidente a partir del aumento en el evento de oxidación del etanol y el acetaldehído. Otro aspecto importante para mencionar es el hecho de que el nucleósido incrementa los niveles de ATP y la carga energética, estimulando "in vitro" y en "vivo" las rutas metabólicas hepáticas como sería la del malato - aspartato que depende de la capacidad energética y oxidativa de la mitocondria (71).

Por otro lado, es capaz de disminuir la necrosis celular inducida por el CCl₄. La adenosina provoca un drástico efecto antilipolítico acompañado por un decremento en la incorporación de ácido palmítico dentro de los triacilglicérols y ácidos grasos libres del hígado. También promueve un decremento en los niveles de cuerpos cetónicos séricos; un decremento en la lipoperoxidación determinada a partir de la cuantificación del MDA. Esto se corroboró al observar que la adenosina preservaba la actividad de diversas enzimas como la glucosa 6- fosfatasa, y permitía una recuperación en los niveles de citocromo P-450, posiblemente al evitar la propagación de las reacciones inducidas por las especies oxígeno reactivas. Estos dos eventos antes mencionados se ven afectados de manera drástica durante el metabolismo del tetracloruro de carbono.

En los tratamientos agudos con tetracloruro, el efecto protector de la

adenosina desaparece aproximadamente cuatro horas después de su administración lo cual sugiere que seguramente este es el tiempo requerido para su metabolización. La eficiencia de la adenosina como hepatoprotector se reflejó en el aumento de la sobrevivencia determinada a partir de experimentos en los que se trataron animales de manera aguda con CCl_4 solución salina y otras tratadas con CCl_4 •ADO, el porcentaje de sobrevivencia fue de un 70% y 60% a las 48 y 120 hrs. respectivamente para el grupo tratado con adenosina; el grupo tratado con CCl_4 • solución salina tuvo un margen de sobrevivencia de 0% (65).

El mecanismo del efecto protector de la adenosina sobre el tejido hepático es hasta ahora un fenómeno que no está completamente establecido; sin embargo, se piensa que la adenosina durante su metabolismo estimula cuando menos dos procesos de defensa: el primero se relaciona con la actividad de la enzima GSH-Per. la cual muestra un incremento en su actividad 30min. después de ser administrada, lo que sugiere que la enzima está estrechamente relacionada con la acción del nucleósido. El segundo proceso se refiere al catabolismo de la adenosina, en este proceso los niveles de ácido úrico y alupurinol (un inhibidor del metabolismo de las purinas)se incrementan y actúan como agentes quelantes de radicales libres. Esto sugiere que el efecto protector de la adenosina no se da en un solo sentido y está determinado por sus productos catabólicos (65,72,73).

En estudios realizados con animales bajo tratamiento crónico con tetracloruro de carbono, la adenosina previene parcialmente el desarrollo de hepatoesplenomegalia inducida por el toxico. Esta disminución de la hepatomegalia está acompañada por un decremento de hasta el 50% en la acumulación de colágena y la preservación del contenido de glucosaminoglicanos. Aparentemente la estimulación de la actividad enzimática de la colagenasa es el mecanismo por el cual se inhibe el aumento en el contenido de colágena, esto se relaciona con una prevención parcial en el desarrollo temprano de fibrosis evaluado a partir del contenido de colágena; estos efectos van acompañados con una importante preservación de la función hepática. Otro aspecto importante que se debe mencionar es el efecto estimulador del nucleosido sobre la carga energética de los nucleotidos ATP ATP/ADP, mismo que se ve afectado drásticamente por el toxico y el cual es detectado a partir de una caída en el contenido de estos compuestos (8).

En otras series de experimentos realizados en nuestro laboratorio, el efecto del CCl_4 sobre la función de las mitocondrias hepáticas obtenidas de los animales tratados crónicamente, muestran profundas alteraciones en la oxidación de los sustratos

del sitio I y el sitio II de las vías metabólicas de la lanzadera del glutamato-malato. En animales que recibieron el tratamiento con adenosina sola no se observaron modificaciones en la oxidación mitocondrial de estos substratos; en el tratamiento simultáneo de adenosina con CCl_4 la adenosina previene estas alteraciones (38). El estado "redox celular" es otro mecanismo que se ve afectado por la intoxicación con CCl_4 , la alteración sufrida se encamina hacia el estado oxidado. La adenosina es capaz de contrarrestar este efecto manteniendo el equilibrio, al modificar el metabolismo de la colágena y el nitrógeno lo cual indica que existe una correlación lineal entre el estado redox celular y el nivel en la síntesis de colágena; sugiriéndose que la correlación entre la función mitocondrial, el estado redox celular y la regulación en el metabolismo de la colágena son aspectos relevantes dentro de la fisiopatología del modelo de cirrosis experimental (65).

Debido a que aún se desconoce si existe una relación directa y estrecha entre el metabolismo energético hepático y el desarrollo de fibrosis; además de saber que la administración de la adenosina juntamente con CCl_4 en los animales tratados crónicamente, mantiene una adecuada disponibilidad de energía a nivel celular y reduce el grado de fibrosis, fue un aspecto muy importante que condujo a nuestro grupo de trabajo a explorar el metabolismo y función del tejido hepático a nivel celular y subcelular. Aunado a esto se tomo como base la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, cuya importancia en este proceso es relevante y de la determinación de la actividad lipoperoxidativa promovida por el efecto del CCl_4 sobre el hígado.

HIPÓTESIS

Utilizando como antecedente todo lo anteriormente mencionado para el desarrollo de este proyecto se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

Si las reacciones pro-oxidantes generadas durante el metabolismo del CCl_4 participan en el proceso cirrogénico inducido en el tejido hepático durante la administración crónica de este compuesto; entonces la adenosina por su parte al ser administrada de manera conjunta con el agente tóxico inhibirá la etapa de propagación de la lipoperoxidación desencadenada por las reacciones pro-oxidantes, evitando que se desencadene el proceso patológico en el tejido.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

Determinar a nivel histológico el daño provocado en el tejido hepático por efecto de la intoxicación crónica con CCl_4 . Utilizando muestras de dicho tejido obtenidas a partir de los diferentes grupos experimentales,
Determinar cuantitativamente el contenido de colágena presente en el tejido hepático analizado de los diferentes grupos experimentales .

ESTUDIAR EL PAPEL QUE JUEGAN LOS RADICALES LIBRES EN LA EVOLUCIÓN DE LA CIRROSIS EXPERIMENTAL INDUCIDA CON CCl_4 .

Determinar la participación de las reacciones pro-oxidantes cuantificando los productos derivados de la lipoperoxidación (MDA y quimioluminiscencia).
Medir el efecto del CCl_4 en las defensas antioxidantes (actividad enzimática de glutathion reductasa y glutathion peroxidasa).

DETERMINAR QUE IMPORTANCIA TUVO LA ADMINISTRACIÓN DE LA ADENOSINA COMO UN AGENTE HEPATOPROTECTOR.

Evaluar el efecto de la administración de adenosina como agente hepatoprotector en el desarrollo del cuadro cirrótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MANEJO DE LOS ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Wistar cuyo peso inicial osciló entre los 90 - 100g. los animales fueron alimentados ad libitum con alimento semisintético para roedores de la marca Chow y agua. Fueron inyectados intraperitonealmente con CCl_4

(0.025ml diluido en aceite vegetal 1: 6) y adenosina (200mg/ kg de peso del animal) suspendida en solución salina pH 7.4 tres veces por semana durante cuatro y ocho semanas; los grupos experimentales se dividieron de la siguiente manera:

1) GRUPO EXP. #1: cuyo tratamiento consistió en la administración de CCl_4 por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces por semana a una dosis de 0.025ml por vez.

2) GRUPO EXP. #2: animales tratados con adenosina por vía i.p. en una concentración de 200mg/kg de peso del animal.

3) GRUPO EXP. #3: animales cuyo tratamiento consistió en la administración simultánea de CCl_4 y adenosina en las mismas dosis administradas en los grupos 1 y 2.

4) GRUPO EXP. #4: este fue el grupo control cuyo tratamiento consistió únicamente en la administración del vehículo utilizado en la disolución del CCl_4 y la adenosina en dosis semejantes a los grupos experimentales.

OBTENCIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos fueron obtenidos de los siguientes laboratorios:

El tetracloruro de carbono fue obtenido de Merck CO. México.

La adenosina, el ácido tiobarbitúrico, glutatión oxidado y reducido, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, azida de sodio y los restantes reactivos fueron obtenidos de Sigma CO. (St. Louis, MO, USA).

DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

Caracterización histológica.

Análisis Morfológico.

Cuantificación de colágena total a partir de la determinación de la cantidad de hidroxiprolina.

Papel de los radicales libres:

Lipoperoxidación: cuantificación de malonaldehído (MDA) por el método del ácido tiobarbitúrico

Cuantificación de quimioluminiscencia.

5) Determinación de parámetros relacionados con las defensas antioxidantes:

Cuantificación de la actividad de Glutación Peroxidasa

Cuantificación de la actividad de Glutación Reductasa

Cuantificación del contenido de glutatión total y

Determinación del índice de "estrés oxidativo".

METODOLOGÍA

Dos días después de finalizar el tratamiento, los animales fueron puestos en ayuno durante toda la noche antes de ser sacrificados. Recibieron una inyección de pentobarbital para anestesia general (40 mg/kg. de peso del animal), mediante procedimientos quirúrgicos se obtuvo el hígado el cual fue pesado. Muestras del tejido de aproximadamente 0.2g fueron homogeneizadas en agua bidestilada (1:9 w/v) para realizar con ellas las determinaciones enzimáticas y del MDA. Para la obtención de fracciones subcelulares (mitocondrias, citosol, membrana plasmática, etc.) se utilizó homogenado de hígado (1:10 v/v) en un medio que contenía 0.25 mM de sacarosa, buffer Tris 10 mM, EDTA 0.3 mM y albúmina 0.2% pH 7.4 y se separaron de acuerdo al método descrito por Schneider y Hogeboom (74).

Las determinaciones histológicas y morfológicas se llevaron a cabo de acuerdo a técnicas de tinción histológicas convencionales adecuadas al caso (tinción tricromica de Masson).

La cuantificación de colágena se realizó por el método descrito por Rojkind y González (75). Se utilizaron muestras de tejido hepático de aproximadamente 0.5 a 0.7g de peso húmedo, las cuales se lavaron con alcohol absoluto (29 ml) y se homogenizaron. Se centrifuga a 17,000 rpm x 25min.; se repite el paso anterior, se resuspende el precipitado en 25ml de buffer tris 0.05 M pH 7.4 (HCL) y se deja durante 24 hrs. en agitación constante en cuarto frío (repetir 2 veces mas este paso), centrifugar a 15,000 r.p.m. x 30 min. El precipitado final se resuspende con 4 ml de ac. acetico 0.25 M y se deja agitando una noche en cuarto frío. Se toman 2 ml de la muestra y se agregan 2 ml de HCl concentrado y se hidrolizan por 24 hr a 110 (C en ampolleta sellada.

Al finalizar la técnica se determinó la absorbancia de hidroxiprolina a 560 nm usando tolueno como blanco.

La lipoperoxidación fue determinada a partir de la cuantificación del contenido de ácido tiobarbitúrico (TBA). Todas las manipulaciones se realizaron de manera rápida y sobre hielo para evitar la peroxidación. Algunas modificaciones del método original fueron introducidas: una muestra del homogenado (aprox. 1mg proteína) se incubo por 30' a 37° en 1 ml de 0.15M de buffer Tris, pH 7.4; la incubación finaliza adicionando 1.5ml de ácido acético al 20% ajustado a un pH 3.5 y 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8%. La muestras fueron incubadas durante 45' a ebullición, al final de la incubación se enfriaron a chorro de agua y se les adicionó 1ml de KCl al 2% (76). La coloración obtenida por la presencia del MDA se extrajo con una mezcla de piridina-butanol (15:1 v/v) y se determinó la absorbancia a 532 nm.

La cuantificación de la quimioluminiscencia tanto en homogenado como en las diferentes fracciones obtenidas se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Cadenas (94). El tejido se homogenizó en un buffer de KCl 120 mM y K₂ HPO₄ 30 mM pH 7.2. Se utilizó luminol como reactivo principal para el ensayo y se preparó de la siguiente manera: buffer de acetato de amonio 0.5 M pH 10.5, CoCl₂ 5 mM, luminol 5 mM en Na₂CO₃ 0.5 M. Se utilizó para cada ensayo 4ml de la mezcla y de 50-100 (l de homogenado).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (77). Se utilizaron muestras de tejido hepático previamente homogenado. Los reactivos utilizados fueron: Solución A: Na₂CO₂ - 2%, NaOH - 0.4%, tartrato de Na₂K - 1%, SDS - 1%. Solución B: CuSO₂ . 5H₂O, reactivo de Folín - 1N. Se realizó una mezcla de los reactivos A y B en proporción 100:1 respectivamente. Para cada muestra se agregaron 3 ml del reactivo, 1 ml de H₂O y finalmente la muestra, se agitó la mezcla y se incubó 30' a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 660nm.

La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GSH-Per.) fue determinada de acuerdo a la técnica descrita por Paglia y Valentine (78) utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato con las modificaciones reportadas por Lawrence y Burk (79). El tejido utilizado fue previamente homogenado en agua. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: buffer de fosfatos(K₂ HPO₄ 50mM), EDTA 1mM, Azida de sodio (Na N₃ - 1mM), NADPH - 0.2 mM, GSH 1mM, GSSG - Rx 0.005ml, muestra 0.02ml. Se leyó a 340 nm hasta estabilizar y se disparó la reacción con 20(de H₂O₂ diluída en H₂O en una proporción de 1:10.

La actividad de la enzima glutatión reductasa (GSSG-Red.) se determinó a partir del método descrito por Horn (80). Se utilizaron muestras homogenadas, buffer de fosfatos [0.067 M] pH 6.6, NADPH disuelto en Na HCO₃ 1%, GSSG disuelto en buffer de fosfatos pH 6.6, la reacción se dispara con la muestra 0.2 ml. Se leyó la absorbancia a 340nm.

Finalmente se llevó a cabo la determinación del contenido de glutatión total y se calculó el índice de "estrés oxidativo" (81). El contenido de glutatión total corresponde a la suma de los valores parciales de GSH + GSSG. El "estrés oxidativo" fue calculado a partir de la siguiente fórmula ([GSSG/GSH] x 100).

RESULTADOS

En base a los objetivos planteados los resultados obtenidos en este trabajo se van a presentar en dos partes:

La primera parte esta relacionada con la validación del modelo experimental utilizado en nuestro proyecto; en esta etapa se valoró de manera histológica el efecto tóxico provocado por el CCl₄ y la potencial protección de la adenosina sobre el tejido hepático de los animales tratados.

La segunda corresponde a la parte bioquímica en la cual se determinó el papel que desempeñaron las reacciones pro-oxidantes en la inducción de la cirrosis experimental y el efecto que tuvo la adenosina en la prevención parcial del daño.

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA

El estudio histológico llevado a cabo en este trabajo se realizó utilizando muestras de tejido hepático obtenidas de cada uno de los grupos experimentales. A las cuatro semanas de tratamiento, el tejido hepático de las ratas tratadas con CCl₄ mostraron cuadro necrotico moderado, inflamacion y desarrollo de septos fibrosos. A las ocho semanas la arquitectura hepatica desarrolló notables modificaciones como la acumulacion de colagena y grasa lo que dio como resultado un aumento en el tamaño del organo (referido al peso húmedo del organo) (82). De esta manera tenemos que los parametros analizados a las ocho semanas corresponden a una cirrosis experimental bien establecida (Tabla 51) La evaluacion histologica se llevo a cabo por duplicado en un total de cuatro muestras tomadas de cada grupo experimental. De acuerdo a los

resultados obtenidos se determinó una relación para obtener el porcentaje de la distribución relativa del daño observado.

Necrosis: los resultados indican que hacia las cuatro semanas de tratamiento más del 90% de la población tratada con CCl_4 mostró evidencias de necrosis en un grado de daño moderado. Para las ocho semanas el cuadro observado en este mismo grupo cambió, de tal manera que el porcentaje observado en el total de la población fue de un 50% con necrosis con un grado de daño moderado y el restante 50% desarrolló una necrosis con un grado de daño severo. En el grupo tratado con CCl_4 +ADO los resultados observados a las cuatro semanas de tratamiento se presentaron de la siguiente manera: el 30% de la población total desarrolló un cuadro necrótico cuyo grado de daño se definió como ligero y el restante 70% como moderado. En el segundo periodo de tratamiento esto es a las ocho semanas, los porcentajes fueron de 60 y 40% y el grado de daño fue de ligero a moderado respectivamente.

Fibrosis: En este parámetro el grupo experimental tratado únicamente con CCl_4 manifestó la presencia de fibrosis en valores porcentuales que fueron del 30-70% siendo el grado de daño de ligero a moderado respectivamente; estos resultados están referidos para el primer periodo de tratamiento (4 semanas). A las ocho semanas los animales muestran un daño determinado como moderado en el 40% del total, y severo para 60% restante. En cuanto a los animales tratados con CCl_4 +ADO se refiere estos se caracterizaron por desarrollar un cuadro fibrótico donde más del 90% presentó daño ligero a las cuatro semanas, y a las ocho semanas se observó en los animales el mismo porcentaje pero con daño moderado.

Acumulación de Grasa: el 90% de la población en el primer grupo experimental mostró a las cuatro semanas de tratamiento acumulación de grasa (fenómeno de esteatosis) pero el grado de daño se consideró como ligero. En el segundo periodo de tratamiento el 75% de los animales continuó con este cuadro de acumulación de grasa con daño ligero y el restante 25% desencadenó un grado de daño de tipo moderado. Los animales del segundo grupo (CCl_4 +ADO), se caracterizaron por que en ambos periodos de tratamiento (4 y 8 semanas), el 90% de la población desarrollo acumulación de grasa pero el daño no superó el grado determinado como ligero.

Inflamación: la inflamación desencadenada en la intoxicación con CCl_4 a las cuatro semanas afectó a la población de la siguiente manera el 65% mostró inflamación y daño ligero, el restante 35% con un grado de daño moderado. Ocho semanas de tratamiento y el 90% de los animales manifiestan daño moderado. Con adenosina los

porcentajes varían siendo 80 y 20% con daño ligero-moderado al primer periodo de tratamiento, y 90% con daño ligero a las ocho semanas.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Todas las muestras de tejido utilizadas para esta parte del trabajo se procesaron de acuerdo a metodologías de tinción convencionales, en este caso para la tinción tricrómica de Masson a partir de la cual se pueden visualizar fibras de colágena (Figs. # 1-3).

La figura # 1A corresponde a una muestra de tejido normal. Hígado de rata normal sin ningún tipo de tratamiento: donde podemos observar el arreglo característico de los hepatocitos formando cordones, el tamaño del núcleo es normal, la colágena se encuentra localizada en los espacios porta y en poca cantidad; no hay infiltración de colágena en los sinusoides los cuales se observan claramente y tampoco se observan vesículas de grasa.

Las figuras # 2A y 2B son imágenes representativas de tejido obtenido de los animales tratados con CCl_4 durante cuatro y ocho semanas.

2A) A las cuatro semanas de tratamiento se empieza a observar pérdida en la estructura celular del tejido, disminución en las uniones intercelulares, un ligero incremento en el tamaño de los núcleos, acumulación de colágena empezando a formar fibras ó septos, se observa la presencia de vesículas de grasa (vesículas esteatóxicas) y eritrocitos.

2B) En este segundo periodo de tratamiento podemos observar como el tejido esta completamente transformado, habiendo perdido por completo su arquitectura normal; no hay una vecindad celular, las bandas fibróticas estan bien acentuadas desplazándose de un espacio vascular hacia otro formando puentes y septos. La colágena también se observa depositada alrededor de los vasos.

Finalmente las figuras # 3A y 3B muestran el tejido hepático de los animales tratados con $\text{CCl}_4 + \text{ADO}$ en ambos periodos de tratamiento

3A) A las cuatro semanas de tratamiento, las alteraciones observadas en este grupo son de menor escala que las que se detectaron en los grupos anteriores. Aquí presencia de septos no es muy marcada, tampoco hay la misma cantidad de colágena acumulada alrededor de los espacios portales y no se observa la presencia de vesículas de grasa.

3B) En esta foto se observa de manera muy clara la presencia de una gran cantidad de vesículas esteatósicas diseminadas principalmente alrededor de conductos como vasos ó arterias; se observa una menor cantidad de colágena alrededor de los espacios portales, no se observan puentes ó septos, podemos apreciar una mayor presencia de hepatocitos. En general el tejido aparece menos dañado.

CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA

Los valores obtenidos a partir de la cuantificación de hidroxiprolina en las muestras que contenían CCl_4 manifiestan un aumento gradual en el contenido de colágena, evento que se observa hasta el momento en que establece de manera clara la cirrosis (Fig. # 4).

A las cuatro semanas de tratamiento la concentración de colágena en los dos principales grupos experimentales se observó aumentada. Al comparar los datos obtenidos se vio que el grupo tratado con CCl_4 incrementó su contenido de colágena en un 250% respecto al grupo control ($p < 0.01$). El grupo tratado con ADO-CCl_4 mostró un incremento en el contenido de colágena que correspondió a un 190% al hacer una comparación contra el grupo control ($p < 0.01$). En esta primera etapa, la comparación de los resultados de ambos grupos mostró una diferencia que estadísticamente no fue significativa.

Los resultados obtenidos en el grupo control y los de los grupos experimentales al final del tratamiento se vieron de la siguiente manera: para el grupo de CCl_4 el incremento en el contenido de colágena se estimó en 460% aproximadamente ($p < 0.01$). El grupo tratado con $\text{CCl}_4\text{-ADO}$ alcanzó hasta un 230% de incremento ($p < 0.01$). Ambos grupos comparados entre sí tuvieron una relación estadística significativa ($p < 0.01$).

Los resultados hasta aquí presentados coinciden con los obtenidos en anteriores trabajos realizados en este laboratorio, validando el uso de este modelo experimental (8) (Fig. # 4).

Esta segunda parte de los resultados está encaminada a estudiar el papel que jugaron los radicales libres y las especies oxígeno - reactivas en la etiología de la cirrosis experimental; además de valorar el papel desempeñado por la adenosina en la prevención parcial del daño.

LIPOPEROXIDACIÓN

El efecto causado por el CCl_4 sobre el tejido hepático se manifiesta de diversas maneras. La lipoperoxidación es una de dichas manifestaciones y se genera por la presencia de radicales libres formados a partir del metabolismo de este agente tóxico. Estos radicales libres actúan directamente sobre los ácidos grasos insaturados formadores de las membranas celulares causando graves daños (22). Los resultados de lipoperoxidación que a continuación describiremos forman parte del análisis bioquímico realizado en este trabajo (Fig. # 5-10).

A las cuatro semanas de tratamiento la cuantificación de MDA en el homogenado de los animales tratados con CCl_4 mostró un incremento de 257%. Al compararlo contra el grupo control la relación estadística fue significativa ($p < 0.01$). En cuanto al grupo tratado con ADO- CCl_4 se refiere el valor cuantificado de MDA correspondió 153%; siendo estadísticamente significativo tanto contra el grupo control como contra el grupo de CCl_4 .

En esta etapa de tratamiento el grupo tratado solamente con adenosina se caracterizó por que los valores en su contenido de MDA se presentaron por debajo de los observados en el grupo control.

A las ocho semanas de tratamiento los valores de MDA en el grupo tratado con CCl_4 siguieron incrementándose hasta alcanzar un aumento de 342% respecto al control. El grupo tratado con CCl_4 - ADO también mostró un incremento en el contenido de MDA llegando a ser de 297% respecto al grupo control. Esta segunda etapa de tratamiento se caracterizó por que en ambos grupos el contenido de MDA sufrió un gran incremento siendo estos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.01$) respecto al control (fig # 5).

A pesar de que en las dos etapas de tratamiento se observó un incremento sustancial en el contenido de MDA en ambos grupos experimentales, el grupo experimental al que se le adicionó la adenosina conjuntamente con el tetracloruro de carbono siempre mantuvo sus valores por debajo del grupo tratado con CCl_4

Los resultados obtenidos en las diferentes fracciones subcelulares se observaron de la siguiente manera:

Mitocondrias: La cuantificación en el contenido de MDA en esta fracción subcelular en ambos periodos de tratamiento no mostró grandes diferencias entre los grupos experimentales. En el primer periodo de tratamiento (cuatro semanas) tanto el grupo tratado con CCl_4 como el grupo tratado con $\text{ADO}\cdot\text{CCl}_4$ reportaron valores de MDA muy cercanos a los del grupo control; el primer grupo mostró un diferencia de 140% en su contenido de MDA y el segundo de 138%. En la segunda parte del periodo experimental (ocho semanas de tratamiento) en el grupo tratado con CCl_4 el valor del MDA disminuyó colocándose en 121% respecto al grupo control, y de acuerdo a lo observado a las cuatro semanas de tratamiento. Por su parte el grupo tratado con $\text{ADO}\cdot\text{CCl}_4$ contrariamente a lo que sucedió con el grupo antes mencionado mostró un incremento 134%; sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Finalmente mencionaremos que el grupo control tratado con adenosina mantuvo una continuidad en su contenido de MDA en ambos periodos de tratamiento (fig. # 6).

Citosol: Las diferencias observadas en el contenido de MDA en esta fracción subcelular para cada uno de los grupos experimentales dentro de las primeras cuatro semanas de tratamiento se dieron de la siguiente manera: en el grupo tratado con CCl_4 el aumento en contenido de MDA se cuantificó en 281% aproximadamente ($p < 0.01$). El grupo tratado con $\text{CCl}_4\cdot\text{ADO}$ presentó un incremento de 662%, lo cual lo coloca como el grupo que mayor contenido de MDA registró en esta primera etapa y estadísticamente sus valores fueron significativos ($p < 0.01$).

En el segundo periodo el grupo tratado con CCl_4 tuvo un incremento en MDA de 192% respecto al grupo control, este valor fue menor que el observado a las cuatro semanas ($p < 0.01$). En lo referente al grupo de $\text{CCl}_4\cdot\text{ADO}$, el contenido de MDA se vio aumentado en 120%, observándose una notoria diferencia con lo sucedido a las cuatro semanas de tratamiento. Algo importante de mencionar es que en esta fracción, el grupo tratado con adenosina presentó un alto contenido de MDA (223%) revasando los valores de los grupos de CCl_4 y $\text{CCl}_4\cdot\text{ADO}$ ($p < 0.01$) (fig. # 7).

Microsomas: Los microsomas son una de las fracciones subcelulares más importantemente afectadas por efecto del tetracloruro de carbono. En ellos observamos un patrón de comportamiento muy semejante a lo que sucedió en las muestras de homogenado total en cuanto al contenido de MDA se refiere.

Para los dos periodos de tratamiento el grupo tratado únicamente con CCl_4 reportó altos niveles de MDA. A las cuatro semanas de tratamiento el contenido de MDA fue de 380% y a las ocho semanas este incremento tuvo un valor de 335% ambos grupos referidos a sus respectivos grupos control. Para los grupos tratados con CCl_4 -ADO los niveles cuantificados de MDA a las cuatro semanas fueron de 180% y a las ocho semanas 251%. Los valores presentaron significancia estadística respecto a los grupos control ($p < 0.01$). La adenosina por si sola, mantuvo en esta fracción el contenido de MDA con valores poco aumentados (fig. # 8).

Membrana plasmática: Los eventos observados en esta fracción a las cuatro semanas nos mostraron que el contenido de MDA se elevó 190% en el grupo de CCl_4 ($p < 0.01$) y 130% en el grupo de CCl_4 + ADO, a pesar del incremento la diferencia no fue significativa en este grupo. A las ocho semanas el valor del contenido de MDA en el grupo tratado con CCl_4 resultó en un 136% de incremento, como se observa este resultado fue menor que a las cuatro semanas. El contenido de MDA en el grupo CCl_4 -ADO llegó a ser de 214%, este valor como vemos estuvo por encima de lo reportado para el CCl_4 y tuvo una significancia de ($p < 0.01$). El grupo tratado con adenosina se colocó con un resultado inferior a lo cuantificado en el grupo control en ambos periodos de tratamiento (fig. # 9)

Núcleos: Los resultados cuantificados en la primera fase experimental en los núcleos, permitieron observar que el MDA en el grupo de CCl_4 se incrementó 150% y en el grupo tratado con CCl_4 -ADO este incremento fue de 311% ($p < 0.01$). A las ocho semanas de tratamiento el grupo de CCl_4 alcanzó un incremento en los niveles de MDA de 180%, no siendo significativo. En cambio el grupo de ADO- CCl_4 mantuvo un incremento constante en ambas etapas, en esta parte el MDA se elevó hasta alcanzar 551% ($p < 0.01$) (fig. # 10). Este resultado fue muy semejante a lo observado en citosol a las cuatro semanas, en donde el incremento alcanzó un valor de 662% (fig. # 7).

Finalmente podemos resumir diciendo que cada una de las muestras analizadas de los grupos con los que trabajamos tuvieron un patrón de comportamiento muy particular en los dos periodos de tratamiento. En las primeras cuatro semanas de tratamiento fracciones como los microsomas, mitocondrias y la membrana plasmática, además del homogenado total de los animales tratados con CCl_4 permitieron observar de manera general un importante incremento en el contenido de MDA. El citosol por su parte mostro un alto contenido de MDA en esta fase, evento que se observó en núcleos y membrana plasmática a las ocho semanas de tratamiento.

A las ocho semanas de tratamiento el incremento en el contenido de MDA en homogenado y microsomas del grupo tratado con CCl_4 siguió en aumento; en el grupo tratado con $\text{CCl}_4\text{-ADO}$ los valores se mantienen por debajo de los de CCl_4 . En núcleos y membrana plasmática se presentó alto contenido de MDA, el primero en ambos periodos de tratamiento, el segundo en la primera etapa. Algo importante que podemos resaltar en esta etapa, es que los valores aumentados en el contenido de MDA en estas fracciones podría estar relacionada con eventos de regeneración celular promovidos por la presencia de la adenosina y no precisamente como consecuencia del daño ocasionado por las reacciones pro-oxidantes (95).

QUIMIOLUMINISCENCIA

La quimioluminiscencia es un evento característico cuantificado durante la propagación del daño oxidativo causado por las especies oxígeno reactivas "ROS".

Es utilizada como un índice de referencia en el cual se mide la emisión de luz derivada de moléculas como serían las moléculas simples de oxígeno (O_2^-) y de radicales libres cuya vida media es muy corta; estas moléculas se encuentran en un estado energético de excitación debido a que en su último orbital existen electrones desapareados (27). Los valores obtenidos en la cuantificación de la quimioluminiscencia son tomados como una medida complementaria que junto con el contenido de MDA muestran de manera más clara los efectos causados por las reacciones pro-oxidantes.

De la misma manera que la lipoperoxidación, la quimioluminiscencia se determinó tanto en el homogenado total como en las diferentes fracciones subcelulares. Los valores se expresaron como cpm/mg de proteína.

El patrón de comportamiento observado durante la cuantificación de la quimioluminiscencia tanto en el homogenado como en las diferentes fracciones fue semejante a lo observado en la lipoperoxidación (Tabla # 2).

A las cuatro semanas de tratamiento el homogenado total presentó los más altos valores cuantificados de especies luminosas para cada uno de los grupos experimentales, siendo el grupo tratado con CCl_4 el de más incremento con 128% respecto al grupo control ($p < 0.01$). El grupo de $\text{ADO}\cdot\text{CCl}_4$ mostró un aumento de 100%. En el núcleo las muestras obtenidas de $\text{ADO}\cdot\text{CCl}_4$ fueron las que más especies luminosas presentaron con un aumento de 400% respecto al control; el grupo de CCl_4 tuvo un incremento de 200%.

En el citosol se cuantificaron valores de especies reactivas muy similares en los grupos experimentales el control se observó con un valor inferior a ellos. El grupo de CCl₄ aumentó 128% y el grupo de ADO-CCl₄ 121%.

En membrana plasmática la quimioluminiscencia se vio elevada en 216% respecto al control para el grupo de CCl₄; ADO-CCl₄ aumentó 177%. Los microsomas fueron la fracción que menor cantidad de especies reactivas manifestó en todos los grupos.

La acción del CCl₄ y la adenosina se manifestó de diversas formas en cada fracción subcelular durante las dos etapas de tratamiento. A las cuatro semanas en los núcleos y el citosol fue donde se presentó un mayor incremento de especies reactivas, pero en los núcleos la diferencia fue más clara en el grupo tratado con ambos compuestos ($p < 0.01$).

A las ocho semanas de tratamiento los resultados dieron un giro de tal manera que las especies reactivas se vieron incrementadas de manera más clara en tres de los cuatro grupos experimentales. En las fracciones de microsomas, citosol y núcleo, tanto el grupo control como el tratado solamente con ADO, mostraron un incremento mayor que los grupos restantes. En membrana plasmática se observó un patrón ligeramente distinto, el grupo tratado con CCl₄+ADO presentó una mayor cantidad de especies reactivas.

En nucleos el grupo tratado con ambos compuestos mostró un descenso de 267% respecto a lo observado en el periodo anterior, CCl₄ descendio 98% ambos comparados con el grupo control. Las diferencias observadas no fueron significativas.

Los resultados de lipoperoxidación y quimioluminiscencia analizados de manera conjunta, nos muestran un panorama complementario de la respuesta celular que se da durante el desarrollo de la peroxidacion durante la propagación del daño provocado por el CCl₄.

SISTEMA DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES

En el sistema de defensas antioxidantes el ciclo del glutatión juega un importante papel debido a que es en este ciclo donde diversos tipos de peróxidos como serian las moléculas de peróxido de hidrogeno, son inactivadas por acción de la enzima GSH-Per en presencia del GSH el cual es oxidado a GSSG. El GSSG producto de esta reacción es reducido y transformado nuevamente en GSH por acción de la enzima GSSG-Red, para que este mecanismo funcione adecuadamente es necesaria la presen-

cia de cofactores como el NADPH el cual aporta equivalentes reductores utilizados en el proceso (72). La relación existente en el contenido de GSH/GSSG es aproximadamente de 100:1 y puede ser tomado como un valor indicativo del índice de estrés oxidativo el cual está íntimamente ligado a la lipoperoxidación.

Así se tiene que la determinación del contenido de glutatión y la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo en su conjunto permiten valorar de manera más objetiva el efecto que tuvo la presencia del CCl₄ y la adenosina, debido a que los niveles de glutatión reducido en el tejido hepático cambian de acuerdo a las condiciones inter e intracelulares que se presentan.

Por otro lado la determinación del índice de "estrés oxidativo" (estado en el cual la exposición de los tejidos celulares a los radicales libres u otro tipo de agentes oxidantes representa un reto o desafío de sobrevivencia para dichos tejidos los cuales tratan de mantener su funcionamiento normal en condiciones adversas) se deducen de la relación existente entre GSH / GSSG (83).

1) Determinación del contenido de glutatión total, índice de "estrés oxidativo" y actividad enzimática (GSH-Per. y GSSG-Red.)

Los cambios observados en el ciclo del glutatión a partir de la administración tanto del CCl₄ como de la adenosina ya sea de manera independiente ó conjunta se muestran en la tabla # 3 .

La disminución en los niveles de GSH hepático en 80% provocado por la administración de CCl₄, fue uno de los cambios importantes observados. Inverso a este valor se observó el índice de "estrés oxidativo" registrado, mismo que se incrementó en 150% respecto al grupo control ($p < 0.01$):

El efecto del CCl₄, fue contrarrestado con la administración de adenosina; los animales tratados conjuntamente con ambos agentes mantuvieron sus niveles de glutatión altos llegando a ser superiores al del grupo control en 107% ($p < 0.01$). En este grupo el índice de "estrés oxidativo" fue menor que en el grupo anterior.

La actividad enzimática de GSH-Per. se observó ligeramente incrementada en el grupo tratado con ambos agentes. Para el primer periodo de tratamiento este incremento no mostró diferencias significativas. En la segunda parte del tratamiento CCl₄ presenta decremento y el grupo tratado con CCl₄+ADO incrementa la actividad enzimática. No obstante las diferencias observadas tampoco fueron estadísticamente significativas.

Por su parte la enzima GSSG-Red. en el primer periodo de tratamiento mantuvo su actividad sin cambios importantes en ninguno de los grupos; en el segundo periodo de tratamiento hubo un ligero descenso en la actividad de esta enzima en el grupo tratado con CCl₄, por su parte el grupo tratado conjuntamente con ambos agentes mostró un incremento, pero para ninguno de los grupos las diferencias fueron significativas.

Al analizar los anteriores resultados observamos que la administración de ADO-CCl₄, muestra una importante acción protectora que permite reducir el daño provocado por el agente tóxico. Esta acción puede estar relacionada con la capacidad de la adenosina de mantener e incrementar los niveles de glutatión y manteniendo bajo el índice de "estrés oxidativo".

TABLA # 1: Evaluación histológica de hígados de rata tratados crónicamente con tetracloruro de carbono y adenosina.

| PARAMETRO | TIEMPO DE TRATAMIENTO(4y8 semanas) | | | |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | CCl ₄ (4sem.) | CCl ₄ (8sem.) | CCl ₄ +ADO (4 sem.) | CCl ₄ +ADO (8 sem.) |
| Necrosis | 2 (> 90%) | 2 - 3 (50 - 50%) | 1 - 2 (30 - 70%) | 1 - 2 (60 - 40%) |
| Fibrosis | 1 - 2 (39 - 70%) | 2 - 3 (40 - 60%) | 1 (> 90%) | 2 (> 90%) |
| Acumulación de Grasa | 1 (> 90%) | 1 - 2 (75 - 25%) | 1 (> 90%) | 1 (> 90%) |
| Inflamación | 1 - 2 (65 - 35%) | 2 (> 90%) | 1 - 2 (80 - 20%) | 1 (> 90%) |

NOTA: El estudio se efectuó por duplicado en laminillas con cuatro secciones del Órgano hepático. Se incluyeron al menos cuatro animales de cada grupo. Tejido hepático de ratas control no mostró ninguna anomalía histológica. Grado de daño: (0) ausencia, (1) ligero, (2) moderado y (3) severo. El porcentaje de la distribución relativa del daño se determinó haciendo una relación del daño observado entre la población analizada.

Fig. 1-3: Imágenes obtenidas de cortes histológicos del hígado de ratas tratadas crónicamente con tetracloruro de carbono y adenosina. Fotomicrografías procesadas con la tinción tricrómica de Masson (10x).

Grupo Control:

Sin ningún tipo de tratamiento. Se observa claramente el arreglo de los hepatocitos en cordones, la colágena depositada en los espacios perivenenosos y periportales y en una mínima cantidad.

Fig.1A : a) Hepatocitos, b) Espacio portahepático, c) Sinusoides, d) Colágena.

Grupo Tratado con CCl₄:

Pérdida de la estructura celular en el tejido, disminución de las uniones intercelulares, la acumulación de una gran cantidad de colágena depositada formando septos y la presencia de vesículas de grasa, son algunos de los cambios característicos observados durante el desarrollo de la cirrosis.

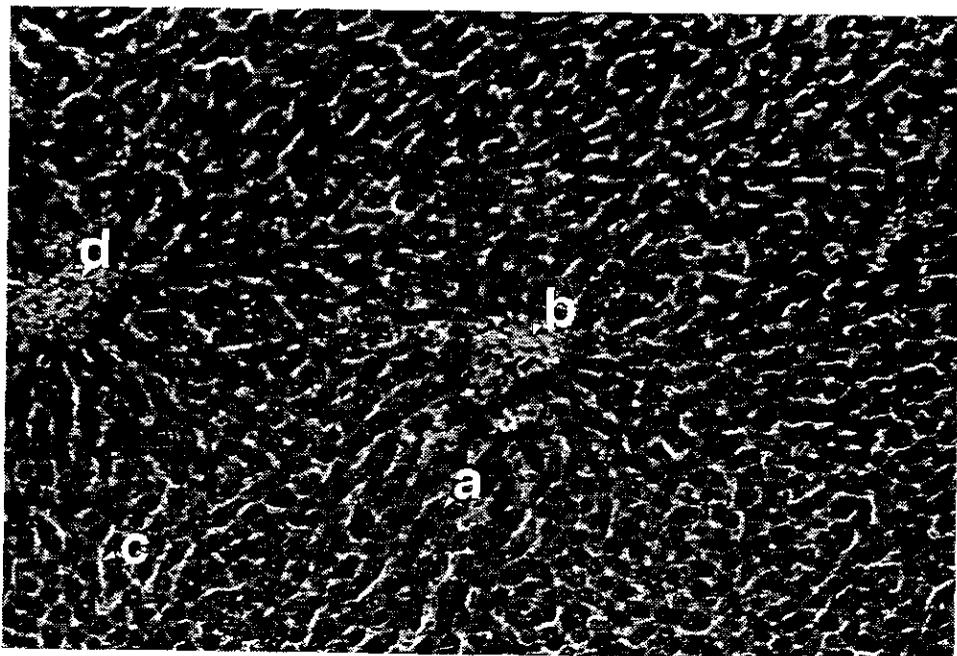
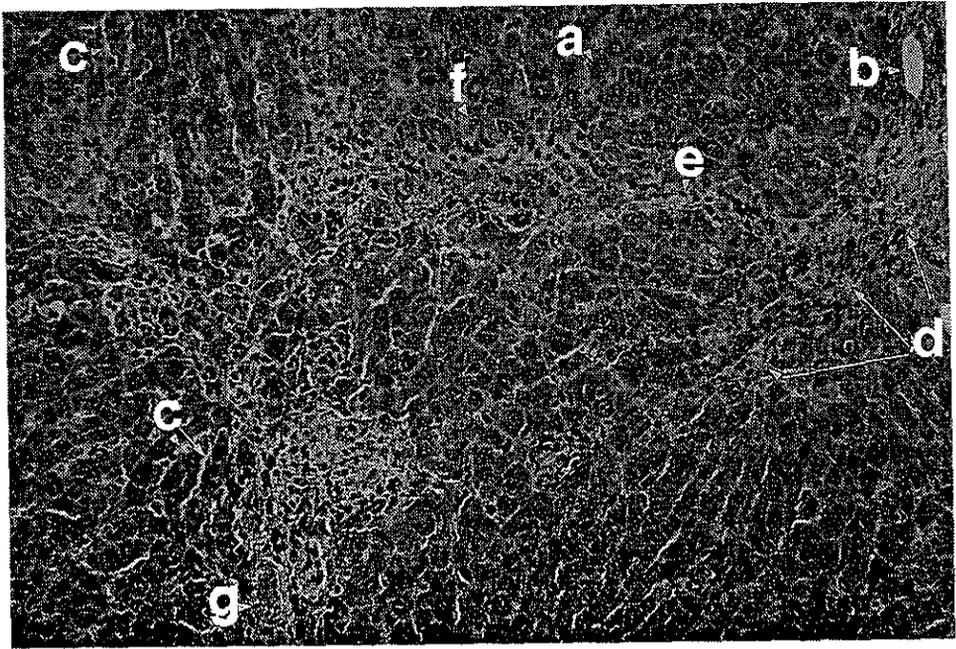


Fig.2A: hígado tratado con CCl₄ durante cuatro semanas,



2B: hígado tratado con CCl₄ durante ocho semanas:

a) Hepatocitos, b) Espacio portahepático, c) Sinusoides, d) Colágena, e) Septos, f) Vesículas esteatósicas, g) Eritrocitos.

Grupo tratado con CCl₄+ADO:

Las alteraciones sufridas en este grupo, son comparativamente menores que en el grupo anterior. Se puede observar la presencia de hepatocitos y una menor cantidad de colágena depositada formando septos. En general la estructura celular en el tejido está mejor preservado.

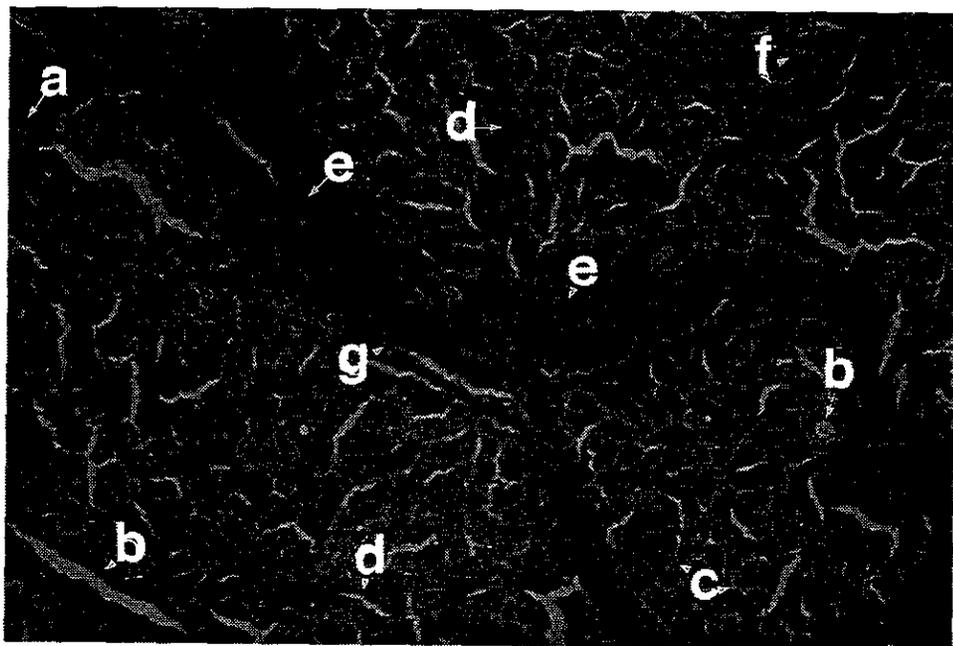
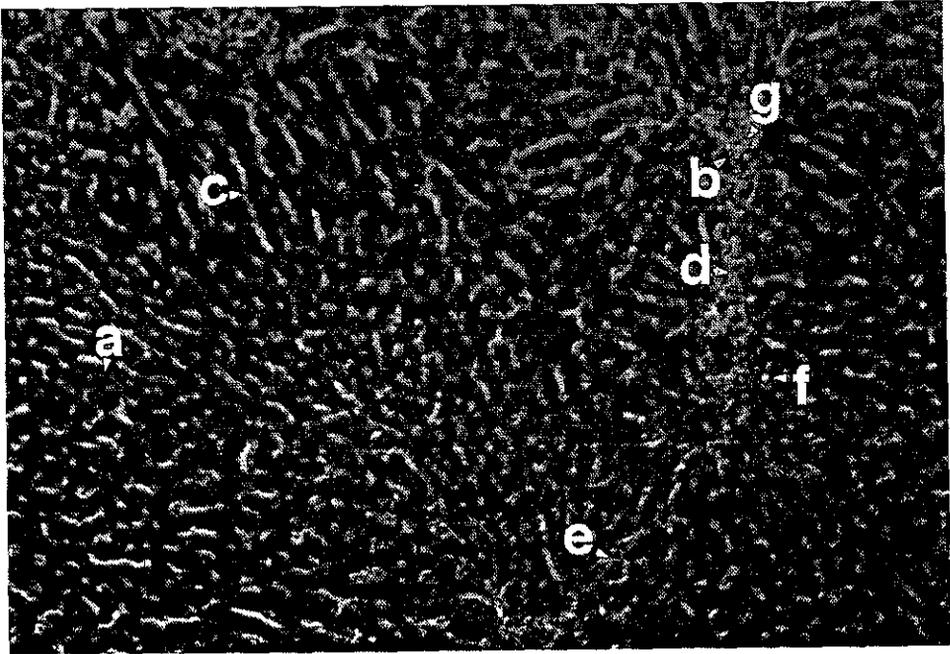


FIG. 3A: hígado tratado con CCl₄+ADO durante cuatro semanas.



3B: hígado tratado con CCl₄-ADO durante ocho semanas.

a) Hepatocitos, b) Espacio portahepático, c) Sinusoides, d) Colágena, e) Septos, f) Vesículas esteatósicas, g) Eritrocitos.

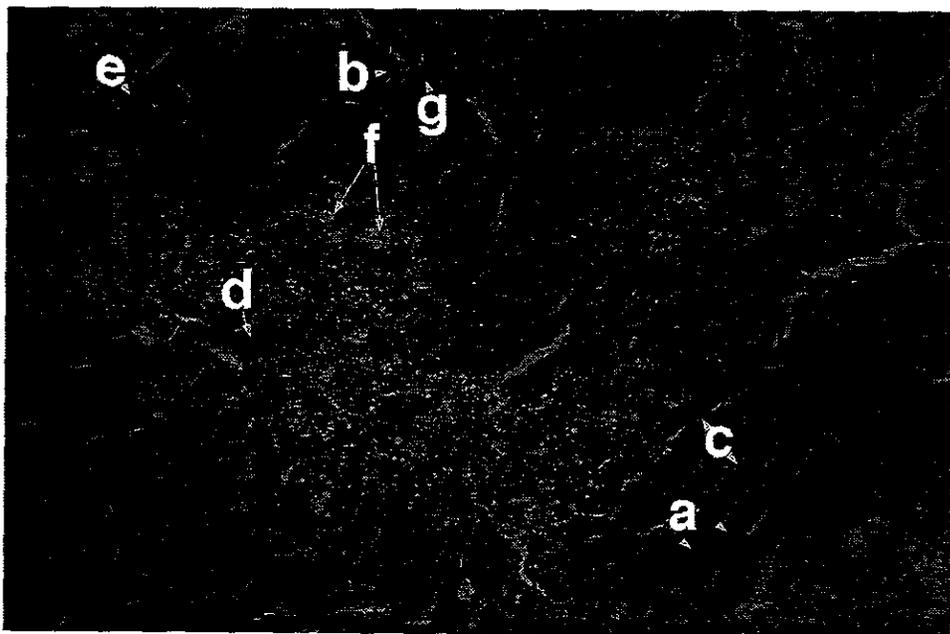


Fig. 4

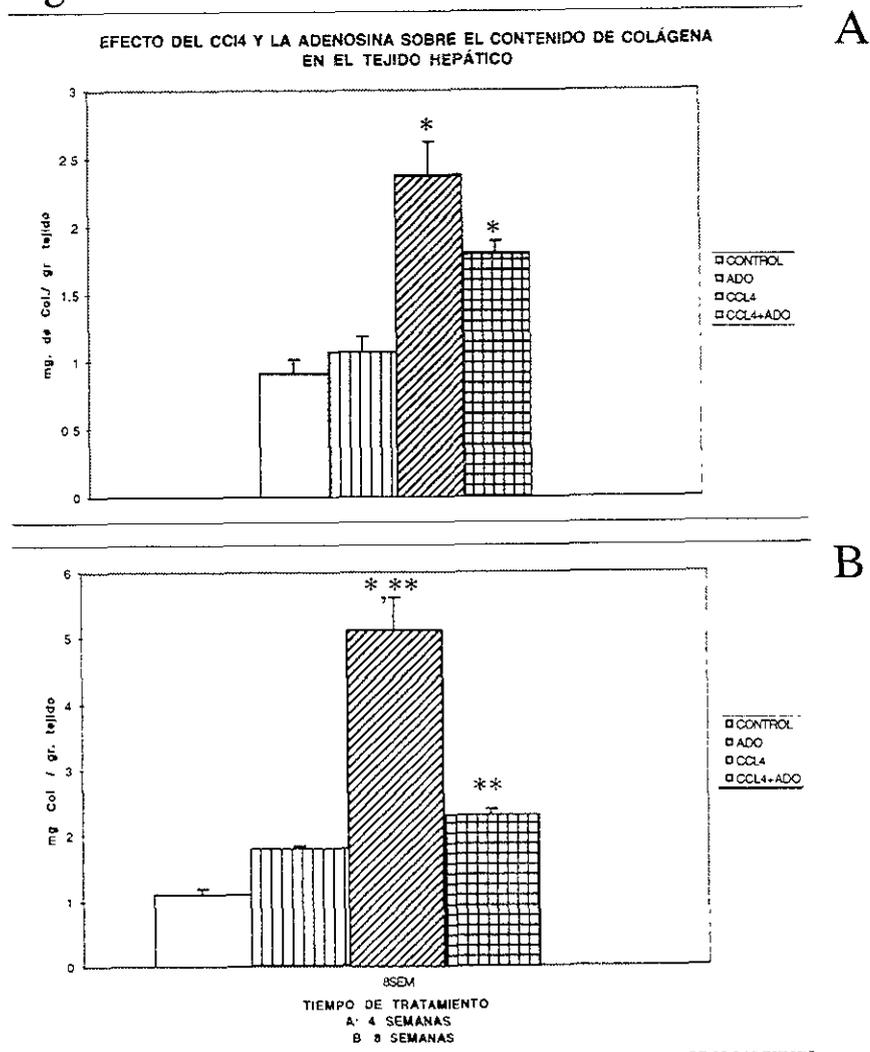


Fig. 4. Contenido de colagena en el tejido hepatico de muestras de higados de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. La significancia estadística se expreso de la siguiente manera y donde n=8:

* P>0.01 vs control

** P<0.01 vs CCl₄

Estadística todos los resultados estan expresados como el Promedio ± ES. La significancia estadística de las diferencias y sus interacciones fue probada por ANOVA

Fig. 5

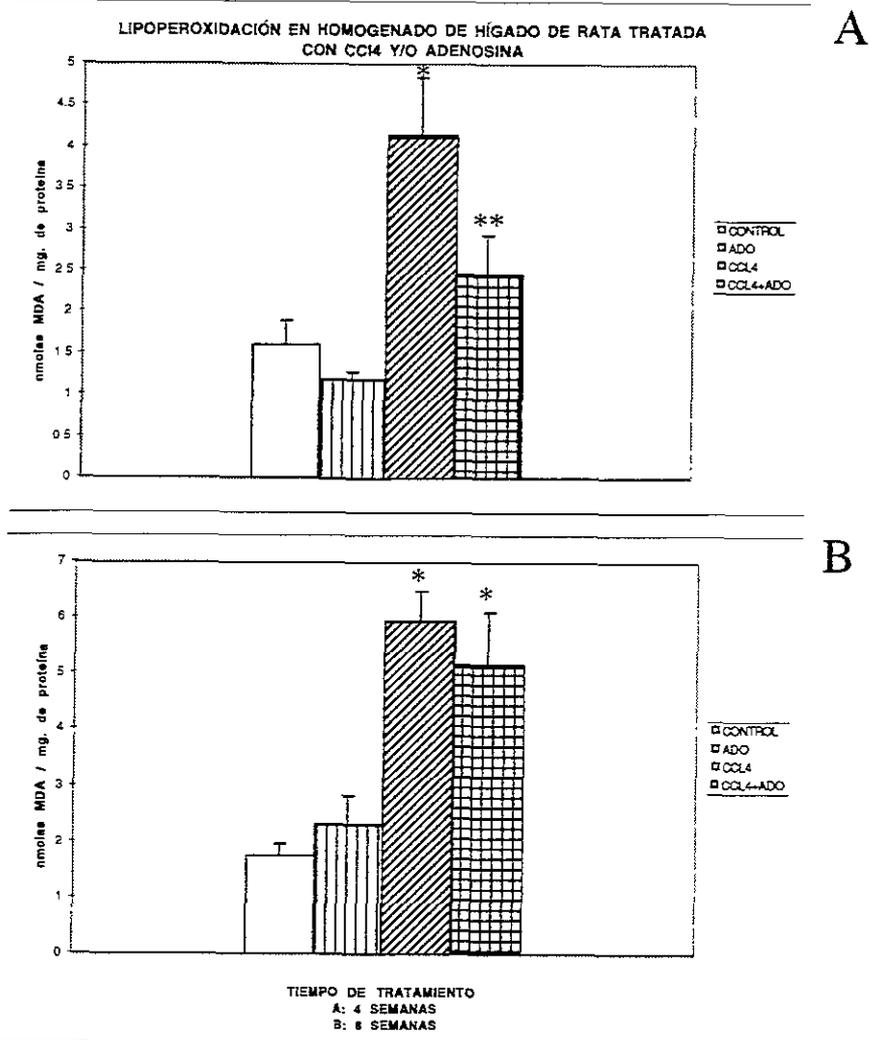


Fig. 5A y 5B. Actividad lipoperoxidativa (nmolas de MDA / mg. de proteína) en muestras de homogenado de hígado de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. Las determinaciones se realizaron en grupos promedio de 8 animales. Representación gráfica de los diferentes grupos experimentales.

Fig. 6

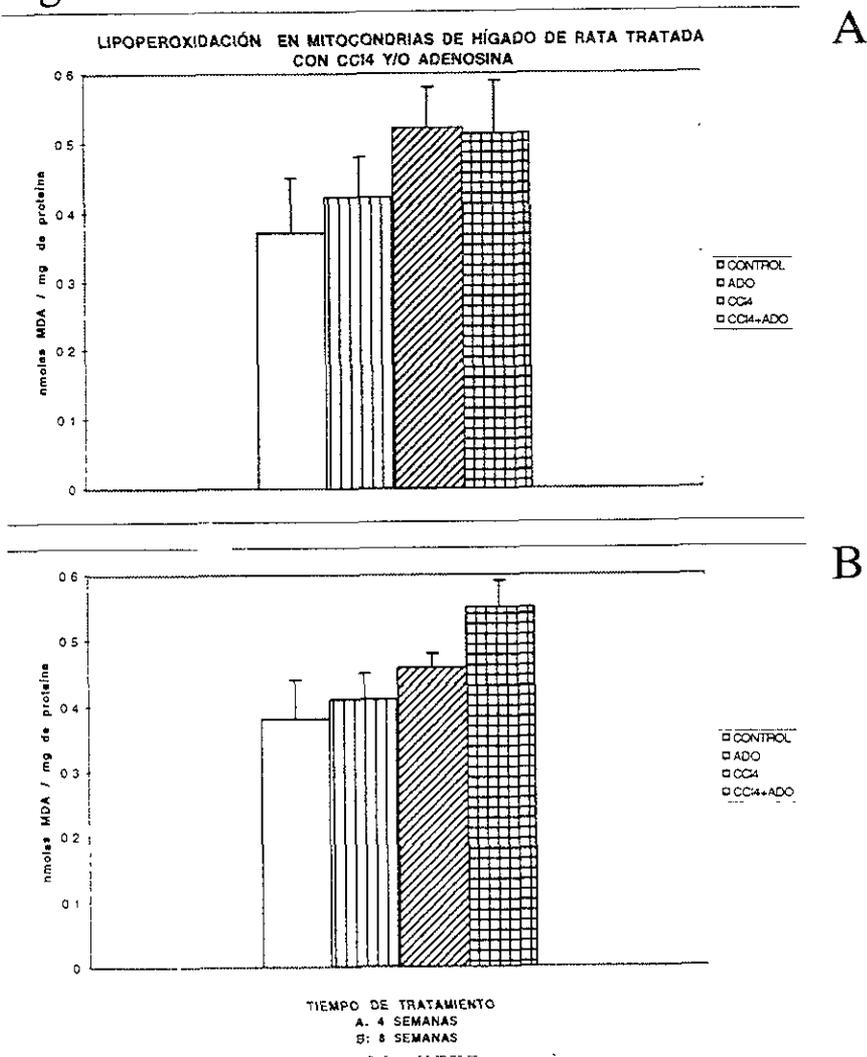


Fig. 6A y 6B. Actividad lipoperoxidativa (nmolas de MDA / mg. de proteina) en mitocondrias obtenidas a partir de muestras de higado de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. Representación gráfica de los diferentes grupos experimentales. La significancia estadística se expreso de la siguiente manera:

* P>0.01 vs control

** P<0.01 vs CCl₄

Estadística: todos los resultados estan expresados como el Promedio±ES. La significancia estadística de las diferencias y sus interacciones fue probada por ANOVA

Fig. 7

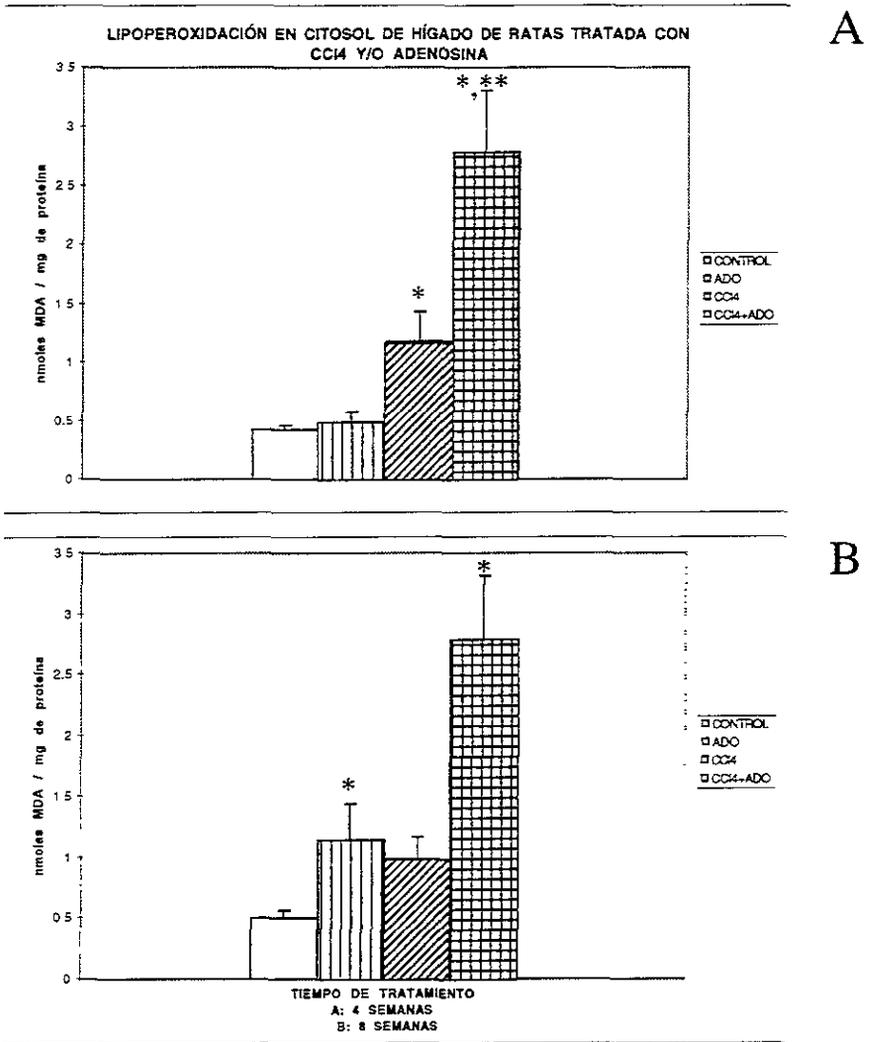
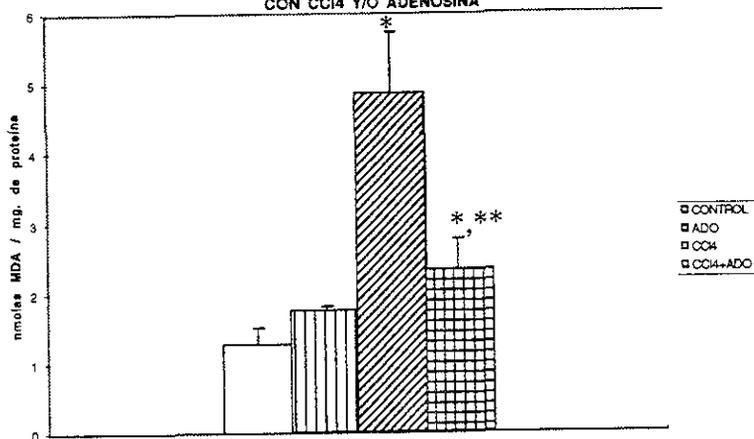


Fig. 7A y 7B. Actividad lipoperoxidativa (nmol de MDA / mg. de proteína) en muestras de citosol obtenidas a partir de hígado de ratas tratadas con CCl₄ y/o Adenosina. Representación gráfica de los diferentes grupos experimentales y donde n= 8.

Fig. 8

LIPOPEROXIDACIÓN EN MICROSOMAS DE HÍGADO DE RATA TRATADA CON CCl₄ Y/O ADENOSINA

A



B

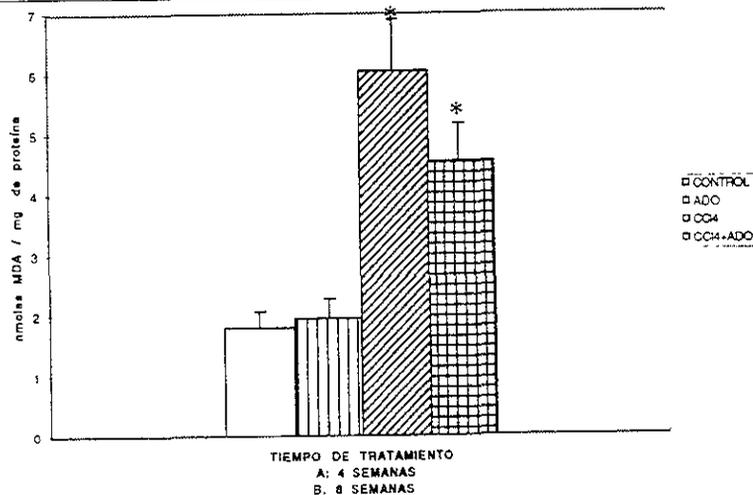


Fig. 8A y 8B. Actividad lipoperoxidativa (nmolas de MDA / mg. de proteína) en muestras de microsomas obtenidas a partir de hígado de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. Representacion grafica de los diferentes grupos experimentales La significancia estadística se expreso de la siguiente manera:

* P>0.01 vs control

** P<0.01 vs CCl₄

Fig. 9

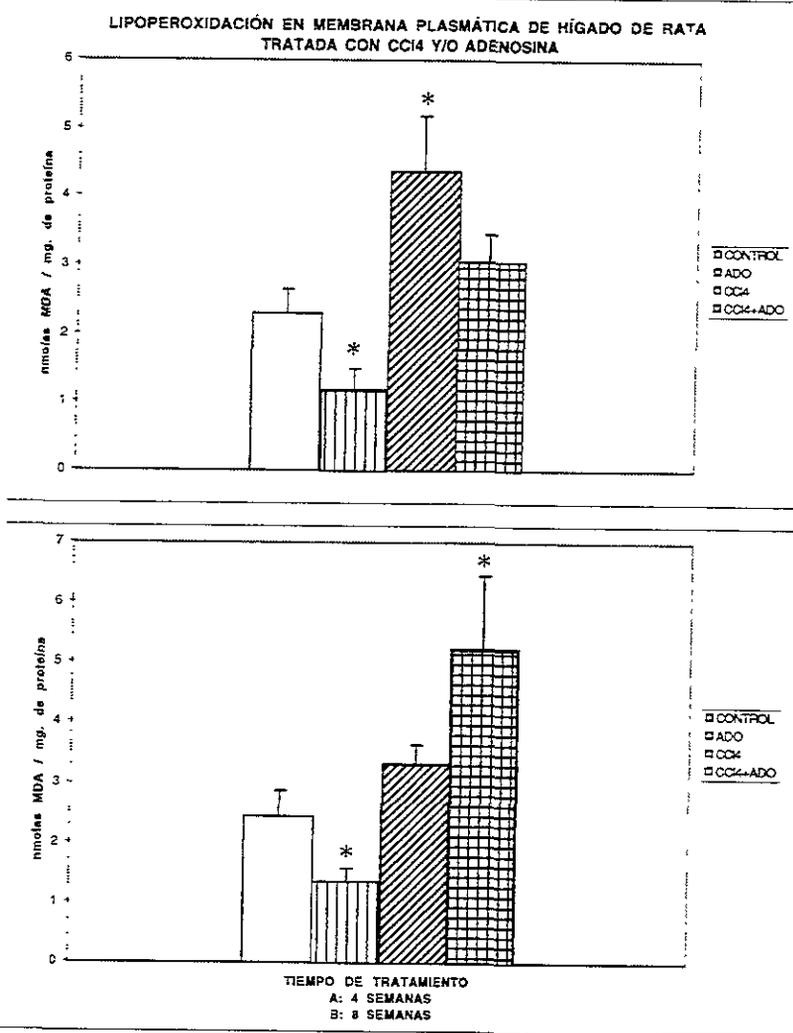


Fig. 9A y 9B. Actividad lipoperoxidativa (nmols de MDA / mg. de proteína) en muestras de membrana plasmática obtenidas a partir de hígado de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. Representación gráfica de los diferentes grupos experimentales y donde n= 8.

Fig. 10

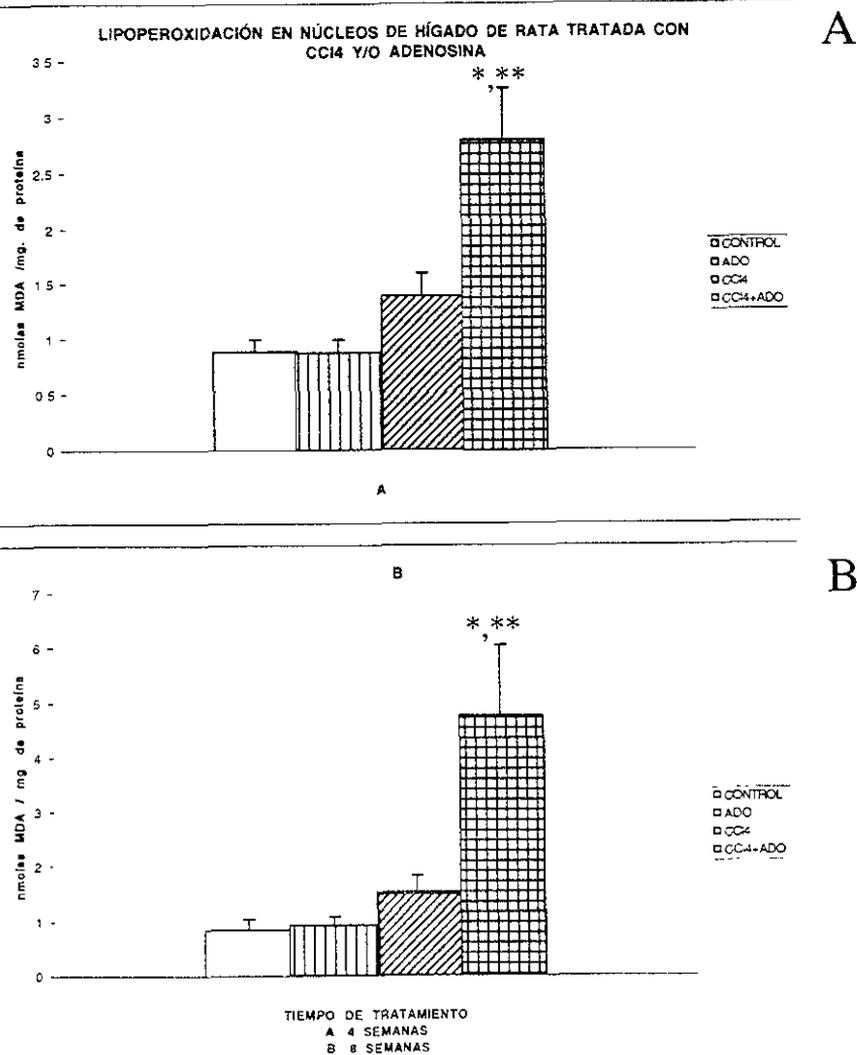


Fig 10A y 10B. Actividad lipoperoxidativa (nmolas de MDA / mg. de proteína) en muestras de nucleos obtenidas a partir de higado de ratas tratadas durante 4 y 8 semanas con CCl₄ y/o Adenosina. Representacion grafica de los diferentes grupos experimentales. La significancia estadistica se expreso de la siguiente manera:

- * P>0.01 vs control
- ** P<0.01 vs CCl₄

TABLA # 2: Efecto de la administración crónica de CCl_4 y/o Adenosina sobre la quimioluminiscencia (tiempo de tratamiento 4-8 semanas).

| TRATAMIENTO | TIPO DE MUESTRA | | | | |
|-------------------------|-----------------|------------|----------|----------------------|-----------|
| | Homogenado | Microsomas | Citosol | Membrana plasmática. | Núcleo |
| Control (4-8) | 16.1±1.6 | 13.1±0.4 | 10.6±1.4 | 16.2±1.3 | 5.8±0.9 |
| CCl_4 + SS (4) | 20.6±0.8* | 9.0±0.7 | 13.6±0.8 | 35.0±4.9* | 11.8±1.5* |
| CCl_4 +ADO (4) | 16.8±0.7 | 15.8±1.4 | 12.8±0.8 | 18.8±3.6* | 23.3±3.9* |
| CCl_4 +SS (8) | 20.9±2.3 | 9.8±0.3 | 12.0±1.4 | 14.1±1.3 | 6.1±0.3 |
| CCl_4 +ADO (8) | 24.9±2.5 | 9.0±0.6 | 12.9±0.8 | 19.0±1.3 | 9.7±1.6 |

NOTA. la quimioluminiscencia fue determinada tanto en el homogenado como en diversas fracciones subcelulares. Los resultados (cpm /mg) fueron expresados como el Promedio ± ES.

* P > 0.01 vs. control

· P < 0.01 vs CCl_4

TABLA # 3: Efecto de la administración crónica de CCl₄ y/o Adenosina sobre el ciclo del glutatión.

| GRUPOS EXPERIMENTALES | | | | |
|-----------------------|--------------|---------------|------------------|-----------------------|
| PARAMETRO | Control | Adenosina | CCl ₄ | CCl ₄ +ADO |
| Cuatro Semanas | | | | |
| GSH | 3.79 ± 0.14 | 4.36 ± 0.14 | 3.03 ± 0.17* | 4.05 ± 0.13' |
| GSSG | 0.05 ± 0.002 | 0.07 ± 0.005* | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.005 |
| GSH+GSSG | 3.48 ± 0.13 | 4.43 ± 0.17 | 3.09 ± 0.19* | 4.11 ± 0.19. |
| "Estrés Oxidativo" | 1.32 | 1.60 | 1.98* | 1.48 |
| GSH-Per. | 3.40 ± 0.31 | 2.82 ± 0.60 | 3.43 0.46 | 4.26 0.51 |
| GSSG-Red. | 0.93 ± 0.07 | 0.99 ± 0.08 | 0.95 ± 0.15 | 0.96 ± 0.18 |
| Ocho Semanas | | | | |
| GSH | 3.70 ± 0.11 | 3.92 ± 0.15 | 3.47 ± 0.12 | 3.95 ± 0.17. |
| GSSG | 0.05 ± 0.004 | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.004 | 0.06 ± 0.004 |
| GSH+GSSG | 3.75 ± 0.13 | 3.98 ± 0.15 | 3.52 ± 0.18 | 4.01 ± 0.20 |
| "Estrés Oxidativo" | 1.35 | 1.52 | 1.73 | 1.52 |
| GSH-Per. | 3.02 ± 0.22 | 3.45 ± 0.70 | 2.08 ± 0.46 | 2.59 ± 0.37 |
| GSSG-Red. | 0.86 ± 0.20 | 0.90 ± 0.10 | 0.75 ± 0.14 | 0.99 ± 0.10 |

NOTA. El contenido de glutatión total corresponde a la suma de los valores parciales de GSH+GSSG. El "estrés oxidativo" fue calculado a partir del Índice del contenido de glutatión total en ratas ($[(GSSG/GSH) \times 100]$). Los resultados fueron expresados como el Promedio ± ES de un total de 7 determinaciones por grupo. La significancia estadística se expresó como:

* P > 0.01 vs control

' P < 0.01 vs CCl₄

Discusión

Se sabe que el establecimiento de cirrosis tanto a nivel clínico como experimental es un evento que involucra una serie de factores tisulares y celulares los cuales interaccionan entre sí para iniciar un proceso de defensa y reparación del daño provocado por el agente tóxico en el tejido hepático (28). El punto de unión entre la lipoperoxidación y el daño hepático aparentemente se debe tanto a la acción de las reacciones pro-oxidantes como a la inhibición de las defensas antioxidantes por la presencia de radicales libres, fenómeno desencadenado durante el metabolismo de diversos agentes tóxicos como el CCl_4 (84).

El desarrollo experimental de diversos trabajos dentro de nuestro laboratorio en los cuales los modelos utilizados fueron tanto la intoxicación hepática aguda como la crónica con tetracloruro de carbono en ratas macho, permitió determinar el papel protector de la adenosina. En el modelo agudo la adenosina fue capaz de aminorar de manera parcial la lipoperoxidación y de prevenir el desarrollo de necrosis celular y de hígado graso (72,75). En el modelo de intoxicación crónica con CCl_4 se ha observado que la adenosina previene la hepato y esplenomegalia, además del incremento en la concentración de colágena hepática la cual es otra característica importante que se establece en el desarrollo de la cirrosis (8).

El desarrollo del presente trabajo permitió hacer una evaluación del papel que desempeñan los radicales libres durante la lipoperoxidación en el proceso cirrótico; además de determinar de que manera influyó la adenosina previniendo o reparando el daño causado por los radicales libres al ser administrada conjuntamente con el tetracloruro de carbono.

De acuerdo con los objetivos planteados esta discusión estará enfocada en tres aspectos. a) validar el modelo experimental utilizado; b) evaluar la participación de los radicales libres generados durante la lipoperoxidación en la etiología de la cirrosis y c) determinar los mecanismos de acción a partir de los cuales la adenosina previene y/o inhibe el daño causado por el CCl_4 sobre el tejido hepático.

Basados en los resultados obtenidos en la primera parte de nuestro trabajo, la cual comprendió el análisis histológico y la cuantificación de colágena y apoyados en anteriores trabajos de nuestro laboratorio y en el conocimiento de trabajos realizados por

otros investigadores, podemos decir que la utilización de este modelo experimental nos permitió cumplir con cada uno de los objetivos planteados.

En principio pudimos reforzar los conocimientos que teníamos acerca del potente efecto tóxico del CCl_4 sobre el tejido hepático. La administración prolongada de este agente tóxico produjo diferentes tipos de lesiones. Macroscópicamente los hígados de los animales tratados con CCl_4 presentaron un incremento en el tamaño, además de observarse un tejido más firme o fibroso y mostrar una coloración parda la cual no es común en los órganos normales. A nivel microscópico como se observó en las figuras presentadas (Fig # 1-3) el tejido mostró cambios muy evidentes como son la pérdida de la estructura celular, la formación de nódulos fibrosos por acumulación de colágena, presencia de depósitos de grasa en forma de gotas (esteatosis), etc. (82). Las muestras de los animales a los que se les administró de manera conjunta tetracloruro de carbono y adenosina no mostraron este patrón morfológico.

Es importante hacer notar que la cuantificación de colágena a partir de la determinación de hidroxiprolina nos permitió inferir que en el tejido de los animales a los que se les administró $\text{ADO} + \text{CCl}_4$, la degradación de colágena se modificó de forma tal que ésta se vio favorecida, observándose una diferencia significativa en el contenido de colágena entre este grupo y el grupo tratado con CCl_4 . El primer efecto positivo de la administración de adenosina se observa aquí. De acuerdo con datos reportados en otros trabajos (85), durante la intoxicación crónica con CCl_4 el contenido de prolina la cual está asociada de manera importante al desarrollo de fibrogénesis y además es un precursor en la síntesis de colágena, aumenta considerablemente. La adenosina es capaz de atenuar gran cantidad de los cambios sufridos durante la intoxicación del tejido hepático; por ejemplo estimula aunque aparentemente no de manera directa la actividad de enzimas como la colagenasa; el mantenimiento de un estado "redox celular" en condiciones favorables y la aportación de energía y su disponibilidad hacia la célula pueden ser algunos de los principales factores que permiten que la adenosina actúe como un importante bloqueador en la acumulación de colágena (8).

Por otro lado, estudios recientes sugieren que existe una relación inversa entre la lipoperoxidación y la actividad de la enzima colagenasa la cual está involucrada en la degradación de la colágena. De esta manera durante la intoxicación hepática con CCl_4 al desencadenarse la lipoperoxidación, se observa una disminución en la actividad de esta enzima y se presenta una acumulación de colágena. De aquí surge la

hipótesis de que la lipoperoxidación hepática participa de manera importante en el desarrollo de la fibrosis (86).

La segunda parte de los resultados en los cuales está incluida la fase bioquímica permitió valorar el papel desempeñado por las reacciones pro-oxidantes en el establecimiento de la cirrosis y la actuación de la adenosina como agente hepatoprotector.

Entre el daño hepático crónico y la lipoperoxidación existe un importante punto de unión que son las defensas antioxidantes. Cuando la lipoperoxidación se presenta y la producción de especies reactivas de oxígeno se desencadena, la actividad de las defensas antioxidantes se deprime desarrollándose un proceso cirrogénico en el tejido; ésto sugiere que la lipoperoxidación participa de manera fundamental en la etiología de la fibrosis hepática (87) (fig. * 5-10).

Dentro de la estructura del tejido hepático, encontramos una región o área muy importante denominada región centrilobulillar. Esta región se caracteriza por presentar bajas concentraciones de oxígeno. La deficiencia de oxígeno de esta zona influye grandemente para que sea la primeramente afectada durante el metabolismo del CCl_4 . Las bajas concentraciones de oxígeno favorecen la conversión del CCl_4 a radicales libres y la presencia de estos radicales induce una gran actividad oxidativa de NADPH en el citocromo P-450 de los microsomas, mismos que sufrirán un ataque peroxidativo sobre los ácidos grasos insaturados formadores de membrana (88). De esto se deduce que la intoxicación por CCl_4 está estrechamente ligada a los sitios donde existe una baja concentración de oxígeno, característica que juega un papel fundamental en este evento (13).

Al analizar los resultados observamos que la fracción microsomal de los animales tratados con CCl_4 presentó un importante incremento en la lipoperoxidación sobre todo a las ocho semanas de tratamiento, cuando la fibrosis está bien establecida. Aunado a estos resultados están los obtenidos para la quimioluminiscencia; específicamente en esta fracción se observó un decremento de especies oxígeno reactivas probablemente debido a que los precursores que dan origen a estas moléculas se encontraban agotados como consecuencia de la intoxicación. El daño provocado sobre las membranas microsomales podría explicar la deficiente capacidad metabólica que se observa en el tejido cirrótico (6) (Tabla * 2).

Por su parte la adenosina al ser administrada conjuntamente con CCl_4 reduce considerablemente la lipoperoxidación, aunque esta reducción no se llevara a cabo de manera general en todas las fracciones subcelulares. Un ejemplo de esto lo observa-

mos de manera muy específica en núcleos, membrana plasmática y citosol. Es posible que la presencia de un alto contenido de MDA en estas fracciones y sobre todo en núcleos, tenga relación con procesos de regeneración en el tejido hepático.

La idea de que la lipoperoxidación funciona como un modulador durante la división celular influenciando el inicio y término de la mitosis durante la regeneración hepática, ha sido propuesta y fundamentada por diversos investigadores (89). De aquí que los resultados obtenidos en este trabajo no son de ninguna manera eventos aislados o sin una aparente explicación; sino más bien una continuidad de procesos relacionados con una respuesta dada por el tejido hacia una agresión recibida, la cual puede ser confortada o apoyada por la presencia de la adenosina en su papel de agente hepatoprotector.

Analícemos ahora lo referente al índice de "estrés oxidativo". Debido a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular la reducción de oxígeno es un evento muy importante en los sistemas biológicos. Si a esto se une la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, el resultado será la deterioración oxidativa de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas biológicas (lipoperoxidación) y el incremento del índice de estrés oxidativo (47). La cuantificación de altos índices de "estrés oxidativo" en ambos periodos de tratamiento permitió sugerir que dentro del proceso cirrogénico el fenómeno del "estrés oxidativo" se desencadena muy tempranamente.

A las cuatro semanas de tratamiento el índice de "estres oxidativo" fue 150% más alto que el control, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. Sin embargo a las ocho semanas el valor cuantificado es menor ¿por qué?, de la misma manera que sucede con la lipoperoxidación la respuesta puede estar relacionada con eventos de regeneración del tejido hepático (90) (Tabla # 3).

Como se mencionó al inicio de este trabajo el ciclo del glutatión forma parte de las defensas antioxidantes y es uno de los mas importantes. Utilizando al NADPH como cofactor la enzima GSSG-Red. reduce el GSSG a GSH el cual es utilizado como substrato por la enzima GSH-Per. para transformar los productos toxicos formados durante la lipoperoxidación como el H₂O₂ y otros peróxidos en productos inocuos como el agua. Por otro lado, la reducción del glutatión oxidado permite mantener el balance normal de los grupos tiol presentes en las membranas, además de equilibrar la relación entre ambos productos permitiendo un funcionamiento celular adecuado (91,92) La depresión en los niveles de glutatión conlleva a una baja en las defensas celulares, y esto a su vez propicia el dano y la muerte celular (93).

Refiriéndonos a nuestras condiciones experimentales el contenido de glutatión en las muestras de homogenado del tejido hepático de los animales que fueron tratados con CCl_4 disminuyó en un 20% respecto de los valores normales observados en el grupo control (tabla^a 3), e inversamente el índice de "estrés oxidativo" se vio favorecido en la primera etapa de tratamiento cuando la cirrosis se está desarrollando. Por su parte, el grupo tratado con ADO- CCl_4 mostró valores de glutatión para ambos periodos más altos que los observados en el grupo antes mencionado. En cuanto al índice de estrés oxidativo se refiere este se vio disminuido lo que sugiere que la adenosina por su parte al mantener los niveles de glutatión elevados permitió que los mecanismos en los cuales este compuesto está involucrado funcionaran de manera adecuada.

Para finalizar diremos que el contenido de este trabajo nos permite concluir que la utilización de la adenosina como agente hepatoprotector fue capaz de reducir el índice de "estrés oxidativo" y la lipoperoxidación promovidos por el CCl_4 durante el proceso cirrogénico; de mantener los niveles de actividad fisiológica y los niveles de glutatión del tejido hepático por encima de los reportados para los animales tratados solamente con CCl_4 , estimulando la actividad de algunas enzimas como la colagenasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y de inhibir la acumulación de colágena, disminuyendo los dramáticos cambios estructurales observados en el hígado por efecto de la intoxicación crónica con este potente agente hepatotóxico (90). Además habrá que mencionar que la presencia de altos niveles de MDA en fracciones como los núcleos y citosol puede estar relacionada con eventos de regeneración y posiblemente la adenosina sea un punto angular en la preservación de la capacidad regenerativa del tejido hepático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Seyer J.M., Hutchenson E.T., Kang A.H. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J. Clin. Invest.* 59:241-248. 1977.
- 2 Pérez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease?. *Pathol. Ann.* 14:183-213. 1979.
- 3 Olaso V., Ortuño J.A. Anatomofisiología del hígado. *Gastroenterología y Hepatología Berenger J.* 1era edición 635 - 644. DOYMA Barcelona 1986.
- 4 Rojkind M., Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. *Collagen. Rel. Res.* 2: 152-175. 1982.
- 5 Rojkind M., Rojkind M. H., Cordero-Hernández J. In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regeneration rat livers. *Collagen. Rel. Res.* 3: 335-347. 1983.
- 6 Murray M., Farrell G.C. Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 33 (4): 687-689. 1984.
- 7 Clawson G.A. Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.* 8: 104-112. 1989.
- 8 Hernández - Muñoz R., Díaz - Muñoz M., Suárez J. y Chagoya de Sánchez Victoria. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology*; 12 (2): 242-248. 1990.
- 9 Costa Anita K., Trudell James R. Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayers. *Exp. Mol. Biol.* 50: 183-192. 1989.
- 10 Muñoz Torres E., Paz Bouza J.I., et. al. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int. J. Tiss. React.* 10(4): 245-251. 1988.
- 11 Christie G.S., Judah J.D. Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells. *Proc. Roy. Soc. London S.B.* 142: 241-257 1954.
- 12 Calvert D.N., Brody T.M. Biochemical alterations of liver function by halogenated hydrocarbons. I. In vitro and in vivo changes and their modification by ethylenediamine tetracetate. *J. Pharmacol. E Exp. Therap.* 124: 273-281. 1958.
- 13 Recknagel Richard O., Glende Eric A., Dolak James A. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac. Ther.* 43: 139-154. 1989.
- 14 Beaune Philippe H., Kremers Pierre G., et. al. Comparison of monooxygenase activities and cytochrome P-450 isozyme concentrations in human liver microsomes. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 14(4). 437-441. 1986

- 15 Gillette J.R., Brodie B.B., LaDu B.N. The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119: 532-540. 1957.
- 16 Bast A., Goossens P.A.L., Savenije-Chapel E.M. Dependence of hydrogen peroxide formation in rat liver microsomes on the molecular structure of cytochrome P-450 substrates: a study with barbiturates and (-adrenoreceptor and antagonists. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 14(2). 93-100. 1989.
- 17 Kitada Mitsukazu, Komori Masayuki, et. al. Form-specific degradation of cytochrome P-450 by lipid peroxidation in rat liver. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology.* 63(2): 175-187. 1989.
- 18 Persson J.O., Terelius Y. and Ingelman-Sundberg. Cytochrome P-450 dependent formation of reactive oxygen radicals: isozyme-specific inhibition of P-450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride. *Xenobiotica;* 20 (9): 887-900. 1990.
- 19 Bondy Stephen C. and Naderi Sassan. Contribution of hepatic cytochrome systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.;* 48 (1): 155-159. 1994.
- 20 Serbinova E.A., Kadiiska M.B., et. al. Lipid peroxidation activation and cytochrome P-450 decrease in rat liver endoplasmic reticulum under oxidative stress. *Toxicology Letters.* 47: 119-123. 1989.
- 21 Mansuy Daniel, Fontecave Marc, Chottard Jean-Claud. A heme model study of carbon tetrachloride metabolism: mechanism of phosgene and carbon dioxide formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 95(4): 1536-1542. 1980.
- 22 Comporti Mario. Biology of Disease: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation;* 53 (6): 599-623. 1985.
- 23 Burk F. Raymond, Patel Kuldeep and Lane James M. Reduced glutathione protection against rat liver microsomal injury by carbon tetrachloride. *Biochem. J.;* 215: 441-445. 1983.
- 24 Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The Am. J. Med.;* 91: 31-37. 1991.
- 25 Tomasi A., Albano E., Banni S. and cols. Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria: a study of the mechanism of action. *Biochem. J.;* 246: 313-317. 1987.
- 26 Kelvin J. A. Davies. *Protein damage and degradation by oxygen radicals.* *J. Biol. Chem.;* 262 (20): 9895-9901. 1987.
- 27 Halliwell B. *Free radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press. Oxford. 1985.
- 28 Glende E.A., Recknagel R. Biochemical basis for the in vitro pro-oxidant action of

- carbon tetrachloride. *Exp. and Molec. Biol.*; 11:172-185. 1969.
- 29 Buc-Calderón P. and Roberfroid M. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by N-Acyldehydroalanines: an in vitro comparative study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 273 (2): 339-346. 1989.
- 30 Tretter L., Nguyen T. H., and cols. Lipid peroxidation in Erlich Ascites cell mitochondria is not determined by the polyunsaturated fatty acid content of the membrane. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*; 163 (1): 356-362. 1989.
- 31 Janssen YMW, Van Houten B., et. al. Biology of Disease: cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Inv.* 69:261-274. 1993.
- 32 Masuda Y. and Murano T. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes in vitro. *Biochem. Pharmacol.*; 26: 2275-2282. 1977.
- 33 Nagasaka Juji, Fujii Shinya, Kaneko Toshio. Microsomal glutathione-dependent protection against lipid peroxidation acts through a factor other than glutathione peroxidase and glutathione s-transferase in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 274(1): 82.86. 1989.
- 34 Poli Giuseppe, Cheeseman Kevin, et. al. The role of lipid peroxidation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes: comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells. *Chem. Biol. Interactions*; 37: 13-24. 1981.
- 35 Puntarulo Sunana, Cederbaum Arthur I. Effect of oxygen concentration in microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals. *Biochem. J.* 251:787-794. 1988.
- 36 Reynolds E.S., Thiers R.E., Vallee B.L. Mitochondrial function and metal content in carbon tetrachloride poisoning. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 273(11): 3546-3551. 1962
- 37 Hernández - Muñoz R., Díaz - Muñoz M., Chagoya de Sanchez V. In vivo and in vitro adenosine stimulation of ethanol oxidation by hepatocytes, and the role of malate - aspartate shuttle. *Bioch. et Biophys. Acta*; 930: 254-263. 1987.
- 38 Hernández - Muñoz R., Díaz - Muñoz M., Chagoya de Sanchez V. Effects of adenosine administration of the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch. of Biochem and Biophys*; 249 (1): 160 - 167. 1992.
- 39 Lauterburg B.H., Smith C.V., et. al. Determinants of hepatic glutathione turnover: toxicological significance. Elsevier Biomedical Press; 245-248 1982.
- 40 Rikans Lora E, Snowden Cynthia D and Moore Danny R. Effect of aging on enzymatic antioxidant defenses in rat liver mitochondria. *Gerontology*, 38. 133-138. 1992

- 41 Jongkind J.F., Verkerk A., et. al. Glutathione metabolism of human vascular endothelial cells under peroxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 7 : 507-512. 1989.
- 42 Kelvin J.A. Davis, Wiese Anne G., et. al. Repair systems in oxidative stress. *Molecular Biology of Aging*; 123-141. 1990.
- 43 McCord J.M., Fridovich Y. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055. 1969.
- 44 Awasthi Yogesh C., Beutler Ernest, Srivastava Satish K. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 250(13): 5144-5149. 1975.
- 45 Pai Emil F. and Schulz George E. The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.*; 258 (3): 1751-1757. 1983.
- 46 Lê-Quốc, D. and Lê-Quốc Khanh. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch. Bioch. Bioph.*; 273(2): 466-478, 1989.
- 47 Videla L.A. and Fernández V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch. Biol. Med. Exp.*; 21: 85-92. 1988.
- 48 Scholz R. W., Kenneth S. et. al. Glutathione disulfide enhances glutathione inhibition of lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 166 (2): 960-966. 1990.
- 49 Gorla N., de Ferreyra E.C., Villarruel M.C. et. al. Studies of the mechanism of glutathione prevention of carbon tetrachloride-induced liver injury. *Br. J. Exp. Path.*; 64: 388-395. 1983.
- 50 Galleoti Tommaso, Borrello Silvia, Masotti Lafranco. Oxygen Radicals: Systemic and disease processes: Oxy.radical sources, scavenger systems and membrane damage in cancer cells. KARGER, Das Essman (eds.); 129-148. 1990.
- 51 Milani Stefano, Herbst Hermann, et. al. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*; 98: 175-184. 1990.
- 52 Vuorio E., Crombrughe B. The family of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 837 - 872; 1990.
- 53 Harper, E. Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.*; 49: 1063-1078. 1980.
- 54 Gelfand V.I. Microtubule dynamics: mechanism, regulation and function. *Annu. Rev. Cell. Biol.* ; 7: 93-116. 1991.
- 55 Bedossa Pierre, Houglum Karl, et. al. Stimulation of collagen $\alpha 1(I)$ gene expression is

- associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology*; 19 (5): 1262-1271. 1994.
- 56 Aycock R., Seyer J. Collagens of normal and cirrhotic human liver *Connective Tissue Research*; 23: 19-31. 1989.
- 57 Masuda, H.; et. al. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(II)$ collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *Clin. Invest.*; 94: 2481-2488, 1994.
- 58 Cerbón-Ambríz J., Cerbón J., González E. and Rojkind M.. Lactate and piruvate increase the incorporation of $[3H]$ proline into collage $[3H]$ hydroxyproline in liver slices of CCl_4 cirrhotic rats. *Laboratory investigation*; 57 (4): 392-396. 1987.
- 59 Gascon-Barré Marielle, Huet Pierre-Michel, et. al. Estimation of collagen content of liver specimens. Variation among animals and among hepatic lobes in cirrhotic rats. *J. Histochem. Cytochem.*; 37 (3): 377-381. 1989.
- 60 Nakatsukasa H.; et. al. Cellular distribution of transforming growth factor- $\beta 1$ and procollagen types III, and IV transcripts in carbón tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*; 85: 1833-1843, 1990.
- 61 Takahara Terumi, Kojima, Takashi et. al. Collagen production in Fat-Storing cells after carbon tetrachloride intoxication in rat. *Laboratory Investigation*; 59 (4). 509-521. 1988.
- 62 Al Adnani M. S. Differential immunohistochemical localization of cytokeratins and collagen types I and II in Experimentally-induced cirrhosis. *J. of Pathology*; 159 : 151-158 1989.
- 63 Dinarello, C.A., Chusid, M.J., Fauci, A.S. Effects of prophylactic colchicine therapy on leukocyte function in patients with familiar mediterranean fever. *Arthritis Rheum.*; 19: 618-622. 1976.
- 64 Brenner, D.A. and Alcorn, J.M. Therapy for hepatic fibrosis. *Seminars in liver disease.*, 10 (1): 75-83. 1990.
- 65 Hernandez - Muñoz R., Díaz - Muñoz M., y Chagoya de Sanchez V Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Bioch. et Biophys Acta*; 1200: 93 - 99. 1994.
- 66 Calvin, M. Chemical evolution. molecular evolution toward the origen of living systems on the earth and elsewhere. Reconstruction of chemical evolution from molecular paleontology and from simulated primitive earth experiments. Oxford

- University Press, London. p. 268. 1969.
- 67 Drury A.N. and Szent-Györgyi. The physiological activity of sdenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)*; 68: 213-237. 1929.
- 68 Chagoya de Sánchez Victoria. Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms?. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*; 73: 339-355. 1995.
- 69 Champigneulle B., Braillon A., et. al. Adenosine and hemodynamic alterations in cirrhotic rats. *Am. J. Physiol.* 260 (Gastrointest. Liver Physiol. 23): G543-G547. 1991.
- 70 Hernández - Muñoz R., Glender W., Díaz - Muñoz M., y cols. Alterations of ATP levels and of energy parameters in the blood of alcoholic and nonalcoholic patients with liver damage. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*; 15 (3): 500-503. 1991.
- 71Lund P., Neal W., Cornell W., y cols. Effect of adenosine on the adenine nucleotide and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.*; 152: 593-599. 1975.
- 72 Chagoya de Sánchez V., Herández - Muñoz R., y cols. Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *J. Biochem. Toxicology*; 10 (i) 41-50.1995.
- 73 Hernández - Muñoz R., Glender W., Díaz - Muñoz M., y cols. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*; 33 (16): 2599-2604. 1984.
- 74 Schneider W.C. and Hogeboon G.C. *J. Biol. Chem.* ;183: 132-128. 1950.
- 75 Rojkind M. and González E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hidroxiprolina.¹⁴C in collagen and in noncollagen proteins. *Analytical Biochemistry*; 57: 1-7. 1974.
- 76 Ottolenghi A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*; 79:355-363. 1959.
- 77 Lowry O.H., et. al. *J. Biol. Chem.* ; 193: 265-275. 1951.
- 78 Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*; 70: 158-169.
- 79 Lawrence R.A., Burk R.F. Glutsthione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 71: 952-958.
- 80 Horn H.D. NADPH-glutathione reductase determination: In methods of enzymatic analysis.H. Bergmeyer, Academic Press, New York: 875-877. 1965
- 81 Akerboom T.P. and Sies H. Determination of reduced and oxidized glutathione. In

methods of enzymology. vol. 77, B. Ginsburg de., pp 373-382. 1981.

82 Muñoz Torres E., Paz Bouza J. I., et. al. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int. J. Tiss. Reac.*; 10 (4): 245-251. 1988.

83 Kelvin J.A., et. al. Repair systems in oxidative stress. *Molecular Biology of Aging.*; 123-141. 1990.

84 Nadkarni G., D'Souza N. Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon Awatashi Yogesh C., Beutler Ernest and Srivastava SatishK.. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biochem. Chem.*; 250 (13): 5144-5149. 1975.

85 Kershenobich D., Fierro F.J., Rojkind M. The relationship between the free pool of proline and collagen content in human liver cirrhosis. *J. Clin. Invest.*; 49: 2246-2249. 1970.

86 Campos J., et. al. Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride - treated rats: effect of zinc administration. *Clin. Sci.* ; 83: 695 - 700. 1992.

87 Noll T., de Grott H. The critical steady - state hypoxic conditions in carbon tetrachloride - induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Acta.*; 795: 356 - 362. 1984.

88 de Grott H., Noll T. The crucial role of low steady state oxygen partial pressures in haloalkane free radical - mediated lipid peroxidation: possible implications in haloalkane liver injury. *Biochem. Pharmacol.*; 35: 15 - 19. 1986.

89 Aguilar-Delfin, I., Lopez-Barrera, F., Hernandez-Muñoz, R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology*; 657 - 662. 1996.

90 Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M. et. al. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄ - induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology*, 1100 - 1110 1997.

91 Kaplowitz, N. and Ookhtens, Aw. The regulation of hepatic glutation. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol*; 25 714-744 1985.

92 Reed, D.J. Glutathione: Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.*; 30: 603-631. 1990.

93 Corrales, F., et.al. Adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-

induced S-adenosylmethionine Ben-Yoseph, O., Boxer, PA., Ross, BD.

94. Cadenas E., Sies H. Low - level chemiluminiscence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods Enzymol*; 105: 221- 231. 1984