

## TOXICIDAD DE LA CICLOSPORINA A EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA. INFLUENCIA DE LA ETAPA DEL DESARROLLO

DAVID ANDRÉS, NURIA SANZ,  
CARMEN DIEZ-FERNÁNDEZ, ASUNCIÓN ZARAGOZA,  
ALBERTO ALVAREZ-BARRIENTOS y MARÍA CASCALES\*

### 1. INTRODUCCION

La ciclosporina A (CsA) es un potente agente inmunosupresor debido a que ejerce un efecto inhibitor específico sobre la vía de transducción de señales del receptor de las células T. Esta propiedad ha sido decisiva para el éxito de la terapia de los trasplantes al reducir la incidencia de los rechazos, sin embargo, su uso clínico se encuentra limitado por sus efectos secundarios adversos que incluyen neuro, nefro y hepatotoxicidad (58). A nivel hepático, en función de la dosis y duración del tratamiento, da lugar a alteraciones bioquímicas como la elevación de la actividad fosfatasa alcalina y de los niveles de bilirrubina y sales biliares en sangre, representativos ambos de un proceso de colestasis (5). Experimentos *in vitro* han demostrado que la CsA induce en hepatocitos una situación de estrés oxidativo, disminución de tioles proteicos y peroxidación lipídica que desemboca en la muerte celular por necrosis (132). Además, la capacidad de antioxidantes, como la vitamina E o el glutatión, de inhibir la peroxidación lipídica inducida por la CsA, sugiere que los radicales libres y especies reactivas de oxígeno pueden jugar un papel importante en su hepatotoxicidad (133).

En 1969, McCord y Fridovich (81) propusieron que la formación de radicales libres de oxígeno era parte integral del metabolismo normal de las células. De hecho, en organismos aerobios el principal productor de especies reactivas de oxígeno es la mitocondria, donde se generan aproximadamente  $3 \times 10^7$  radicales superóxido por mitocondria y día (98). Estos no pueden ser eliminados en su totalidad y van acumulándose progresivamente con la edad, pudiendo reaccionar con el peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, vía reacción de Fenton o Haber-Weiss, dando lugar al radical hidroxilo (OH), oxidante poderoso con gran capacidad para reaccionar con DNA, lípidos y proteínas (51). Por ello, el estado de mayor oxidación originado por la edad, puede jugar un papel importante en los mecanismos de respuesta frente a la agresión tóxica de xenobióticos, tales como la CsA.

---

\* Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Avda. Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid.

Un requisito para la supervivencia de los organismos es contar con sistemas de defensa que impidan la formación de los radicales libres de oxígeno o que protejan a las células y tejidos de sus efectos nocivos. Mediante estos sistemas, los radicales son capturados por moléculas antioxidantes, como el glutatión, que muestran por ellos una afinidad especial, o son transformados rápidamente en especies inertes mediante la acción concertada de enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Cuando las defensas antioxidantes disminuyen, o cuando la excesiva generación de estas especies agresivas supera la capacidad antioxidante celular, las macromoléculas sufren lesiones oxidativas que, al alterar su estructura, afectan de manera irreversible la función celular (142).

La cantidad y diversidad de condiciones patológicas que se asocian con la excesiva generación de radicales libres de oxígeno (45) ha despertado el interés de los investigadores para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales los radicales influyen en las respuestas celulares. El hígado es el órgano más estudiado en relación con estas alteraciones, utilizándose los cultivos primarios de hepatocitos cada vez con mayor frecuencia para investigar los mecanismos de acción de compuestos hepatotóxicos, con la ventaja sobre los estudios *in vivo* de poder concretar el efecto de dichos compuestos sobre una población celular homogénea (113).

Por todo ello, en el presente trabajo se ha estudiado la influencia del desarrollo (ratas macho Wistar de 2 a 6 meses) sobre la citotoxicidad inducida por la CsA. El uso clínico de este fármaco comprende pacientes de edades muy diversas en los que habría que tener en cuenta no sólo las especies reactivas de oxígeno originadas por el tratamiento con el fármaco, sino también los niveles propios de cada individuo en función de su edad.

### 1.1. Farmacología de la ciclosporina

La ciclosporina A (CsA) pertenece a una familia de péptidos cíclicos producidos por un hongo, el *Tolypocladium inflatum gams*, también denominado como *Trichoderma polysporum*. Está constituida por 11 aminoácidos de naturaleza lipofílica lo que dificulta la solubilidad de la CsA en medio acuoso. Presenta un aminoácido muy especial de nueve carbonos, ubicado en la posición 1 (130). El nitrógeno de todos los grupos amido está unido a hidrógeno o está metilado y la actividad biológica es muy sensible a alteraciones en la configuración estereoquímica y a modificaciones de los residuos en las posiciones 1, 2, 3, 10 y 11. La CsA contiene un sólo residuo D-aminoácido en la posición 8 y el residuo metil-amido entre las posiciones 9 y 10 está en la configuración *cis*, en tanto que todos los demás residuos metil-amido están en la forma *trans*. (Figura A).

Debido a las propiedades de la CsA como potente agente inmunosupresor, su principal uso terapéutico va dirigido a la reducción de la incidencia de los rechazos que pudieran originarse después de un trasplante de órganos (57,58). Su efecto inmunosupresor se debe a la interferencia con las funciones normales de las células T (111), ya que inhibe la producción de interleukina-2, citoquina que interviene en la proliferación y diferenciación de las células T (39).

La activación de células T se inicia cuando antígenos específicos, presentados por las células presentadoras de antígenos (APC), se unen al receptor de las células T

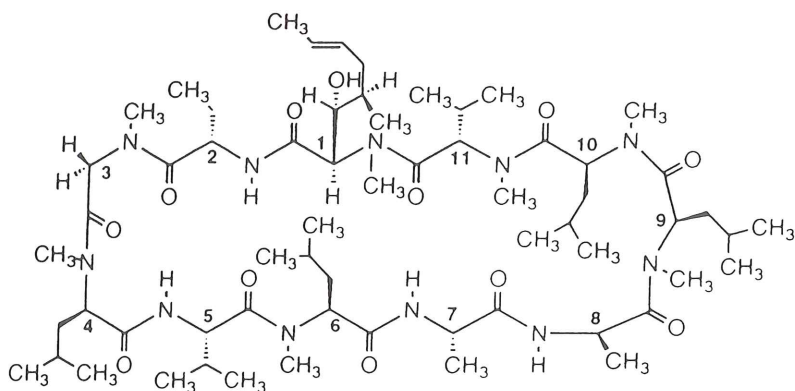


FIGURA A. Estructura de la ciclosporina A

(TCR). Así se activa una cascada de reacciones que incluye la fosforilación de un residuo de tirosina que activa la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y con ello la hidrólisis del fosfatidil-inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> origina un aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico responsable de la estimulación de la actividad fosfatasa dependiente de calcio de la calcineurina como paso crucial de la activación y traslocación nuclear de la subunidad citoplasmática del factor de transcripción NF-ATc (85). Por otra parte el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que induce la subunidad nuclear de este mismo factor (NF-ATn). Otro factor de transcripción involucrado en este proceso es el NF- $\kappa$ B, proteína heterodimérica constituida por las subunidades p50 y p65 y estabilizada por unión a una tercera proteína, la I $\kappa$ B. La fosforilación de esta última libera el NF- $\kappa$ B que se trasloca al núcleo. Tanto el complejo formado por las dos subunidades del NF-AT como el NF- $\kappa$ B, se unen a la zona promotora del gen que codifica para la IL-2. La IL-2 sintetizada se libera al exterior celular uniéndose a su receptor IL-2R. El proceso de señalización mediado por esta unión implica la activación de JAK-quinasas, transductores de señal y activadores de transcripción (STATs), y la quinasa p70<sup>s6</sup>, todas ellas responsables de que las células progresen de G<sub>1</sub> a S. (Figura B).

La ciclofilina A (CypA) es una proteína de bajo peso molecular (18 kDa) de la familia de las inmunofilinas que posee actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (121). Se trata de una molécula esferoidal consistente en ocho cadenas antiparalelas de lámina- $\beta$ , dos  $\alpha$ -hélice y una serie de bucles y giros (61). La CsA se une al centro activo de la CypA mediante los aminoácidos situados en las posiciones 1, 2, 3, 9, 10 y 11 lo que implica un cambio conformacional de *cis* a *trans* en la amida localizada entre las posiciones 9 y 10 (123). (Figura C).

Durante casi 30 años, los agentes citotóxicos permitieron efectuar con relativo éxito trasplantes de aloinjertos. Sin embargo, la introducción de la ciclosporina y su empleo en combinación con otros inmunosupresores aumentaron las posibilidades de éxito en los trasplantes de órganos, que permitió prolongar la vida a miles de pacientes cada año (9). Aunque los trasplantes que predominan son los renales, la frecuencia y el éxito de los trasplantes cardíacos, hepáticos y pancreáticos aumentan de forma progresiva (120). El trasplante de médula ósea se ha convertido en el tratamiento de elección para muchos pacientes con anemia aplásica, leucemia no linfocítica aguda y

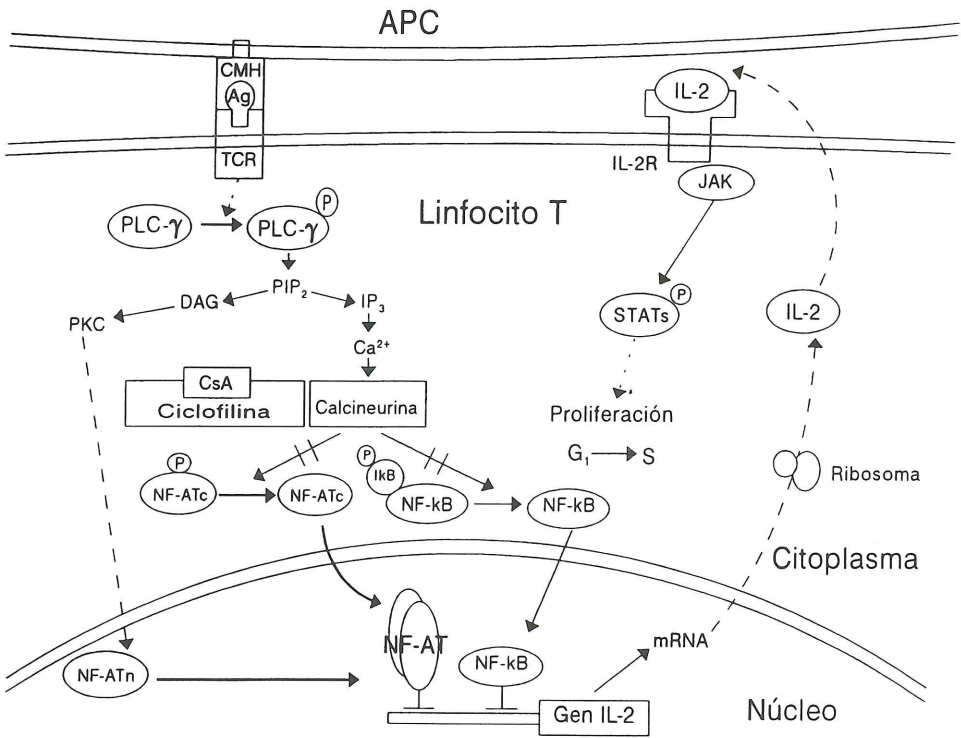
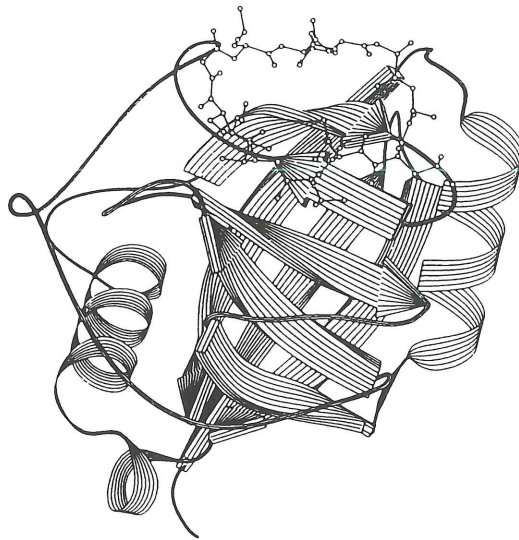


FIGURA B. Activación de células T. Mecanismo de acción de la ciclosporina A



CypA: CsA

FIGURA C. Complejo formado por la ciclosporina A y la ciclofilina A

un síndrome grave de inmunodeficiencia combinada. La CsA se emplea como fármaco alternativo del metotrexato para prevenir la evolución del rechazo del injerto en estos pacientes, aunque algunos protocolos emplean ambos agentes (119).

La CsA tiene otras propiedades que no parecen estar relacionadas con sus acciones sobre las células T y que pueden ser un reflejo de la ubicuidad en la distribución de las ciclofilinas. Una variedad de infecciones parasitarias, que incluyen la esquistosomiasis y el paludismo, responden a este compuesto, posiblemente por una acción directa sobre el parásito (82). La CsA también puede restablecer la sensibilidad de líneas celulares y de tumores experimentales resistentes a distintos agentes quimioterápicos que inducen la sobreexpresión de P-glicoproteínas (el producto del gen MDR, gen de la multirresistencia) (114) y que se emplean para el tratamiento del cáncer. Se cree que el mecanismo de este efecto no está relacionado con el mecanismo responsable de la inmunosupresión, dado que tanto los análogos activos como los inactivos de la ciclosporina pueden provocarlo (12).

## 1.2. Farmacocinética de la ciclosporina

### *Absorción*

La biodisponibilidad de la ciclosporina por vía oral es relativamente baja con un amplio margen de variabilidad de unos individuos a otros (20 - 50%). Se ha demostrado que la absorción se asemeja a un proceso cinético de orden cero (dosis-independiente) más que a una cinética de orden uno (dosis-dependiente), lo que ha llevado a postular la idea de la existencia de una ventana de absorción en la zona superior del intestino delgado donde se encontraría un transportador que llevaría a cabo el paso de la ciclosporina a través de la pared intestinal (40).

### *Distribución*

Una vez que la CsA se incorpora a la circulación sanguínea, se distribuye ampliamente debido a su naturaleza lipofílica y a la ubicuidad de la ciclofilina (96), lo que sugiere un volumen de distribución aparente relativamente alto (4 L/Kg) (33). En sangre, se une principalmente a lipoproteínas y eritrocitos (69), acumulándose también con gran avidez en leucocitos debido al mayor contenido de ciclofilina en dichas células.

### *Metabolismo*

La CsA se metaboliza en hígado por el citocromo P-450 3A, originando 15 metabolitos desmetilados e hidroxilados (68). Este sistema está constituido por una familia de flavoproteínas que catalizan la transferencia de electrones desde el NADPH a la hemoproteína generando el sustrato hidroxilado. La secuencia de reacciones se inicia por la unión del sustrato al citocromo y la reducción del complejo enzima-sustrato a la forma ferrosa, mediante la cit P-450 reductasa-NADPH que contiene FAD y FMN en proporción 1:1. Posteriormente se incorpora el O<sub>2</sub> y tras una serie de reacciones en cadena, se culminará con la ruptura de la molécula de O<sub>2</sub> y la monooxigenación del



evitando así la apertura de este canal iónico (43). La excesiva acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  causa alteraciones en las funciones mitocondriales (125, 79), ya que varias deshidrogenasas mitocondriales se regulan por concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y se desactivan a concentraciones superiores. Del mismo modo se inhiben la carbamoil fosfato sintetasa, la piruvato carboxilasa y la síntesis de ATP (55). Como consecuencia de la inactivación de las deshidrogenasas, se produce un aporte insuficiente de electrones que causa la caída de los niveles de GSH mitocondrial (56). Esto explicaría que las células renales sean más sensibles que los hepatocitos a la acción de la CsA, ya que contienen unos niveles basales de GSH tres veces inferiores a los de estos últimos (105).

### 1.3.1. *Hepatotoxicidad de la ciclosporina*

La ciclosporina A en función de la dosis y la duración del tratamiento da lugar a alteraciones bioquímicas y estructurales en el hígado (36,1). Las alteraciones bioquímicas comprenden la elevación de la fosfatasa alcalina asociada con incrementos en los niveles de bilirrubina y sales biliares en sangre, representativos ambos de un proceso de colestasis (5). Algunos autores postulan que este proceso no se produce como consecuencia de un daño directo sobre las células hepáticas sino que, es debido a un desequilibrio en la secreción biliar originado por modificaciones del metabolismo del colesterol (18) o por la interacción del fármaco con las proteínas transportadoras de sales biliares al inhibir competitivamente la captación de colato y taurocolato, pero no de glicocolato (6). Otra hipótesis establece que la CsA es un inhibidor efectivo de la ácido biliar CoA ligasa debido a su interacción tanto con el sitio de unión de este enzima para los ácidos biliares como con el  $\text{Mg}^{2+}$  requerido para esta actividad enzimática (127).

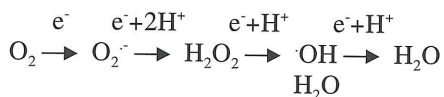
Experimentos *in vitro* han demostrado que la CsA induce una disminución en los niveles de GSH que desemboca en una situación de estrés oxidativo acompañada de una peroxidación lipídica y disminución de los grupos tiólicos proteicos, ocasionando en última instancia la muerte celular (133). La oxidación de tioles proteicos trae consigo la inhibición de la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -traslocasa lo que da lugar a un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular responsable de la activación directa de procesos catalíticos tales como la degradación de fosfolípidos, proteínas, DNA y citoesqueleto (89). Del mismo modo, la destrucción de las membranas celulares producida como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados induce cambios en su fluidez y modula la actividad de varios enzimas integrantes de membranas (62). Las alteraciones anteriormente mencionadas son consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno posiblemente generadas tanto a nivel del retículo endoplásmico como a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, ya que se ha demostrado un notable incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno celulares en cultivos de hepatocitos incubados con concentraciones de 10 a 50  $\mu\text{M}$  (132).

## 1.4. Radicales libres de oxígeno

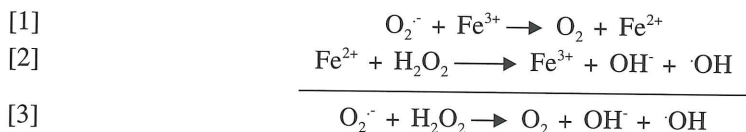
El oxígeno es un elemento esencial para la vida en su papel de aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, principal fuente de energía en los organismos aerobios. Sin embargo, la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos

se debe a que en esta utilización del oxígeno por las células se generan radicales libres. Un radical libre se define como una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo.

La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas «incompletamente reducidas» del oxígeno entre éste y el agua: el radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , que no es un radical pero puede generarlos) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ):



En oposición a puntos de vista anteriores, hoy se sabe que el radical superóxido carece de suficiente reactividad para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  da lugar al radical hidroxilo, que sí posee una elevada reactividad:



[3] es la reacción de Haber-Weiss (42), propuesta en 1934, y resultante de [1] y [2]. [2] es la reacción de Fenton, que este autor describió en 1894 (31) para explicar las propiedades oxidantes de la mezcla  $SO_4Fe$  y  $H_2O_2$ .

El principal productor de radicales de oxígeno en los organismos aerobios es la mitocondria (71), ya que bajo circunstancias fisiológicas normales, utiliza aproximadamente el 98% del  $O_2$  celular a nivel del citocromo  $a_3$ , citocromo del estado IV de la cadena de transporte de electrones de la respiración mitocondrial. Un pequeño porcentaje (del 1 al 4%) del  $O_2$  incorporado por la mitocondria, genera especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El radical superóxido se produce por la adición de un electrón a la molécula de  $O_2$ . La membrana del retículo endoplásmico liso de la mayoría de las células animales y vegetales contiene citocromo P-450, monooxigenasa de función mixta que interviene en la oxidación de gran parte de xenobióticos, así como de sustratos propios de las células. La reacción transcurre mediante la adición de un átomo de oxígeno que se incorpora al sustrato en forma de grupo hidróxido, y la reducción del otro átomo a agua:

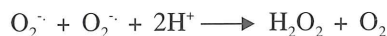


siendo RH el sustrato y  $DH_2$  el donador de H, generalmente  $NADPH + H^+$ . El enzima NADPH citocromo P-450 reductasa proporciona los electrones requeridos por el citocromo P-450 vía  $NADPH + H^+$ . Tanto la forma reducida de la reductasa como la forma oxidada del citocromo P-450 pueden proporcionar electrones para reducir al oxígeno, que así produce el  $O_2^{\cdot -}$ . Otro sistema de producción de  $O_2^{\cdot -}$  en el transporte electrónico



microsomal es el citocromo  $b_5$  con su correspondiente NAD(P)H citocromo  $b_5$  reductasa, que participa en la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos (54).

En solución acuosa, el anión superóxido puede comportarse como reductor o como oxidante débil (45), y es inestable debido a que es capaz de reaccionar espontáneamente consigo mismo produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (dismutación):



Por eso, su reactividad es mayor en medio hidrofóbico. El  $O_2^{\cdot -}$  es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ , pKa 4,8) (34), que presenta una reactividad mucho mayor, aunque a pH fisiológico predomina la forma no protonada. De todas formas, en las proximidades de la membrana, donde se produce el radical, el pH es mucho más bajo que en el citosol, por lo que predominará el  $HO_2^{\cdot}$ , que por su carácter no iónico podría introducirse en la membrana y desencadenar la peroxidación lipídica (28).

El peróxido de hidrógeno se forma en todos los sistemas que producen superóxido, por la dismutación espontánea o catalizada por la SOD de este radical. Los peroxisomas presentan gran capacidad de formación de  $H_2O_2$ , ya que contienen una elevada concentración de oxidasas que pueden catalizar la reducción divalente del oxígeno molecular sin la formación del radical superóxido (26). Al igual que el superóxido, el  $H_2O_2$  puede actuar como oxidante y reductor, y su reactividad también es baja en solución acuosa. Sin embargo, y como ya hemos mencionado anteriormente, a pesar de no ser un radical resulta muy lesivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas (44) e inducir la formación de otros radicales, como el radical  $\cdot OH$ , en puntos alejados de su lugar de origen (104).

Por esto, aunque tanto el anión superóxido como el  $H_2O_2$  tienen una reactividad baja, es de extrema importancia eliminarlos rápidamente de la célula, antes de que puedan formar otros derivados del oxígeno mucho más tóxicos. Los enzimas que desempeñan esta función cobran mayor interés sabiendo que, al contrario de lo que ocurre con el  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ , no existe protección enzimática contra el  $\cdot OH$ .

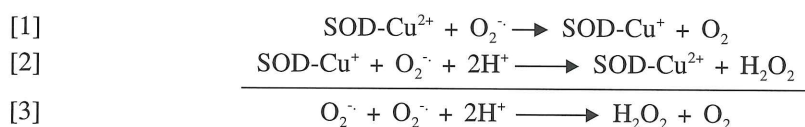
## 1.5. Sistemas de defensa antioxidante

Para eliminar estos radicales libres existen unos mecanismos de defensa de carácter enzimático y no enzimático, estratégicamente compartimentados en los orgánulos subcelulares, conocidos como antioxidantes, secuestrantes de radicales libres o reductores. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Los antioxidantes no enzimáticos se pueden clasificar a su vez en dos grupos: hidrosolubles, cuyos principales representantes son el ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión, y liposolubles, entre los que se incluyen la vitamina E, los carotenoides, la melatonina y el coenzima  $Q_{10}$  (53).

### 1.5.1. Enzimas antioxidantes

En 1969, McCord y Fridovich (81) identificaron la acción del enzima *superóxido dismutasa* (SOD), al observar que era capaz de eliminar catalíticamente al radical superóxido. La SOD es una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos y localización intracelular variable. Existen hasta el momento tres clases de superóxido dismutasas conocidas: la cobre-zinc SOD (CuZnSOD), la manganeso SOD (MnSOD) y la hierro SOD (FeSOD) (35).

La CuZnSOD se encuentra en el citoplasma de casi todas las células eucariotas, en los peroxisomas, algo de su actividad está presente en los lisosomas y posiblemente entre las membranas mitocondriales interna y externa, así como en el núcleo. Es capaz de acelerar  $10^4$  veces la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  respecto a la dismutación espontánea a pH fisiológico. Tiene dos subunidades, cada una de las cuales tiene un ión cobre y un ión zinc (45). El centro activo del enzima presenta carga positiva, y así consigue atraer al  $O_2^{\cdot -}$ , lo que explica que la constante de la reacción sea tan elevada (138). El ión cobre, ligado al centro activo a través de los anillos de imidazol de la histidina, participa en la reacción oxidándose y reduciéndose alternativamente:



El ión zinc toma parte en el proceso con una función estabilizadora. El enzima puede ser inactivado por su producto, el  $H_2O_2$ , que es capaz de reaccionar con él dando radicales  $O_2^{\cdot -}$  y  $\cdot OH$  como resultado de la inactivación. Estos radicales pueden abandonar el centro activo del enzima y reaccionar con otras moléculas de la célula (137). La CuZnSOD se inhibe por cianuro y dietilditiocarbamato que eliminan el ión cobre del centro activo del enzima.

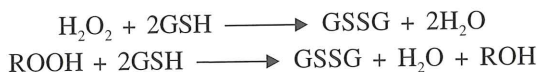
La MnSOD se localiza en la mitocondria. Tiene cuatro subunidades proteicas que contienen manganeso en su centro activo. Durante el proceso catalítico, el manganeso va cambiando su estado redox, pero no se conoce el mecanismo exacto de la reacción. La MnSOD es mucho más hábil a la desnaturalización por calor o por reactivos químicos que la CuZnSOD y no se inhibe por cianuro o dietilditiocarbamato. Por último, la FeSOD se encuentra principalmente en procariontes, algunos protozoos y vegetales.

La *catalasa* es el enzima que moviliza el  $H_2O_2$  de la célula para transformarlo en oxígeno y agua, según la reacción:



Es una hemoproteína que consta de cuatro subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo [hierro(III)-protoporfirina] unido a su centro activo. Se localiza principalmente en los peroxisomas, donde se acumula para eliminar el  $H_2O_2$  resultante de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. El mecanismo de la reacción transcurre con la formación de un complejo entre el enzima y el sustrato, complejo que después se disocia para liberar los productos.

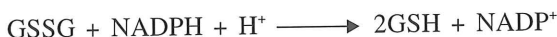
Además de la catalasa, la protección contra el  $H_2O_2$  la proporcionan también las *peroxidasas*, de modo que ambas enzimas pueden con frecuencia actuar conjuntamente. La más importante de estas peroxidasas en células animales es la glutatión peroxidasa, que se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque también puede encontrarse en mitocondria. Contiene cuatro átomos de selenio, con los que es capaz de catalizar la reducción del  $H_2O_2$  y de otros peróxidos, a la vez que oxida la forma reducida del glutatión (GSH) a su forma oxidada (GSSG):



Existe otra forma enzimática de glutatión peroxidasa en ciertos tejidos animales que no contiene selenio, es dimerica y sólo es capaz de eliminar hidroperóxidos orgánicos.

La catalasa y la GSH peroxidasa desempeñan papeles complementarios ya que este último enzima elimina cantidades de hidroperóxidos bajas pero producidas constantemente, mientras que la catalasa es de gran importancia en situaciones de estrés oxidativo debido a que presenta valores de la  $K_m$  y  $V_{max}$  casi tres órdenes de magnitud mayores que los de la GSH peroxidasa.

El GSH consumido por la glutatión peroxidasa puede regenerarse a través de la glutatión reductasa. Este enzima citosólico reduce el GSSG utilizando el NADPH, equivalente reductor que puede ser generado por varios sistemas de óxido-reducción dependientes del NADPH (21).



Ninguno de los enzimas descritos desempeña una función central en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno. Al contrario, una protección eficiente habrá de ser proporcionada por una coordinación adecuada entre todos los enzimas y demás sistemas antioxidantes de la célula. Por ejemplo, el aumento de la expresión de un solo enzima, la SOD, conduce, en fibroblastos de ratón, a un aumento de la sensibilidad frente a tóxicos que ejercen su efecto produciendo  $O_2^{\cdot -}$  (64). Se produce una acumulación de  $H_2O_2$ , y si su exceso no es hidrolizado por catalasas o peroxidasas, puede reaccionar con la SOD produciendo radicales  $\cdot OH$ . La importancia del equilibrio entre la catalasa y la SOD ha sido probada por otros autores en células epiteliales transformadas de ratón: un mínimo incremento, fisiológico, en la actividad de la CuZnSOD provoca la formación de cantidades masivas de  $H_2O_2$  (4).

### 1.5.2. Antioxidantes no enzimáticos

Las propiedades antioxidantes de la *vitamina C* residen en la capacidad del anión ascorbato, la forma ionizada del ácido ascórbico, para reaccionar con los radicales  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO_2^{\cdot}$  y  $\cdot OH$  y para regenerar la vitamina E. Además de sus propiedades antioxidantes, el ascorbato también es capaz de reducir el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y el  $O_2$  a  $H_2O_2$ , proporcionando los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción de Fenton ya mencionada (116). A pesar de ello, y aunque se ha demostrado que las mezclas de hierro y ascorbato estimulan la peroxidación lipídica *in vitro* (135), se pone en duda que la vitamina

C pueda actuar como oxidante bajo condiciones fisiológicas normales *in vivo* (83), llegándose a la conclusión de que concentraciones micromolares de ascorbato, junto con la presencia de iones hierro o cobre, ejercen un efecto prooxidante, mientras que concentraciones milimolares, similares a las fisiológicas, muestran un efecto sobre la peroxidación de lípidos y proteínas fundamentalmente inhibitorio (99).

El *ácido úrico* es un excelente antioxidante para el que se ha descrito la capacidad de eliminar  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , oxígeno singlete, o radicales peroxilo ( $ROO\cdot$ ), y además puede eliminar de la solución trazas de  $Fe^{2+}$  (24), el cual, en caso de estar presente, podría actuar como estimulador potente de procesos peroxidativos.

El *glutathion*, el principal tiol no proteico celular, es un tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicocola. Actúa como cofactor de diversos enzimas, como tampón redox y regulador de los grupos SH de las proteínas celulares, como sustrato de enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa o la dehidroascorbato reductasa (enzima que regenera el ascorbato consumido), y como antioxidante no enzimático capturando radicales  $\cdot OH$  y oxígeno singlete (46).

Entre los antioxidantes liposolubles, uno de los más importantes es la *vitamina E*, que incluye un grupo de cuatro tocoferoles estrechamente relacionados entre sí (29). La vitamina E es capaz de atrapar y anular las acciones del oxígeno singlete y de los radicales  $O_2^-$ ,  $HO_2\cdot$  y  $\cdot OH$ , y de bloquear las reacciones en cadena que ocurren durante la peroxidación lipídica de las membranas (84).

Los *carotenoides* son constituyentes importantes de las membranas de los cloroplastos y que representan las especies químicas más eficientes para atrapar el oxígeno singlete (10). Presentan acciones sinérgicas con la vitamina E, pero mientras los carotenoides actúan en presencia de bajas presiones de oxígeno, la vitamina E lo hace a valores elevados (27). Así mismo, la vitamina E protege de la oxidación a los dobles enlaces conjugados de los carotenos (15).

Otro representante del grupo de los antioxidantes liposolubles, que difunde rápidamente a través de la membrana interna mitocondrial debido a la presencia de 10 isoprenos en su estructura, es el *coenzima Q<sub>10</sub>* o ubiquinona 50, un constituyente natural de la cadena de transporte de electrones, con capacidad de estabilizar membranas por inhibir la peroxidación lipídica. Dicha propiedad antioxidante se debe a la capacidad del ubiquinol, forma reducida de la coenzima Q<sub>10</sub> ( $CoQH_2$ ), de reaccionar directamente con el radical superóxido y radicales alquilo y peroxilo (3).

## 1.6. Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

La muerte celular es la consecuencia final del daño producido por un estímulo patológico, pero también es un fenómeno natural en la regulación y mantenimiento de la homeostasis en las células y tejidos del organismo. Así, es posible diferenciar dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis (76).

La necrosis es, generalmente, el resultado de un trauma severo y ocurre a través de una pérdida de la integridad de la membrana y liberación del contenido celular que, invariablemente, conduce a respuestas inflamatorias. La apoptosis, sin embargo, tiene

lugar principalmente en condiciones fisiológicas o como resultado de un estímulo patológico suave (70). La muerte celular por apoptosis es esencial para el desarrollo de los seres vivos (20). Ocurre en todos los estados de la organogénesis durante el desarrollo embrionario; se alterna con la mitosis durante el recambio normal de los tejidos, representando el balance entre la proliferación y la eliminación celular; se ocupa de la selección de los clones apropiados en las poblaciones de linfocitos en proliferación, destruyendo aquellos que responden a los antígenos propios; y constituye un factor decisivo en la finalización de la respuesta inflamatoria. Además, hoy se reconoce que la pérdida del control de la apoptosis juega un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, y quizás incluso en el envejecimiento (124).

Apoptosis y necrosis pueden caracterizarse atendiendo a los cambios morfológicos que se producen dentro de las células pero también es posible diferenciar ambos procesos cuando se observan *in vivo*, tanto por su distribución como por las reacciones tisulares que los acompañan. Así, mientras que la necrosis sucede en grupos de células contiguas y suele inducir una respuesta inflamatoria aguda, la apoptosis tiene lugar generalmente en células dispersas en el tejido y no suele ir acompañada de infiltración de leucocitos. Estas y otras características de la muerte celular por apoptosis y necrosis, comparando ambos procesos, se resumen en la tabla A.

### **1.7. Ciclo de división celular; análisis de la ploidía y distribución de DNA por citometría de flujo**

La citocinética comprende el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y poblaciones de células (30). Los estudios de citocinética se basan en el ciclo celular, que se define, como el tiempo entre el final de la mitosis de las células progenitoras, y el final de la mitosis de las células hijas.

Para conseguir la multiplicación por división, las células abandonan el estado quiescente ( $G_0$ ) para entrar y proceder a través del *ciclo celular*. Esto supone una serie de etapas consecutivas que culminan en la división mitótica. El ciclo celular se divide en cuatro fases:  $G_1$  o fase postmitótica, S o período de síntesis del DNA,  $G_2$  o fase premitótica y M o mitosis (101).  $G_1$  es una fase de latencia, que precede a la replicación del DNA, donde las células tienen el mismo contenido en DNA que las  $G_0$ , pero donde tienen lugar el transporte de proteínas, una serie de cambios en la concentración intracelular de iones, el transporte de nutrientes dentro de la célula y la síntesis de enzimas específicos necesarios para la síntesis del DNA. Durante la fase S se verifica la duplicación del DNA y la síntesis de la mayoría de proteínas e histonas. La fase  $G_2$  con dos veces el contenido  $G_0/G_1$  de DNA es, de nuevo, una fase de latencia que precede a la mitosis sin cambios en el contenido de DNA. Aquí tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas como preparación para la mitosis, y se produce la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en división en la fase mitótica (M) y las células hijas vuelven a la fase  $G_0$  (fase quiescente) o a la fase  $G_1$  (128). Durante la transición de  $G_1$  a  $G_0$  ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis proteica decrece y cesa la síntesis de RNA.

<i>Características</i>	<i>Apoptosis</i>	<i>Necrosis</i>
Estímulo	Fisiológico o patológico	Patológico
Origen	Pérdida de un factor de crecimiento, influencia hormonal, estímulo tóxico suave	Anoxia, daño químico, daño físico
Propiedades de adhesión	Inmediatamente perdidas	Inicialmente intactas
Primera manifestación	Reducción celular, encogimiento	Hinchamiento celular
Cambios nucleares	Condensación, cariorrexis	Cariolisis
Cromatina nuclear	Marginación, segmentación	Plegamiento nuclear
Cambios nucleolares	Intacto, degradado al final	Granulado
Integridad de membrana	Persiste durante un tiempo	Fallo temprano
Morfología superficie	Alisamiento, blebbing	Lisis
Cambios en superficie	Expresión de vitronectina y trombospodina	Ninguno
Cambios citoesqueleto	Protrusión en superficie, budding citoplasmático, formación cuerpos apoptóticos	Fragmentación, liberación de contenidos celulares
Mitocondria	Inicialmente no afectada	Hinchamiento, entrada de Ca <sup>2+</sup>
RE/Aparato de Golgi	Inicialmente no afectados	Dilatados
Vacuolas	Estructuralmente intactas	Hinchadas (leaky)
Síntesis de proteínas	Puede bloquearse por actinomicina D y cicloheximida	No afectada por antibióticos
Cambios citoplasmáticos	Ca <sup>2+</sup> ↑, endonucleasa ↑, transglutaminasa ↑	Ruptura de lisosomas, liberación del contenido
Cambios nucleares	p-53 ↑, bcl-2 ↓, c-myc ↑, ruptura internucleosomal, escalera de DNA	Degradación difusa, smear DNA
Células afectadas	Células individuales, células dispersas	Grupos de células contiguas, áreas tisulares
Eliminación	Englobamiento por macrófagos y células endoteliales	Inflamación en tejidos adyacentes
Formación de cicatrices	Ausente	Presente

TABLA A. *Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis (Haanen y Vermes, 1995).*

En general, la fase S, dura entre 7 y 8 horas, la G<sub>2</sub>, entre 2 y 4 horas y la M menos de 1 hora, mientras que la duración de la fase G<sub>1</sub> es la más variable. En un momento dado de muestreo de una población celular, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2C de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hasta dos veces este contenido (4C) de la fase G<sub>2</sub>/M. Normalmente, los hepatocitos, se encuentran en el estadio G<sub>0</sub>, es decir, no se dividen, si no es, por ejemplo, por el tratamiento con agentes mitógenos.

En las células animales la proliferación celular está regulada principalmente en fase G<sub>1</sub>. Al final de esta fase, en el denominado punto de restricción, las señales mitogénicas se integran y las células proliferan. El punto de restricción define un proceso de «no retorno», de manera que una vez que las células lo pasan, se comprometen a llevar a cabo un ciclo celular completo incluso si la señal mitogénica desaparece. La progresión de las células a lo largo del ciclo está controlado por las proteína quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que se activan como consecuencia de su asociación con unas subunidades reguladoras denominadas ciclinas. Las ciclinas se sintetizan en unas fases del ciclo celular, activan a la CDK correspondiente y poste-

riormente son degradadas por proteólisis. Hasta el momento se han descrito ocho CDKs (CDK1-CDK8) y ocho ciclinas (A-H), sin embargo, sólo unas cuantas de las combinaciones posibles juegan un papel en la regulación del ciclo celular. Así por ejemplo, está claro que en  $G_1$  se activan los complejos CDK4 y CDK6 en combinación con las ciclinas D, y el de CDK2 con la ciclina E (110). La ciclina A funciona más tarde durante la fase S (17), así como en la transición  $G_2/M$ , formando complejos con CDK2 y CDK1 respectivamente. Finalmente la activación del complejo CDK1-ciclina B es necesaria para promover la entrada en mitosis, donde fosforila un gran número de sustratos que determinan la transición  $G_2$ /metafase (87). (Figura E).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína fundamental en el ciclo de división celular, ya que interviene en el proceso de síntesis del DNA debido a que actúa como auxiliar de la DNA polimerasa  $\delta$ , y a nivel de la reparación del DNA por acción conjunta con la DNA polimerasa  $\epsilon$  (72). En un ciclo de división normal, la máxima expresión del PCNA se alcanza en la transición  $G_1/S$  para posteriormente disminuir en fase  $G_2/M$  (73). Sin embargo cuando las células sufren una lesión del DNA se produce un aumento del PCNA en la fase  $G_2$ , donde tiene lugar la reparación del DNA (63). En la actualidad se considera el PCNA como uno de los mejores marcadores de proliferación celular (91), aunque su utilización como marcador de la fase S presente el inconveniente de su elevada vida media, entre 8 y 20 horas, lo que supone su posible detección no sólo en células comprometidas en dicha fase sino también en fase  $G_2/M$  (2).

La citometría de flujo se puede aplicar al estudio del ciclo celular, el cual puede ser explorado a lo largo de sus diferentes fases, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA que permite clasificar las poblaciones celulares en  $G_0/G_1$ , S o  $G_2/M$ . Pero su utilidad sobre el estudio de la ploidía de las células no queda ahí sino que puede detectar con rapidez si se produce una aneuploidía en la población celular que está expuesta a un agente supuestamente tóxico. Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del DNA (22), en el presente trabajo se ha utilizado la técnica de Vindelov *et al* (129), que utiliza el yoduro de propidio como agente intercalante y analiza la distribución del DNA en 10 ó 50 x 1000 células. Este fluo-

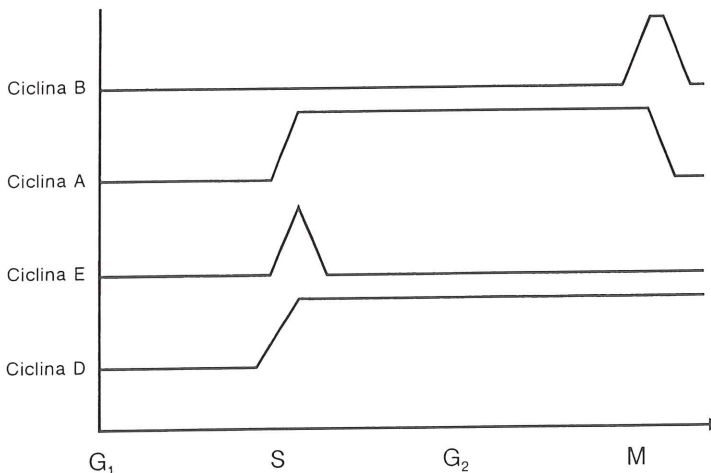


FIGURA E. Niveles de ciclinas en cada una de las fases del ciclo celular.

rocromo presenta, sobre otros, las propiedades de ser muy estable y poder ser excitado por un láser de argón estándar, producir histogramas con un coeficiente de variación bajo y emitir en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultáneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína. Para los complejos formados con el yoduro de propidio, las longitudes de onda de máxima excitación y emisión son 545 y 623 nm, respectivamente. (Figura F).

### 1.8. Edad y desarrollo

La edad es un proceso complejo que implica cambios a nivel morfológico y bioquímico tanto en células aisladas como en órgano entero. Entre las diferentes teorías sobre la edad, la que más interés ha despertado ha sido la que responsabiliza a los radicales libres de oxígeno, generados espontáneamente en la cadena de transporte mitocondrial y acumulados progresivamente, del daño generado en el proceso del envejecimiento (47). En el caso concreto de las células parenquimales hepáticas se ha demostrado que la generación de especies reactivas de oxígeno excede a la inducción de su capacidad antioxidante, provocando una situación de estrés oxidativo y peroxidación (103).

Es bien conocido el hecho de que el radical  $\cdot\text{OH}$  es un potente oxidante que produce lesiones a nivel del DNA (112), sin embargo estas lesiones no desembocan en alteraciones de las funciones celulares debido a la perfecta actuación de los sistemas de reparación. Por el contrario, en edades avanzadas se verifica un disminución de la

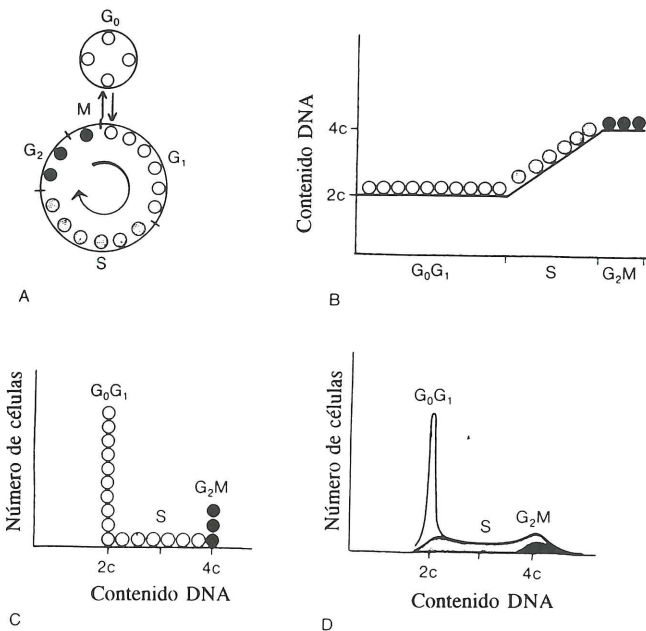


FIGURA F. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo. (A) Fases del ciclo celular. (B) Relación entre el contenido de DNA y la progresión de las fases del ciclo celular. (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de la población ilustrada en B. (D) Distribución analítica del DNA en una población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



eficiencia de estos sistemas debido a una reducción de la capacidad proliferativa dando lugar a una situación de inestabilidad genómica caracterizada por mutaciones somáticas tales como sustitución, inserción, traslocación, delección, recombinación y cambio en el número de cromosomas (13). Se ha propuesto que esta pérdida de la capacidad proliferativa debida a la edad es consecuencia de una activación y/o alteración en la regulación de un inhibidor específico de la síntesis del DNA denominado Sdi1 (86). Este producto génico, también conocido como p21, WAF1, CIP1 y Cap20 (73), es un factor peptídico que inhibe la actividad de los complejos ciclina/quinasa-dependiente de ciclina (CDK) responsables de la progresión del ciclo celular en su fase G<sub>1</sub>/S (93). Esta inhibición, que se manifiesta por una parada de las células en G<sub>1</sub>, se debe, a que los complejos ciclina/CDK son necesarios para la fosforilación de la proteína Rb, producto del gen supresor de retinoblastoma. Esta proteína juega un papel fundamental en el envejecimiento ya que, las células senescentes tienen bloqueada la capacidad de fosforilación de Rb en respuesta a estímulos normales de crecimiento (118).

En el caso concreto del hígado de rata, el crecimiento durante el desarrollo normal se caracteriza por una progresiva poliploidización (38), y que en edades avanzadas irá acompañado de una disminución de la fracción de hepatocitos comprometidos en fase de síntesis. Los hepatocitos fetales de rata y los obtenidos durante las 3 primeras semanas de vida son en su mayor parte mononucleares diploides y así se mantienen durante los 3 primeros meses de vida; a partir de este punto, comienza el proceso de poliploidización con la aparición sucesiva de células tetraploides y octoploides, siendo el 50-70% de los hepatocitos adultos, mononucleares tetraploides (122).

Si la producción de radicales libres es el factor clave que relaciona el daño oxidativo con el envejecimiento, es de esperar que éste se refleje directamente y en primera instancia a nivel de las propias mitocondrias. Existen varias características de las mismas que nos inducen a pensar en su contribución al envejecimiento como que, en ellas se consume el 98% del oxígeno, el DNA mitocondrial está tan empaquetado que todo él codifica, carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su reparación es mínima si se compara con la del DNA nuclear. Además, las membranas mitocondriales al ser ricas en ácidos grasos altamente insaturados son muy susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (7). De hecho, las especies más longevas como son algunos pájaros o incluso el hombre han demostrado tener una menor proporción de ácidos grasos insaturados de 4 o más dobles enlaces por sustitución de araquidónico por linoleico, lo cual influye en la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones y con ello en la disminución de la producción de radicales libres (90). Con la edad se incrementan los niveles del mutágeno 8-desoxiguanidina, disminuyen los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, se producen transcripciones anómalas, descienden el complejo I y IV de la cadena de transporte electrónico, únicos complejos codificados por el DNA mitocondrial a diferencia de los II y III codificados por el DNA nuclear, y se produce una pérdida de la producción energética con el consiguiente incremento en los niveles de oxidantes al reaccionar los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas con grupos amino libres (25).

Otro aspecto a tener en cuenta es el estudio de los efectos de la edad sobre la hepatotoxicidad de los xenobióticos, ya que la frecuencia de las lesiones hepáticas puede variar considerablemente con el paso del tiempo. La respuesta tóxica a muchos agentes químicos depende de su biotransformación a metabolitos reactivos (tioacetamida, paracetamol, cocaína, etc) o no reactivos (fenobarbital, morfina, etc). En el

envejecimiento parece ser que se incrementa la sensibilidad al efecto hepatotóxico de los xenobióticos (106). Se sabe que la edad afecta a los enzimas microsómicos que dependen del citocromo P-450 (99), pero mientras unos autores describen que el sistema microsómico oxidasa de función mixta disminuye por efecto de la edad (107), otros describen el efecto contrario (77). La disponibilidad del glutatión para la formación de conjugados disminuye con la edad, lo cual eleva la hepatotoxicidad de fármacos que dependen del glutatión para su detoxificación (115). Otros estudios han descrito que la expresión génica de la SOD y la catalasa, los enzimas directamente encargados de eliminar el radical superóxido y el  $H_2O_2$ , va siendo menor a medida que transcurre la edad, mientras que la glutatión peroxidasa se incrementa en el mismo rango (75).

Experimentos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto, en hígado de rata, que durante el desarrollo (2 a 6 meses) se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno desembocando en un descenso del cociente GSH/GSSG, es decir, un estado de mayor oxidación celular acompañado de un aumento de los sistemas antioxidantes endógenos Mn SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Esta inducción enzimática, aunque no es capaz de evitar la alteración del estado redox, sin embargo es suficiente para prevenir el daño a nivel de proteínas y la peroxidación lipídica (102).

## 1.9. Objetivos

Las células hepáticas durante el desarrollo sufren modificaciones en su capacidad funcional que pueden conllevar a una mayor incidencia de reacciones adversas producidas por efecto de fármacos. Esto es debido a que las especies reactivas de oxígeno que se forman espontáneamente en la respiración mitocondrial se acumulan progresivamente con la edad, y a ellas se unen las especies reactivas de oxígeno generadas por los xenobióticos. En nuestro caso, el agente citotóxico utilizado ha sido la ciclosporina A ya que por un lado conocemos los acontecimientos oxidativos que induce en los hepatocitos y por otro es un fármaco utilizado en multitud de trasplantes realizados a personas de edades muy variadas.

Por ello, mediante el uso de un modelo experimental de citotoxicidad inducida en cultivos primarios de hepatocitos de 2 y 6 meses sometidos a concentraciones crecientes de ciclosporina A, nos propusimos los objetivos siguientes:

- A. Establecer las modificaciones en la citotoxicidad inducida por la ciclosporina A durante el desarrollo frente a variables de concentración y tiempo de incubación.
- B. Investigar las diferencias en los niveles de los radicales libres de oxígeno en la citotoxicidad de la ciclosporina A en cultivos de hepatocitos de ratas de 2 y 6 meses.
- C. Determinar las variaciones en la expresión génica de los sistemas enzimáticos implicados en la defensa de los hepatocitos frente al ataque oxidativo (SOD y CAT), entre ratas jóvenes y adultas ocasionadas por la exposición a ciclosporina A.

- D. Estudiar la influencia de la ciclosporina A en la progresión de las células a lo largo del ciclo celular durante el desarrollo.

## **2. MATERIAL Y METODOS**

### **2.1. Animales**

Se utilizaron ratas macho de 2 y 6 meses (200-250 g y 350-400 g, respectivamente) de la raza Wistar. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura, con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua.

### **2.2. Obtención de hepatocitos y cultivos celulares**

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión del hígado *in situ* con medio Hepes (Hepes 20 mM, KCl 5 mM,  $\text{SO}_4\text{Mg}$  1 mM,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  5 mM, ClNa 150 mM y glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método clásico de Krebs *et al* (64) y modificado por Seglen (109) que permite obtener hepatocitos con un elevado porcentaje de viabilidad.

La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (preparada al 0,2% en suero salino). Las células muertas o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que permanecen vivas y mantienen su membrana íntegra no incorporan el colorante al interior de la célula y aparecen sin teñir. El recuento de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90%.

Las células obtenidas se cultivaron en placas de 60-mm a una densidad de  $7.1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en 3 ml de medio DMEM suplementado con penicilina, estreptomina y gentamicina a una concentración de 50 mg/ml (DMEM completo) y 10% FCS (suero fetal de ternero). Tras un período de tres horas a 37°C en atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ /95% aire, el medio fue reemplazado por DMEM completo con FCS al 2% con las diferentes concentraciones de CsA (0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante períodos de 3, 18 y 24 horas.

### **2.3. Observación morfológica**

Las características morfológicas de los hepatocitos controles y cultivados con una concentración de ciclosporina A 50  $\mu\text{M}$ , fueron observadas por microscopía con un objetivo 40X.

### **2.4. Análisis por citometría de flujo y microscopía confocal de la producción de radicales libres de oxígeno**

La producción intracelular de radicales libres de oxígeno se determinó usando los compuestos 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA) (8) e hidroetidina

(HEt) (100). La DCFH-DA tiene la particularidad de atravesar la membrana celular, dado su carácter no polar. Las células viables son capaces de desacetilar el compuesto dando lugar a la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente, estable algunas horas y que al ser polar queda atrapado en el interior de la célula. Este intermediario reacciona cuantitativamente con  $H_2O_2$  y peróxidos de bajo peso molecular intracelulares produciendo el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF). Por su parte, la hidroetidina es un derivado reducido del etidio capaz de atravesar la membrana de las células vivas, este fluorocromo presenta una fluorescencia azul en el citoplasma que cambia a roja cuando se intercala en el DNA tras sufrir un proceso de deshidrogenación ocasionado por el  $O_2^-$ .

## 2.5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Los hepatocitos de ratas se cultivaron con diversas concentraciones de CsA por el procedimiento descrito en el apartado 2.2 de Métodos. Mediante la utilización del citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un láser de argón de 15 mW, se llevó a cabo el estudio a nivel celular del contenido y distribución del DNA. Este parámetro se considera de gran utilidad para determinar la cito y genotoxicidad de los xenobióticos (23). Las células se analizaron utilizando un test suministrado por Bio-Rad basado en los métodos de Vindelov *et al* (129) y Pellicciari *et al* (91).

## 2.6. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La determinación de la lactato deshidrogenasa se realizó en muestras del cultivo y del sobrenadante recogidas a distintos tiempos (3, 18 y 24 horas) tras la incubación de los hepatocitos con CsA.

La actividad de este enzima (EC 1.1.1.27.), como parámetro de daño irreversible de la membrana y muerte celular, se determinó espectrofotométricamente en el medio de cultivo y en el interior celular midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a  $NAD^+$  en la reacción de reducción del piruvato a lactato (11).

## 2.7. Determinación de proteínas

Las proteínas se evaluaron por el método de Bradford (14) utilizando albúmina de suero bovino como patrón y reactivo de Coomassie. Este método se basa en la reacción, por fuerza iónica, entre grupos sulfonados ácidos presentes en el azul Coomassie y grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina, de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 620 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína.

## **2.8. Aislamiento de RNA y análisis por Northern-blot de enzimas antioxidantes**

El RNA total de  $2 \times 10^6$  hepatocitos se extrajo siguiendo el método de tiocianato guanidina (19). Tras la electroforesis en gel de agarosa al 0,9% con 0,66M de formaldehído, el RNA se transfirió a membranas Gene Screen TM, determinando los niveles de mensajero utilizando los cDNA de Mn-, Cu,Zn-SOD y catalasa marcados con  $a^{32}P$ -dCTP mediante el kit de multiprimer DNA-labeling. La cuantificación de las películas se llevó a cabo mediante densitometría utilizando como sonda de normalización la ribosomal 18S rRNA.

## **2.12. Métodos estadísticos**

Los valores presentados son la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o cuadruplicado de un número variable de experimentos que se especifican en cada caso. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la t de Student. La significación estadística se estableció en términos de toxicidad frente a los respectivos controles (a) y en términos de estadio adulto frente a joven (b), y se definió como  $p < 0,005$ .

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Efectos citotóxicos de la ciclosporina A en cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses**

La liberación de enzimas citoplasmáticos por parte de las células dañadas al medio de cultivo ha demostrado ser un método muy útil para la evaluación de la toxicidad en cultivos primarios, que se basa en la capacidad de la membrana plasmática de retener los enzimas celulares. Este es el caso de la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima exclusivamente citosólico, cuya liberación al medio de cultivo tras la exposición a xenobióticos se relaciona directamente con la ruptura de la membrana plasmática, fenómeno característico de la muerte celular por necrosis.

Muestras de  $2 \times 10^6$  de hepatocitos, aislados de ratas de 2 y 6 meses, se suspendieron y cultivaron en 3 ml de DMEM con concentraciones crecientes de ciclosporina A (0 - 50  $\mu$ M) midiendo las variaciones experimentadas en la actividad de la LDH en el medio al cabo de 3, 18 y 24 horas de incubación. Como puede observarse en los resultados obtenidos en la Tabla 1, el efecto citotóxico se incrementa a medida que aumenta la concentración de la CsA y el tiempo de incubación. Ello produce en ambas edades un incremento de la liberación de LDH al medio, de modo que el efecto citotóxico resultó ser dependiente tanto de la dosis como del tiempo de incubación.

A las 3 horas de incubación, no se detectaron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las dos edades. A las 18 horas, en hepatocitos de rata de 2 meses no se modificó esta situación, pero en los de 6 meses se registraron diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 5  $\mu$ M que alcanzaron a 50  $\mu$ M valores de un 42,9% frente a un 19,6% del control correspondiente. En este mismo período de incubación, se observaron diferencias significativas entre ambas edades

CsA ( $\mu\text{M}$ )	3 horas		18 horas		24 horas	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	6,0 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 0,9	19,6 $\pm$ 1,8	16,2 $\pm$ 0,9	19,8 $\pm$ 1,2
0,5	6,4 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 1,6	28,0 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	21,3 $\pm$ 1,9	31,4 $\pm$ 4,1
1	6,7 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 1,8	30,2 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	22,3 $\pm$ 2,0	37,1 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>
5	6,7 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 1,8	37,3 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>	25,0 $\pm$ 2,0	38,9 $\pm$ 3,2 <sup>ab</sup>
10	6,9 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 0,9	17,6 $\pm$ 1,7	37,4 $\pm$ 3,5 <sup>ab</sup>	29,4 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	42,0 $\pm$ 3,9 <sup>ab</sup>
25	7,0 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 0,7	18,2 $\pm$ 1,7	42,3 $\pm$ 3,9 <sup>ab</sup>	32,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	44,9 $\pm$ 4,0 <sup>ab</sup>
50	7,1 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 0,9	19,4 $\pm$ 2,0	42,9 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>	33,5 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	45,5 $\pm$ 4,0 <sup>ab</sup>

Tabla 1. Liberación de LDH al medio de cultivo. La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó en el medio de cultivo, tomando muestras a las 3, 18 y 24 horas de incubación con las distintas concentraciones de CsA. Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de actividad del enzima liberado al medio. Los resultados son media de tres placas procedentes de tres experimentos representativos.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

desde la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  (28,0  $\pm$  3,0 versus 14,3  $\pm$  1,6,  $p < 0,005$  en hepatocitos de rata de 6 y 2 meses respectivamente) hasta la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (42,9  $\pm$  4,3 frente a 19,4  $\pm$  2,0  $p < 0,005$ ). A las 24 horas de incubación, tanto los hepatocitos procedentes de ratas de 2 meses como los de ratas de 6 meses, mostraron diferencias significativas frente a sus controles respectivos a partir de las concentraciones de 10 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente. La comparación de los datos obtenidos de hepatocitos de ratas adultas frente a los de animales jóvenes, mostró diferencias significativas desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (37,1  $\pm$  3,9 frente 22,3  $\pm$  2,0,  $p < 0,005$ ) disminuyendo esta diferencia a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (45,5  $\pm$  4,0 frente a 33,5  $\pm$  3,0).

En vista de estos resultados, consideramos las 24 horas como el tiempo idóneo de cultivo (Figura 1) que permite detectar con mayor amplitud las diferencias dependientes tanto de la dosis como de la edad, capacitándonos para estudiar comparativamente el mecanismo de toxicidad y las alteraciones en la función celular inducidas por dicho fármaco durante el desarrollo.

Como la liberación de la LDH al medio implica la ruptura de la membrana celular, realizamos un estudio morfológico por microscopía confocal. En la Figura 2 se observa que las células de los cultivos control, tanto de 2 como de 6 meses, presentan la membrana citoplasmática íntegra y muestran tendencia a agruparse y a adquirir forma poligonal para simular la estructura originaria del parénquima hepático, mientras que, las células incubadas con CsA 50  $\mu\text{M}$  aparecen redondeadas y aisladas mostrando una pérdida de la integridad celular. Hay que destacar que la intensidad de las alteraciones es mayor en el cultivo celular procedente de ratas adultas.

### 3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno en cultivo primario de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas incubados en presencia de ciclosporina A

Para investigar la causa de las diferencias en la intensidad del efecto citotóxico de la ciclosporina A puestas de manifiesto al medir la liberación de enzimas citosólicos

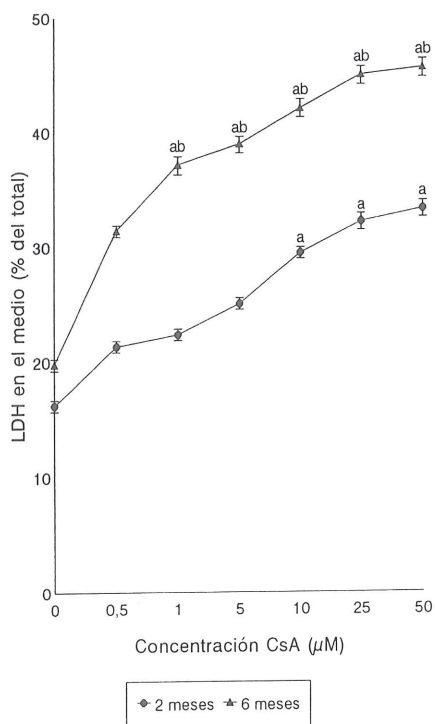
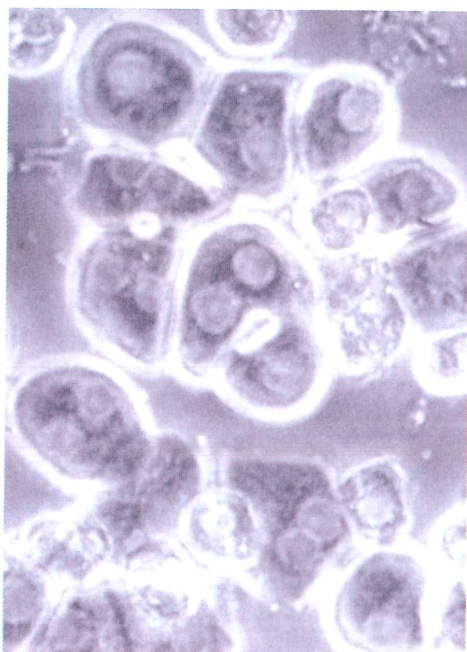


FIGURA 1. Efectos citotóxicos de la ciclosporina A en hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses. Los hepatocitos en cultivo primario se incubaron con concentraciones crecientes de CsA durante 24 horas. Después del tratamiento, la citotoxicidad se evaluó midiendo el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Los resultados son media de tres placas procedentes de tres animales distintos.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

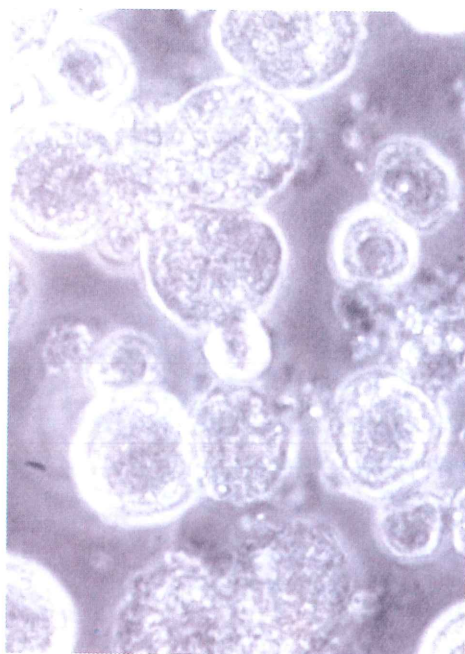
al medio, se procedió a evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno por las células al ser este uno de los mecanismos desencadenantes de la hepatotoxicidad del fármaco. La generación de estas especies se determinó por técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal. Las especies reactivas de oxígeno, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, pueden ser generadas por diversas vías durante el metabolismo de numerosos xenobióticos. Tanto el  $O_2^{\cdot-}$  como el  $H_2O_2$  presentan una reactividad muy limitada, de modo que su importancia reside en la posibilidad de producir el  $\cdot OH$ , altamente reactivo, con la participación de metales de transición.

La producción de estas especies reactivas de oxígeno se valoró en los hepatocitos de ambas edades incubados durante 24 horas con concentraciones crecientes de CsA (0-50  $\mu M$ ). Para ello se utilizaron los fluorocromos hidroetidina (HET), específica para radical superóxido, y la 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), altamente sensible en la detección del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos.

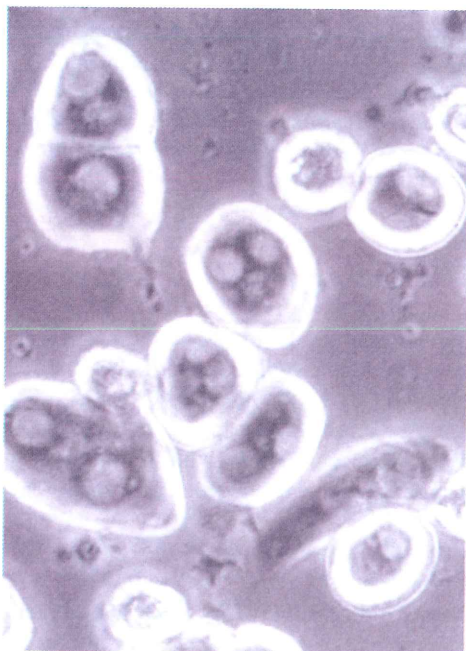
Para comprobar los resultados registrados citométricamente, se procedió a visualizar por imagen la producción de superóxido y peróxidos utilizando la microscopía confocal. Las aplicaciones de la microscopía confocal son las mismas que las de la



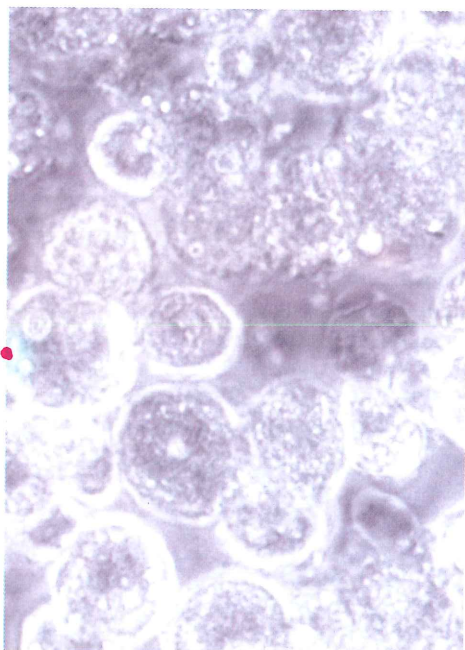
**A**



**B**



**C**



**D**

FIGURA 2. Alteración de la morfología celular inducida por la CsA en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Los hepatocitos control e incubados con una concentración 50  $\mu\text{M}$  de CsA se observaron por microscopía. (A) Control 2 meses; (B) CsA 50  $\mu\text{M}$  2 meses; (C) Control 6 meses; (D) CsA 50  $\mu\text{M}$  6 meses.



microscopía de fluorescencia, la de campo claro o la de contraste de fases, con la ventaja del aumento de resolución y la capacidad de incrementar los contrastes sin disminuir dicha resolución. Se siguió el procedimiento que se detalla en el capítulo de Material y Métodos, escaneando las células una sola vez con el láser, ya que la DCFH es tan sensible a la oxidación que la exposición más continuada a la luz láser puede inducir fotooxidación, dando como resultado una fluorescencia incrementada (Mattson *et al*, 1995).

### 3.2.1. Niveles de peróxido de hidrógeno

La DCFH-DA es un compuesto que una vez incorporado a las células sufre un proceso de desacetilación por esterasas intracelulares y posteriormente es oxidado por peróxidos celulares para generar el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF). La intensidad de fluorescencia de la DCF es un índice de la cantidad de peróxidos ( $H_2O_2$  y peróxidos de bajo peso molecular) en el interior de las células.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo, en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses, se muestran en las Figuras 3 y 4 respectivamente, donde se pueden observar los histogramas de un experimento representativo en los que se representa en abcisas la intensidad relativa de fluorescencia emitida por la diclorofluorescina frente al número de células en ordenadas. La Tabla 2 recoge el análisis cuantitativo de los mismos experimentos. La cuantificación muestra, tanto en hepatocitos de ratas jóvenes como de adultas, que la producción global de peróxidos aumenta significativamente a concentraciones bajas y medias (de 0,5 a 10  $\mu M$ ), y disminuye a dosis elevadas (25 y 50  $\mu M$ ). Sin embargo, atendiendo únicamente a los valores de intensidad de fluorescencia de células DCF positivas, se observa, en hepatocitos de ambas edades, como la producción de peróxidos aumenta de forma paralela a la concentración de CsA. Aunque el perfil descrito para ambas edades es similar, existen diferencias en la producción global de peróxidos respecto a la edad, ya que en hepatocitos de rata de 2 meses aumenta más intensamente a bajas concentraciones (0,5 y 1  $\mu M$ ) para disminuir a partir de 5  $\mu M$ , mientras que el aumento es progresivo y sostenido hasta concentraciones de 10  $\mu M$  para disminuir, a las concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50  $\mu M$ ). Los cambios registrados fueron más marcados en ratas de 6 meses.

En las Figuras 5 y 6 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal al incubar con diclorofluorescina diacetato y yoduro de propidio durante 30 minutos, las células de ratas de 2 y 6 meses previamente incubadas con CsA durante 24 horas. Las fotografías A, B, C y D corresponden a concentraciones de CsA de 0, 5, 25 y 50  $\mu M$  respectivamente. En principio podemos apreciar, por la señal correspondiente al yoduro de propidio, que las células de los cultivos, tanto de ratas de 2 como de 6 meses, tratados con las concentraciones más altas de ciclosporina A, principalmente 25 y 50  $\mu M$ , aparecen teñidas con más intensidad (fluorescencia roja), indicando que en estas condiciones aparece una mayor proporción de células muertas frente a los controles sin CsA y frente a células tratadas con dosis menores de la droga.

Comparando las figuras relativas a las dos edades ensayadas (2 y 6 meses) se aprecia que la proporción de células muertas a elevadas concentraciones de CsA, es mayor en cultivos de rata adultas. Por otra parte, la señal correspondiente a la diclorofluorescina (fluorescencia verde) nos indica que en ambas edades la presencia de

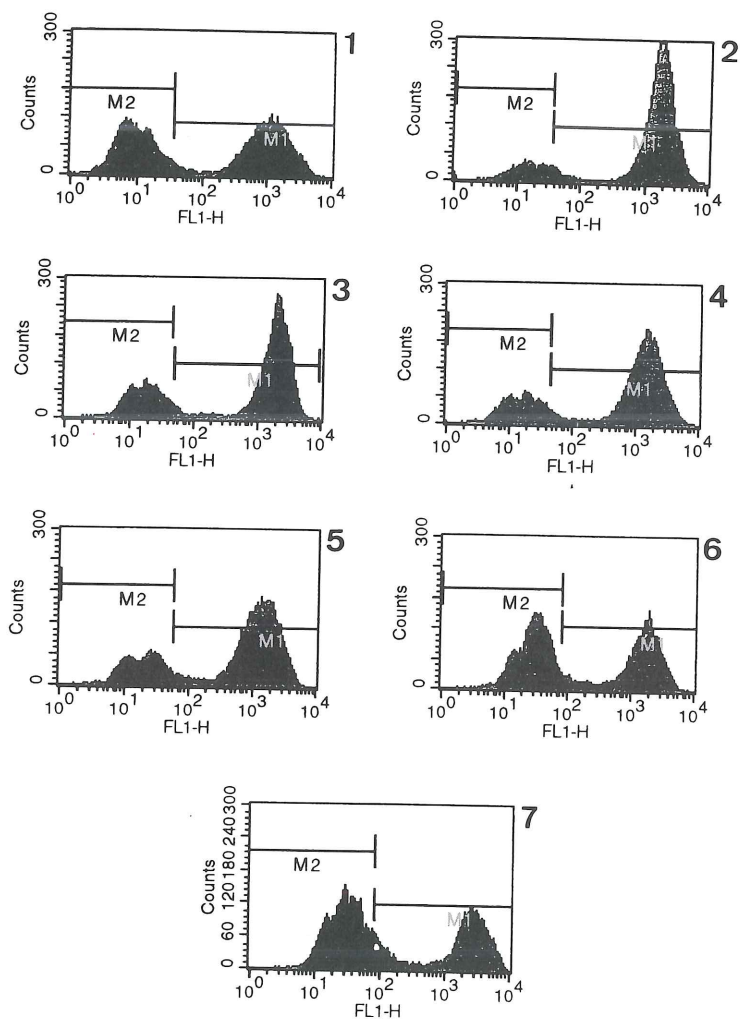


FIGURA 3. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

peróxidos en las células es más abundante a medida que se incrementa la concentración del fármaco. Sin embargo, a las concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) la señal global de la DCF disminuye coincidiendo con el aumento de la señal de yoduro de propidio, lo que indica un aumento de la relación de células muertas (concentraciones tóxicas de la droga). En estas últimas, los hepatocitos muestran una intensidad de fluorescencia más baja, indicando que la producción global de peróxidos es menor, dato corroborado por citometría de flujo. Sin embargo, algunas células aparecen fuertemente teñidas con el fluorocromo que son las detectadas por citometría como DCF positivas de elevada intensidad de emisión (2098,6  $\pm$  200,8 y 2149,6  $\pm$  158,9 para hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente).

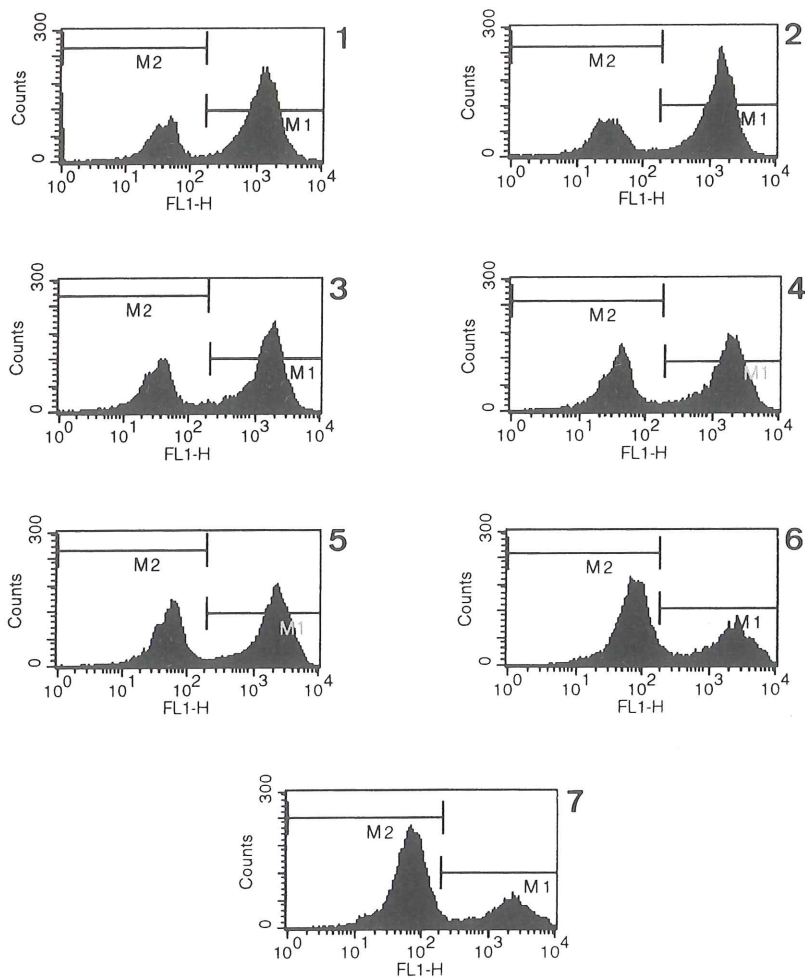


FIGURA 4. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 6 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

### 3.2.2. Niveles de radical superóxido

La hidroetidina es un derivado hidrogenado del etidio capaz de atravesar la membrana de células vivas y que presenta fluorescencia azul en el citoplasma. Esta fluorescencia azul pasa a roja cuando el fluorocromo se intercala en el DNA tras sufrir una deshidrogenación ocasionada por el radical superóxido.

En la Figuras 7 y 8 se muestran los histogramas de un experimento representativo, correspondientes a cultivos de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas, obtenidos por citometría de flujo. La Tabla 3 recoge el análisis cuantitativo de los mismos experi-

Concentración de CsA ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad media células DCF (+)		Intensidad media global	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	1182,9 $\pm$ 123,3	1258,3 $\pm$ 146,3	638,2 $\pm$ 59,2	884,2 $\pm$ 95,2 <sup>b</sup>
0,5	1580,3 $\pm$ 143,3 <sup>a</sup>	1396,7 $\pm$ 102,0	1262,2 $\pm$ 133,4 <sup>a</sup>	976,6 $\pm$ 114,8 <sup>b</sup>
1	1780,2 $\pm$ 166,8 <sup>a</sup>	1568,8 $\pm$ 93,1	1263,8 $\pm$ 125,8 <sup>a</sup>	978,5 $\pm$ 124,7 <sup>b</sup>
5	1620,0 $\pm$ 173,8 <sup>a</sup>	1730,6 $\pm$ 137,8 <sup>a</sup>	1182,1 $\pm$ 102,1 <sup>a</sup>	1028,8 $\pm$ 98,1 <sup>a</sup>
10	1515,8 $\pm$ 158,4 <sup>a</sup>	2054,7 $\pm$ 153,1 <sup>ab</sup>	1122,2 $\pm$ 95,0 <sup>a</sup>	1220,8 $\pm$ 102,3 <sup>a</sup>
25	1680,3 $\pm$ 181,4 <sup>a</sup>	2151,8 $\pm$ 162,2 <sup>ab</sup>	935,3 $\pm$ 100,8	852,2 $\pm$ 71,0
50	2098,6 $\pm$ 200,8 <sup>a</sup>	2149,6 $\pm$ 158,9 <sup>a</sup>	920,6 $\pm$ 105,8	644,2 $\pm$ 82,2 <sup>ab</sup>

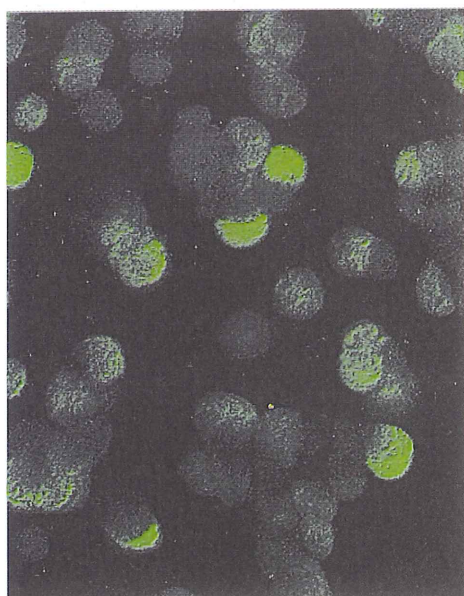
TABLA 2. Análisis citométrico de los niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Intensidad relativa de fluorescencia de la DCF como medida de la producción de peróxidos por las células tratadas con las diferentes dosis de CsA. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos.  $p < -0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

mentos. En las dos edades ensayadas se observa, que tanto la producción global de radical superóxido como sus niveles en células HET positivas van disminuyendo a medida que aumenta la concentración de ciclosporina A, siendo significativa esta disminución a partir de 5  $\mu\text{M}$  en cultivos de hepatocitos de rata de 6 meses, y a partir de 25  $\mu\text{M}$  en los de 2 meses.

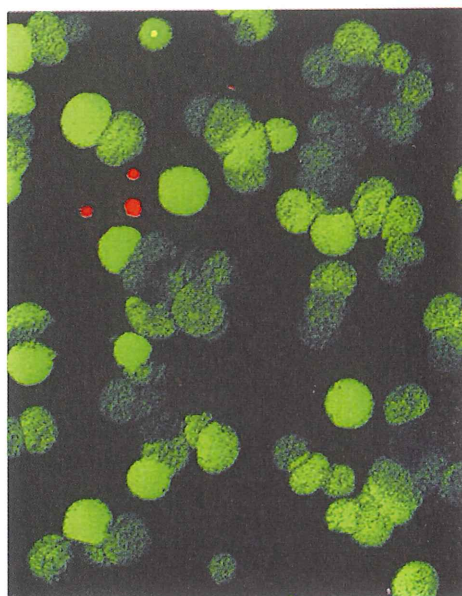
Las Figuras 9 y 10 muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal tras un proceso de incubación con HET durante 30 minutos de los cultivos previamente incubados durante 24 horas con CsA. Las fotografías A, B, C y D se corresponden con las concentraciones de 0, 5, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de ciclosporina A, respectivamente. En los cultivos de ambas edades, se aprecia que la señal correspondiente al HET oxidado (fluorescencia roja) va perdiendo intensidad con el aumento de la concentración del fármaco, para llegar a un mínimo de emisión a 50  $\mu\text{M}$  coincidiendo con la mayor proporción de células muertas (células de tonalidad oscura-negra).

### 3.3. Estudio de los sistemas de defensa antioxidante en la citotoxicidad de la ciclosporina A durante el desarrollo

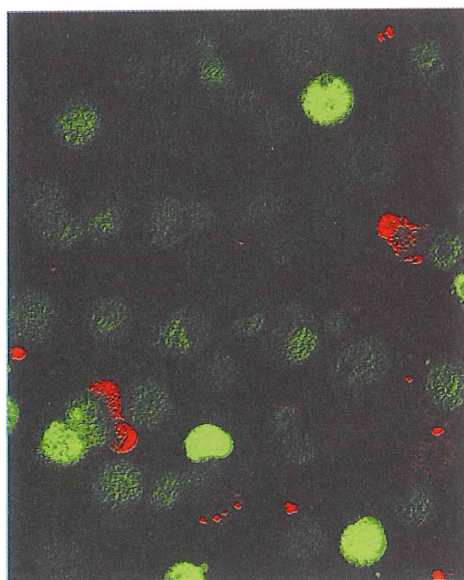
Después de comprobar que la generación de especies reactivas de oxígeno en los cultivos de hepatocitos de animales de 6 meses tratados con ciclosporina A es superior a la de 2 meses, y para profundizar en la relación de la hepatotoxicidad de la droga con dicha producción, se procedió a determinar los cambios sufridos en la expresión y actividad de los mensajeros de enzimas implicados en la respuesta de la célula frente al estrés oxidativo. En este trabajo se registran las variaciones observadas en los enzimas superóxido dismutasa (CuZn-SOD y Mn-SOD) y catalasa. Todos ellos protegen a las células de los efectos lesivos de las especies reactivas de oxígeno, la SOD eliminando al radical  $\text{O}_2^-$  y la catalasa haciendo disminuir los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



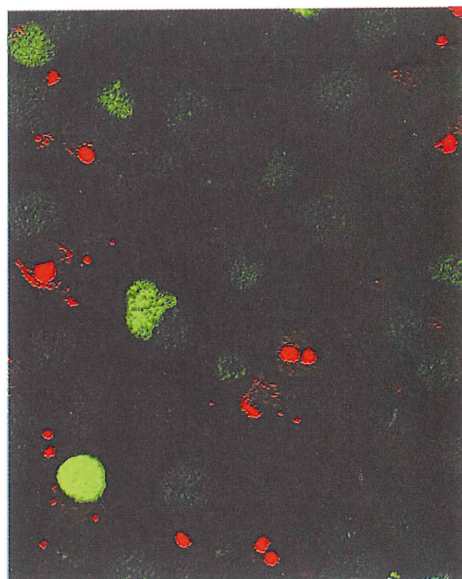
A



B

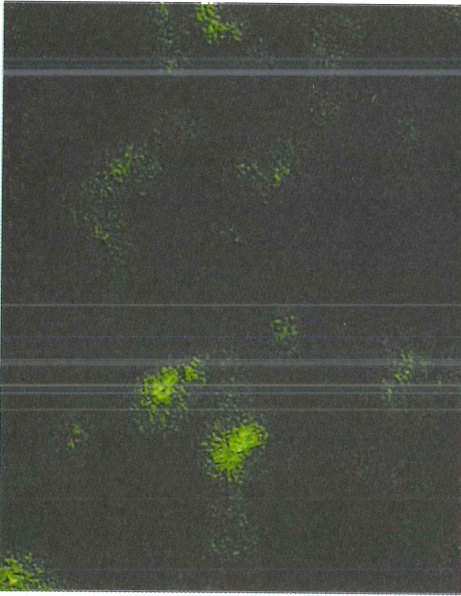


C

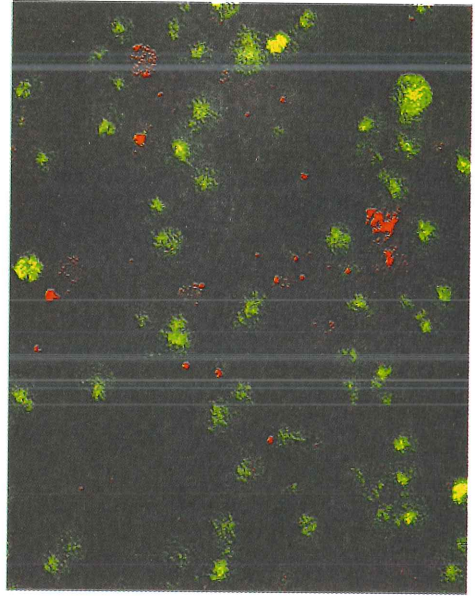


D

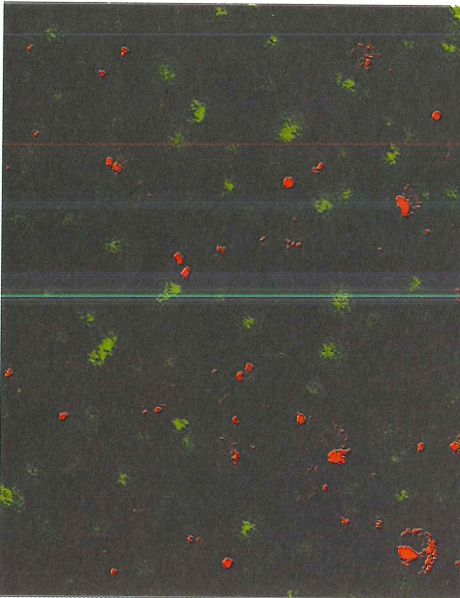
FIGURA 5. Niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 2 meses analizados por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50  $\mu\text{M}$  de ciclosporina A.



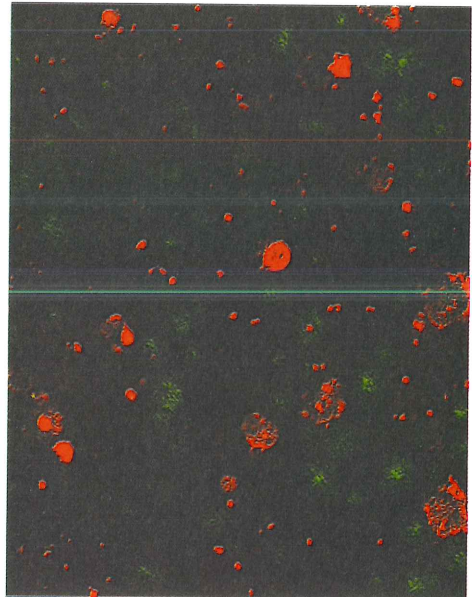
**A**



**B**



**C**



**D**

FIGURA 6. Niveles de peróxidos en hepatocitos de rata de 6 meses analizados por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50  $\mu\text{M}$  de ciclosporina A.

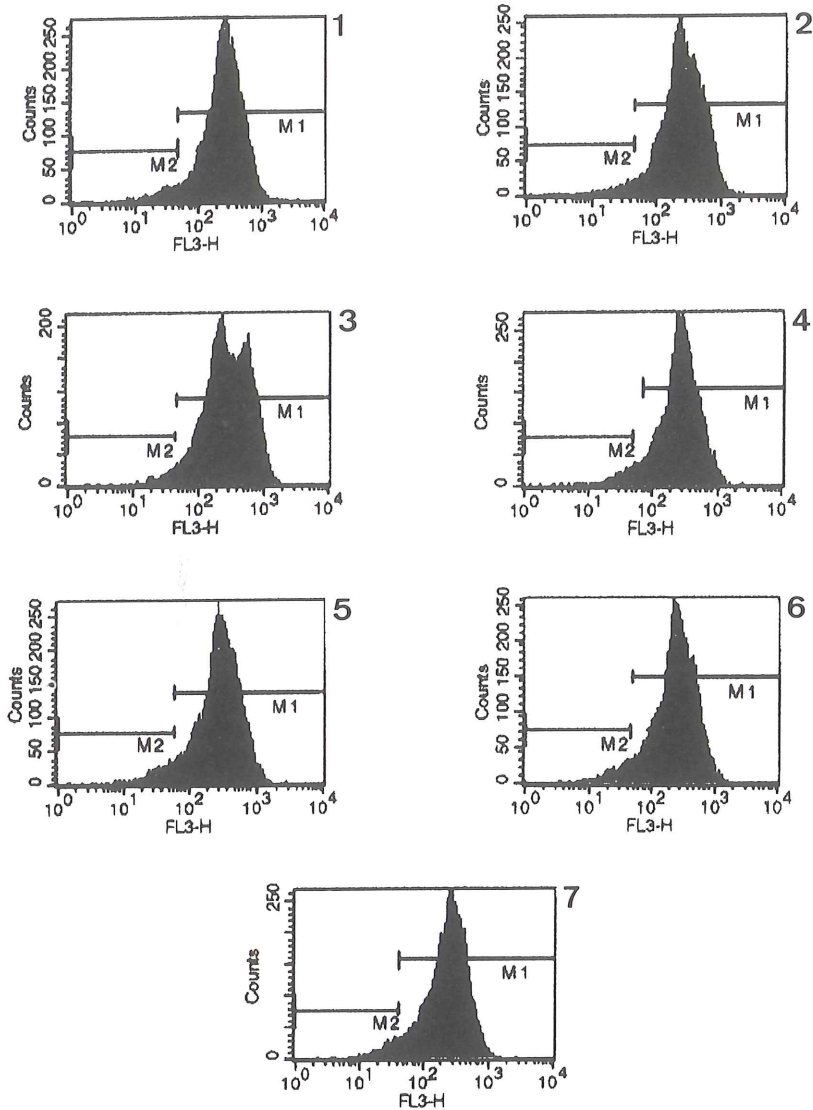


FIGURA 7. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 2 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con HEt durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

### 3.3.1. Expresión génica de la Mn-SOD y la CuZn-SOD

La SOD es una familia de metaloenzimas con diferentes grupos prostéticos que actúan protegiendo a la célula del radical superóxido, ya que catalizan su transformación para dar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ . En este trabajo se ha determinado la expresión de las dos isoenzimas, la Mn-SOD y la CuZn-SOD.

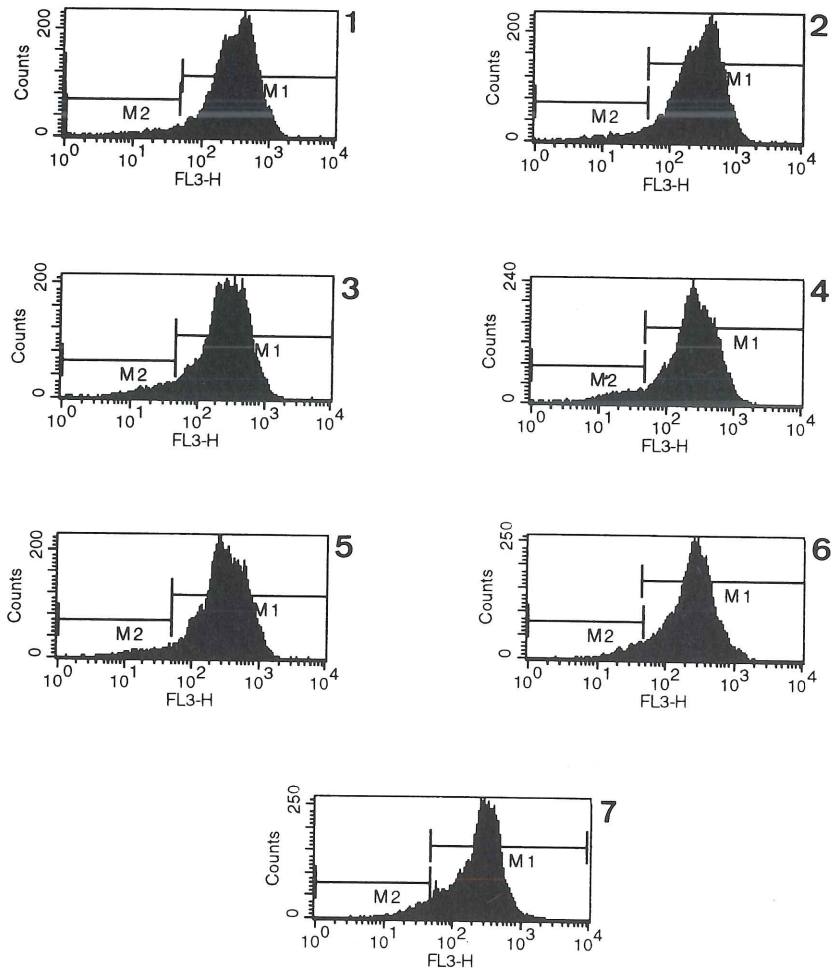


FIGURA 8. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 6 meses. Los hepatocitos tratados con CsA durante 24 horas se incubaron con HEt durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

La Figura 11 muestra el análisis por Northern blot y la cuantificación por densitometría, de la expresión de la Mn-SOD en cultivos primarios de hepatocitos de rata de 2 y 6 meses expuestos a dosis crecientes de CsA desde 0 a 50  $\mu\text{M}$  durante 24 horas.

En los cultivos de hepatocitos de rata de 2 meses, podemos observar que los niveles de mRNA de la Mn-SOD experimentan un aumento significativo a partir de la concentración de 5  $\mu\text{M}$ , llegando a incrementarse hasta un 270% a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Por otra parte, en los cultivos de hepatocitos de rata adulta, la incubación con ciclosporina provocó modificaciones en los niveles del mensajero de la Mn-SOD teniendo lugar un aumento significativo a concentraciones elevadas del fármaco (25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Comparando los niveles del transcrito de Mn-SOD en las dos edades, se observa como éstos son siempre más elevados en ratas adultas alcanzando diferencias



Concentración de CsA ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad media células HET (+)		Intensidad media global	
	2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
0	315,1 $\pm$ 33,2	369,4 $\pm$ 35,2 <sup>b</sup>	302,7 $\pm$ 28,6	351,4 $\pm$ 41,1
0,5	311,8 $\pm$ 28,6	340,9 $\pm$ 42,9	300,3 $\pm$ 23,7	323,5 $\pm$ 35,3
1	324,5 $\pm$ 28,8	316,2 $\pm$ 43,5	312,6 $\pm$ 36,2	296,4 $\pm$ 34,0
5	301,7 $\pm$ 37,2	304,4 $\pm$ 33,8 <sup>a</sup>	287,8 $\pm$ 26,7	282,8 $\pm$ 36,8 <sup>a</sup>
10	295,1 $\pm$ 26,3	308,3 $\pm$ 31,7 <sup>a</sup>	275,5 $\pm$ 30,1 <sup>a</sup>	291,4 $\pm$ 34,7 <sup>a</sup>
25	283,5 $\pm$ 30,0 <sup>a</sup>	289,8 $\pm$ 34,9 <sup>a</sup>	266,3 $\pm$ 27,2 <sup>a</sup>	273,4 $\pm$ 32,9 <sup>a</sup>
50	266,8 $\pm$ 24,8 <sup>a</sup>	291,5 $\pm$ 30,2 <sup>a</sup>	253,2 $\pm$ 31,3 <sup>a</sup>	274,9 $\pm$ 38,0 <sup>a</sup>

TABLA 3. Análisis citométrico de los niveles de superóxido en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Intensidad relativa de fluorescencia del etidio como medida de la producción de superóxido por las células tratadas con las diferentes dosis de CsA. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

significativas en varios puntos (control, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ ), sin embargo si comparamos la magnitud de los incrementos en ambas edades, vemos como ésta es mayor en hepatocitos de rata joven, alcanzando un incremento de un 270% frente al 217% de hepatocitos de rata adulta.

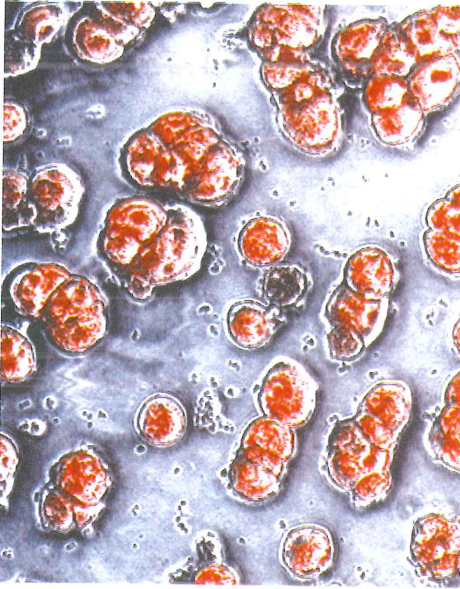
La Figura 12 muestra el análisis por Northern blot y la cuantificación por densitometría, de la expresión de la CuZn-SOD en cultivos primarios de hepatocitos de ratas jóvenes y adultas incubados con CsA durante 24 horas.

Por los datos obtenidos por densitometría, podemos observar que tanto en los cultivos procedentes de ratas jóvenes como adultas, la expresión de la CuZn-SOD aumenta paralelamente con la dosis de CsA, para alcanzar valores significativos a partir de concentraciones de 50 y 25  $\mu\text{M}$  para hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente. Al igual que en la Mn-SOD, los niveles del mensajero de CuZn-SOD fueron mayores, en todas las condiciones del cultivo, en hepatocitos de rata adulta, siendo significativa la diferencia en todas las concentraciones. Sin embargo, la magnitud del incremento volvió a ser superior en hepatocitos de rata joven (279%) frente a los de rata adulta (203%).

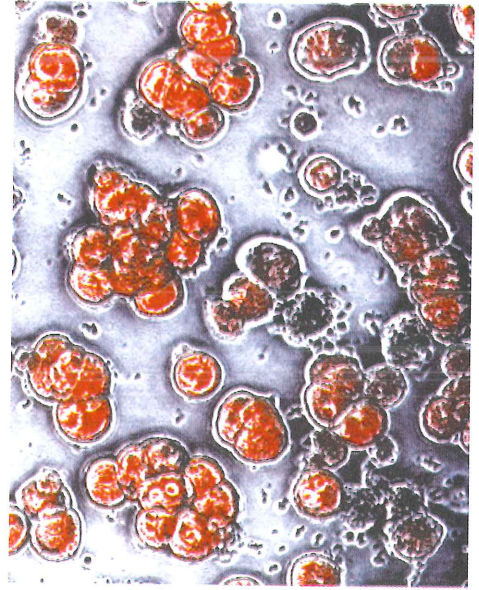
### 3.3.2. Expresión génica de la catalasa

La catalasa es el enzima encargado de eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la célula para producir  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Tras exponer los cultivos de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses a concentraciones de ciclosporina A de 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ , se procedió a realizar el análisis por Northern blot de los niveles del transcrito del mismo enzima. Tanto el Northern blot como su cuantificación densitométrica se muestran en la Figura 13.

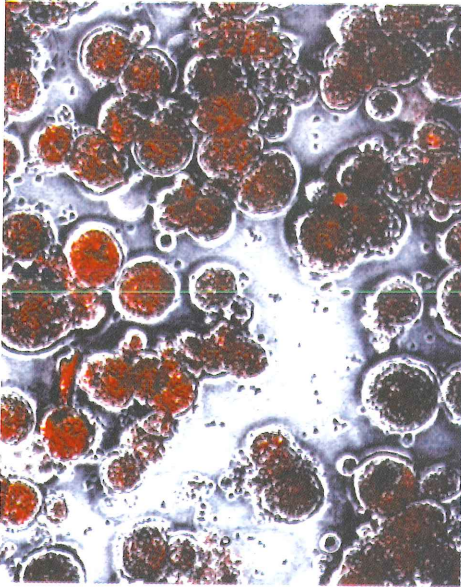
Podemos observar, como la incubación de las células parenquimales hepáticas con concentraciones crecientes de CsA provoca, tanto en cultivos de ratas jóvenes como de adultas, un incremento en la expresión de la catalasa, pero mientras que en hepatocitos



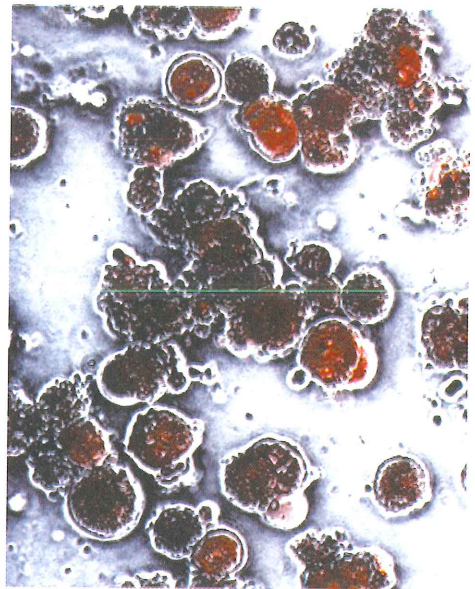
A



B

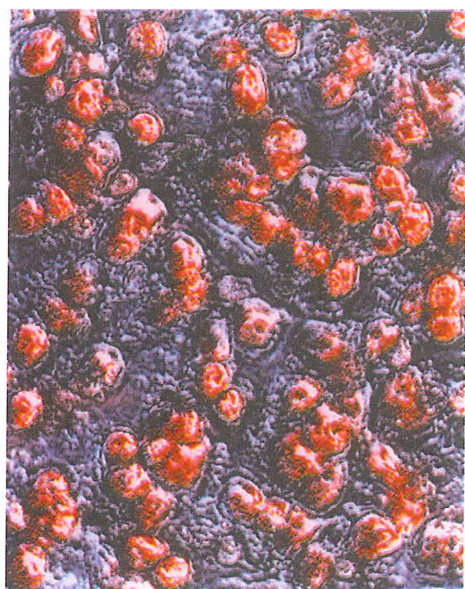


C

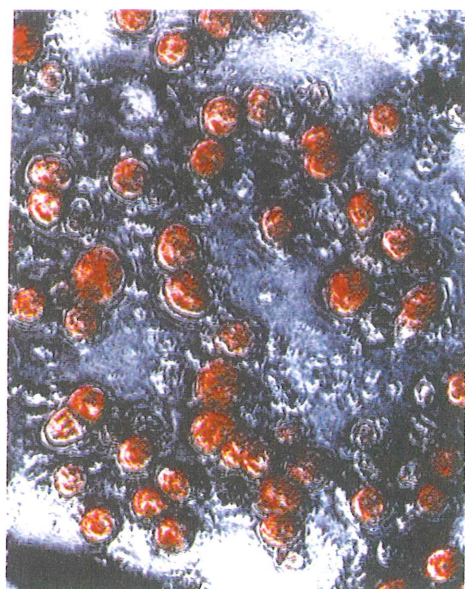


D

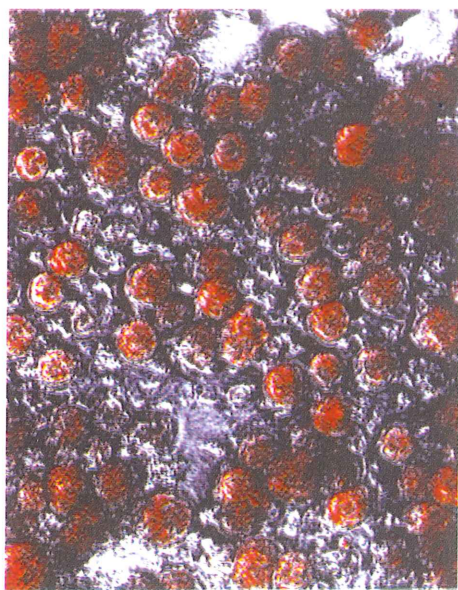
FIGURA 9. Niveles de radical superóxido en hepatocitos de rata de 2 meses analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50  $\mu$ M de ciclosporina.



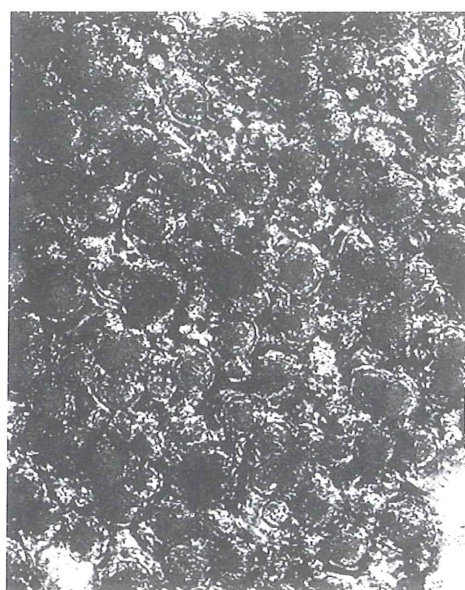
**A**



**B**



**C**

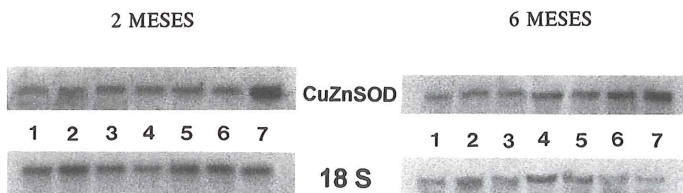


**D**

FIGURA 10. Niveles de radical superóxido en hepatocitos de rata de 6 meses analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 5, (C) 25 y (D) 50  $\mu$ M de ciclosporina.



1



2

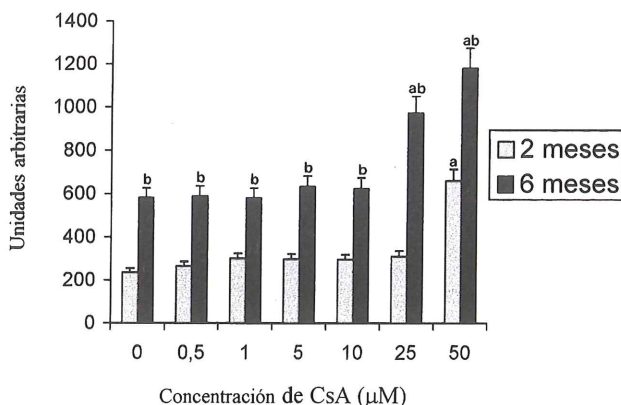


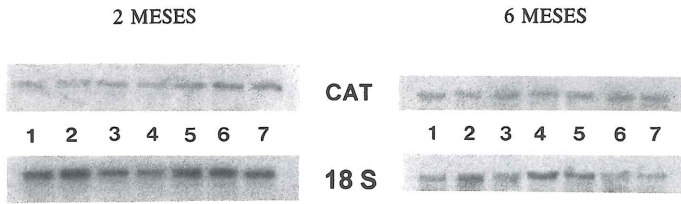
FIGURA 12. Análisis por Northern blot del mRNA de la CuZn-SOD en hepatocitos de rata tratados con concentraciones crecientes de CsA. El Panel 1 muestra un Northern blot representativo de tres experimentos realizados en cultivos porcedentes de tres animales distintos. 20  $\mu\text{g}$  de RNA total se hibridaron con el cDNA de la CuZn-SOD marcado con  $a\text{-}^{32}\text{P}$  utilizando como sonda de normalización el rRNA 18S. (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente). El Panel 2 muestra el análisis cuantitativo de dichos mRNAs mensajeros.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

### 3.4.1. Análisis del contenido del DNA genómico por citometría de flujo

Las muestras de cultivos de hepatocitos de ratas de 2 y 6 meses incubados durante 24 horas con diferentes concentraciones de CsA, se procesaron y analizaron en base a su contenido en DNA. En las Figuras 14 y 15 se muestran los histogramas donde se representa el contenido de DNA en abscisas, evaluado por la fluorescencia del yoduro de propidio, frente al número de células en ordenadas, procedentes de animales de 2 y 6 meses, respectivamente. El análisis cuantitativo de cada histograma se muestra en la Tabla 4, donde se muestra el porcentaje de las poblaciones diploides (2C), tetraploides (4C), octoploides (8C),  $S_1$  y  $S_2$ .

Coincidiendo con resultados previos de nuestro grupo (103), los cultivos de hepatocitos control muestran durante el desarrollo (de 2 a 6 meses) una tendencia hacia la poliploidización, caracterizada por un descenso a un 45% de los hepatocitos con con-

1



2

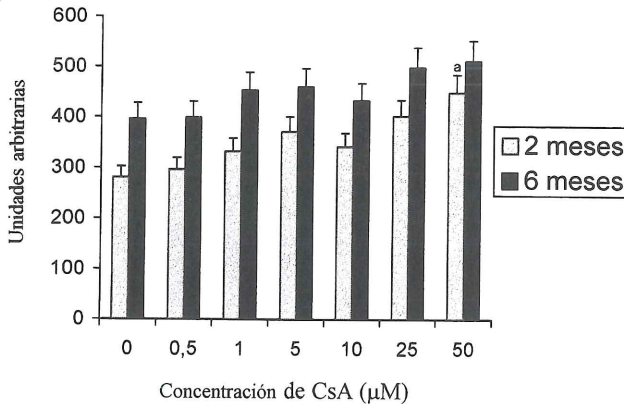


FIGURA 13. Análisis por Northern blot del mRNA de la catalasa en hepatocitos de rata tratados con concentraciones crecientes de CsA. El Panel 1 muestra un Northern blot representativo de tres experimentos realizados en cultivos porcedentes de tres animales distintos. 20  $\mu\text{g}$  de RNA total se hibridaron con el cDNA de la catalasa marcado con  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  utilizando como sonda de normalización el rRNA 18S. (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente). El Panel 2 muestra el análisis cuantitativo de dichos mRNAs mensajeros.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

tenido diploide (de un  $48,0 \pm 5,1$  a un  $21,7 \pm 2,6$ ;  $p < 0,005$ ) a favor de un incremento de los hepatocitos con contenido tetraploide (127%) y octoploide (1050%) (de  $46,2 \pm 3,8$  a un  $58,7 \pm 4,6$  y de  $0,6 \pm 0,09$  a  $6,3 \pm 0,7$ , respectivamente). Cabe destacar el incremento significativo (616%) que se verifica en la apoptosis en muestras de 6 meses frente a las de 2 meses ( $7,4 \pm 0,8$  versus  $1,2 \pm 0,2$   $p < 0,005$ ).

Respecto a los cultivos tratados con CsA, los datos muestran que al aumentar la concentración del fármaco se produce un descenso de la proporción de hepatocitos con dotación diploide con un paralelo incremento de las células tetraploides. Estas modificaciones, aunque se producen tanto en células de animales jóvenes como en las de los adultos, son más acusadas en estos últimos (reducción a un 38% en células 2C e incremento a un 131% en 4C en hepatocitos de rata de 6 meses, frente a la reducción a un 86% en 2C e incremento a un 108% en 4C para hepatocitos de rata de 2 meses), siendo además significativo, respecto al control, tanto el descenso de células 2C desde

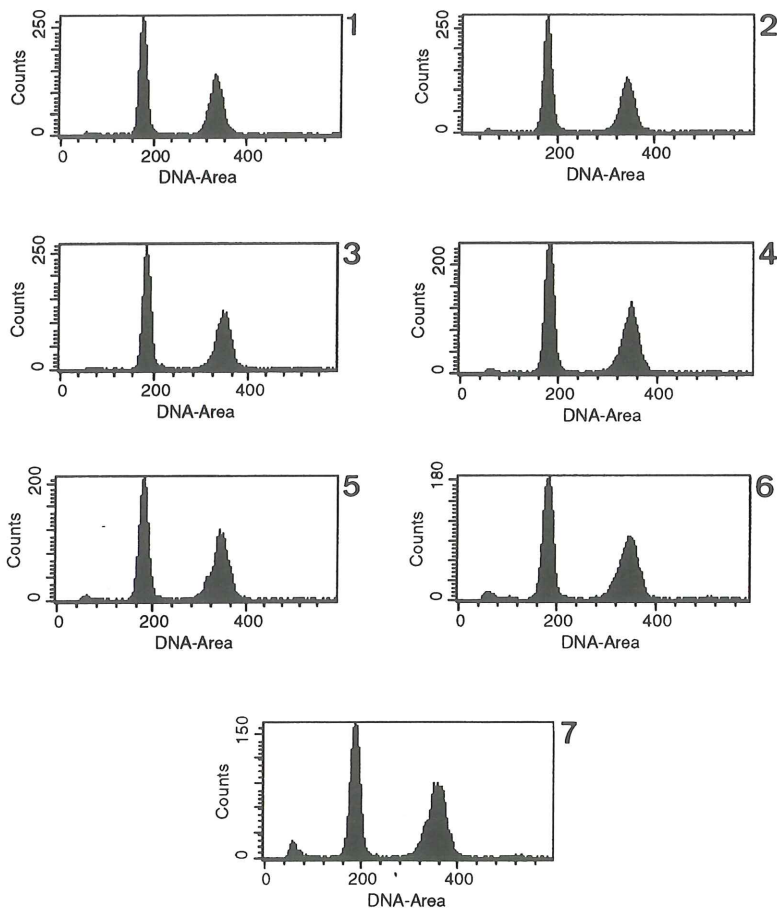


FIGURA 14. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo en hepatocitos de rata de 2 meses. Las células tratadas con CsA se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  como el incremento de 4C desde 5  $\mu\text{M}$  para los hepatocitos de ratas adultas, mientras que en los de ratas jóvenes, ni el descenso ni el incremento, fue significativo a ninguna concentración. Por otra parte, se observa en todas las concentraciones, como la proporción de células 2C es significativamente menor, así como la proporción de células 4C es significativamente mayor, en hepatocitos de ratas adultas respecto a las jóvenes.

La cuantificación del pico hipodiploide, reveló que a bajas dosis de CsA (hasta 1  $\mu\text{M}$ ), se producía un descenso del porcentaje de células con dotación <2C, tanto en hepatocitos de ratas jóvenes como adultas, pero con la diferencia de que el descenso sólo fue significativo en estos últimos (de  $7,4 \pm 0,8$  a  $0,9 \pm 0,1$ ). A partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , se verificó un aumento de la proporción de células <2C en ambas edades, llegando a un  $4,3 \pm 0,5$  y a un  $6,5 \pm 0,5$ , a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , en

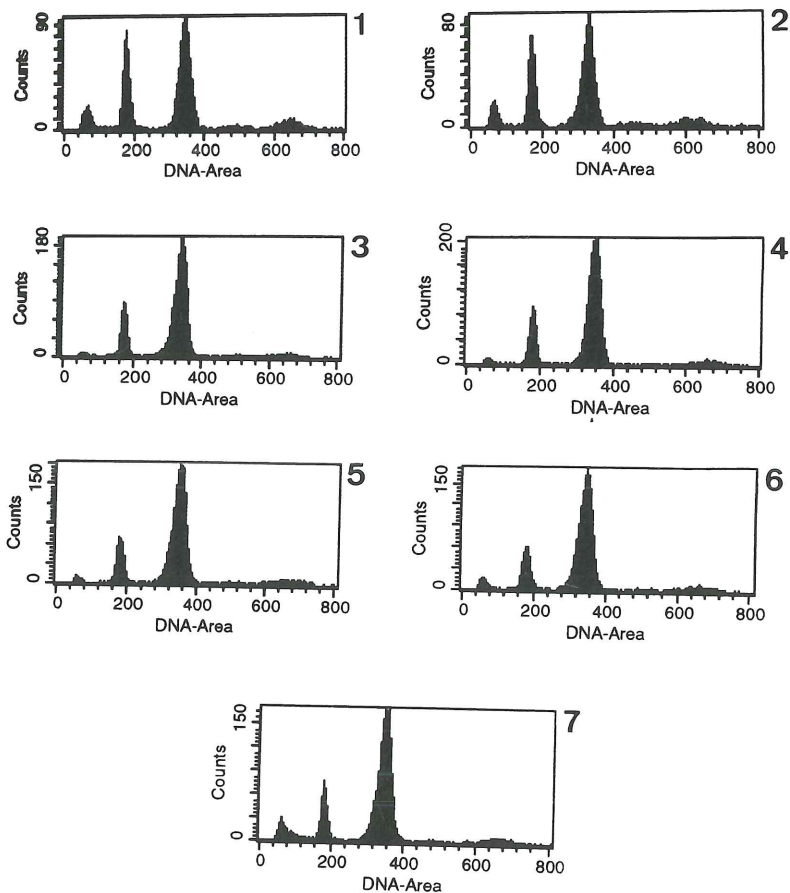


FIGURA 15. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo en hepatocitos de rata de 6 meses. Las células tratadas con CsA se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 0,5, (3) 1, (4) 5, (5) 10, (6) 25 y (7) 50  $\mu\text{M}$  de CsA.

hepatocitos de rata de 2 y 6 meses respectivamente. Hay que destacar, que aunque el incremento de células  $<2C$  desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$  fue mayor en hepatocitos de ratas de 6 meses (de  $0,9 \pm 0,1$  a  $6,5 \pm 0,5$ ) que en los de rata de 2 meses (de  $0,7 \pm 0,1$  a  $4,3 \pm 0,5$ ), en estos últimos, el valor de  $4,3 \pm 0,5$  fue muy superior al valor del control ( $1,2 \pm 0,2$ ), hecho que no ocurre en hepatocitos de ratas adultas ( $6,5 \pm 0,5$  a 50  $\mu\text{M}$  frente a  $7,4 \pm 0,8$  del control).

Atendiendo a los valores de células comprometidas en fase de síntesis  $S_1$ , no se produjeron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las dos edades, ni tampoco respecto a la edad. Sin embargo, en la fase  $S_2$ , en los cultivos de hepatocitos de rata de 6 meses, se observó un significativo descenso respecto al control a partir de la concentración 1  $\mu\text{M}$ . Además, en esta fase  $S_2$ , aparecieron diferencias significativas respecto a la edad en los controles y en los cultivos tratados con 0,5  $\mu\text{M}$  de CsA.



A

CsA ( $\mu$ M)	2 meses					
	< 2C	2C	S <sub>1</sub>	4C	S <sub>2</sub>	8C
0	1,2 ± 0,2	48,0 ± 5,1	2,6 ± 0,2	46,2 ± 3,8	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,09
0,5	0,9 ± 0,1	48,7 ± 4,7	2,6 ± 0,4	46,0 ± 5,0	1,3 ± 0,2	0,5 ± 0,06
1	0,7 ± 0,1	46,8 ± 4,8	2,3 ± 0,3	48,3 ± 5,8	1,4 ± 0,3	0,5 ± 0,08
5	1,0 ± 0,2	46,0 ± 5,7	2,1 ± 0,2	49,1 ± 3,3	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,05
10	1,1 ± 0,2	45,9 ± 5,8	2,5 ± 0,3	49,0 ± 4,2	1,0 ± 0,3	0,7 ± 0,11
25	2,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	43,7 ± 3,7	2,6 ± 0,4	49,0 ± 4,3	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,07
50	4,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	41,5 ± 5,9	2,3 ± 0,5	50,0 ± 3,9	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,13

B

CsA ( $\mu$ M)	6 meses					
	< 2C	2C	S <sub>1</sub>	4C	S <sub>2</sub>	8C
0	7,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	21,7 ± 2,6 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,2	58,7 ± 4,6 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
0,5	6,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	22,5 ± 1,9 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,2	59,7 ± 6,0 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>b</sup>
1	0,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,4 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,3	74,5 ± 7,8 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>b</sup>
5	1,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,2	76,7 ± 6,4 <sup>ab</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
10	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,2 ± 1,6 <sup>ab</sup>	1,8 ± 0,2	78,1 ± 6,5 <sup>ab</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
25	3,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,6 ± 1,5 <sup>ab</sup>	1,7 ± 0,3	76,5 ± 6,7 <sup>ab</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
50	6,5 ± 0,5	8,2 ± 1,0 <sup>ab</sup>	2,0 ± 0,1	77,0 ± 6,7 <sup>ab</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>b</sup>

TABLA 4. Porcentaje de distribución del DNA analizado por citometría de flujo. (A) Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 14 (B) Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 15. Los resultados son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

La fracción de células con dotación 8C, no sufrió variaciones significativas respecto al control en los cultivos de hepatocitos de rata de 2 ni de 6 meses, aunque en estos últimos se observó un ligero descenso. En todas las concentraciones, el porcentaje de células 8C fue significativamente mayor en cultivos de ratas adultas frente a ratas jóvenes.

CsA ( $\mu$ M)	2 meses		6 meses	
	% 2C PCNA (-)	% apoptóticas PCNA (+)	% 2C PCNA (-)	% apoptóticas PCNA (+)
0	11,4 ± 1,1	0,28 ± 0,04	17,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,12 <sup>b</sup>
0,5	8,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03	17,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,08 <sup>b</sup>
1	6,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,07	6,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,05 <sup>ab</sup>
5	5,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,09
10	5,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,14
25	3,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,18 <sup>a</sup>
50	3,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,87 ± 0,51 <sup>ab</sup>

TABLA 5. Porcentaje de células analizadas por citometría de flujo con el kit Kinesis-PCNA en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia y son media de dos placas tomadas de tres experimentos representativos.  $p < 0,005$  (<sup>a</sup> diferencias significativas versus control; <sup>b</sup> diferencias significativas versus 2 meses).

### 3.4.2. Niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Los cambios observados en la ploidía y distribución del DNA nos llevaron a considerar que la CsA en cultivo primario de hepatocitos, inducía un descenso en la proporción de células con dotación diploide (2C) unido a un aumento paralelo de la fracción de células tetraploides (4C). Este perfil descrito, aparece en algunos procesos de proliferación, pero acompañado además de un aumento de la proporción de células en fases de síntesis. En nuestro caso, utilizando el método de tinción de DNA con yoduro de propidio, no se pudo detectar con claridad que la CsA provocara un aumento significativo de la fracción de hepatocitos en fase S<sub>1</sub>, por ello y para esclarecer el efecto de la CsA decidimos estudiar los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El PCNA, como su nombre indica, es específico de células proliferantes, aunque no puede considerarse como marcador de la fase de síntesis del DNA, ya que su degradación no es inmediata después de que la célula supere la fase S, pudiéndose detectar en fase G<sub>2</sub> y M (2), así como en fase G<sub>1</sub>, debido a que su expresión se produce al final de esta fase. A pesar de ello, el PCNA se considera en la actualidad uno de los mejores marcadores de proliferación celular (91).

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5 de Material y Métodos, se obtuvieron por citometría de flujo, los datos que aparecen en la Tabla 5. Según estos valores, se observa como la proporción de hepatocitos en estado quiescente, considerando ésta como células 2C PCNA negativas, disminuye significativamente en presencia de concentraciones bajas de CsA (0,5 y 1 µM) para quedar reducida a un 26% (de 11,4 ± 1,1 a un 3,0 ± 0,3 p<0,005) y a un 13% (de 17,9 ± 1,0 a un 2,2 ± 0,2 p<0,005) del valor inicial en ratas jóvenes y adultas respectivamente. En los controles y en presencia de CsA 0,5 µM aparecieron diferencias significativas dependientes de la edad, siendo mayor el porcentaje de células quiescentes en cultivos procedentes de rata de 6 meses que en los de 2 meses.

Respecto a la fracción de células apoptóticas PCNA positivas, se aprecia un significativo aumento de la misma en presencia de CsA. En hepatocitos de animal joven el ascenso de células apoptóticas PCNA positivas se registro a partir de concentraciones de CsA 5 µM, mientras que en los de animal adulto este ascenso se produjo en presencia de concentraciones más elevadas de CsA (25 y 50 µM). Al comparar estos resultados con los referentes a la hipodiploidía obtenido por citometría de flujo, se observa que a bajas concentraciones de CsA, el porcentaje de células apoptóticas PCNA positivas respecto al total de células hipodiploides es inferior que a elevadas concentraciones donde las células <2C PCNA positivas representan la mayoría de las apoptóticas:

	2 meses	6 meses
Control	23%	13%
50 µM	65%	74%

## 4. DISCUSION

En el campo clínico de los trasplantes la ciclosporina A se ha confirmado como el principal fármaco de elección para evitar rechazos debido a su potente acción inmunosupresora (60,111). No obstante, su uso clínico implica ciertas complicaciones como hipertensión, neuro, nefro y hepatotoxicidad (36,97). En el caso concreto de esta última, estudios previos han demostrado la participación de especies reactivas de oxígeno en su citotoxicidad (132,133), especies que por otra parte se incrementan progresivamente con la edad (103). Por ello, que el estudio de la toxicidad de la ciclosporina en cultivos primarios de hepatocitos frente a la edad (desarrollo y senescencia), sea de gran importancia farmacológica, ya que los pacientes potencialmente objeto de su uso se incluyen dentro de un intervalo de edad muy amplio.

### 4.1. Modificaciones en la citotoxicidad de la ciclosporina A *in vitro* debidas a la edad

En el presente trabajo, se ha investigado el efecto del desarrollo sobre la hepatotoxicidad de la ciclosporina A (CsA) utilizando un modelo *in vitro* de cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas de 2 y 6 meses de edad.

En primer lugar, con el fin de evaluar las modificaciones dependientes de la edad en el efecto tóxico de la ciclosporina A, se procedió a medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo, método por el que podemos registrar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y que, como se indicó en la introducción, es la principal característica que permite evaluar *in vitro* la muerte celular por necrosis. En los resultados obtenidos pudimos comprobar que la ciclosporina A ocasiona un daño letal en los hepatocitos en cultivo procedentes de ratas de ambas edades y que la toxicidad es dependiente de la edad, de la concentración de la droga y de la duración del tratamiento. El desarrollo de la muerte celular, evaluado por la liberación de LDH al medio, fue más temprano y más intenso en los cultivos de hepatocitos de ratas adultas. A las 18 horas de incubación tan sólo se encontraron diferencias significativas en los procedentes de animales adultos.

Para poder establecer comparaciones en la citotoxicidad del fármaco, se fijó en 24 horas el tiempo de incubación que fue en el que se detectaron variaciones significativas en hepatocitos de ambas edades. Al comparar los resultados de liberación de LDH entre ratas adultas y jóvenes, se observó que los valores fueron superiores, de una manera significativa, en el rango de concentraciones de CsA de 1-50  $\mu\text{M}$  en las ratas de 6 meses frente a las de 2 meses. Estos resultados se corroboraron con las observaciones morfológicas, donde a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de CsA la pérdida de integridad celular fue más acusada en los cultivos celulares procedentes de animales adultos.

### 4.2. Variaciones durante el desarrollo en la situación de estrés oxidativo inducida por ciclosporina A en cultivos de hepatocitos de rata

Estudios previos han demostrado, en diferentes órganos y sistemas celulares, que la CsA induce la generación de especies reactivas de oxígeno (131,132,88), así como

un proceso de peroxidación lipídica (52) acompañado de una disminución de tioles proteicos y de los niveles de glutatión reducido (132), todas ellas manifestaciones que conducen a una situación de estrés oxidativo (133). Por otra parte, estudios previos de nuestro grupo sobre hepatotoxicidad y senescencia (102), han demostrado la existencia de cambios a nivel de los sistemas de defensa antioxidante, en función de la edad, hecho que puede incrementar la toxicidad de aquellos xenobióticos cuyo mecanismo sea la generación de especies reactivas de oxígeno. La generación espontánea de estas especies en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (98) y su incompleta eliminación, pueden provocar su acumulación con el paso del tiempo (47), con el consiguiente incremento en el estado de oxidación celular (102). Es conocido también, que durante el metabolismo microsómico de la CsA, mediado por el citocromo P 450 3A (95), se generan especies reactivas de oxígeno. Esto unido al conocimiento de que la edad afecta a los sistemas microsómicos monooxigenasa de función mixta que dependen del citocromo P 450 (99), hace interesante el estudio conjunto de la lesión hepática inducida por hepatotóxicos y la edad en un doble aspecto: desarrollo y senescencia. En la presente memoria los resultados obtenidos en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses nos muestran las variaciones debidas al desarrollo, ya que aunque a los dos meses las ratas han adquirido su capacidad reproductora, el estado adulto no se alcanza hasta los 6 meses (102).

Por todo ello, y una vez establecido el potencial citotóxico de la CsA en cultivo primario de hepatocitos en ambas edades y que la edad adulta influyó en dicha toxicidad mostrándola anticipada y de mayor intensidad, el siguiente paso era estudiar las variaciones durante el desarrollo en la situación de estrés oxidativo inducida por el fármaco.

Para ello, y mediante el análisis por citometría de flujo, determinamos los niveles relativos de especies reactivas de oxígeno en células hepáticas utilizando los compuestos 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA) e hidroetidina (HET), que nos permiten diferenciar entre niveles de peróxidos y niveles de radical superóxido. El compuesto de DCFH-DA es apolar y atraviesa las membranas para hidrolizarse en el interior celular y dar la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH) cuya oxidación mediada por peróxidos lo convierte en 2',7'-diclorodihidrofluorescina que fluoresce en verde y es específica para la detección de peróxidos (37). Por otra parte, la HET también difunde a través de las membranas, y en el interior celular se oxida específicamente por el radical superóxido originando etidio, compuesto que se intercala en el DNA donde emite fluorescencia roja (100).

Así comprobamos que el tratamiento de las células con CsA durante 24 horas de incubación, provoca un aumento de los niveles de peróxidos de forma paralela al aumento de la concentración de CsA hasta 10  $\mu\text{M}$  en ratas de 6 meses y hasta 1  $\mu\text{M}$  en ratas de 2 meses, para posteriormente disminuir a partir de dichas concentraciones. En ratas de 6 meses este hecho coincide con el aumento de la emisión de yoduro de propidio a las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$ , indicativo de una mayor proporción de células muertas las cuales no poseen capacidad de emisión de diclorofluorescina. En hepatocitos de rata de 2 meses, el descenso en los niveles de peróxidos es menos marcado ya que la proporción de células que emiten fluorescencia roja (células muertas) es mucho menor que en 6 meses. Sin embargo, en esta edad, el inicio del descenso de los niveles de peróxidos se produce a concentraciones inferiores (a partir de 5  $\mu\text{M}$ ) donde todavía la muerte celular es baja, por lo que debe existir alguna otra causa que

provoque la reducción de los niveles de peróxidos, además del aumento de la muerte celular, como puede ser la eliminación de  $H_2O_2$  por la catalasa, enzima antioxidante endógeno. Por otra parte, en ambas edades, existe una proporción de células cuyos niveles de peróxidos van aumentando paralelamente con el aumento de la concentración de CsA. Estas células posiblemente al no expresar de forma eficiente sus sistemas enzimáticos de defensa, principalmente la catalasa, están destinadas a la muerte celular por necrosis.

A diferencia de lo que ocurre con los peróxidos, los niveles de radical superóxido, van disminuyendo paulatinamente al aumentar la concentración de CsA. Esta disminución puede explicarse, bien por una eficiente eliminación del radical superóxido por acción de las superóxido dismutasas (Mn-SOD y CuZn-SOD) o por el aumento de la muerte celular a elevadas dosis del fármaco.

Los datos obtenidos referentes a los niveles de especies reactivas de oxígeno, parecen estar relacionados con la secuencia de pasos que conducen a la muerte celular, sugiriéndose que el aumento de especies reactivas de oxígeno, ha de preceder a la aparición de la toxicidad y muerte celular.

Una producción incrementada de especies reactivas de oxígeno, o una capacidad disminuida de los sistemas de defensa que las eliminan, da como resultado la situación de estrés oxidativo. Además estas especies reactivas pueden actuar en la cascada de reacciones implicadas en la transducción de señales y representar un mecanismo de control de la expresión génica. Se ha demostrado que la activación y unión al DNA de varios factores de transcripción (NF- $\kappa$ B por ejemplo) depende del estado redox celular (108).

Los principales sistemas enzimáticos implicados en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno son las superóxido dismutasas (CuZn-SOD y Mn-SOD) y la catalasa. Por tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno ha de traer consigo una respuesta en los sistemas antioxidantes endógenos para evitar la agresión oxidativa, ya que uno de los sistemas más importantes en la defensa celular frente a la toxicidad del oxígeno, lo constituye la acción concertada de estos dos enzimas. Basados en este hecho, evaluamos los efectos del tratamiento con CsA en la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo.

Los niveles de mRNA de la Mn-SOD (mitocondrial), la CuZn-SOD (citoplasmática) y la catalasa evaluados en hepatocitos de rata de 2 y 6 meses incubados con CsA durante 24 horas, mostraron un progresivo aumento dependiente de la concentración del fármaco. Los niveles de los mensajeros de estas enzimas fueron siempre mayores en rata adulta. Sin embargo, parece ser que la capacidad de la respuesta frente al estrés oxidativo es mayor en las ratas jóvenes, ya que la magnitud de los incrementos en los niveles de los mRNA de los tres enzimas fue siempre superior en hepatocitos de rata joven frente adulta. Esto podría ser debido a que los niveles de mRNA en hepatocitos control de rata de 6 meses, son más elevados que en los de ratas jóvenes, lo que puede dificultar que el incremento sea más marcado.

Los incrementos más acusados en los niveles del mRNA, y que ocurren a concentraciones más bajas de CsA, corresponden a la Mn-SOD, enzima que se localiza en mitocondria. Es sabido que la CsA perturba la función mitocondrial actuando directa-

mente sober este orgánulo (43) provocando la acumulación de calcio que originará finalmente la alteración de la cadena de transporte electrónico con la consiguiente generación de especies reactivas de oxígeno (55). Este hecho podría explicar la más temprana y acusada inducción de la Mn-SOD (mitocondrial) con el objeto de eliminar el radical superóxido generado a este nivel subcelular.

La inducción de la expresión de la Mn-SOD junto con la de la CuZn-SOD, sería la responsable de la disminución de los niveles de radical superóxido desde concentraciones bajas de CsA en ambas edades.

Por otra parte, tanto en hepatocitos de rata joven como adulta, la inducción de la expresión de la catalasa fue menor, lo que facilitaría la acumulación de  $H_2O_2$  a concentraciones bajas y medias del fármaco. A dosis elevadas de CsA tiene lugar una mayor inducción, pero alcanzando tan sólo valores de un 160% y un 130% frente a los controles en 2 y 6 meses respectivamente. Este hecho unido a la elevada muerte celular a estas concentraciones, ocasionarían la disminución de la emisión de diclorofluoresceína indicativo de que los niveles de peróxidos son menores.

De manera que, la correcta eficiencia de los sistemas encargados de eliminar el radical superóxido (generando a su vez  $H_2O_2$ ), junto con la insuficiente eficacia en la eliminación del  $H_2O_2$  por parte de la catalasa, provocaría la acumulación de esta especie reactiva de oxígeno la cual sería previa a la muerte celular por necrosis. La importancia del equilibrio entre la catalasa y la SOD, ha sido probada por otros investigadores en células epiteliales transformadas de ratón, donde un ligero incremento en la actividad de la SOD provoca la formación de cantidades masivas de peróxido de hidrógeno (4).

#### **4.3. Influencia de la ciclosporina A y de la edad en la distribución del DNA en hepatocitos en cultivo primario.**

Durante los años en los que se ha utilizado en clínica la CsA, se ha observado un aumento del desarrollo de diversos tipos de cánceres en pacientes tratados con este fármaco (92). Además, es frecuente que los trasplantes de hígado realizados a pacientes que han sufrido previamente un tumor primario hepático y han sido tratados con CsA fracasen debido a la elevada proporción de recurrencia de dichos tumores (117). Durante los últimos años, se ha investigado sobre los posibles papeles de la CsA en la modulación del crecimiento de tumores celulares utilizando diversos modelos de carcinogénesis experimental (140,48). Concretamente en el modelo de carcinogénesis hepática, se ha observado que la administración oral de CsA aumenta significativamente la aparición de lesiones preneoplásicas inducidas por agentes químicos carcinogénicos en hígado de rata (134). Aunque se desconocen aún los mecanismos precisos por los que la CsA facilita el desarrollo de estas lesiones preneoplásicas, la estimulación en la proliferación de células parenquimales hepáticas inducida por la CsA podría ser un factor importante (78). Varios investigadores han propuesto que la CsA facilita la respuesta regenerativa de hepatocitos en ratas y ratones tras una hepatectomía parcial (141,32), así como que estimula *in vivo* la proliferación de hepatocitos quiescentes en ratas no sujetas a la hepatectomía (78,66). Sin embargo, los estudios *in vitro* realizados con el objeto de establecer las causas de este efecto citoproliferativo, han reportado resultados contradictorios a los obtenidos *in vivo*, adjudicando un papel citostático en

diversos sistemas celulares (50,59). Concretamente en cultivos de hepatocitos se ha observado un modelo bifásico de efectos en función de la concentración de la CsA, siendo citostático a concentraciones superiores a  $1\mu\text{M}$ , pero citoproliferativo a concentraciones menores (134).

Por nuestra parte, decidimos realizar un estudio de la influencia de la CsA y la edad en la progresión de los hepatocitos a lo largo del ciclo celular y en la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), utilizando para ello la técnica de citometría de flujo que permite cuantificar el contenido en DNA de las células a la vez que nos informa de la proporción de éstas que han expresado el PCNA. De los resultados obtenidos se observa, en cultivos de células control, como la edad modifica el perfil de distribución de las células en función del contenido en DNA, tendiendo en hepatocitos de ratas de mayor edad hacia un estado de poliploidización, datos que concuerdan con los obtenidos por otros investigadores (38). Además, según los datos obtenidos de la cuantificación de la expresión del PCNA en células control, con la edad existe una tendencia hacia un estado más diferenciado (quiescencia).

La incubación de los cultivos con CsA durante 24 horas provocó, en los hepatocitos de ambas edades, una tendencia hacia la acumulación de las células en la fase  $G_2/M$  (tetraploide) a la vez que indujo la disminución de la población de células comprometidas en fase  $G_0/G_1$  (diploide). Estos cambios en el perfil de distribución del DNA fueron más acusados cuanto mayor fue la dosis de CsA utilizada. También se apreció que el porcentaje de células en fase de síntesis  $S_2$  sufrió una disminución en ambas edades al aumentar la concentración de CsA. Además, en hepatocitos de rata de 6 meses, se verificó un ligero descenso de la población octoploide (8C). Todos estos hechos parecen indicar que la CsA induce en los hepatocitos el abandono de la fase  $G_0/G_1$  a la vez que provoca la acumulación de las células en  $G_2/M$  (136), posiblemente por inhibición de la transición  $G_2 \rightarrow M$  o por alteración de alguna de las fases de la mitosis.

Los resultados obtenidos de la evaluación cuantitativa de la expresión del PCNA mostraron que la CsA induce, de manera dependiente de la dosis, una disminución de la población de células diploides quiescentes, consideradas como células 2C PCNA negativas. Este hecho junto con la detención de las células en la fase  $G_2/M$ , serían los responsables de la disminución de la población 2C y el aumento de la 4C. Curiosamente, los hepatocitos de rata de 6 meses, que en los controles presentan un estado de mayor quiescencia, son los que experimentan una mayor inducción a abandonar la fase  $G_0$ .

De los resultados citométricos también se desprende la existencia de un porcentaje considerable de células apoptóticas en el control de hepatocitos de rata de 6 meses, siendo mucho menor en los de 2 meses, lo que posiblemente refleja una mayor sensibilidad de los hepatocitos de rata adulta a las condiciones del cultivo el cual puede carecer de las citoquinas y factores de crecimiento necesarios. Además, existen estudios que demuestran que los hepatocitos en cultivo sufren un proceso de ruptura del DNA muy lento, pero que se incrementa con la duración del cultivo (16). La cuantificación del pico hipodiploide en los cultivos de hepatocitos tratados con CsA, reveló que esta droga a dosis bajas parece tener un efecto inhibitorio de la apoptosis, mientras que a concentraciones elevadas (25 y  $50\mu\text{M}$ ) tiene un efecto opuesto facilitando la muerte celular programada, la cual debe coexistir con la necrosis según los datos obtenidos por la liberación de LDH al medio de cultivo.

Otro hecho que nos ha revelado la evaluación de la expresión del PCNA, es que la relación entre el porcentaje de células apoptóticas PCNA positivas y el porcentaje de células apoptóticas totales, aumenta paralelamente a la concentración de CsA. Este dato podría indicar que parte de las células que abandonan el estado quiescente para entrar y proceder a lo largo del ciclo celular, no finalizan dicho ciclo y lo abandonan para morir por apoptosis.

En resumen, los resultados de este trabajo, ponen de manifiesto la influencia del desarrollo sobre los efectos hepatotóxicos de la CsA a niveles tales como la producción de especies reactivas de oxígeno, la expresión génica de sistemas antioxidantes, la ploidía y distribución del DNA y la muerte celular. Estos resultados abren camino para investigar la influencia de la senescencia sobre la toxicidad de este fármaco ya que el envejecimiento se caracteriza por la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno. La modulación de la toxicidad de la CsA mediante el empleo de antioxidantes es otro de los objetivos que se plantea en investigaciones futuras.

## 5. CONCLUSIONES

1. La citotoxicidad de la ciclosporina A, evaluada por la liberación de lactato deshidrogenasa al medio, es dependiente de la concentración del fármaco, del tiempo de incubación (3, 18, 24 horas) y de la edad, mostrándose más intensa, más temprana y a concentraciones más bajas en hepatocitos de rata adulta.

2. Como resultado de la exposición de las células a diferentes concentraciones de ciclosporina A durante 24 horas de incubación, se generan especies reactivas de oxígeno. En el caso del peróxido de hidrógeno los niveles alcanzan su máximo a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  en hepatocitos de rata joven y de 10 mM en hepatocitos de rata adulta, mientras que los niveles del radical superóxido muestran una disminución similar en ambas edades.

3. La inducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos Mn-SOD, CuZn-SOD y catalasa es más acusada en hepatocitos de rata joven confiriéndoles una mayor capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo. Sin embargo, la diferencia que existe en el grado de inducción entre las SOD y la catalasa origina, en ambas edades, la acumulación de peróxido de hidrógeno debido a una pérdida de coordinación entre ambos sistemas.

4. La acumulación de especies reactivas de oxígeno precede a la inducción de la expresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes, y a la aparición de la toxicidad.

5. El tratamiento de los hepatocitos con ciclosporina A durante 24 horas, induce el abandono del estado quiescente (evaluado por la expresión del PCNA), a la vez que provoca la acumulación de las células en la fase  $G_2/M$ , siendo estos hechos más acusados en hepatocitos de rata adulta.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Actis GC, Debernardi-Venon W, Lagget M, Marzano A, Ottobreilli A, Ponzetto A, Rocca G, Boggio-Bertinet D, Balzola F, Bonino F y Verme G. Hepatotoxicity of intravenous cyclosporine A in patients with acute ulcerative colitis on total parenteral nutrition. *Liver* **15**, 320-323 (1995).
2. Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Dalla-Palma P y Barbareschi M. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch (A)* **419**, 417-423 (1991).
3. Alleva R, Tomassetti M, Battino M, Curatola G, Littarru GP y Folkers K. The roles of coenzyme Q<sub>10</sub> and vitamin E on the peroxidation in human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9388-9391 (1995).
4. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I y Cerutti P. The balance between Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* **30**, 9305-9313 (1991).
5. Arias IM. Cyclosporin, the biology of the bile canaliculus, and cholestasis. *Gastroenterology* **104**, 1558-1560 (1993).
6. Azer SA y Stacey NH. Differential effects of cyclosporin A on the transport of bile acids by human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **46**, 813-819 (1993).
7. Barja G. Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad de crecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **31**, 153-161 (1996).
8. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC y Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**, 1910-1917 (1983).
9. Bennett WM y Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med* **37**, 215-224 (1986).
10. Bensasson R, Land EJ y Maudinas B. Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. *Photochem Photobiol* **23**, 189-193 (1976).
11. Bergmeyer HU, Gawehn K y Grassl M. En: *Methoden der Enzymatischen Analyse* (ed HU Bergmeyer), pp 512-513, Verlag Chemie, Weinheim (1974).
12. Böhme M, Jedlitschky G, Leier I, Büchler M y Keppler D. ATP-dependent export pumps and their inhibition by cyclosporins. En: *Advances in Enzyme Regulation* (G. Weber, ed.) **Vol 34**, pp 371-380. Pergamon Press, Tarrytown (1994).
13. Bohr VA y Anson RM. Mutation Research DNAGing genetic instability and aging. *Mutat Res* **338**, 25-34 (1995).
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
15. Burton GW e Ingold KV.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**, 569-573 (1984).
16. Cain K, Salmaan H, Hussain I, Covet C, Quin H y Oberhammer F. A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time depended increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF- $\beta$ 1 treatment. *Cytometry* **23**, 312-321 (1996).

17. Cardoso M, Leonhardt H y Nadal-Ginnard B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication. *Cell* **74**, 979-992 (1993).
18. Chanussot F, Botta-Fridlung D, Porte PL, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Hauton J, Gauthier A y Lafont H. Effects of cyclosporine and corticosteroids on bile secretion in the rat. *Transplantation* **54**, 226-231 (1992).
19. Chomzynski K y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159 (1987).
20. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* **14**, 126-130 (1993).
21. Cotgreave IA, Modeus P y Orrenius S. Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **28**, 189-212 (1988).
22. Crissman HA, Stevenson AP, Kissane RJ y Tobey RA. Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometric analysis. En: *Flow Cytometric and Sorting*. (eds MR Melamed, PF Mullaney, ML Mendelsohn). pp 243-261. John Wiley and Sons, New York (1979).
23. Dallas CE y Evans DL. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* **345**, 557-558 (1990).
24. Davies KJA, Sevanian A, Muakassah-Kelly SP y Hochstein PA. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem J* **235**, 747-754 (1986).
25. De la Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J y Viña J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* **10**, 333-338 (1996).
26. Del Rio LA, Sandalio L, Palma J, Bueno P y Corpas PJ. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biol Med* **13**, 557-580 (1992).
27. Di Mascio P, Murphy Me y Sies H. Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* **53**, S194-S200 (1991).
28. Elstner EF. Oxygen radicals - biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* **69**, 949-956 (1991).
29. Evans HM y Bishop KS. On the existence of hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**, 650-651 (1922).
30. Evans MJ, Shami SG y Wells JR. Quantitative techniques for morphological evaluation. En: *Handbook Toxicol Pathol* (eds MH Wanda y CG Rousseaux). pp 37-48. Academic Press, Inc (1991).
31. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* **65**, 899-910 (1894).
32. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng Q, Parter K y Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK506 compared with cyclosporine. *Lancet* **ii**, 1007-1011 (1989).
33. Freeman DJ. Pharmacology and pharmacokinetics of cyclosporine. *Clin Biochem* **24**, 9-14 (1991).
34. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880 (1978).
35. Fridovich I. Superoxide dismutases. *J Biol Chem* **264**, 7761-7764 (1989).
36. Galán AI, Fernández E, Morán D, Muñoz ME y Jiménez R. Cyclosporine A hepatotoxicity: Effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22**, 260-265 (1995).
37. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC.

- Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcriptional nuclear factor- $\kappa$ B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* **48**, 825-834 (1995).
38. Gerlynk P, Abyholm A, Grotmos T, Erikstein B, Huitfieldt HS, Stokke T y Seglen PO. Binucleation and polyploidization pattern in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Proliferation*. **26**, 557-565 (1993).
  39. Granelli-Piperno G. Lymphokine gene expression *in vivo* is inhibited by cyclosporine A. *J Exp Med* **171**, 533-544 (1990).
  40. Grevel J, Kutz K, Abish E y Nueesch E. Evidence for zero order absorption of cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* **22**, 220P (1986).
  41. Haanen C y Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflammation* **4**, 5-15 (1995).
  42. Haber F y Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc London Serie A* **147**, 332-351 (1934).
  43. Halestrap AP y Davidson AM. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondria-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* **268**, 153-160 (1990).
  44. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Commun* **9**, 1-32 (1990).
  45. Halliwell B y Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514 (1986).
  46. Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Oxford University Press, New York (1991).
  47. Harmon D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* **257**, 257-266 (1992).
  48. Hattari A, Kunz HW, Gill TJ, Pan SF y Shinozuka H. Diversity of the promoting action of cyclosporine on the induction of lymphoid tumors. *Carcinogenesis* **9**, 1091-1094 (1988).
  49. Hunt JV, Bottoms MA y Mitchinson MJ. Ascorbic acid oxidation: a potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus. *FEBS Lett* **311**, 161-164 (1992).
  50. Ikeda H y Fujiwara K. Cyclosporin A and FK-506 in inhibition of rat Ito cell activation *in vitro*. *Hepatology* **21**, 1161-1166 (1995).
  51. Imlay JA y Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309 (1988).
  52. Inselmann G, Hannemann J y Baumann K. Cyclosporine A induced lipid peroxidation and influence on glucose-6-phosphatase in rat hepatic and renal microsomes. *Res Commun Chem Pathol Pharm* **68**, 189-203 (1990).
  53. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83-86 (1996).
  54. Jones DP. The role of oxygen concentration in oxidative stress: Hypoxic and hyperoxic models. En: *Oxidative Stress* (ed H Sies). pp 273-309 Academic Press, New York-London (1985).
  55. Jung K y Pergande M. Influence of cyclosporine A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett* **183**, 167-169 (1985).
  56. Jung K, Reinholdt C y Scholz P. Inhibited efficiency of kidney mitochondria isolated from rats treated with cyclosporine A. *Nephron* **45**, 43-45 (1987).

57. Kahan BD, Mickey R, Flechner SM, Lorber MI, Wideman CA, Kerman RH, Tersaki P y Van Buren CT. Multivariate analysis of risk factors impacting on immediate and eventual cadaver allograft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* **43**, 65-70 (1987).
58. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* **321**, 1725-1738 (1989).
59. Karashima T, Hachisuka H y Sasai Y. FK506 and cyclosporine A inhibit growth factor-stimulated human keratinocyte proliferation by blocking cells in the G0/G1 phases of the cell cycle. *J Dermatol Sci* **12**, 246-254 (1996).
60. Kasaian MT y Biron CA. Cyclosporine A inhibition of interleukin 2 gene expression, but not natural killer cell proliferation, after induction *in vivo*. *J Exp Med* **171**, 299-306 (1990).
61. Ke H, Zydowsky LD, Liu J y Walsh CT. Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9483-9487 (1991).
62. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* **23**, 21-48 (1993).
63. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-640 (1997).
64. Kelner MJ y Bagnell R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. *J Biol Chem* **265**, 10872-10875 (1990).
65. Kim PCW, Cohen Z, Wong PY, Craig M, Cullen J y Levy GA. Cyclosporine A vs cyclosporine A metabolites: comparison of *in vivo* and *in vitro* immunosuppressive and toxic effects. *Transplant Proc* **22**, 2487-2490 (1990).
66. Kim YI, Kobayashi M, Egashira T, Kawano K, Morimoto A, Kai T y Shimada T. Augmentation of hepatocyte proliferation by immunosuppressant pretherapy is associated with up-regulation of malondialdehyde production. *Res Exp Med* **193**, 337-345 (1993).
67. Krebs HA, Cornell NE, Lund P y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism*. (eds F Lundsquist y N Tygstrup). pp 726-750, Copenhagen, Munksgaard (1974).
68. Kronbach T, Fisher V y Meyuer UA. Cyclosporin metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporin-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporin with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* **43**, 630-635 (1988).
69. Lemaire M y Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the *in vitro* binding and distribution of cyclosporine A in the blood. *J Pharm Pharmacol* **34**, 715-718 (1982).
70. Lennon SV, Martin SJ y Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation* **24**, 203-214 (1991).
71. Lezza AMS, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P y Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 772-779 (1994).
72. Li R, Wage S, Hannon CJ, Beach D y Stillmann B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* **371**, 534-537 (1994).
73. Linden MD, Torres FX, Kubus J y Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *J Clin Pathol* **97**, Suple. 1, S4-S13 (1992).

75. Liu J y Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev* **71**, 23-30 (1993).
76. Majno G y Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
77. Maloney AG, Schmucker DL, Vessey DS y Wang RK. The effects of aging on the hepatic microsomal mixed-function oxidase system of male and female monkeys. *Hepatology* **6**, 282-287 (1986).
78. Masuhara M, Ogasawara H, Katyal SL, Nakamura T y Shinozuka H. Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats. *Carcinogenesis* **14**, 1579-1584 (1993).
79. Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. En: *Cell death, methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **V01 46**, pp187-216, Academic Press (1995).
80. Maurer G, Loosli HR, Schreier E y Keller B. Disposition of cyclosporine in several animal species and man: I. Structural elucidation of its metabolites. *Drug Metab Dispos* **12**, 120-126 (1983).
81. McCord JM y Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055 (1969).
82. Nickell SP, Scheibel LW y Cole GA. Inhibition by cyclosporine A of rodent malaria *in vivo* and human malaria *in vitro*. *Infect Immun* **37**, 1093-1100 (1982).
83. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* **54**, 1119S-1124S (1991).
84. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E y Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* **53**, 201S-205S (1991).
85. Northrop JP, Ullman KS y Crabtree GR. Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. *J Biol Chem* **268**, 2917-2923 (1993).
86. Norwood TH y Gray M. The role of DNA damage in cellular aging: is it time for a reassessment? *Exp Gerontol* **31**, 61-68 (1996).
87. Nurse P. Universal control mechanism regulating on set of M-phase. *Nature* **344**, 503-508 (1990).
88. Obregón L, Duque I, Rodriguez-Puyol D, Lamas S, López-Nova JM y Hernando L. Role of reactive oxygen species (ROS) on cyclosporin A nephrotoxicity. Studies on isolated rat glomeruli. *Eur J Clin Invest* **19**, parte 2, A 47 (1989).
89. Orrenius S. En: Free radicals: from basic science to medicine. Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds). Basel, Birkhäuser Verlag, pp 47-64 (1993).
90. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M y Barja G. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev* **86**, 53-66 (1996).
91. Pellicciari C, Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M y Wang E. Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* **21**, 329-327 (1995).
92. Penn I. Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation* **43**, 32-35 (1987).

93. Peter M y Herskowitz I. Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79**, 181-184 (1994).
94. Porter TD y Coon MJ. Cytocrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **266**, 13469-13472 (1991).
95. Prueksaritanont T, Correia MA, Rettie AE, Swinney DC, Thomas PE y Benet LZ. Cyclosporine metabolism by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **21**, 730-737 (1993).
96. Reid M, Gibbon S, Kwok D, Van Buren CT, Flechner S y Kahan BD. Cyclosporine levels in human tissues of patients treated for one week to one year. *Transplant Proc* **15**, 2434-2438 (1983).
97. Remuzzi G y Perico N. Cyclosporin-induced renal disfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int [Suppl]* **52**, S70-S74 (1995).
98. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J Biochem Cell Biol* **27**, 647-653 (1995).
99. Rikans LE. Influence of aging on chemically induced hepatotoxicity. Role of age-related changes in metabolism. *Drug Metab Rev* **20**, 87-110 (1989).
100. Rothe G y Valet G. Flow cytometry analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol* **47**, 440-448 (1990).
101. Sandberg AA. The chromosomes and the cell cycle. En: *Diagnostic Cytology*. eds LG Koss, JB Lippincott. 4ª ed. **Vol I**. pp 154-179. Company, Philadelphia (1992).
102. Sanz N, Díez-Fernández C y Cascales M. Variations of hepatic antioxidant systems and DNA ploidy in rats aged 2 to 8 months. *Biochim Biophys Acta* **1315**, 123-130 (1996).
103. Sanz N, Díez-Fernández C, Alvarez A y Cascales M. Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* **27**, 525-534 (1997).
104. Saran M y Bors W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin Wochenschr* **69**, 957-964 (1991).
105. Schlegel J, Meier P, Kass GEN y Richter C. Inhibition by cyclosporine A of the prooxidant-induced but not the sodium-induced calcium release from rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* **42**, 2193-2197 (1991).
106. Schmucker DL. Aging and drug disposition. En: *Review of biological research in aging*. (ed M Rothstein). **Vol II**. pp 465-501, Alan L Liss, New York (1985).
107. Schmucker DL y Wang RK. Effects of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug metabolizing system. *Mech Aging Dev* **15**, 189-202 (1981).
108. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandervoorde V, Haegeman G y Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effect of TNF. *EMBO J* **12**, 3095-3104 (1993).
109. Seglen PO. Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. En: *In vitro biological systems*. (ed CA Tyson y JM Frazier). **Vol I**. pp 231-244, Academic Press, London (1993).
110. Sherr CJ. G1 phase progression: Cyclin on cue. *Cell* **79**, 551-555 (1994).
111. Sigal NH y Dumont FJ. Immunosuppression. En: *Fundamental immunology*. (Paul WE, ed). Tercera edición. 903-915. New York: Raven Press (1993).
112. Simpson JF, Dutt L y Page DL. Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas. *Hum Pathol* **26**, 608-611 (1992).

113. Skett P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/ metabolism-based toxicity testing. Solutions? *Toxicology in Vitro* **8**, 491-504 (1994).
114. Slater LM, Sweet P, Stupecky M y Gupta S. Cyclosporine A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia *in vitro*. *J Clin Invest* **77**, 1405-1408 (1986).
115. Spearman ME y Leibman LS. Aging selectively alters glutathione-S-transferase isoenzyme concentration in liver and lung cytosol. *Drug Metab Dispos* **12**, 661-671 (1984).
116. Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* **54**, 1125S-1128S (1991).
117. Starzl TE, Demetris AJ y Van Thiel D. Liver transplantation. *N Engl J Med* **321**, 1014-1021 (1989).
118. Stein GH, Beeson M y Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science*. **249**, 666-668 (1990).
119. Storb R et al. Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporine compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Br J Haematol* **72**, 567-572 (1989).
120. Sutherland DER, Moudry KC y Fryd DS. Results of pancreas-transplant registry. *Diabetes* **38**, 46-54 (1989).
121. Takahashi N, Hayano T y Suzuki M. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475 (1989).
122. Tamura J, Tanaka J, Fujita KI, Yoshida M, Kasamatsu T, Arii S y Tobe T. Cell kinetics of regenerating liver after 70% hepatectomy in rats. 2-color flow cytometric analysis. *HPB Surg* **5**, 103-114 (1992).
123. Thieriault Y, Logan TM, Meadows R, Yu L, Holzman TF, Simmer RL y Fesik SW. Solution structure of the cyclosporine A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* **361**, 88-91 (1993).
124. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
125. Tuena De Gómez-Poyou M, Gavilanes M, Gómez-Poyou A y Ernster L. Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of proton-motive force and Ca<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta* **592**, 396-405 (1980).
126. Venkataramanan R, Burckart GJ y Ptachcinski RJ. Pharmacokinetics and monitoring of cyclosporine following orthotopic liver transplantation. *Semin Liver Dis* **5**, 357-368 (1985).
127. Vessey DA y Kelley M. Inhibition of bile acid conjugation by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* **1272**, 49-52 (1995).
128. Vielh P, Magdelénat H, Remvikos Y y Dutrillaux B. Analysis of DNA content. En: *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Flow Cytometric*. (ed P Vielh). pp 21-57. Igaku-Shoin, New York-Tokyo (1991).
129. Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327 (1983).
130. Wenger RM. Synthesis of cyclosporin and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog Allergy* **38**, 46-64 (1986).
131. Wolf A y Broadhurst M. Cyclosporin A (Sandimmun) induces the formation of free reactive oxygen species *in vitro* in rat liver and kidney microsomes. En: *Oxygen Radicals*, ed Yagi K, Kondo

- M, Niki E, Yoshikawa. pp 525-528, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1992).
132. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P y Cordier A. Role of glutathione in cyclosporine A *in vitro* hepatotoxicity. *Transplant Proc* **26**, 2912-2914 (1994).
  133. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P, Houy S, Trommer WE y Cordier A. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *Journal Pharmacol Exp Toxicol* **280**, 1328-1334 (1997).
  134. Yabu K, Watty VS y Shinozuka H. Cyclosporine enhances the growth of carcinogen-induced enzyme altered foci in rat liver. *Hepatology* **13**, 304-309 (1991).
  135. Yamamoto K, Takahashi M y Niki E. Role of iron and ascorbic acid in the oxidation of methyl linoleate micelles. *Chem Lett* 1149-1152 (1987).
  136. Yamamoto M, Baba H, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Maehara Y, Kuwano M y Sugimachi K. Cyclosporin A and FK506 reverse anthracycline resistance by altering the cell cycle. *Anticancer Drugs* **6**, 570-577 (1995).
  137. Yim MB, Chock PB y Stadtman ER. Copper-zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Nat Acad Sci USA* **87**, 5006-5010 (1990).
  138. Yim MB, Chock PB y Stadtman ER. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* **268**, 4099-4105 (1993).
  139. Yokoyama I, Hayashi S, Sato E, Kobayashi T, Negita M, Uchida K y Takagi H. Enhancement of tumor proliferation by cyclosporine A in early phase of experimental hepatic metastasis. *Jpn J Cancer Res* **85**, 704-709 (1994).
  140. Yokota K, Hattori A, Kunz HW, Gill TJ y Shinozuka H. Experimental analysis of the effects of cyclosporine on the induction and growth of epithelial tumors. *Transplant Proc* **21**, 3211-3214 (1989).
  141. Yoshimura S y Kamada N. Effect of cyclosporine A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc* **21**, 911-912 (1989).
  142. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162 (1994).