

María Cascales Angosto

MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD



Madrid, 2001

Portada:

Corte de hígado de rata (Naranja de Acridina) mostrando necrosis periportal inducida por una dosis subletal de cocaína (60 mg/kg) en rata previamente tratada con fenobarbital. × 386 (Cascales, 1997)

ISBN: 84-920377-4-1
Depósito legal: M. 12.785-2001

Imprime: REALIGRAF, S. A.
Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

ÍNDICE

	<u>Págs.</u>
Prólogo	7
Sistemas celular y vascular y microanatomía hepática	9
Vulnerabilidad del hígado a la lesión tóxica	43
Monooxigenasas microsómicas de función mixta	73
Mecanismos de defensa hepatocelular	99
Mecanismos moleculares de la colestasis y transporte hepatobiliar	125
Fibrosis hepática	157
Hepatitis producidas por fármacos	187
Regeneración hepática	215
Hepatotoxicidad y hepatocarcinogenesis	251
Modulación de la hepatotoxicidad por interacción de xenobióticos .	275

PRÓLOGO

Es de todos conocida la labor de la académica María Cascales que ofrece rasgos especiales por su inquietud y por su afán de organizar actividades científicas, tanto en la Real Academia de Farmacia como en la Real Academia de Doctores en donde, desde hace tiempo, ha destacado por su vitalidad y capacidad organizadora, actividades que transmite al Instituto de España en donde actualmente *actúa* como representante de la Real Academia de Farmacia en la Mesa de la Institución.

Una vez más la Doctora María Cascales ha organizado un curso, en este caso sobre *Mecanismos de hepatotoxicidad*, en el que con la colaboración de un amplio número de investigadores y profesores, nos ha puesto al día un tema de la máxima actualidad y del máximo interés para la comunidad farmacéutica. El Ciclo de Conferencias ha sido patrocinado por la Real Academia de Doctores y se ha desarrollado en la sede de la Real Academia de Farmacia en la primera quincena de Diciembre de 2000.

La doctora Cascales, tomando como base este curso y su gran experiencia investigadora, nos presenta hoy esta obra con el mismo título «*Mecanismos de Hepatotoxicidad*», en la que la simple lectura de los títulos de los diez capítulos, da una buena idea de la extensión y profundidad de los temas abordados, que van desde la organización estructural del hígado, dotado de funciones específicas, a la de la actuación del hígado como claro guardián y protector del organismo, con funciones intermedias entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. Es necesario aclarar que el hígado recibe un doble aporte de sangre, de la vena porta por la que importa una gran variedad de nutrientes y sustancias tóxicas, y de la arteria hepática que le proporciona la sangre oxigenada. Resulta obvio subrayar que mediante estas especiales circunstancias, el tan importante órgano, recibe una gran variedad de xenobióticos, entre los que se incluyen un buen número de tóxicos exógenos y aquellos procedentes del sistema digestivo. Basta dar una lectura

al texto para apreciar el verdadero significado del hígado, calificado como órgano metabólico, al mismo tiempo que como glándula endocrina y exocrina.

Una de las funciones más importantes del hígado es la biotransformación de las sustancias tóxicas de naturaleza hidrofóbica, en derivados hidrosolubles que puedan ser excretados por la bilis o la orina. Aunque esta función también la realizan otros órganos, como el riñón y el intestino, el hígado es el órgano que juega el papel más importante en la destoxificación y también el órgano que resulta más lesionado por efecto de las sustancias tóxicas. A la vista del contenido de alguno de los capítulos no hay la menor duda que el hígado es el órgano principalmente afectado cuando se trata del metabolismo y eliminación de los xenobióticos. Entre estos xenobióticos se incluyen numerosos fármacos y agentes terapéuticos

Este libro constituye un buen ejemplo de los avances científicos en el metabolismo hepático de fármacos, en los que la doctora Cascales posee experiencia personal, dado que sobre ellos ha desarrollado la mayor parte de su carrera investigadora, como se puede observar en las citas de sus propias publicaciones incluidas en la bibliografía. En esta obra se dan dos características que en un libro científico es preciso resaltar y agradecer, la concisión de cada uno de los capítulos desarrollados y la claridad del lenguaje expositivo. Su planteamiento original tiene como objetivo aglutinar las distintas manifestaciones de la hepatotoxicidad —necrosis, inflamación, colestasis, fibrosis, cirrosis y cáncer— para aplicarlas al metabolismo de agentes terapéuticos específicos. Este planteamiento es decisivo para despertar el interés de los profesionales implicados en las Ciencias de la Salud en general y del farmacéutico en particular. Estamos seguros que esta obra servirá de apoyo importante para la enseñanza de la Bioquímica Farmacológica y Toxicológica en Facultades de Biología, Farmacia, Medicina y Veterinaria, en donde, tanto los profesores como los estudiantes lo agradecerán. Su lectura serena y pausada ha de permitir, sin lugar a dudas, un mayor análisis y reflexión sobre los datos y conceptos recogidos.

Auguramos un gran éxito para esta obra muy documentada y llena de aportaciones de última hora y estamos seguros que los lectores interesados en temas hepáticos han de saber apreciar en su justo valor.

JULIO RODRIGUEZ VILLANUEVA
*Académico Numerario
de la Real Academia de Doctores
Sección Farmacia*

SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR Y MICROANATOMÍA HEPÁTICA

SUMARIO

1. Introducción
2. La unidad funcional hepática
3. Circulación hepática
 - 3.1. Subunidades microcirculatorias
 - 3.2. Sistemas portal, venoso y arterial. Sinusoide
 - 3.3. Sistema biliar
 - 3.4. Sistema linfático
4. Inervación hepática
5. Células hepáticas
6. Heterogeneidad funcional del hígado. Zonación metabólica
7. Ecología sociológica de las células hepáticas
8. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

El hígado de los mamíferos constituye el 3-5 % del peso corporal y posee cuatro lóbulos: izquierdo, medio, derecho y caudado; los tres últimos, compuestos a su vez por dos sublóbulos. El hígado recibe un doble aporte de sangre, la arterial con elevada presión, a través de la arteria hepática y la venosa con menor presión, a través de la vena porta, que procede del drenaje venoso esplénico. La arteria hepática es la vía que aporta oxígeno, mientras que la vena porta transfiere al hígado las sustancias nutritivas procedentes del tracto gastrointestinal para su metabolismo y eliminación. El eflujo de la sangre se verifica a través de una vena común, la vena hepática. La circulación y la excreción biliar se encuentran distribuidas en compartimentos para facilitar el intercambio entre sangre y hepatocitos. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramales gástrico y gastroduodenal siguiendo, a través del ligamento hepatoduodenal, como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los seg-

mentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta representa el único canal venoso que atraviesa otro órgano, el hígado, antes de retornar al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa portal confluyen en el sinusoides, capilar recubierto por un endotelio que posee poros o fenestras a través de los cuales circula el plasma sanguíneo, y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior. Directas observaciones de las oscilaciones en el flujo de la circulación sinusoidal sugieren que el intercambio (entrada y salida) del flujo sanguíneo sinusoidal se regula mediante esfínteres. En algunas especies, las paredes de las venas hepáticas poseen esfínteres musculares potentes, pero en los humanos las paredes de estos canales vasculares son muy finas.

La organización estructural del hígado refleja sus notables funciones. Este órgano segmentado, único en el organismo y dotado de funciones específicas, se encuentra interpuesto, como un guardián, entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. Debido a esta interposición, el hígado al recibir un doble aporte de sangre, venosa y arterial, importa con ello, además del oxígeno, una gran variedad de xenobióticos y endobióticos entre los que se incluye los nutrientes y sustancias tóxicas exógenas y las derivadas del sistema digestivo. Por tanto, una de las mayores funciones del hígado implica la incorporación eficiente de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas y su almacenamiento, conversión metabólica y liberación a la sangre y a la bilis. Igualmente importante es la biotransformación hepática, que convierte las sustancias hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados por bilis u orina. Debido a sus funciones metabólicas y secreciones en la sangre, el hígado se califica como un órgano metabólico y como una glándula endocrina. Al mismo tiempo su producción y secreción de bilis le atribuye la misión de una glándula exocrina.

2. LA UNIDAD FUNCIONAL HEPÁTICA

La unidad funcional de un órgano puede definirse como la unidad más pequeña, estructuralmente distinta y «autosuficiente», que puede realizar todas las funciones conocidas del órgano. Un ejemplo de tal concepto es la nefrona porque es una unidad bien definida estructural y funcional. No ha sido identificada una unidad similar hepática que pueda reconciliar el doble suplemento vascular y los dos tractos de salida, el vascular y el biliar, con todas las funciones conocidas del órgano. Esto refleja la complejidad funcional del hígado y la sofisticación de las interfases de su arquitectura (Figura 1).

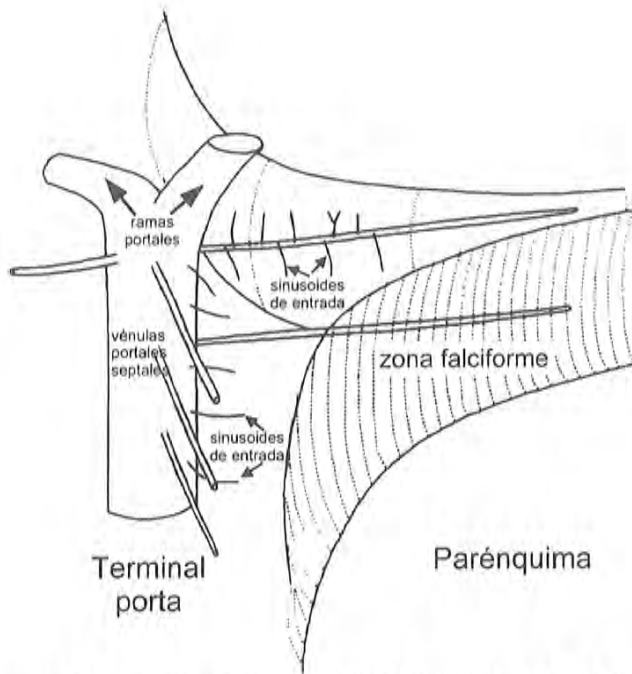


FIGURA 1. Esquema de angioarquitectura en hígado humano. La vena porta se ramifica en ramas terminales portales y en vénulas portales septales. Estas últimas penetran en el parénquima y dan origen a los sinusoides de entrada. Alternativamente, las ramificaciones sinusoidales pueden surgir directamente del terminal porta (4, 5).

El concepto del lóbulo clásico, definido como unidad funcional por sus características estructurales, se conoce desde hace más de un siglo. El lóbulo de Kiernan (1) era hexagonal con los tractos portales en las esquinas del hexágono y con una vena hepática en el centro (Figura 2). El lóbulo portal descrito por Mall (2) tenía un tracto portal en el centro y vénulas centrales en la periferia. Un concepto paralelo de lóbulo biliar tuvo su base en el tracto portal. En 1954 Rappaport et al., (3) describieron el acino hepático, definiendo la unidad funcional sobre la base del flujo microcirculatorio en el interior del hígado. Los conceptos de lóbulo clásico, lóbulo portal y acino no han sido nunca completamente aceptados, pero tampoco han sido rechazados. Cada uno de ellos puede explicar con éxito algunos de los procesos fisiológicos y patológicos en el hígado, pero ninguno puede explicarlos todos. Parece cierto que el lóbulo clásico posee las bases estructurales y metabólicas del gradiente porto-central de los procesos metabólicos, el flujo vascular y el drenaje biliar. Sin embargo, no explica los gradientes laterales o portal-portal entre tractos portales adyacentes. El lóbulo clásico no es la unidad funcional más pequeña, mas bien puede considerarse que está compuesta por unidades más pequeñas con el acino como candidato conceptual (Figura 2).

Lóbulo primario y secundario

Durante los últimos veinte años han surgido dos conceptos pioneros en la percepción de la arquitectura lobular. A través de una exhaustiva y cuidadosa reconstrucción tridimensional de secciones seriadas de hígado humano, se ha observado el papel de los «septa» vasculares en el parénquima hepático estableciendo el marco de la arquitectura lobular, la cual ya había sido aludida en el modelo anteriormente descrito (3). Aunque en este último no se describían los *septa* vasculares ambos modelos ofrecían conceptos similares: los capilares arteriales y portales terminales se ramificaban fuera de los tractos portales a diferentes niveles y de forma tridimensional. Estos capilares aparecían orientados perpendicularmente a las venas centrales y juntos, acompañados de conductos biliares, formaban los ejes de las unidades acinares propuestas.

El *septum* vascular no es un *septum* fibroso, más bien es el terminal y la rama terciaria de distribución de la vena porta desprovisto de tejido conjuntivo y sólo un poco más grande que los sinusoides que surgen de él.

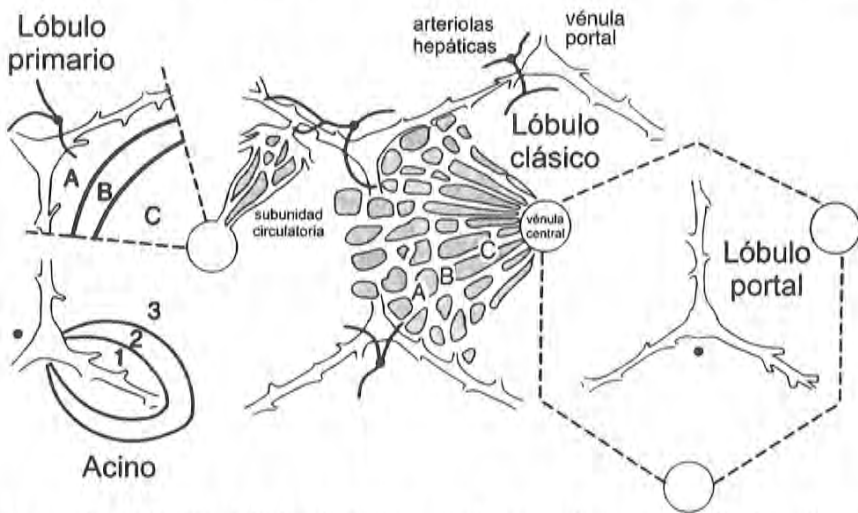


FIGURA 2. Se muestran lóbulos hepáticos contiguos y la conexión de los sinusoides derivados de dos vénulas portales. Las arteriolas hepáticas suministran sangre a los sinusoides cerca de la periferia del lóbulo. Se han postulado tres zonas (1, 2, 3) componentes del acino hepático, de diferente oxigenación y metabolismo (3), con su eje en el tracto portal. Varios de estos acinós podrían formar el lóbulo portal descrito por Mall (2). Se ha propuesto también que cada lóbulo clásico contiene varias subunidades alimentadas por sangre arterial y portal en la periferia, con el ápice en la vénula central. A, B, C representan líneas de potencial hemodinámico en un lóbulo primario. Una modificación más reciente (11) subdivide los lóbulos en subunidades microcirculatorias irrigadas por una vénula de entrada (9).

Este ramal terminal de la vena porta, que denominaremos vénula portal, es un *septum*, puesto que define los límites y separa lóbulos adyacentes. Así, divididos por vénulas portales, el parénquima hepático se compone de lóbulos primarios y secundarios, estando formado el último por 6 - 8 lóbulos primarios en una disposición hexagonal que corresponde al lóbulo clásico visto en imágenes bidimensionales. Cada lado del hexágono está compuesto por dos *septa* vasculares que contienen sus respectivas vénulas portales que surgen de tractos portales adyacentes. Estos dos *septa* vasculares entran en la región medioseptal, a medio camino entre tractos portales adyacentes.

En las reconstrucciones tridimensionales, cada lóbulo primario es una unidad en forma de cono rodeada por *septa* vascular y compuesta por dos zonas, portal y septal. La zona portal es un área en forma falciforme atrancada en el tracto portal, cuyos bordes afilados se diseminan lateralmente hacia los tractos portales adyacentes de cada lado (Figura 1). Esta zona está irrigada por vénulas cortas que surgen directamente del terminal hacia el interior del tracto portal y la porción proximal de la vénula portal. Las vénulas de suministro irrumpen inmediatamente en los canales sinusoidales, los cuales se diseminan transversalmente antes de volver hacia adentro coronando radialmente una vena central. Por el contrario, la zona septal está alimentada por vénulas de entrada que parten de la porción distal de la vénula portal. Los sinusoides que surgen en esta región, denominados sinusoides septales, no tienen un curso transversal, pero coronan radialmente la vena central. Se han introducido dos conceptos nuevos (4):

1. el lecho de los sinusoides transversales, que constituye la zona falciforme, proporciona el frente de influjo para la perfusión del lóbulo, que es totalmente diferente del suministro lineal o axial descrito para el modelo acinar;
2. se contempla la distinción de estas dos zonas, como base para explicar diferencias en las propiedades metabólicas de los hepatocitos a lo largo de un gradiente, así como van progresando desde el tracto portal a la región medioseptal (5).

Muchos procesos patológicos, como las alteraciones lipídicas, la necrosis perivenular y la tinción con glucosa-6-fosfatasa, son consecuencia de la presencia de una zona falciforme. Sin embargo, extrapolando desde los anfibios hasta los pequeños mamíferos, no resulta consistente un tipo de flujo tal como el «influjo frontal» con la variación en el flujo sanguíneo entre sinusoides adyacentes en el mismo lóbulo, como se ha observado por visualización directa al microscopio. De la misma manera, esto no está de

acuerdo con quienes mantienen que algunos sinusoides están totalmente perfundidos por la sangre arterial y otros por la sangre venosa. Por tanto, no se debe permitir que las implicaciones dinámicas funcionales puedan ser trazadas a partir de estudios con tejido fijado. Sin embargo, la presencia de un lecho anatómico sinusoidal en la zona portal o en la falciforme proporciona un influjo potencial frontal, cuyo efecto se observa en estados patológicos tales como isquemia o alteración lipídica.

Placa de células hepáticas

Coincidiendo con lo anteriormente mencionado, algunos autores han introducido un nuevo término, la placa de células hepáticas, como representación de la unidad microvascular del parénquima hepático. Así, se han propuesto estructuras tridimensionales triangulares alargadas con la base en un terminal porta y el ápice en un terminal venoso. Un lóbulo hepático contiene 6 a 8 de estas unidades. A pesar de la configuración geométrica de las unidades microvasculares, existen ciertos elementos que son comunes a todas las propuestas (6):

1. El elemento estructural de la organización hepática tisular, es la placa individual de células hepáticas. Cada placa está formada por una simple capa de células, que se extiende desde el espacio porta hasta la vénula hepática. Cada placa posee un número de hepatocitos entre 15 y 25 y una longitud aproximada de 400 μm . En estas placas se encuentran, además de los hepatocitos, las células endoteliales cubriendo los sinusoides, las células de Kupffer en el interior de los sinusoides, los lipocitos en el espacio de Disse, las células pit localizadas o embebidas por las células endoteliales y las células del conducto biliar.
2. La función hepática se lleva a cabo en el interior de la placa. Es en esta estructura donde se verifican los contactos hepatocito-hepatocito, como también los contactos hepatocito-matriz extracelular.
3. Las células se perfunden con sangre de la vénula porta y la arteria hepática. La sangre fluye a partir de estas estructuras vasculares a través de las fenestras de los sinusoides y drena en la vena hepática.
4. Debido a la perfusión unidireccional las primeras células expuestas a la sangre estarán en contacto con las concentraciones más elevadas de solutos entrantes: oxígeno, sustratos, hormonas, etc. La eliminación de estos solutos por incorporación a las células y la adición

de productos metabólicos por secreción de dichas células, resultará en la modificación progresiva de la composición de la sangre sinusoidal a medida que vaya atravesando la placa de células hepáticas. Por tanto, en el terminal distal del sinusoides, cerca de las vénulas hepáticas, el microambiente que rodea las células será muy diferente de aquel de entrada a las vénulas portales (Figura 3).

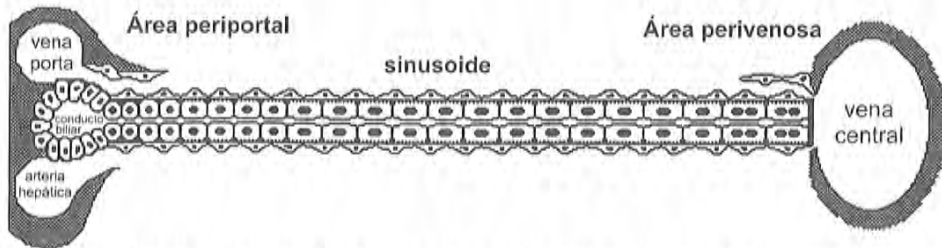


FIGURA 3. *Distribución de los hepatocitos y las células endoteliales entre la triada portal y la vena central.*

3. CIRCULACIÓN HEPÁTICA

Después de que William Harvey en 1649 introdujese el concepto del movimiento circular de la sangre, el mayor desafío para la aceptación de este concepto era la peculiar configuración anatómica de la circulación hepática (7, 8). Basándose en sus experimentos, Harvey refutó el concepto de Galeno, de flujo y reflujo en el sistema portal y trató de acomodar una nueva ciencia fisiológica, que reemplazara el razonamiento puramente dialéctico basado en los 1500 años anteriores. Aunque el inmediato impacto de este descubrimiento fue desviar el centro de la circulación desde el hígado al corazón, la circulación hepática ha continuado desconcertando a los estudiosos hasta el momento presente.

Debido a la sumamente compleja organización del hígado y su suministro sanguíneo, como también a la inaccesibilidad de las vísceras esplénicas, los progresos durante los 300 años siguientes han tenido su base en el desarrollo tecnológico.

El hígado de los mamíferos recibe un suministro doble de sangre. El 80% de la sangre que entra en el hígado es sangre venosa poco oxigenada suministrada por la vena porta, mientras que el 20% restante es sangre arterial bien oxigenada y suministrada por la arteria hepática. Estos vasos sanguíneos entran por el espacio porta donde los conductos biliares eferentes y los linfáticos salen del órgano. El riego venoso del hígado cursa independiente de la bilis y la linfa para drenar en la vena cava inferior cerca del diafragma.

La arteria hepática aporta oxígeno y un flujo de sangre con elevada presión, mientras que la vena porta procedente del drenaje venoso esplénico, con menor presión, transfiere las sustancias nutritivas absorbidas por el tracto gastrointestinal, para su metabolismo y eliminación. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramas gástrica y gastroduodenal, siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta es el único canal venoso que atraviesa otro órgano, el hígado, antes de retornar al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa confluyen en el sinusoides, capilar recubierto por las células endoteliales que poseen poros o fenestras, a través de los que fluye el plasma sanguíneo, y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior (Figura 4)

Dentro del hígado, las ramas de distribución de la vena porta y de la arteria hepática cursan en paralelo, y después de repetidas ramificaciones, los ramales terminales de estos vasos (véculas portales y arteriolas hepáticas) suministran sangre a los sinusoides hepáticos (Figuras 1 y 4). Los sinusoides son los principales vasos implicados en el intercambio transvascular entre la sangre y las células parenquimáticas. Ramas de arteriolas

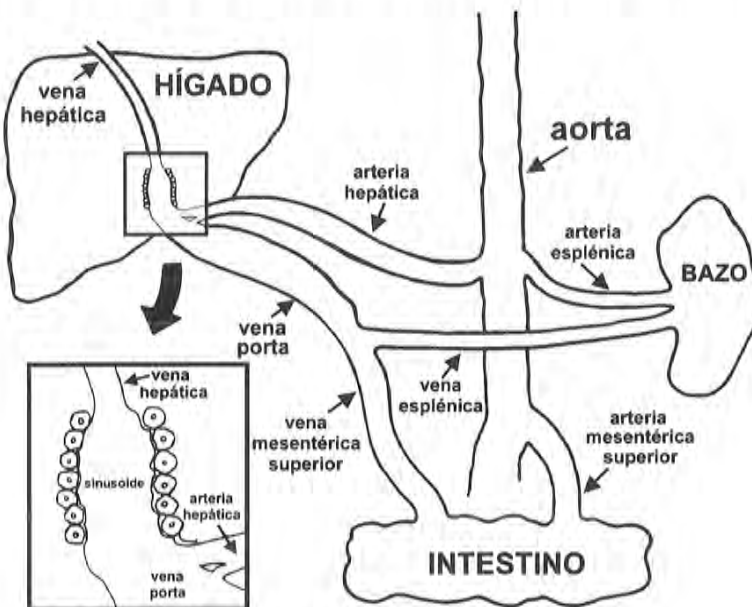


FIGURA 4. *Circulación hepatoesplénica (8).*

hepáticas suministran también a la cápsula del hígado y a los conductos biliares, donde alimentan un plexo peribiliar de capilares, los cuales a su vez drenan en los sinusoides. La sangre portal y arterial fluyendo a través de los sinusoides se recoge en pequeñas ramas de venas hepáticas (vénu- las hepáticas centrales o terminales) a través de las cuales la sangre se dirige, a través de las venas hepáticas más grandes, a la vena cava inferior. Los vasos linfáticos se originan como capilares terminales ciegos en espacios del tejido conjuntivo (tractos portales), asociados con las venas por- tales y las arterias hepáticas

3.1. Subunidades microcirculatorias

El sistema microvascular hepático comprende todos los vasos intrahe- páticos que tengan un diámetro interno menor que 300 μ m, por tanto incluye todos los vasos sanguíneos y linfáticos implicados en la entrada y la salida de los fluidos hacia y desde el parenquima hepático, tales como vénulas portales, arteriolas hepáticas, sinusoides, vénulas centrales y lin- fáticas. Los sitios principales de regulación del flujo sanguíneo y de inter- cambio de solutos están en el entramado sinusoidal, el cual exhibe he- terogeneidad estructural y funcional. Los factores que regulan el flujo sanguíneo a través del sistema microvascular hepático y sus relaciones con la estructura y función hepáticas no están, hasta la fecha, completamente esclarecidos (9, 10).

La unidad funcional hepática es la mínima cantidad de tejido requerida para realizar las funciones del órgano. Una restringida área del tejido hepá- tico ha sido considerada como la unidad funcional. Esta unidad comprende un sinusoides con su contiguo tejido hepático y las inmediatas conexiones aferentes y eferentes, vascular, biliar linfáticas y neurales. Sin embargo, esta unidad probablemente es demasiado restringida, porque no todos los sinu- soides reciben conexiones directas de la arteria hepática y en la perifería de la unidad se segmentarían en dos aquellas células parenquimáticas cuyos sinusoides adyacentes están separados por placas parenquimáticas de una célula de grosor. También hay que considerar las interacciones entre unida- des de tejido con conexiones comunes aferentes (vénula portal de entrada o terminal) y eferentes (vénula central). Esto se ha resuelto con la identifi- cación de la *subunidad microcirculatoria hepática* que es una expansión del concepto antes mencionado.

Mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía con fluoro- cromos *in vivo*, Ekataksin *et al.*, (11) han mostrado en diversas especies una

unidad microcirculatoria piramidal con su base en el perímetro del lóbulo clásico y su ápice en la vena central (Figura 5). Lechos vasculares similares irrigados por una vénula de entrada se han mostrado por Matsumoto *et al* (5) en hígado humano. Esta unidad piramidal, denominada *subunidad microcirculatoria hepática*, está irrigada por una sola vénula de entrada que alimenta un grupo de aproximadamente 19 sinusoides. La vénula de entrada se localiza con un canal de Hering, el cual drena bilis de la misma área piramidal. Siguiendo el paso de un fluorocromo, estos autores demostraron una onda dinámica de intensidad, el «frente de influjo» que llena la unidad piramidal a través de la vénula de entrada. El fluorocromo se acumula entonces en los conos de las placas hepáticas y en una fase más tardía se observó un modelo difuso de canaliculo biliar. Estos investigadores creen que la subunidad hepática microcirculatoria representa la unidad básica funcional del hígado y en analogía con la nefrona, describen un flujo «contracorriente» entre la vénula de entrada y el canal de Hering. La sangre llega a los hepatocitos por la vénula de entrada y la bilis drena por el canal de Hering en dirección opuesta desde el mismo territorio piramidal. Las evidencias que indican que los hepatocitos periportales son los primeros responsables de la incorporación y secreción de las sales biliares en condiciones normales, sostienen el concepto de «contracorriente» (11).

Así que el sistema continuo (muralia) de placas hepáticas anastomosadas y los espacios sinusoidales (laberinto hepático) de Elías (12), han dado origen a una organización de áreas bien demarcadas de parénquima hepático aso-

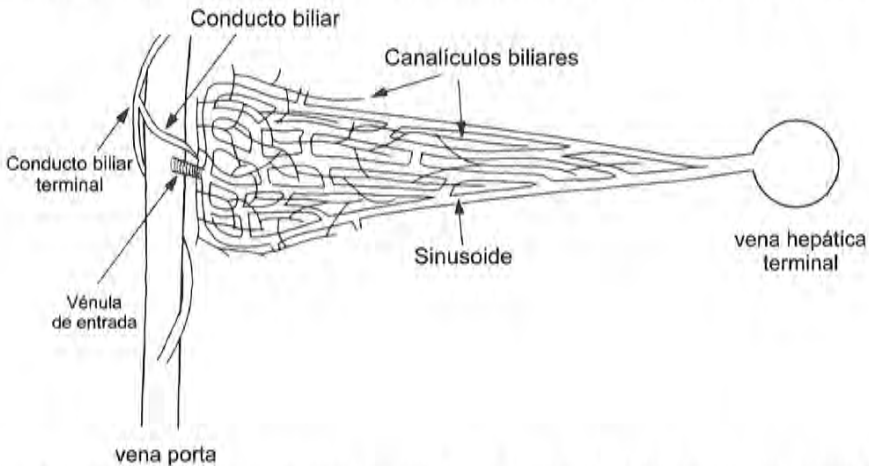


FIGURA 5. Unidad microcirculatoria piramidal: el terminal porta origina una vénula de entrada que alimenta a 19 sinusoides. La vénula de entrada se localiza al lado de un canal de Hering (no se muestra), que drena la bilis de la misma área piramidal. El conductillo biliar conecta el conducto biliar terminal con el canal de Hering (4,11).

ciado con vénulas de suministro y canales biliares de drenaje que se ramifican siguiendo un modelo regular. La subunidad hepática microcirculatoria es con certeza el grupo más pequeño de hepatocitos alrededor de un conducto y vénula de entrada. Sin embargo, esto no está de acuerdo con la idea de la zona falciforme funcionalmente integrada, descrita por Matsumoto et al., (5). El lóbulo primario, por otra parte, es más inclusivo, pero no concuerda con el concepto de vena hepática terminal o arteria hepática terminal.

Si creemos lo que Matsumoto ha propuesto, que la ramificación regular de primer orden distribuye el ramal porta, en once ramales de segundo orden que distribuyen el flujo portal sin acompañamiento de ramificación de la vena hepática, esto equivale a yuxtaponer 6 tractos portales alrededor de una vena central. Ahora la unidad funcional comienza a parecerse al lóbulo clásico, como originalmente describió Kiernan, con significación funcional añadida.

Una observación importante es la variación en forma de la subunidad hepática microcirculatoria. En porciones periféricas del hígado, la distancia entre vénulas de entrada es menor, a veces tan pequeña como $25\mu\text{m}$, abarcando solo un hepatocito, así que la vénula de entrada irriga los hepatocitos que se encuentran en un solo plano. En lugares subcapsulares, por tanto, la subunidad hepática circulatoria, generalmente cónica, presenta una forma achatada (subunidad hepática microcirculatoria prematura) y carece de tercera dimensión. La fusión de las subunidades hepáticas microcirculatorias adyacentes en la periferia crea varios perfiles apareciendo el lóbulo portal en forma triangular, el acino hepático romboidal y el lóbulo primario hexagonal. Esta observación refleja dos hechos:

1. las características de la arquitectura es diferente en las diversas partes del hígado;
2. aunque existe una configuración regular en el lóbulo, ésta no siempre se traslada a una forma geométrica regular, más bien se ajusta a la forma local del hígado.

Por tanto, lo que puede ser verdad en la región periférica, puede no asumirse como verdadero en las regiones más centrales.

Como la arquitectura lobular del hígado depende de la relación entre el modelo de ramificación del sistema venoso portal y de la del sistema venoso hepático, estos dos sistemas se discutirán teniendo en cuenta como se lleva a cabo el sistema hepático arterial cuyo papel en la perfusión parénquimal no está bien definido.

3.2. Sistemas portal, venoso hepático y arterial. Sinusoide

El *sistema venoso portal* en humanos consiste en sistemas conductores y sistemas distribuidores. Como el nombre sugiere, el sistema conductor es el responsable de llevar sangre hasta la esquina más alejada del hígado. Para conseguir esto, el sistema conductor muestra frecuentes ramificaciones en las zonas perihiliar y subcapsular, y muestra gran versatilidad en la longitud y número de las ramas y número de órdenes de ramificación, que se acomodan a la forma del órgano, para asegurar un suministro uniforme de sangre al parénquima. El sistema distribuidor es el responsable del intercambio de sustancias entre la sangre y los elementos hepáticos y por lo tanto del mantenimiento de las interfases de la microarquitectura. Para conseguir esto, el sistema distribuidor sigue una estricta pauta de ramificación. Las ramas terminales del sistema conductor dan lugar a ramas de primer orden del sistema distribuidor en una secuencia ordenada, pero de dirección arbitraria. Cada una de estas ramas suministra a una masa definida de parénquima. Cada rama de primer orden da lugar a once sucesivas ramas de segundo orden en ángulos rectos. Las ramas de segundo orden corresponden a las venas portales que se ven al microscopio ordinario. Las ramas de tercer orden son vénulas portales que surgen de las de segundo orden y corresponden a las ramas septales que se ven en los septa vasculares interlobulares.

El sistema *venoso hepático* se ha considerado durante mucho tiempo como un compartimento de drenaje pasivo para los sistemas portal venoso y el arterial hepático y no ha recibido tanta atención como el portal. La sangre drena desde los sinusoides hasta las venas hepáticas y desde aquí hacia las venas sublobulares que por último se unen a las venas hepáticas terminales. La significación del modelo de ramificación de las venas hepáticas en la arquitectura lobular nos dirige otra vez a las reconstrucciones detalladas de Matsumoto et al., (5) de la angioarquitectura. Ellos han observado que el sistema venoso hepático no sigue el mismo orden de ramificación que el venoso portal. Mientras las ramas portales de primer orden de distribución, daban lugar a once ramas de distribución de segundo orden, las venas hepáticas no siguen el mismo ejemplo. Esto da lugar a la posición de seis venas portales alrededor de una vena central y a la formación del clásico lóbulo hexagonal. De la misma manera la reconstrucción de los lóbulos en tres dimensiones en el hígado de rata muestra la orientación de los lóbulos basada en venas hepáticas localizadas centralmente y su relación con el modo de ramificación del sistema venoso portal.

El *sistema hepático arterial* es el responsable del 25% del flujo sanguíneo hepático. Existe discusión acerca del modo de terminación del sistema

arterial hepático. ¿terminan las arterias hepáticas en los sinusoides vía arteriolas hepáticas? ¿Existe una anastomosis arterio-portal? Y si las arteriolas terminan en los sinusoides, ¿lo hacen cerca del tracto portal o caminan hasta el interior de los lóbulos como arteriolas intralobulares?

La interpretación de las observaciones publicadas por diferentes autores sobre este tema es complicada, por las variaciones en la anatomía de las especies, el flujo sanguíneo en el momento de la observación, la dinámica de los esfínteres y el tipo de anestesia. Se han descrito esfínteres en tres sitios distintos del lecho sinusoidal: los *esfínteres aferentes* en el lugar de incorporación de la vénula de entrada a los sinusoides; los *esfínteres eferentes* en el lugar de comunicación de los sinusoides con la vena central; y los que se encuentran en el lugar de unión de los sinusoides intersinusoidales con los sinusoides radiales. Se han identificado también en las arteriolas hepáticas *esfínteres precapilares*, que consisten en músculo liso.

Son pocos los estudios acerca del suministro arterial en hígado humano y todavía no está claro si existen atajos en forma de anastomosis arterio-portal tal como se han detectado en rata y no han podido ser detectados en humanos. Saxena et al.,(4) concluyen que existe una enorme variación entre las especies y entre las diferentes partes del hígado. La última consideración es si las arteriolas mantienen alguna relación para penetrar en los canales ductulares biliares, que conducen a los canales de Hering. Tal disposición puede ayudar a preservar el suministro de sangre a una zona proliferativa importante en hígado severamente lesionado.

Los sinusoides son los sitios principales de intercambio transvascular entre la sangre y el hepatocito. La estructura del sinusoides hepático es única, está compuesta por células endoteliales, células de Kupffer y células perisinusoidales. Las células endoteliales recubren la superficie del sinusoides y presentan en sus extremos un citoplasma atenuado donde se encuentran una serie de poros agrupados en forma de tamiz denominados fenestras. Las fenestras endoteliales son estructuras dinámicas cuyo diámetro está afectado por la presión sanguínea del lumen, y también por sustancias vasoactivas, fármacos y toxinas. De esta manera las fenestras regulan el paso de compuestos de gran tamaño, como los quilomicrones, mientras que permiten el paso del plasma y de grandes proteínas. Ocasionalmente existen fenestras más grandes que proporcionan lugar para la inserción de células de Kupffer fagocíticas a la superficie luminal del endotelio. La fagocitosis de partículas por las células de Kupffer es rápida y ocurre entre 18 - 23 segundos después que la partícula se ha puesto en contacto con la superficie celular. Las células de Kupffer no solo fagocitan, sino que son también

fuente de una serie de sustancias vasoactivas, que pueden influenciar el flujo sanguíneo sinusoidal y los procesos de intercambio, mediante su acción sobre las células que tapizan el sinusoides. Las células de Kupffer generan también mediadores beneficiosos y tóxicos, que participan en mecanismos de defensa no específica del hospedador, como también en la lesión hepática. La fagocitosis y la liberación de estas diversas sustancias se cree que están moduladas en parte por endotoxinas procedentes del intestino, porque las células de Kupffer son las responsables de la eliminación de estos productos bacterianos, presentes en la sangre portal. Por tanto, la disfunción de las células de Kupffer frente a la endotoxina se ha implicado en la fisiopatología de la enfermedad hepática.

Los lipocitos se localizan en espacio perisinusoidal de Disse. Estas células contienen gotitas de grasa que son el almacenamiento de la vitamina A. Las delgadas protuberancias de estas células cursan a través del espacio perisinusoidal y abrazan las superficies lumbinales del endotelio. En hígado sano de mamíferos, poca o ninguna lamina y colágeno basales están asociados al endotelio sinusoidal. Como resultado, la pared sinusoidal es una estructura muy permeable que permite la continuidad del plasma entre la sangre y el hepatocito. En ciertos casos de lesión hepática, el material de la membrana basal y las fibrillas de colágeno se acumulan en el espacio perisinusoidal, dando origen a la «capilarización» de los sinusoides y a la alteración del intercambio transvascular.

El espacio perisinusoidal se considera por algunos investigadores que funciona como un espacio linfático que canaliza el plasma a los verdaderos vasos linfáticos que cursan en el tracto portal. Aunque esta hipótesis ayudaría a explicar el gran eflujo de la linfa desde el hígado, no puede considerarse válida. Las conexiones anatómicas entre el espacio de Disse y el tracto portal no han sido aún identificadas (13). Además, el flujo plasmático en el espacio de Disse tendría que ocurrir frente a un gradiente de presión, si se asume la igualdad de la presión entre el espacio sinusoidal y el de Disse debida a la porosidad de la pared sinusoidal. Sin embargo, tal flujo retrogrado ha de ocurrir mediante la influencia del roce de los leucocitos sobre el lecho endotelial para crear un efecto de bomba de rodaje. Otra explicación, que tiene que ser explorada, es la producción de linfa por el plexo peribiliar en el espacio portal.

Células sinusoidales

Las células sinusoidales se dividen en endoteliales y perisinusoidales. Entre estas últimas están las células de Kupffer, las células pit y los lipocitos (células de Ito, células estrelladas, acumuladoras de grasa)

Las células sinusoidales hepáticas juegan un papel crítico en el mantenimiento de la función hepática en circunstancias normales y patológicas. Dentro del lóbulo hepático los diferentes tipos de células sinusoidales tienen una localización particular que se relaciona directamente con sus funciones. Las células endoteliales y las células de Kupffer están en directo contacto con el torrente circulatorio, mientras que las parenquimales (hepatocitos) están en contacto con el plasma sanguíneo sólo a través del espacio de Disse.

Las células endoteliales fenestradas forman una barrera física que capacita, mediante las fenestras, el contacto directo de los hepatocitos con la mayoría de las proteínas plasmáticas en el espacio de Disse, pero previene el contacto directo de los hepatocitos con las células sanguíneas, los quilomicrones, virus y bacterias. Las células endoteliales comprenden el 44% del volumen sinusoidal celular y son las responsables del intercambio de fluidos y su contenido entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse

Los sinusoides hepáticos carecen de membrana basal. El acceso directo al espacio de Disse lo proporciona el abundante número de fenestras en las células endoteliales que tienen un diámetro aproximado de 150 nm. Estas fenestras se componen de anillos de proteínas del citoesqueleto; actina, miosina y proteínas de enlace a la actina. Las fenestras son estructuras dinámicas que se contraen y dilatan en respuesta a señales específicas. Por ejemplo, la serotonina activa la contracción de las fenestras elevando el calcio intracelular, que activa como segundo mensajero la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina y con ello la contracción. Se conoce muy poco acerca de la formación de las fenestras, pero se sabe que desaparecen en células endoteliales cultivadas recientes y que retornan poco a poco a los pocos días y que aparecen numerosas y pequeñas cuando se añade al cultivo éster del forbol. Aunque los sinusoides contienen abundantes células endoteliales con muchas fenestras, las células endoteliales adyacentes al terminal venoso carecen de ellas. Se desconoce el mecanismo responsable de esta notable diferencia.

Las funciones reconocidas de las células endoteliales son muy diversas e incluyen:

1. modulación de la circulación hepática;
2. reclutamiento de la masa funcional hepatocelular;
3. adhesión de plaquetas;
4. síntesis y liberación de citoquinas y
5. protección de los hepatocitos del contacto con partículas (virus, etc) que excedan los 150 nm de diámetro.

Las células endoteliales poseen, además, receptores especializados para manosa/N-acetilglucosamina y N-acetilneuramínico, e incorporan por endocitosis la transferrina, la ceruloplasmina, la transcobalamina II, glucosaminoglicanos, lipoproteínas de elevada y baja densidad modificadas, lipasa y otros ligandos.

Los otros tipos de células sinusoidales, son las perisinusoidales e incluyen las células de Kupffer, los lipocitos y las células pit. Aproximadamente 1/3 del volumen celular sinusoidal deriva de las células de Kupffer y un 1/5 de los lipocitos. Todas las células sinusoidales participan en un sistema de defensa coordinado en el cual las células de Kupffer son las que tienen la misión de fagocitar y presentar antígenos. Los lipocitos son importantes en el metabolismo del colágeno y en el almacenamiento de la vitamina A. Las células pit pueden mostrar actividad de células naturales asesinas y neuroendocrina.

Estas células interactúan entre ellas adaptándose a diversas situaciones de estrés entre las que se incluye la hipoxia y la endotoxemia.

3.3. Sistema biliar

En todas las especies estudiadas, los canales biliares intralobulares comienzan como canalículos biliares, que observados al microscopio electrónico son de 1 a 2 μm de diámetro y están situados entre dos hepatocitos adyacentes, que se unen por las membranas apicales de estas células. Los canalículos biliares forman un complejo de ramificaciones y canales que se anastomosan con tortuosos cursos y se encaminan al conducto biliar terminal, a través de conductos biliares denominados colangiolos o canales de Hering. Hering en 1866 dio su nombre a estos canales que constituyen la unión entre el sistema canalicular de los hepatocitos y el árbol biliar. El

examen de estos canales por microscopía electrónica ha revelado que están parcialmente recubiertos por hepatocitos en una parte y por células pequeñas piramidales o cuboideas con escaso citoplasma por otra. Estas células pequeñas tiene una membrana basal como las porciones más distales del árbol biliar, pero una superficie apical similar a la membrana canalicular de un hepatocito.

Se desconoce hasta el momento la naturaleza exacta de los recorridos de los canales de Hering a través de los lóbulos hasta la perifería. La cuestión es si existe un colangiolo intralobular, o se extiende el canal de Hering a través del lóbulo, o se detiene en la vecindad de la placa limitante. Hasta hace poco se ha creído que los canales de Hering eran inaparentes en el interior del parénquima hepático, pero no se sabe si corresponde cada canal de Hering a un canaliculo o forman los canaliculos una confluencia antes de entrar en los confines del canal de Hering. Por definición, los canales de Hering son canales tubulares estrechos presentes en la vecindad del tracto portal, parcialmente cubiertos por hepatocitos en una parte y por colangiocitos en la otra (Figura 6)

Se ha postulado que el sistema biliar intralobular consiste en canaliculos biliares entre hepatocitos a lo largo de todo el lóbulo y que ellos entran en canales de Hering que penetran en el tercio periportal del lóbulo. De esta manera el canal de Hering sirve como un contenedor para recolectar la bilis parenquimal y transportarla al terreno del tracto portal (figura 6B). Aquí los canales biliares adquieren un revestimiento de colangiocitos fácilmente observables en tinciones de rutina como estructuras circulares (4). Recientes estudios en hígado humano (15), han observado la estructura tridimensional de las reacciones ductulares en necrosis masiva y han sugerido que estas reacciones son proliferaciones de células que tapizan los canales de Hering, lo cual lleva a proponer que estos canales consisten en, o encubren, células progenitoras facultativas.

3.4. Sistema linfático

El sistema linfático se ha estudiado en modelos experimentales de ratas, conejos y cerdos. La teoría más aceptada es que la linfa se forma en hígado por filtración del plasma en los espacios de Disse, a medida que la sangre pasa a través de los sinusoides. Desde el espacio de Disse, la linfa atraviesa el espacio de Mall en el tracto portal y desde aquí se dirige a los vasos linfáticos, los cuales ellos mismos empiezan como canales ciegos en el interior de los tractos portales. Se cree que la linfa fluye a través de las fibras

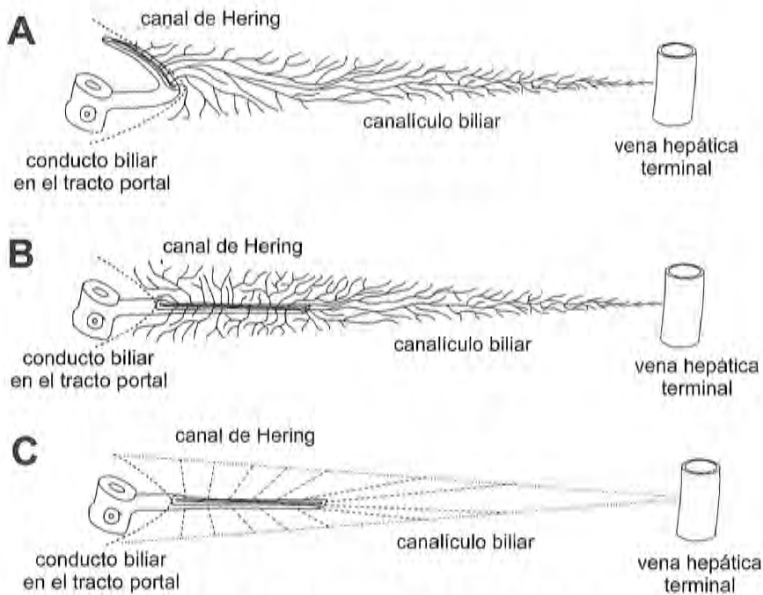


FIGURA 6. *Relacion del canal de Hering con el parénquima hepático. A. El conducto biliar terminal en el tracto portal puede dar lugar a un conductillo biliar y a un canal de Hering, que conecta con los canalículos biliares de los hepatocitos sólo en la interfase entre el tracto portal y el parénquima (línea punteada). B. El conducto biliar terminal en el tracto portal puede dar lugar a un conductillo biliar y a un canal de Hering, que penetra directamente en el parénquima y se extiende hasta aproximadamente un tercio del camino hacia el terminal venoso. Como el canal de Hering está construido parcialmente con células epiteliales y hepatocitos (no se muestra) puede actuar como un contenedor para la recolección de la bilis desde el canalículo biliar hepatocelular (4, 11, 15).*

de colágeno, que parecen ser continuas entre el espacio de Disse y los tractos portales, haciendo un canal submicroscópico para el flujo de la linfa. También se cree que la linfa fluye en la matriz empleando las vénulas y arteriolas portales de entrada que penetran la placa limitante (13). En conejos, los canales linfáticos forman ricos entramados alrededor de los vasos portales y conductos biliares y se extienden distalmente hasta los tractos portales terminales. No ha podido observarse aún, comunicación alguna entre los canales linfáticos portales y aquellos que acompañan a las venas hepáticas (4)

3. INERVACIÓN HEPÁTICA

El hígado humano posee una rica inervación simpática y parasimpática, predominando la primera. Las fibras nerviosas simpáticas o adrenérgicas forman un plexo perivascular rico alrededor de los vasos sanguíneos, desde los cuales emiten las ramificaciones. Estas ramas viajan a través de los sinusoides, para suministrar inervación a los lóbulos, donde las ramas terminales rodean las células perisinusoidales y los hepatocitos (16). Las fibras nerviosas parasimpáticas o colinérgicas inervan ramales extra e intrahepáticos de la arteria hepática, la vena porta y la vena hepática. La inervación colinérgica de los hepatocitos y sinusoides es, sin embargo, escasa. Se ha demostrado que existe una relación inversa entre el número de fibras nerviosas y la densidad de los canales de comunicación (gap junctions). Se ha sugerido que estos canales proporcionan un acoplamiento eléctrico de forma que se evita la necesidad de inervación como línea de comunicación (16).

Con el advenimiento del trasplante de hígado están cambiando una serie de conceptos que se han creído durante mucho tiempo inamovibles respecto a la inervación hepática en el metabolismo y la fisiología vascular y biliar. Estos conceptos se han puesto en duda debido a que piezas denergadas de hígado pueden funcionar efectivamente (17, 18)

5. CÉLULAS HEPÁTICAS

El hígado está formado por siete clases de células, que se clasifican en parenquimáticas (hepatocitos) y no parenquimáticas (ductulares, conjuntivas y sinusoidales). las sinusoidales se dividen a su vez en: células de Kupffer, células pit y lipocitos llamados también células perisinusoidales, de Ito, estrelladas o «fat storing cells». Los hepatocitos, las células que se encuentran en mayor proporción, muestran una uniformidad histológica, pero revelan diferencias histoquímicas. De esta heterogeneidad descriptiva y funcional de las células parenquimatosas del hígado existen revisiones muy recientes (19, 20).

Parenquimales	HEPATOCITOS
No parenquimales	DUCTULARES: COLANGIOCITOS
	CONJUNTIVAS
	SINUSOIDALES: ENDOTELIALES
	PERISINUSOIDALES: KUPFFER
	PIT
	LIPOCITOS

La célula del parénquima hepático es el *hepatocito*, que constituye aproximadamente, el 60 % del total de las células del hígado y el 80 % del volumen hepático. Los hepatocitos están orientados en cordones, compuestos por una fila de células (21), excepto en neonatos y niños hasta la edad de 4-5 años que tienen dos filas, separadas del sinusoides vascular por el llamado «espacio de Disse», el cual constituye un micro-ambiente intersticial donde se localizan los lipocitos y fibras de colágeno tipo I y III (22). El canalículo está localizado en el polo opuesto al sinusoides. Los hepatocitos son células poliédricas, con núcleo central redondeado y abundante citoplasma. Su membrana plasmática tiene tres dominios morfológica y funcionalmente distintos: perisinusoidal, intercelular y pericanalicular.

El *perisinusoidal* constituye el 37 % de la superficie celular y posee microvellosidades con el objeto de aumentar la superficie de contacto con el espacio de Disse; lo cual unido a su elasticidad y al contenido en componentes matriciales de dicho espacio, facilita el intercambio con el flujo sanguíneo. Esta zona de la membrana tiene menor contenido en colesterol y mayor fluidez que el resto de los dominios. Es el sitio de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ (23), del cotransporte $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$, de la proteína ligada a la bilirrubina y a los ácidos grasos así como del transportador acoplado de Na^+ para la liberación de sales biliares

El *intercelular* ocupa el 50 % de la membrana plasmática y es la región especializada en la comunicación y adhesión intercelular, que interviene activamente en la secreción biliar, ya que al estar localizada a ambos lados del canalículo constituye una barrera canalículo-sinusoidal. Se considera una «barrera bioelectrolítica» al ser permeable selectivamente a distintos cationes, hecho a su vez controlado por hormonas y xenobióticos.

La *pericanalicular* engloba el 13 % restante de la superficie plasmática. Este dominio tiene sus propias características morfológicas y funciones especializadas. La pared del canalículo biliar está formada por una estría (hemicanalículo) en un lateral de la membrana plasmática de dos hepatocitos adyacentes. El elevado contenido en colesterol de este dominio explica su bajo grado de fluidez, lo cual influye en la actividad de las glicoproteínas integrales de la membrana con las funciones enzimáticas. Aquí se localiza la proteína transportadora de sales biliares del canalículo, el intercambio de $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ y los sitios de reabsorción del glutamato y de la glicocola. Entre sus contenidos enzimáticos hay que destacar la 5' nucleotidasa, la γ -glutamil-transferasa, la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa.

La polaridad secretora de los hepatocitos hace que funcionen simultáneamente como glándulas exocrinas y metabólicas, por lo cual requieren

una perfecta organización del sistema intracelular para encaminar los productos generados hacia los distintos destinos (24).

Las *células de Kupffer* constituyen el 15% de la población de células hepáticas y poseen el 2,5% de las proteínas totales del hígado. Fueron descubiertas por Carl von Kupffer en 1868 (25), como macrófagos fijos en forma de estrella y suponen del 80 al 90% de los macrófagos tisulares del sistema retículo endotelial. Se encuentran ancladas a las células endoteliales por largas protuberancias citoplasmáticas (pseudópodos), y algunas de estas protuberancias atraviesan a menudo las fenestras y llegan hasta los hepatocitos. Las células de Kupffer difieren de todos los tipos de células hepáticas y parecen ser el estadio final de las series mononucleares fagocíticas derivadas de monocitos o de células progenitoras de la médula ósea. Se encuentran predominantemente en el área perivenosa del acino. Su reparto intraacinar es como sigue: 43% en el área periportal; 32% en el área mediozonal y 25% en el área perivenosa. Las que se encuentran cerca del terminal portal son más grandes, contienen mayor número de lisosomas y son más activas en la fagocitosis. Las células de Kupffer más pequeñas son las que se sitúan en la vecindad del terminal venoso, las cuales son más activas en la generación de citoquinas y en su capacidad citotóxica. Tanto el número como la actividad de las células Kupffer puede variar según las condiciones inmunológicas y fisiopatológicas del hígado. Las células de Kupffer poseen la morfología típica y el comportamiento de los macrófagos. Sus características ultraestructurales unidas a la abundancia de lisosomas y vesículas pinocíticas y la variedad de enzimas lisosómicos, reflejan el papel prominente de estas células en la degradación de partículas y sustancias tomadas del torrente circulatorio. Su estratégica localización en el sinusoides hepático, las coloca en una posición ideal para liberar la sangre portal de microorganismos y toxinas derivados del tubo digestivo.

Los *lipocitos*, también denominadas células Ito, perisinusoidales, parasinusoidales, estrelladas y células acumuladoras de grasa, se sitúan en hígado normal en el espacio de Disse, detrás de las células endoteliales. No están en contacto con el torrente circulatorio y tienen un fenotipo doble: quiescente y proliferativo. En hígado sano se expresa el fenotipo quiescente (baja actividad proliferante y larga vida). Contienen gotitas de lípidos ricas en vitamina A, retículo endoplásmico rugoso moderadamente desarrollado, cantidades moderadas de elementos citoreguladores y un número pequeño de mitocondrias y lisosomas. Estas células se encuentran en contacto con haces de colágeno intersticial.

En enfermedad crónica hepática los lipocitos adquieren el fenotipo activo proliferante y su morfología se altera adquiriendo características de

miofibroblastos. Desarrollan un retículo endoplásmico rugoso dilatado, acumulan numerosos polisomas, microtubulos y filamentos y haces de filamentos de actina. La activación suele acompañarse por la pérdida de las gotitas de lípidos. En el tránsito de quiescente a proliferativo estas células pierden gran parte de las gotas de grasa características del fenotipo quiescente.

Entre las funciones conocidas de los lipocitos están las siguientes:

1. incorporación, almacenamiento y liberación de retinoides;
2. síntesis y secreción de proteínas de la matriz extracelular;
3. síntesis y secreción de metaloproteinasas degradadoras de la matriz extracelular, como también del inhibidor tisular de las metaloproteinasas;
4. participación en el entramado de comunicación intercelular por síntesis y secreción de citoquinas y factores del crecimiento y por expresión de los receptores de las citoquinas;
5. contracción del lumen sinusoidal en respuesta a endotelina-1, trombina, angiotensina II, tromboxano A₂ y prostaglandina F₂α;
6. dilatación del lumen sinusoidal en respuesta a la prostaglandina I₂ y prostaglandina E₂ y a los agentes que elevan el AMP cíclico.

Las células pit, descubiertas por Wisse en 1970 (26), son el cuarto tipo de células sinusoidales. Estas células son las únicas, entre las células sinusoidales, que pueden ser consideradas como células asesinas naturales (NK) residentes en hígado. Las NK representan una población de linfocitos diferente de los linfocitos T y B, que son capaces de matar «espontáneamente» una serie de líneas celulares tumorales sin necesidad de activación o inmunización previa. No están restringidas a los antígenos de histocompatibilidad para el reconocimiento de los objetivos. Son muy activas como resultado de un influjo o marginación de las naturales asesinas periféricas en el sinusoides. Se ha demostrado que las células pit se originan en el ambiente sinusoidal, a partir de linfocitos grandes granulares sanguíneos, que se diferencian en células de elevada densidad y posteriormente en células de baja densidad. Los sinusoides contienen una población heterogénea de linfocitos, de la cual los linfocitos granulares grandes o células pit son solo un elemento. El nombre de «células pit» deriva de sus gránulos citoplasmáticos característicos electrón densos que se asemejan a las pipas de la fruta. Son

células linfoides grandes con polaridad densa y pseudópodos que se adhieren a la pared sinusoidal. El número de células pit en el hígado puede elevarse por administración de interleuquina-2 o por una amplia variedad de moduladores de la respuesta biológica, lo cual representa un mecanismo de defensa frente a situaciones patológicas.

Las *células endoteliales* constituyen el 20% de las células hepáticas y poseen sólo el 3,3 % del contenido proteico. Son células con delgadas extensiones que contienen poros (fenestras) dispuesta a modo de colador. Estas fenestras permiten el contacto directo entre aquellas células localizadas detrás de la barrera endotelial y el plasma. Las células endoteliales fenestradas forman una barrera física que permite el contacto directo de los hepatocitos con la mayoría de proteínas plasmáticas en el espacio de Disse, pero que previene la interacción directa de los hepatocitos con las células sanguíneas, los grandes quilomicrones, los virus y las bacterias.

Las fenestras además de servir de filtro, poseen una acción dinámica. Son más grandes en los espacios periportales, pero más numerosas en los venosos. Las células endoteliales poseen capacidad endocítica.

Canales de comunicación intercelular

Son zonas de la superficie de los hepatocitos que se unen mediante complejos de comunicación consistentes en:

1. *desmosomas (macula adherens)*, proporcionan la adherencia en las células en contacto
2. *tight junctions (zonula occludens)*, o *zonas de oclusión*, separan el grueso de las fases fluídas y mantienen la segregación entre los dominios basolateral y apical,
4. *gap junctions (macula communication)* o *canales de comunicación*, son orgánulos de membrana que consisten en canales que cruzan la membrana de células adyacentes para formar una vía intercelular de baja resistencia. Están compuestos por numerosos conductos denominados conexones que unen el citoplasma de una célula con el de la célula adyacente. Cada conexon está compuesto por seis polipéptidos homogéneos denominados conexinas. Las conexinas están unidas en forma hexagonal delineando el poro (27). En células adyacentes, cada célula forma sus propios conexones, los cuales se

combinan con los conexones de la célula adyacente para formar el conducto. Numerosos conexones se encuentran frecuentemente juntos en la placa denominada «gap junction». El tamaño de las moléculas que pueden pasar los conexomes no pueden ser mayores que 1000 daltons. Funcionalmente los *gap junctions* parecen ser importantes en el mantenimiento la homeostasis celular en los hepatocitos adultos. La agresión hepática física o química modifica la comunicación intercelular mediada por estas estructuras. El bloqueo de esta comunicación intercelular por agentes tóxicos interfiere con la transferencia de sustancias de bajo peso molecular entre las células. Cuando una célula muere por necrosis o apoptosis se cierra esta comunicación en las células adyacentes viables para evitar la transferencia de metabolitos tóxicos o iones (calcio) procedentes de las células en proceso de morir. Los *gap junctions* de los hepatocitos son importantes en el funcionamiento normal de la células y del hígado (Figura 7)

En secciones delgadas de tejido, los desmosomas son aparentemente bastante lábiles y en el proceso de disociación tisular se desbaratan. Las tight y las *gap junctions* entre hepatocitos sobreviven a la disociación mecánica del hígado en pares de hepatocitos (Figura 7)

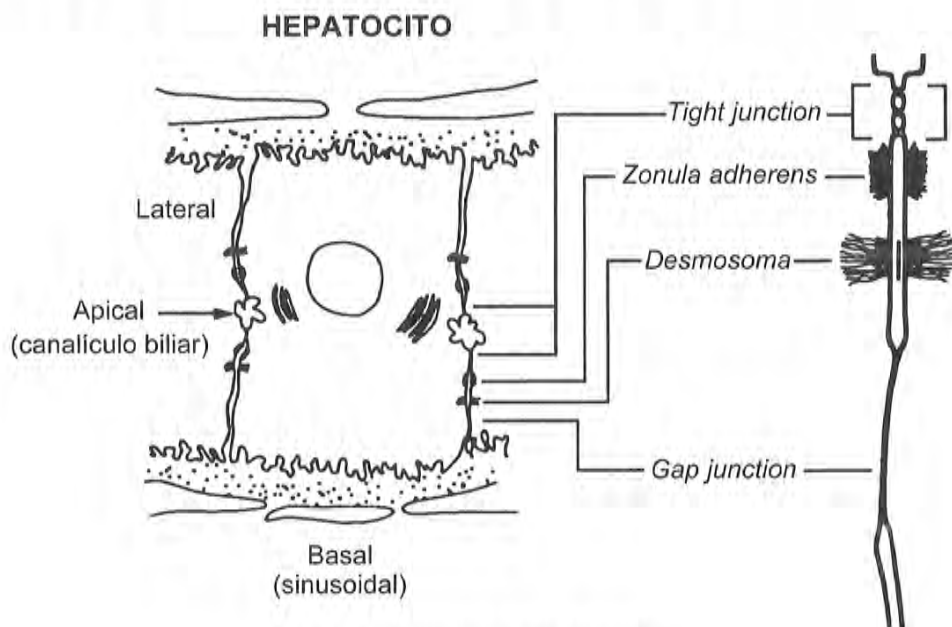


FIGURA 7. Comunicación intercelular.

6. HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DEL HÍGADO. ZONACIÓN METABÓLICA

Los hepatocitos no son una población celular homogénea ya que contribuyen de manera diferente a los diversos procesos metabólicos dependiendo de su localización intraacinar. Ya en el siglo pasado varios autores describieron el fenómeno de heterogeneidad del parénquima hepático (28, 29, 30). Cien años después con el advenimiento de la histoquímica y la microdissección quedó claro que existe una distribución heterogénea de los enzimas en el interior del lóbulo hepático. Estas observaciones adquirieron una nueva dimensión cuando se propuso que la distribución heterogénea de enzimas era la causa de la compartimentación de los procesos metabólicos. El modelo conceptual de la organización hepática se definió entonces, no sólo en el sentido anatómico estricto, sino por áreas de especialización metabólica o «zonación metabólica» (31)

El concepto de unidad estructural del hígado que englobe la totalidad de las células hepáticas para formar una unidad funcional se encuentra aún en debate. El clásico lóbulo en su modificación de «zona falciforme» se caracteriza por una zona de flujo de sangre directamente del tracto portal que forma zonas falciformes de equipotencial hemodinámico. El acino, por el contrario, se define como un influjo lineal de sangre que forma estructuras de tipo granuloso de equipotencial hemodinámico alrededor del eje vascular aferente. De acuerdo con el flujo sanguíneo pueden delimitarse dos regiones, tanto en el acino como en la zona falciforme de los lóbulos: la región periportal (aferente) regada por sangre rica en oxígeno, sustratos y hormonas, y la región perivenosa (eferente) que recibe sangre pobre en oxígeno, sustratos y hormonas, pero rica en CO_2 y otros productos. Por todo ello, anatómicamente, los hepatocitos están distribuidos en tres áreas, definidas por su proximidad a los terminales circulatorios: periportal, mediozonal y perivenosa; mientras que funcionalmente, se considera que los hepatocitos residen en acinos, compuestos por tres zonas metabólicas (Figura 2):

Zona 1: Mayor cantidad de sustratos y oxígeno, cercana al área periportal.

Zonas 2 y 3: Alejadas del área periportal y del aporte vascular.

A nivel del *metabolismo energético oxidativo* el catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos a acetil CoA es posible sólo en presencia de oxígeno, por tanto, los hepatocitos periportales se encuentran equipados preferente-

mente con alanina aminotransferasa, tirosina aminotransferasa y β -hidroxi-butiril CoA deshidrogenasa (31). El catabolismo inicial de la glucosa (en su parte glucolítica), como también la liponeogénesis, son procesos exergónicos posibles en ausencia de oxígeno, por tanto, las células perivenosas son las que poseen predominantemente los enzimas clave de la glucolisis: la glucoquinasa (32), la piruvato quinasa (33) y enzimas generadores de NADPH, todos ellos implicados en la síntesis de ácidos grasos (34). Un proceso que depende del NADPH, como la ureagénesis a partir de aminoácidos, mecanismo general de detoxificación, se localiza también en la zona perivenosa. Todos los hepatocitos catalizan la oxidación final a CO_2 , pero las células periportales al recibir más oxígeno son más capaces verificar el metabolismo oxidativo, ya que contienen un mayor número de mitocondrias, y poseen actividades más elevadas de los enzimas del ciclo tricarbóxico y de la cadena respiratoria. La gluconeogénesis es un proceso endergónico que ha de acoplarse al catabolismo oxidativo, de ello que su localización sea predominante en las células de la región periportal, con la localización de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, la glucosa-6-fosfatasa y la lactato deshidrogenasa (35). El metabolismo del glucógeno parece estar distribuido heterogéneamente dentro del parénquima hepático ya que todos los hepatocitos pueden sintetizar y degradar glucógeno, pero el tiempo y la velocidad de estos procesos son diferentes en células periportales o perivenosas.

Respecto a la *biotransformación*, el hígado es el principal órgano cuando se trata del metabolismo y eliminación de los xenobióticos. Las sustancias extrañas son detoxificadas por oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación. La oxidación está, en su mayoría catalizada por monooxigenasas dependientes del NADPH ubicadas en el retículo endoplásmico liso. Este retículo predomina en la región perivenosa y se induce en esta zona por los barbituratos. Por ello, no sólo los enzimas generadores de NADPH, sino también los enzimas consumidores de NADPH, como la citocromo P-450 NADPH reductasa y la glutatión reductasa predominan en las inmediaciones del terminal venoso. Puede por tanto, concluirse que la biotransformación de los xenobióticos es una función preferencial del espacio venoso, y por ello, los hepatocitos ubicados en esta zona muestran una susceptibilidad mayor frente a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos formados a través de las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450 o de flavina.

Aunque todos los hepatocitos tienen el mismo genoma, las diferencias zonales se detectan en las pautas de expresión de los genes de la mayoría de los enzimas clave. Esta zonación de la activación genética en el acino

TABLA 1. Zonación de las principales vías metabólicas en hígado (20).

Zona Periportal	Zona perivenosa
Metabolismo oxidativo y energético	Glucolisis
Oxidación de ácidos grasos	Lipogénesis
Gluconeogénesis	Monooxigenación (P-450)
Síntesis del colesterol	Conjugación del glutathion
Ureagénesis	Glucuronidación
Producción de ácidos biliares	
Peroxidación del glutathion	

hepático se origina por la heterogeneidad en la entrada y transmisión de señales originadas por:

- (a) sustratos, incluyendo el oxígeno y sus productos, hormonas, mediadores e inervación;
- (b) interacciones célula-célula, e
- (c) interacciones célula-matriz extracelular

Las pautas de expresión zonal pueden ser seguidas a diferentes tasas de transcripción, degradación del mRNA, traducción del mRNA o degradación de proteínas. La zonación del mRNA y proteínas en la misma área indica que la expresión del gen se regula principalmente a nivel pre-traducciona l o por degradación del mRNA. Pautas zonales desiguales de mRNA y proteínas implica que la expresión se regula a nivel traduccional o post-traducciona l.

La expresión de genes de enzimas que controlan la gluconeogénesis: fosfoenol piruvato carboxiquinasa y fructosa 1,6, bis-fosfatasa, como también los enzimas que metabolizan aminoácidos: serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa, se regulan a nivel pre-traducciona l. Estudios de hibridación *in situ* en hígado de rata, han revelado que el mRNA de los enzimas anteriormente mencionados se encuentra principalmente en la zona periportal, así como también las proteínas y las actividades enzimáticas. También se ha detectado que los mRNA y actividades de estos enzimas se encuentran más elevados al final del período de ayuno y descienden después de la alimentación. Estas alteraciones controladas por los nutrientes en la expresión genética durante un ritmo normal de alimentación y ayuno, se denominan zonaciones metabólicas (20).

Por el contrario, los genes que controlan los enzimas glucolíticos: glucoquinasa y piruvato quinasa tipo L, se regulan principalmente a nivel traduccional y post-traduccional durante un ritmo de alimentación normal. Los mRNA de estos enzimas se distribuyen homogéneamente en el parénquima, mientras que las proteínas y actividades enzimáticas muestran una clara predominancia perivenosa. La zonación de estos enzimas es dinámica, con actividades incrementadas con el alimento y disminuídas en el ayuno.

Los genes de los enzimas clave de la destoxicación del amonio, se regulan también a nivel pre-traduccional. El mRNA y las proteínas del enzima ureogénico carbamilo fosfato sintetasa, se localizan en las zonas periportal y perivenosa proximal. El mRNA y la proteína de la glutamina sintetasa se encuentra exclusivamente en el área perivenosa distal. Curiosamente, ninguno de los mRNA ni proteínas de estos dos enzimas cambia según el estado nutricional, por lo que esta pauta de expresión se denomina zonación estable.

Las funciones de las células no parenquimáticas también muestran una heterogeneidad a lo largo del acino hepático, lo cual parece ser un requisito para el funcionamiento del órgano.

Las *células endoteliales*, que actúan como un filtro entre la sangre y los hepatocitos, poseen fenestras o poros que son más pequeños y numerosos en el área perivenosa, con lo cual en esta zona acinar es mayor la capacidad de filtrado.

Las *células de Kupffer* son más numerosas y poseen mayor capacidad endocítica y actividad lisosómica en el área periportal, mientras que están dotadas con actividad citotóxica mayor en la zona perivenosa.

Los *lipocitos* son más numerosos en la zona periportal, ya que es este el lugar acinar donde se concentra la formación de la matriz y el almacenamiento de vitamina A.

Las *células pit* exhiben actividad de células naturales asesinas sobre células tumorales cuya eliminación ocurre principalmente en el área periportal.

7. ECOLOGÍA SOCIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS

La yuxtaposición de las diversas poblaciones celulares y los componentes de la matriz extracelular, en armonía con la angioarquitectura, da como

resultado un delicado sistema bioecológico. Las investigaciones hepatológicas de los últimos años, han proporcionado y continúan proporcionando, asombrosos descubrimientos acerca de las interacciones y la regulación entre los diferentes tipos celulares y los componentes de la matriz del órgano. Estos descubrimientos están llevando a diseñar una nueva ciencia donde se unen la ecología y la sociología de las células hepáticas (36). Ejemplos se incluyen en las múltiples interacciones del metabolismo celular con el complicado mundo de las citoquinas (Figura 8)

Las interacciones bien coordinadas entre los hepatocitos incluyen las siguientes:

- (i) vías metabólicas recíprocas, localizadas en territorios lobulares (acinares) diferentes, para el metabolismo de los carbohidratos y el amonio;

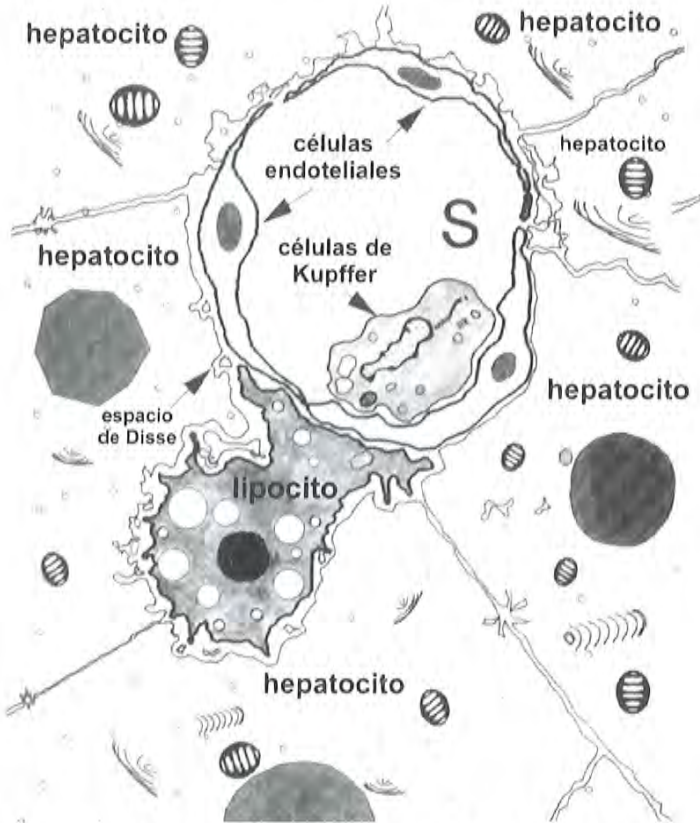


FIGURA 8. Modelo de sinusoide hepático (5) en hígado normal por microscopía electrónica (36)

- (ii) comunicaciones intercelulares a través de canales de comunicación (gap junctions) que muestran su propia heterogeneidad zonal; y
- (iii) señales intercelulares a través de moléculas de superficie.

Las interacciones de los hepatocitos con las células de Kupffer, son tan evidentes que volúmenes enteros están dedicados a este tema (37). Las interacciones de los hepatocitos con las células endoteliales, implican la modulación hepatocelular del fenotipo endotelial y la producción endotelial de prostaglandinas, endotelina y citoquinas, tales como las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6) y el factor del crecimiento de los hepatocitos (HGF). Las señales emitidas por los lipocitos comprenden la liberación de péptidos estimuladores de las células parenquimáticas, de citoquinas inhibitoras del crecimiento (TGF β), como también de citoquinas estimuladoras de la proliferación (HGF). Las células de Kupffer se adhieren a las células endoteliales, mediante la expresión por las últimas de receptores de superficie CD4 e ICAM-1, e inician la activación de los lipocitos, mediante la expresión del receptor del TGF β , por secreción de un factor estimulador de los lipocitos. La matriz extracelular en el espacio de Disse, modula el fenotipo y la función de las células endoteliales, los lipocitos y los hepatocitos. La heterogeneidad zonal de la matriz a lo largo del eje portal-central, se relaciona con el concepto del *streaming liver* (38), y determina la expresión fenotípica y la activación de genes específicos en zonas o compartimentos particulares en el parénquima. Además, la composición de la matriz extracelular en puntos específicos, es crucial para la modulación más fina de la señalización intercelular.

Las fibras nerviosas hacen contacto con cada hepatocito e influyen su actividad metabólica. Metabolitos, hormonas y citoquinas procedentes de la sangre sinusoidal afectan la actividad de las células parenquimáticas y sinusoidales, de acuerdo con los gradientes y la densidad de los receptores celulares. Las células del epitelio ductular biliar (los colangiocitos), pueden actuar sobre la función hepatocelular por contacto directo a través del sistema portal peribiliar y del ciclo cole-hepático (39).

Las condiciones patológicas tales como la fibrosis y la cirrosis, reflejan alteraciones en el equilibrio de las innumerables interacciones celulares, mientras que el crecimiento desmedido de la neoplasia refleja una rotura de las leyes sociales del hígado. Los años venideros nos han de proporcionar una información detallada y variada sobre los mecanismos moleculares de ciertas de las funciones biológicas celulares, tales como la regulación de la expresión génica, los mecanismos de la coleresis y la colestasis, las vías que con-

ducen a la fibrogénesis, la estimulación del crecimiento y la regeneración, los linajes celulares en la carcinogénesis y las etapas cruciales en la lesión y muerte celulares. Son de esperar progresos importantes para desentrañar síndromes tales como las alteraciones que conllevan a la desaparición de los conductos biliares, y los mecanismos inmunológicos en enfermedades autoinmunes y víricas, en el rechazo de los trasplantes, y en las enfermedades derivadas del injerto frente a su horpedador. Las poderosas armas de la biología molecular han de ayudar a establecer terapias genéticas adecuadas en enfermedades metabólicas descubiertas y en las por descubrir.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kiernan F (1833) The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Biol* **123**, 711-770
2. Mall FP (1906) A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat* **5**, 227-308
3. Rappaport A (1954) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus) *Anat Rec* **130**, 673-689
4. Saxena R, Theise ND y Crawford JM (1999) Microanatomy of the human liver. Exploring the hidden interfaces. *Hepatology* **30**, 1339-1346
5. Matsumoto T, Komori R, Magara T, Ui T, Kawakami M, Tokuda T, Takasati S et al., (1979) A study on the normal structure of the human liver with special referente to its angioarchitecture *Jikeikai Med J* **26**, 1-40
6. Gumucio JJ, Biliar BM, Moseley RH y Berkowitz CM (1994) Liver cell plate. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. 3ª edición, (Eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA y Shafritz DA), pp 1143-1163. Raven Press, Ltd., Nueva York.
7. Riolan J (1649) Encheiridium Abatomicum et Pathologicum, citado por Whitteridge G, en: William Harvey and the circulation of the Blood, p 181, McDonald, London & American Elsevier, Nueva York, 1971; y citado por Witte CL & Witte MH en: The liver. Normal and Abnormal functions, p 12, 1974
8. Witte CL y Witte MH (1974) Hepatic circulation. En: *The liver. Normal and abnormal functions*, **part A** (ed Becker FF) pp 11-54, Marcel Dekker, Inc, Nueva York
9. McCuskey R (1994) The hepatic microvascular system. En: *The liver: Biology and Pathobiology*, 3ª edición (eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB Schachter DA y Shafritz DA. pp 1089-1106. Raven Press, Ltd, Nueva York.
10. McCuskey R (1996) A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat* **119**, 455-478.

11. Ekataksin W y Wake K (1997) New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. *Prog Liv Dis* **15**, 1-30
12. Elias H (1949) A re-examination of the structure of the mammalian liver II: the hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary systems *Am J Anat* **85**, 379-456
13. Niiro GK y O'Morchoe CCC (1986) Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat. *Anat Rec* **215**, 351-360
14. Hering E (1865) Uber den Bau der Wirbeltierleber, Sitzber. *Akad Wiss Wien, Math Naturic Kl* **54**, 496-515
15. Theise ND, Saxena R, Portman BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A y Crawford JM (1999) The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-1433.
16. Bioulac-Sage P, Lafon ME, Saric J, Balabaud C (1990) Nerves and perisinusoidal cells in human liver *J Hepatol* **10**, 105-112
17. Lauth WW (1980) Hepatic nerves: a review of their functions and effects. *Can J Physiol Pharmacol* **58**, 105-123
18. LeSage G, Alvaro D, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Eisen W, Caligiuri A et al., (1999) Cholinergic system modulates growth, apoptosis and secretion of cholangiocytes from bile duct-ligated. *Gastroenterol* **117**, 191-199
19. Jungermann K y Thurman R (1992) Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* **46**, 72-93
20. Jungermann K y Kietzmann T (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* **16**, 179-203
21. Desmet VJ (1992) Modulation of the liver in cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* **7**, 313-323.
22. Geerts A, De Bleser P, Hautekeete ML, Niki T y Wisse E (1994) Fat storing (Ito) cell biology. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. 3ª edición, (Eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA y Shafritz DA), pp 819-838. Raven Press, Ltd, Nueva York.
23. Sellinger M, Barret C, Malle P, Gordon ER y Boyer JL (1990) Criptic Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat liver canalicular plasma membranes: Evidence for its basolateral origin. *Hepatology* **11**, 223-229
24. Desmet VJ (1990) The hepatocyte: Structural specialization and functional integration. En: *Systematic and quantitative hepatology. Pathophysiological and methodological aspects*. pp 43-50 (eds Molino G y Avagnina P) Masson, Milan. 24ª.
25. von Kupffer C (1886) Uber Sternzellen der Leber. *Arch Mikrosk Anat Entwcklgesch* **12**, 353-358
26. Wisse E y Daems WT (1970) Fine estructural study on the sinusoidal lining cells of rat liver. En: *Mononuclear phagocytes* (ed Van Furth R) pp 200-215, Blackwell, Oxford.

27. Lowenstein WR (1981) Junctional intercellular communication: the cell to cell membrane channel. *Physiol Rev* **61**, 829
28. Jones HC (1946) On the secretory apparatus of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 473-481
29. Jones HC (1853) Further inquiries as to the estructure, development and function of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1-28
30. Beale LS (1856) The minute anatomy of the liver. *Med Times Gazette* **13**, 82-85
31. Welsh FA (1972) Changes in the distribution of enzymes within the liver lobule during adaptative increases. *J Histochem Cytochem* **20**, 107-111
32. Fischer W, Ick M y Katz N (1982) Reciprocal distribution of hexoquinase and glucokinase in periportal and perivenous rat liver tissue. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **363**, 375-380
33. Guder WG y Schmidt U (1976) Liver cell heterogeneity. The distribution of pyruvate kinase and phophoenolpyruvate carboxy kinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **357**, 1793-1800
34. Gibson DM, Lyons RT, Scott DF et al. (1972) Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Adv Enz Reg* **10**, 187-204
35. Katz NR (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* **122**, 843-849
36. Gressner AM y Bachem MG (1995) Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* **56**, 335-346.
37. Billiar TR y Curran RD editores (1992) Hepatocyte and Kupffer cells interactions. Londres CRC Press
38. Zajicek G (1992) Time dimension in histopathology. *Pathol Res Pract* **188**, 410-412
39. Popp JA y Cattley RC (1991) Hepatobiliary system. En: *Handbook of Toxicologic Pathology* (eds WM Haschek y CG Rousseaux) pp 279-314. Acad Press Inc, Nueva York, Londres.

VULNERABILIDAD DEL HÍGADO A LA LESIÓN TÓXICA

SUMARIO

1. Introducción
2. Lesión hepática inducida por xenobióticos
3. Biotransformación de hepatotóxicos y generación de radicales libres
4. Mecanismos involucrados en la lesión hepatocelular
 - 4.1. Efecto directo de un tóxico sobre sistemas celulares
 - 4.2. Formación de metabolitos reactivos
 - 4.3. Glutathion, oxidación de grupos tiólicos. Estrés oxidativo
 - 4.4. Calcio citoplasmático
5. Apoptosis y necrosis
6. Muerte celular y enfermedad hepática
7. Conclusiones
8. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

Ante el incesante aumento de agentes químicos a los que se encuentra continuamente sometido el hombre y cualquier ser vivo, la susceptibilidad del hígado a ser lesionado por estos agentes es consecuencia del destacado papel que juega este órgano en el proceso de su biotransformación. La hepatotoxicidad de estos xenobióticos es un fenómeno que depende de la dosis y del tiempo y que es reversible en las etapas iniciales de la intoxicación, siempre que se elimine la exposición al tóxico. Sin embargo, la intoxicación severa puede conducir a la necrosis hepatocelular e incluso a la muerte del organismo. Existen diversas razones que contribuyen a potenciar la vulnerabilidad del hígado frente a la agresión de los hepatotóxicos. Entre ellas cabe citar como las más directas aquellas que derivan: de la

elevada concentración que alcanzan los tóxicos de naturaleza liposoluble en el interior del órgano, de las transformaciones metabólicas que sufren las sustancias tóxicas en el interior del hepatocito y de la posición del hígado como puerta de entrada hacia los tejidos (1, 2).

La muerte de la célula hepática se desencadena por una serie de agresiones que surgen del ambiente externo o desde el interior de la célula. Estas agresiones pueden comprometer a receptores de la superficie celular con dominios de muerte lo cual conduce a una cascada proteolítica que implica a caspasas iniciadoras y ejecutoras y a una muerte por apoptosis. Alternativamente, las agresiones puede alterar profundamente la función mitocondrial y ocasionar una pérdida de la homeostasis acompañada por activación de hidrolasas y una muerte necrótica o lítica. La distinción entre estas dos formas de muerte se encuentra controvertida, porque se ha reconocido que el mismo estímulo puede inducir una u otra y que puede producirse apoptosis independiente de la caspasa. Las mitocondrias juegan un papel clave en la forma de muerte celular. Así, la liberación selectiva de mediadores amplifica el programa apoptótico, mientras que una pérdida profunda en la función mitocondrial conduce a la necrosis. Los metabolitos reactivos de oxígeno y el óxido nítrico participan como factores iniciadores y moduladores.

2. LESIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR XENOBIÓTICOS

Entre las causas más corrientes de enfermedad hepática se encuentran aquellas lesiones producidas en este órgano por efecto de los xenobióticos. Una porción considerable de fármacos y agentes que contaminan el medio ambiente se encuentran clasificados entre los xenobióticos hepatotóxicos los cuales originan lesiones hepáticas de tipo muy diverso: necrosis en su triple aspecto (zonal, masiva o difusa), esteatosis, colestasis, fibrosis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y colangiocelular alteraciones circulatorias intra-hepáticas. La respuesta hepatotóxica del hígado depende de la concentración del tóxico y se produce, principalmente a través de la formación de especies químicas reactivas que se generan en el proceso de biotransformación del agente tóxico. Estas especies químicas se trasladan a las diferentes regiones del acino por el flujo sanguíneo. El acino hepático consiste en parénquima centrado alrededor de ramas terminales de la vena porta o la arteria hepática que drenan hacia la vena hepática (vena central). El flujo de sangre desde la región portal a la región venosa origina 3 zonas microcirculatorias en el acino donde residen las células. Las células en la zona 1 son las que se encuentran más cercanas a los vasos aferentes y reciben las

mayores concentraciones de oxígeno y nutrientes. Las células en la zona 2 se encuentran más allá (mediozonal) y las de la zona 3 descansan cerca del terminal venoso. Este gradiente de oxígeno y nutrientes es lo que lleva a establecer la zonación de las funciones metabólicas del hígado. Así, los hepatocitos de la zona 1 (aferente) y de la zona 3 (eferente) difieren en contenido de enzimas y de metabolitos y de capacidad metabólica. Por ejemplo, los hepatocitos de la zona 1 poseen mayor número de mitocondrias y una tasa mayor de respiración que las células de la zona 3. Sin embargo, estudios con hígado perfundido han demostrado que la zonación de los procesos metabólicos a lo largo del acino hepático puede cambiar si se altera el flujo de anterogrado a retrogrado (3). Esto indica que la mayor parte de los procesos metabólicos dependen del suministro de nutrientes, cofactores o agentes químicos.

La zonación intraacinar tiene gran importancia en casos de toxicidad inducida por fármacos. Las hepatotoxinas producen letalidad característica en zonas específicas debido en parte a la diferente expresión de enzimas y de gradientes de cofactores y tóxicos en la sangre a lo largo del acino. La mayoría de sustancias hepatotóxicas producen necrosis, lo cual implica una pérdida de la homeostasis celular en trectos contiguos de células, que va a dar lugar a hinchazón de la célula, formación de protuberancias en la membrana y rotura y destrucción de los orgánulos.

3. BIOTRANSFORMACIÓN DE HEPATOTÓXICOS Y GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES

Debido al proceso de biotransformación una gran parte de las hepatotoxinas se transforman en compuestos más tóxicos que el compuesto original. Estos compuestos reactivos se clasifican en: *compuestos electrofílicos*, con capacidad para reaccionar covalentemente con las macromoléculas celulares o *radicales libres* con capacidad para iniciar la peroxidación lipídica. Unos y otros al encontrarse en exceso en el interior del hepatocito, reaccionan con el grupo -SH del glutatión haciendo disminuir con ello la concentración celular de este tripéptido. Estos eventos encadenados con otros, conducen a alteraciones que ocasionan una serie de lesiones de tipo funcional y/o estructural, que en casos de intoxicación masiva o de naturaleza idiosincrásica conducen inexorablemente a la muerte celular.

Para abordar el estudio de las disfunciones hepáticas producidas por sustancias tóxicas, se cuenta en la actualidad con una serie de modelos de

hepatotoxicidad inducida experimentalmente. Estos modelos proporcionan sistemas *in vivo* e *in vitro* de una gran utilidad para profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de las alteraciones moleculares, funcionales y estructurales y de los mecanismos de defensa que posee el hígado para prevenir o reparar la lesión tóxica (1, 2). Son muchos los xenobióticos que actúan como sustancias hepatotóxicas, y poseen capacidad de generar necrosis hepática. En unos casos, el tóxico es el agente químico *per se* y en otros casos son tóxicos los metabolitos reactivos derivados de su biotransformación. La perhexilina, por ejemplo, se acumula directamente en el interior de los lisosomas donde al provocar una disminución de la actividad de las fosfolipasas, origina una fosfolipidosis hepática (4). El 5-fluorouracilo, un agente antineoplásico, se convierte en ácido fluorodesoxiuridílico, inhibidor de la timidilato sintetasa y por consiguiente, de la síntesis del DNA (5). La tioacetamida se transforma en tioacetamida S-óxido cuyos derivados reaccionan formando aductos con el grupo amino en ϵ de residuos de lisina en proteínas nucleares (6) y el tetracloruro de carbono se convierte en el radical CCl_3 , agente promotor de la peroxidación lipídica (7). El acetaminofeno, así como una gran cantidad de fármacos, se transforman en metabolitos químicamente reactivos que presentan una elevada hepatotoxicidad (8). El pirprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, posee una estructura de 2-arilpropionato que transforma su anillo pirrolínico y da lugar a los metabolitos reactivos responsables de un tipo de ictericia hepatocelular idiosincrásica, que suele declararse en pacientes susceptibles. El grupo propionato de este mismo fármaco es capaz, por otro lado, de formar un derivado propionil-Coenzima A, inhibidor de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, con lo cual se origina una esteatosis microvesicular (9). Existen, por tanto, mecanismos de hepatotoxicidad muy diversos según la amplia variedad de estructuras químicas de los agentes tóxicos y de la complejidad de la célula hepática. Una toxina puede interferir con la actividad de un enzima, con la función de un transportador o con la de un mecanismo regulador.

A pesar de la dificultad que entraña la gran diversidad de mecanismos de hepatotoxicidad producidos por los xenobióticos, los progresos conseguidos en los últimos años han puesto en evidencia que el mecanismo más frecuente de hepatotoxicidad se origina a través de la formación de *especies químicas reactivas*, entre las cuales cabe distinguir: los *compuestos electrofílicos* productos de la biotransformación de tóxicos tales como la tioacetamida, el bromobenceno y el acetaminofeno; los *radicales libres* derivados de compuestos tales como el tetracloruro de carbono y las «especies activas de oxígeno», formadas en reacciones oxidativas por reducción (adición de electrones) del oxígeno molecular.

Las *especies químicas reactivas* originan una serie de alteraciones moleculares por su capacidad de reaccionar mediante enlace covalente con macromoléculas celulares y con el grupo -SH del glutatión. Los metabolitos electrofílicos se clasifican en fuertes y débiles de acuerdo con la densidad de carga polarizada que posean. Los metabolitos electrofílicos débiles reaccionan generalmente con los grupos -SH de la cisteína o la metionina, el -NH₂ de la lisina o arginina o el —NH— de la histidina (10). La unión covalente entre el metabolito y la proteína puede alterar la estructura y la función proteica disminuyendo con ello la actividad de un enzima, la función de un transportador, etc. Por otro lado, los metabolitos electrofílicos fuertes pueden unirse a lugares nucleofílicos relativamente fuertes de las moléculas de ácidos nucleicos, y ocasionar mutagénesis y cáncer. Esto explica el por qué algunas especies reactivas son necrogénicas mientras que otras son mutagénicas y carcinogénicas. Esta distinción, sin embargo, no es absoluta, ya que existen compuestos que son a la vez necrogénicos y carcinogénicos, bien porque la reactividad del metabolito electrofílico sea intermedia, o bien porque el agente hepatotóxico en su transformación origine metabolitos débiles y fuertes al mismo tiempo (11). La complejidad de las reacciones de los metabolitos electrofílicos con los grupos nucleofílicos celulares es, por tanto, consecuencia del concepto dual fuerte y débil. El átomo donador del *nucleófilo débil* es muy polarizable y poco electronegativo, lo que le hace fácilmente oxidable y que se asocie con orbitales de baja densidad. El átomo donador del *nucleófilo fuerte* es poco polarizable, muy electronegativo, se oxida difícilmente y se asocia con orbitales de alta energía, por supuesto inaccesibles. Por otro lado, el átomo aceptor de un *electrófilo débil* debe presentar una carga positiva baja, gran tamaño y poseer varios electrones externos fácilmente excitables. El átomo aceptor de un *electrófilo fuerte* es de carga positiva elevada, de tamaño pequeño y no presenta electrones externos excitables.

De acuerdo con la densidad de carga polarizada, en orden creciente, los metabolitos electrofílicos se clasifican como sigue: aldehídos y dobles enlaces polarizados < epóxidos, alquil sulfatos y alquil haluros < iones aril carbonio < iones bencil carbonio < iones alquil carbonio. Los sitios nucleofílicos de las macromoléculas se clasifican en siguiente orden creciente: grupos tiol (residuos cisteinil en proteínas y glutatión < átomos de azufre de los residuos metionil de las proteínas < grupos amino primarios y secundarios de las proteínas < grupos amino de las bases púricas en DNA y RNA < átomos de oxígeno de purinas y pirimidinas en DNA y RNA < átomos de oxígeno del fosfato en DNA y RNA (11).

Las alteraciones moleculares inducidas por el hepatotóxico producen una serie de modificaciones en la estructura y función de la célula hepática. Una de las primeras alteraciones es la peroxidación que sufren los lípidos integrantes de la membrana plasmática. La lipoperoxidación de estas membranas se manifiesta por una alteración en su permeabilidad (dispersión de los iones) y por la aparición de protuberancias en la superficie celular. Una serie de hepatotoxinas actúa inhibiendo la captación del calcio por los microsomas, debido probablemente a alteraciones en la permeabilidad de las membranas y/o a modificaciones en los grupos -SH de las proteínas que son críticas para el funcionamiento de las ATP-etas que dependen del calcio (12). Por tanto, si el calcio entra libremente en las células, si la captación por los microsomas y las mitocondrias es menor y la salida del calcio de la célula es también menor, se originará un incremento sostenido de la concentración del calcio citosólico (13). Este incremento, a su vez, activa un sistema no lisosómico, la fosfolipasa A₂, que origina la ruptura de las membranas con producción de productos citotóxicos derivados de ellas mismas (14). También, la activación de las endonucleasas, mediada por el Ca²⁺, conduce a una fragmentación del DNA causante en último término, de la muerte de los hepatocitos por apoptosis (15, 16). Por último, se ha observado una elevación en la actividad de la glucógeno fosforilasa a en hígado de rata tratada con CCl₄, diquat, acetaminofeno (17) y tioacetamida (18), indicativa de la elevación del Ca²⁺ *in vivo*. El incremento de calcio en el interior de la célula trae consigo, además, un descenso en la síntesis proteica, una menor formación de ATP, una disminución en la concentración de distintos efectores y una inhibición de actividades enzimáticas (19). Entre todas estas alteraciones es difícil delinear cual de ellas precede a la otra y cual es la determinante o la accesoria. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que consideran que una de las primeras manifestaciones que determina la lesión hepática y la muerte celular, es el incremento sostenido del calcio citoplasmático.

Los metabolitos reactivos débiles, tales como el acetaldehído, pueden abandonar con facilidad el lugar de su formación, mientras que los metabolitos con una reactividad mayor, debido a su inestabilidad y a que poseen una vida media muy corta, reaccionan en el propio lugar de su formación. La abundancia de citocromo P-450 en el hígado y la reacción *in situ* de los metabolitos reactivos, explica el importante papel que juegan éstos en la necrosis hepática inducida por xenobióticos. Esta reacción *in situ* del metabolito reactivo contribuye también a la localización de la necrosis hepatocelular. Los isoenzimas del citocromo P-450 se reparten de manera no homogénea en las diferentes áreas del acino hepático, de forma que son los hepatocitos perivenosos (centrilobulares) los que poseen una

mayor cantidad de citocromo P-450. Considerando que tales hepatocitos poseen menor cantidad de glutatión (20), las uniones covalentes de los metabolitos reactivos con las macromoléculas celulares afectan principalmente a la región perivenosa, que es donde suele iniciarse la necrosis hepatocelular.

4. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA LESIÓN HEPATOCELULAR

Los mecanismos mediante los cuales los hepatotóxicos lesionan las células hepáticas pueden incluirse en cuatro áreas no exclusivas, que pueden operar al mismo tiempo con un solo agente tóxico:

1. Efecto directo de un tóxico sobre sistemas celulares
2. Formación de metabolitos reactivos
3. Depleción del glutatión y oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas. Estrés oxidativo
4. Calcio citoplasmático

A veces diferentes mecanismos pueden operar según la dosis de la sustancia tóxica y está claro que no existe un simple botón pulsado por el tóxico que cause la muerte celular. Más bien es un número de acontecimientos celulares críticos, objetivos de los agentes tóxicos, los cuales activando o inhibiendo alguna función celular pueden desencadenar una serie de reacciones que conduzca a la muerte celular. Para comprender las bases fisiológicas de los efectos de los agentes tóxicos se necesita conocer la forma en la que la célula regula sus funciones críticas.

4.1. Efecto directo de un tóxico sobre sistemas celulares

El mecanismo más simple implicado en la citoletalidad es el efecto directo de un tóxico sobre sistemas celulares críticos. Fármacos o medicamentos tales como la clorpromazina y otras fenotiazinas, eritromicina y el desoxicolato pueden tener efectos directos surfactantes sobre la membrana plasmática del hepatocito. (21). La faloidina, toxina de los hongos, se une a la actina y altera el citoesqueleto lo que afecta a la permeabilidad de la membrana plasmática (22). Diversos xenobióticos e iones metálicos se unen a las membranas mitocondriales y a enzimas alterando el metabolismo

energético y la respiración celular. Muchos hepatotóxicos son inhibidores directos y desacopladores del transporte electrónico mitocondrial.

4.2. Formación de metabolitos reactivos

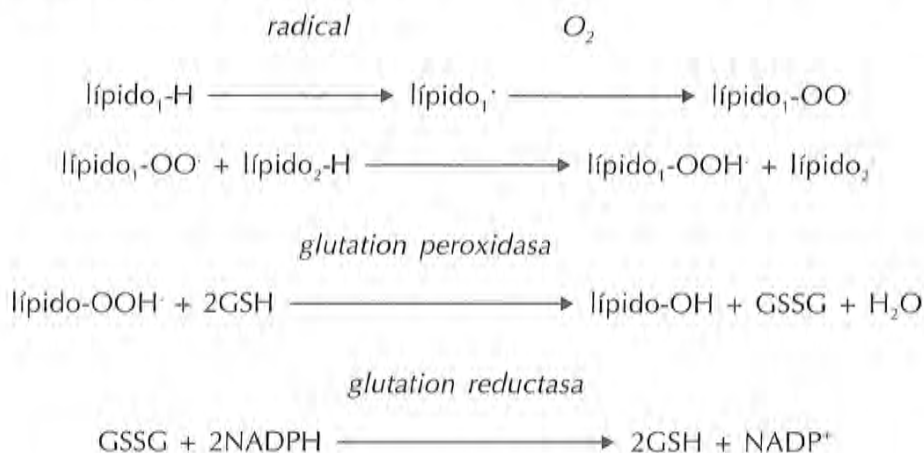
Un segundo mecanismo implicado en la citotoxicidad de xenobióticos es la formación de metabolitos reactivos. Muchos hepatotóxicos como el acetaminofeno, la tioacetamida, la cocaína, etc., son activados metabólicamente a especies químicas reactivas. Estas especies son generalmente especies deficientes en un electrón en su orbital externo y por ello se denominan especies electrofílicas, que se unen con gran avidez a macromoléculas celulares ricas en electrones de naturaleza nucleofílica, inactivando funciones celulares críticas. Aunque la teoría del enlace covalente de la toxicidad química es conceptualmente satisfactoria, el objetivo celular crítico para la unión covalente del tóxico que va a desencadenar la muerte celular no ha sido hasta la fecha identificado.

4.3. Glutation, oxidación de grupos tiólicos. Estrés oxidativo

El glutatión es compuesto tiólico nucleófilo más abundante en la célula y proporciona una vía eficiente de detoxificación para la mayoría de los metabolitos reactivos electrofílicos (ver capítulo 4 de este volumen). La concentración intracelular de glutatión disminuye al reaccionar con agentes alquilantes, especies activas de oxígeno, exceso de sustratos para conjugación, etc. La disminución del glutatión intracelular deja a las células indefensas frente a la agresión tóxica. En estas condiciones los compuestos intermedarios tóxicos son capaces de reaccionar con los grupos tiólicos protéicos, lo que puede conllevar la muerte celular (23). Los metabolitos reactivos electrofílicos tienen gran avidez por los grupos nucleofílicos del glutatión y por los grupos -SH de las proteínas con lo cual al desaparecer el GSH se origina una arilación o alquilación de las proteínas celulares.

Por otro lado, los radicales libres pueden actuar atrapando un átomo de H^+ de un lípido insaturado, dando lugar a un radical lipídico, que fija oxígeno y forma un radical lipoperóxido. El lípido peróxido reacciona con un segundo lípido insaturado y origina un lipohidroperóxido y un segundo radical lipídico, responsable de la propagación del proceso de peroxidación. La glutatión peroxidasa transforma el hidroperóxido lipídico en derivado alcohólico (lípido-OH), con la intervención del GSH que pasa a GSSG; el GSSG formado puede regenerar el GSH mediante la acción de la gluta-

tion reductasa. La actividad de la glutatión reductasa consume NADPH, equivalente reductor coenzimático suministrado por las deshidrogenasas, dependientes del NADP⁺ del ciclo de las pentosas fosfato, principalmente la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa:



Cuando el hepatocito se encuentra sometido a una situación severa de estrés oxidativo, se produce GSSG a gran velocidad, lo cual altera el equilibrio del par GSH/GSSG. Esto entraña un rechazo hacia el GSSG formado en exceso, que tiene que salir del hepatocito. La extrusión del GSSG origina consecuentemente un descenso en la concentración de GSH hepático. La disminución del cociente GSH/GSSG va acompañada por una oxidación de los grupos -SH de las proteínas (24). La superóxido dismutasa y la catalasa tienen una acción protectora frente a la oxidación, pues impiden la formación de radicales activos de oxígeno que desencadenan el proceso.

Además del enlace covalente de los metabolitos reactivos con las macromoléculas celulares, y la disminución del glutatión reducido (GSH) intracelular, los intermediarios reactivos pueden iniciar otros procesos patológicos tales como la peroxidación lipídica y reacciones redox cíclicas que implican la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 1). Estos procesos están implicados en el tercer mecanismo general que conduce a la muerte celular, el estrés oxidativo, que puede ser definido como una alteración en la proporción prooxidante/antioxidante a favor de los prooxidantes (25). Las reacciones cíclicas de formas oxidadas y reducidas de agentes tóxicos, tales como las quinonas producen aniones superóxido, que a su vez dan lugar a peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Los metales tales como el hierro y el cobre pueden participar en estas reacciones. Las ROS producidas pueden disminuir el glutatión por oxidación, pueden oxidar los grupos -SH de las

proteínas implicadas en la regulación celular o enzimática y pueden iniciar la peroxidación lipídica. Los hidroperóxidos orgánicos pueden, a su vez, inducir estrés oxidativo directamente mediante la oxidación de grupos tiólicos celulares críticos o por iniciación de procesos con radicales libres.

La peroxidación lipídica es uno de los mecanismos centrales de toxicidad debido al estrés oxidativo y a tóxicos generadores de radicales libres, tales como el acetaminofeno, tetracloruro de carbono, tioacetamida, etc. En

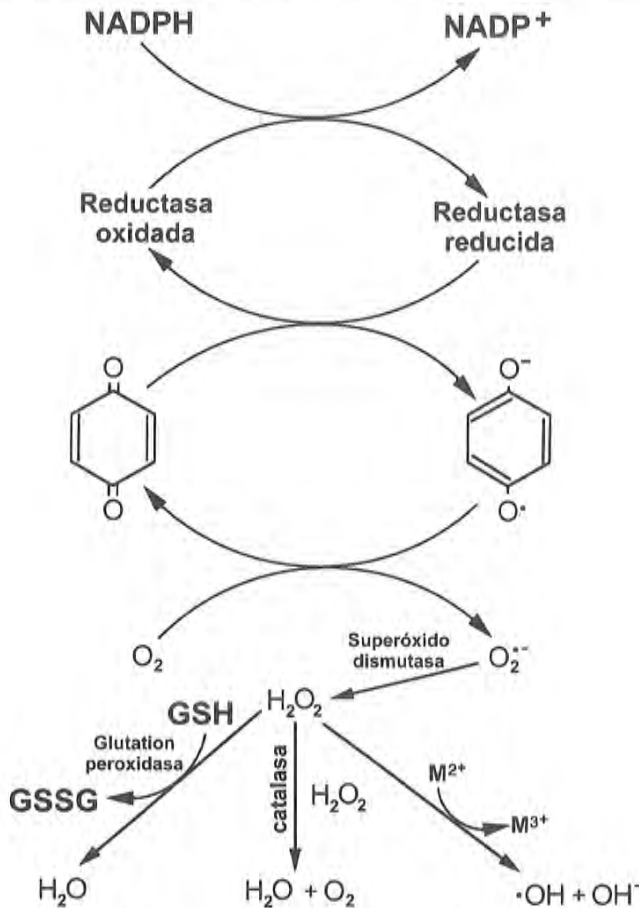


FIGURA 1. Reacciones cíclicas redox que conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno. Un fármaco quinónico se reduce a semiquinona por acción de la flavoproteína reductasa dependiente de NADPH. La semiquinona reduce el oxígeno molecular a anión superóxido. La superóxido dismutasa convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede convertirse en agua por la catalasa o la glutatión (GSH) peroxidasa o puede reaccionar con un ión metálico para formar el radical hidroxilo.

ausencia de hierro exógeno, sin embargo, la peroxidación lipídica no es muy activa y su significación toxicológica no está clara. La peroxidación lipídica puede ser importante por varias razones:

- (a) porque amplifica la generación de radicales libres,
- (b) porque los productos de la degradación de los lipoperóxidos son tóxicos (malondialdehído, hidroxinonenal), y
- (c) porque puede comprometer los sistemas de destoxicación endógenos como el glutatión.

El papel de la peroxidación lipídica en la citoletalidad se encuentra todavía en debate y se sigue discutiendo de qué manera interviene y de qué manera se puede atribuir a este proceso, una responsabilidad directa en los mecanismos que conducen a la muerte celular. Para ello hace años que Tribble (26), enunció una serie de argumentos que debían cumplirse para demostrar la intervención directa de la peroxidación lipídica:

- (a) debe ocurrir en todos los casos de toxicidad inducidos por un determinado agente químico;
- (b) debe ocurrir en momentos previos a la iniciación de la muerte celular;
- (c) la intensidad de la lipoperoxidación debe relacionarse con la intensidad de la lesión celular, y
- (d) las sustancias que prevengan la peroxidación lipídica deben proteger a las células de la citoletalidad.

Estos razonamientos fueron utilizados por Rush (27) en sus estudios con *tert*-butil hidroperóxido en hepatocitos en cultivo. Estos autores encontraron que en los hepatocitos incubados con este hidroperóxido, la peroxidación lipídica era paralela a la liberación de lactato deshidrogenasa y que la inclusión del antioxidante prometazina en el medio de cultivo prevenía la peroxidación lipídica, pero no la muerte celular, lo que indicaba que la peroxidación lipídica no estaba implicada en la citotoxicidad inducida por el *tert*-butil hidroperóxido. Aunque la peroxidación lipídica puede ser un mecanismo importante de citotoxicidad para algunos agentes, evidencias experimentales como la anteriormente mencionada, muestra que no es un componente absolutamente esencial.

4.4. Calcio citosólico

La elevación del calcio citoplasmático es prominente en el tejido necrótico y una hipótesis que va ganando adeptos es que la entrada de Ca^{2+} en las células es un acontecimiento inicial e importante que contribuye a la lesión celular tóxica letal y a la hipóxica. En células sanas las bombas de Ca^{2+} dependientes del ATP mantienen el gradiente de este elemento en exceso 10.000 a 1 a través de la membrana plasmática, siendo la concentración del Ca^{2+} citosólico 100 - 150 nM. Por tanto, parece lógico que un incremento del calcio intracelular puede ser una de las primeras respuestas a la lesión celular y la causa de cambios tempranos, tales como la aparición de protuberancias en las membranas. Sin embargo en modelos de hipoxia inducidos por cianuro, el calcio libre citosólico no se eleva apreciablemente hasta que se inicia la muerte celular al fallar la barrera de la permeabilidad de la membrana (28). Resultados similares se han obtenido en modelos de lesión hepática inducida por fármacos (29)

Por ello, la elevación del calcio citoplasmático traerá como consecuencia la muerte celular, ya que la membrana plasmática alterada por peroxidación lipídica o fijación covalente dejará entrar el calcio que se encuentra en grandes cantidades en el espacio extracelular (30). La disminución de NAD(P)H, observada en ciertas situaciones de estrés oxidativo, aminora la capacidad mitocondrial para acumular calcio. La oxidación de los tioles protéicos disminuye la actividad de las ATPasas dependientes del calcio del retículo endoplásmico y de la membrana plasmática (31), lo cual permite que el calcio penetre libremente en el citosol, que no se acumule en la mitocondria ni en el retículo endoplásmico y que no encuentre rechazo suficiente que le obligue a salir del hepatocito. El resultado es un aumento importante y prolongado del calcio en el espacio citoplásmico del hepatocito, lo cual conlleva la muerte celular (32, 33). Estas perturbaciones en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , que se caracterizan por elevaciones sostenidas del calcio citosólico, parece que juegan un papel crítico en la muerte celular inducida por sustancias tóxicas (34). Los efectos citotóxicos inducidos por ese incremento originan alteraciones en el citoesqueleto que se asocian con la aparición de prominencias en la membrana plasmática (35), la activación de las fosfolipasas dependientes de calcio que lesionan la membrana y la activación de proteasas neutras, también dependientes del calcio (36).

Estudios nuestros en un modelo de intoxicación con el hepatotóxico tioacetamida en ratas han detectado incrementos significativos de calcio citoplasmático que precedieron a la necrosis (33).

5. APOPTOSIS Y NECROSIS

Muchos compuestos muestran su toxicidad a través de los metabolitos reactivos derivados de su biotransformación, o como resultado de la generación de especies químicas activas derivadas en el proceso de reducción tetravalente del oxígeno. La mayoría de los xenobióticos que son transformados por el citocromo P-450 hepático a metabolitos reactivos, causan necrosis perivenosa, lo cual parece ser debido a que la mayor concentración de citocromo P-450 se encuentra ubicada en el área que rodea la vena central. La región periportal, con alto contenido en oxígeno, contiene asimismo la mayor parte de los enzimas del metabolismo intermediario para la síntesis de las proteínas plasmáticas y para el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La necrosis de la región periportal se suele asociar con una acción directa de hepatotoxinas, que penetran en el hígado por la vena porta y no requieren bioactivación.

El ritmo mediante el cual el citocromo P-450 se une a los diferentes sustratos para que sean metabolizados, puede elevarse mediante agentes inductores, entre los que se encuentra el fenobarbital (37). La respuesta adaptativa a estos agentes, da lugar a un incremento del retículo endoplásmico liso y de la actividad monooxigenasa dependiente del citocromo P-450. Se inducen al menos dos isoenzimas del citocromo P-450, y se incrementan las actividades de la epóxido hidrolasa y de la glucuronil transferasa. La actividad de la superóxido dismutasa se eleva en condiciones de prolongado estrés oxidativo. Todo esto conduce a una hipertrofia aparente en los hepatocitos perivenosos.

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la muerte celular surge como consecuencia de procesos patológicos, ahora se sabe que la muerte de algunas células supone un fenómeno fisiológico necesario para el desarrollo normal y la renovación celular. El estudio de la morfología de las células que mueren, ha revelado dos modelos diferentes de muerte celular, denominados necrosis y apoptosis. Con el reconocimiento de la significación biológica y los mecanismos que conducen a la apoptosis se han realizado grandes progresos en los cinco últimos años.

La *necrosis* tiene lugar, generalmente, en condiciones patológicas. Las células que sufren necrosis se hinchan y muestran una disrupción de las membranas externas e internas, con prominencias en la membrana plasmática. Puede observarse una fase prenecrótica, conocida como hinchamiento hidrópico. En esta fase, el retículo endoplásmico se dilata y las mitocondrias aparecen también hinchadas. Las alteraciones necróticas irreversibles

se manifiestan, a menudo, por expansiones en el volumen de las mitocondrias que van acompañadas por disrupción de la estructura mitocondrial, la disolución de orgánulos y la ruptura de la membrana plasmática (32). Los patrones de necrosis se pueden reproducir en animales, siendo similares, a los descritos en casos de humanos que han estado expuestos a diferentes productos químicos y drogas, y se pueden clasificar en tres grupos en función de la zona del acino dañada: La *necrosis perivenosa*, es con mucho la más frecuente, en animales expuestos de forma aguda a agentes hepatotóxicos. Tiene lugar en el área perivenosa del lobulillo hepático rodeando totalmente la terminación de la vena central y se denomina centrilobular, central o de la zona 3 del acino. También recibe el nombre de perivenosa en base a su distribución alrededor de las venas centrales. El porcentaje de células dañadas depende de la agresividad del agente y de la dosis. Se presenta generalmente como necrosis coagulativa y puede limitarse a una simple fila de hepatocitos alrededor de la vena central, o extenderse a través del lóbulo. Una célula bajo el efecto de una necrosis coagulativa muestra un incremento en la eosinofilia del citoplasma cuando se tiñe con hematoxilina y eosina, debido a la pérdida del citoplasma, normalmente basófilo, asociado normalmente con el RNA (ácido), y un incremento de la unión de eosina a las proteínas desnaturalizadas (básicas). Las células presentan, frecuentemente una apariencia homogénea opaca, por la pérdida de partículas de glucógeno, que son las que dan al citoplasma una apariencia granular. Las mitocondrias aparecen hinchadas. Eventualmente las células se vacuolizan y puede haber una calcificación. El núcleo de la célula muerta aparece encogido y basófilo, picnótico, con un acumulo de cromatina; se puede romper en pequeños fragmentos diseminándose en el citoplasma (cariorrésis) o disolverse y desaparecer progresivamente (cariolisis). El tejido necrosado va normalmente unido a un proceso inflamatorio. La necrosis perivenosa comienza su reparación a las 24 horas de su inicio y sólo queda, una fibrosis mínima en la zona de necrosis, en caso de que se dañen las células sinusoidales. La *necrosis mediozonal*, es la menos frecuente. Consiste en una banda de células muertas equidistante entre la zona portal y la vena central, generalmente es una zona muy estrecha, que afecta solo a dos o tres células de la zona del acino equidistante entre la región venosa y la región portal. La *necrosis periportal*, menos frecuente que la perivenosa, en ella los hepatocitos necrosados rodean al terminal porta, y en este tipo de necrosis no suele aparecer hemorragias. Su localización se trata de explicar, teniendo en cuenta, que el área periportal es la primera que se entra en contacto con la toxina, que se encuentra en la sangre, lo que sugiere que los hepatocitos periportales, pueden recibir dosis mayores de sustancia tóxica, por la mayor actividad metabólica de esta zona (38).

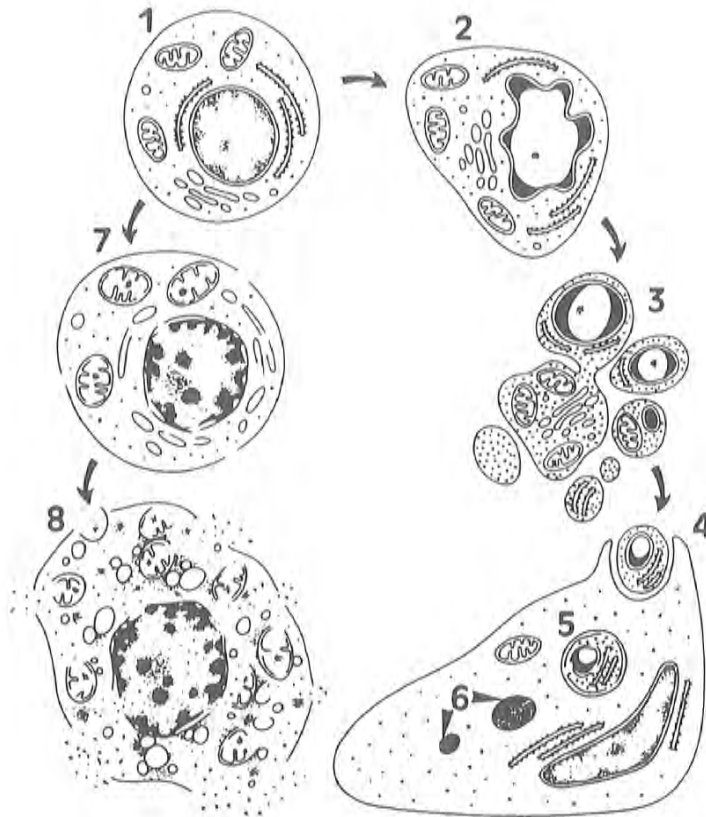


FIGURA 2. *Necrosis y apoptosis. Diferencias estructurales (40)*

La *apoptosis*, o muerte celular programada, es una forma especial de muerte individual que se ha descrito como suicidio celular (39). Al contrario que las células necróticas, no hay liberación de contenido de las células muertas y no se presentan células propias de procesos inflamatorios, como neutrófilos y macrófagos. Los orgánulos citoplasmáticos de las células apoptóticas se hacen más compactos, aunque las mitocondrias, en apariencia, continúan intactas. A veces, aparecen prominencias en la membrana nuclear. Existe una concentración característica de la cromatina, la cual se ha relacionado con la actividad de nucleasas endógenas. Estas endonucleasas pueden activarse por una elevación de la concentración citosólica de calcio. En sus primeras fases, las células apoptóticas pierden el contacto con las células adyacentes y sufren condensación del citoplasma, pérdida de las estructuras especializadas de superficie, condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y formación de protuberancias en la superficie celular. A continuación, las protuberancias de

la superficie celular se separan en múltiples cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos nucleares y orgánulos intactos y que se caracterizan histológicamente por su estructura eosinofílica, con cromatina densa y a veces fragmentada. Algunos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células residentes hepáticas o por fagocitos. La apoptosis es la forma fisiológica de pérdida celular. En el hígado se presenta con una frecuencia muy baja y se restringe en principio al área perivenosa, representando la pérdida fisiológica de los hepatocitos senescentes. La apoptosis aparece incrementada en hígado hiperplásico que regresa a su tamaño normal, tras sufrir un tratamiento con agentes químicos o sustancias, que dan lugar a la proliferación de peroxisomas (1, 40).

Numerosos agentes químicos, así como otros estímulos tóxicos, pueden lesionar las células y originar en ellas una secuencia compleja de reacciones que culminan en la muerte celular. La lesión celular originada por xenobióticos conduce a menudo a la necrosis donde la muerte celular se debe al fallo de sistemas endógenos necesarios para mantener el equilibrio, pero otras veces puede conducir a la iniciación de un proceso activo que lleve a la apoptosis. La idealizada distinción entre necrosis y apoptosis, anteriormente descrita, implica que se encuentran involucradas distintas causas y distintos mecanismos. Sin embargo, evidencias recientes indican que estas diferencias pueden ser más aparentes que reales. Un número de estímulos induce predominantemente una u otra forma de muerte celular dependiendo del tipo celular, el nivel de exposición, el estado metabólico de la célula y la integridad de la maquinaria que participa en la muerte celular.

Teleológicamente, la muerte celular por apoptosis puede ser considerada como un mecanismo controlado, no llamativo, que libera al organismo de las células lesionadas o innecesarias. Así, las células con DNA alterado o con virus replicantes pueden ser eliminadas con mínima inflamación o fibrosis. Sin embargo, la subversión del proceso apoptótico, como resultado de mutaciones o de acción específica de productos de genes víricos, puede jugar un papel crítico en la carcinogenesis hepática o en la perpetuación de la replicación vírica. Por tanto, es cierto que las estrategias dirigidas a inhibir la apoptosis no son nunca beneficiosas. La posibilidad de causar un cambio hacia la necrosis puede promover inflamación y fibrosis. Así que en muchas circunstancias la apoptosis puede ser considerada beneficiosa para el huésped, mientras que la necrosis puede ser considerada lesiva.

En la Tabla I se muestran una serie de factores que desencadenan la muerte celular en el hígado. Algunos implican la participación de recep-

tores de muerte y una maquinaria intracelular para la señalización y ejecución del programa de muerte celular por apoptosis, mientras que otros evaden completamente esta maquinaria o la intercalan más allá. Los mismos acontecimientos iniciales desencadenantes, pueden promover apoptosis o necrosis. Por ejemplo, una hipoxia moderada puede inducir la apoptosis y una hipoxia severa la necrosis. La exposición moderada a especies reactivas de oxígeno, o agentes químicos tóxicos puede causar apoptosis, mientras que una exposición más marcada puede inducir necrosis.

TABLA I. Factores que inician la muerte celular en enfermedad hepática.

Hipoxia (isquemia-reperfusión)
Metabolitos reactivos de oxígeno (enfermedad hepática por etanol, fármacos, inflamación, etc)
Acidos biliares (colestasis)
Agentes tóxicos (agentes terapéuticos)
Factor de necrosis tumoral (TNF) (enfermedad hepática por etanol, fármacos y virus)
Ligando FAS (FasL), grandzima B/porin (autoinmune, fármacos, virus)

El programa apoptótico

La apoptosis, como se comentó anteriormente, puede ser iniciada por ligandos tales como $TNF\alpha$ o FASL, que se unen a receptores en la superficie celulares, o por acontecimientos intracelulares que se intercalan en la cascada en alguna etapa subsiguiente (por ejemplo, los ácidos biliares promueven la trimerización de FAS y los metabolitos reactivos de oxígeno pueden alcanzar la mitocondria).

La cascada apoptótica clásica empieza con la unión al receptor de muerte (Figura 3). Los receptores de muerte contienen un dominio citoplasmático (dominio de muerte) adaptado para la unión de proteínas, que va a servir como soporte para el enlace y autoactivación de las caspasas iniciadoras o señalizadoras, tales como la caspasa 8. Cuando FasL se une al receptor Fas, o $TNF\alpha$ se une al TNFR1, las moléculas del receptor trimerizan formando un grupo de dominios de muerte. El receptor Fas se une entonces a FADD (proteína asociada al dominio de muerte Fas) y TNF-R1 se une a

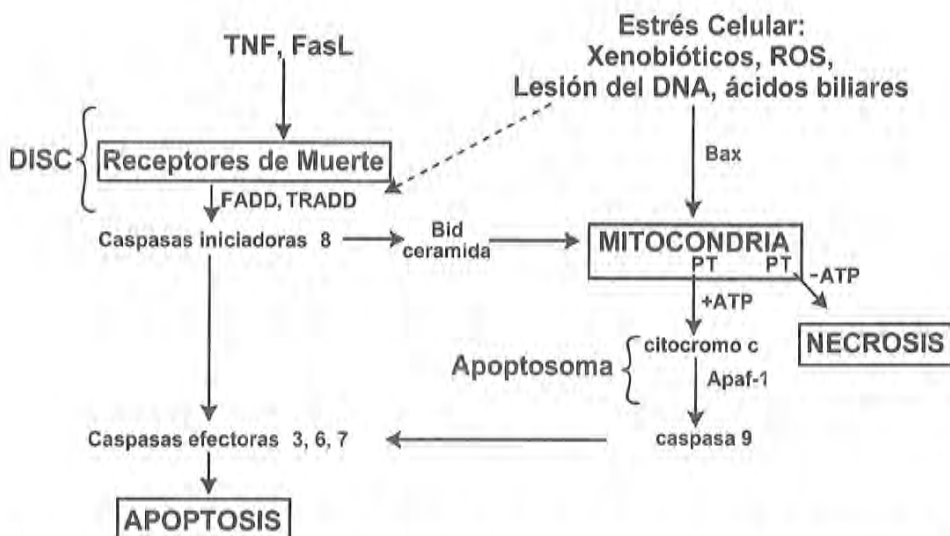


FIGURA 3. Vías que conducen a la muerte celular. Contraste entre los receptores de muerte y la lesión intracelular inducida por situaciones de estrés, poniendo énfasis en el papel amplificador de la mitocondria en la vía iniciada por los receptores y en el papel determinante sobre la vía iniciada por situaciones de estrés. La apoptosis depende de la acción de las caspasas iniciadoras y las caspasas ejecutoras. La necrosis se asocia con profundas alteraciones en la mitocondria que implican la pérdida de ATP. En la apoptosis participa el apoptosoma y se requiere ATP. FasL, ligando Fas; TNF, factor de necrosis tumoral; DISC, complejo señalizador inductor de muerte; FADD, proteína asociada a Fas; TRADD, proteína asociada al receptor TNF; Bid miembro apoptogénico de la familia Bcl2; ROS, especies reactivas de oxígeno; Bax, miembro apoptogénico de la familia Bcl2; PT, permeabilidad transitoria (42).

TRADD (proteína asociada al dominio de muerte del receptor TNF), el cual, a su vez, se une a FADD. FADD se une a la procaspasa 8 y la activa. TRADD se une también a otras proteínas, tal como RIP (proteína que interacciona con el receptor) y TRAF2 (factor 2 asociado al TNF-R). Estos promueven la activación de quinasas que activan a su vez a factores de transcripción (NF κ B), que promueven la transcripción de genes de supervivencia (41, 42). Este fenómeno es crítico ya que vuelve a los hepatocitos muy resistentes a la apoptosis inducida por el TNF α .

Una característica clave de la apoptosis es la participación de un grupo de enzimas proteolíticas conocidos como caspasas, enzimas que requieren cisteína -SH en su grupo activo y que rompen los sustratos (proteínas) después de los residuos aspartato (43). Las caspasas están presentes en las células en forma inactiva, y pueden dividirse en tres grupos:

1. Caspasas implicadas en la producción de citoquinas (ICE like 1, 4, 5, 13),
2. Caspasas iniciadoras que transmiten o propagan el programa apoptogénico (2, 8, 9, 10), y
3. Caspasas efectoras o ejecutoras que rompen sustratos selectivos para desorganizar las estructuras celulares e inabilitar los mecanismos reparadores (3, 6, 7)

Las caspasas pueden ser activadas por otras proteasas. Por ejemplo, la granzima B liberada por las células T citotóxicas puede romper la procaspasa y activar Bid. La granzima B se internaliza con los endosomas junto con la perforina, la cual permeabiliza las vesículas, liberando granzima B en el citosol (44). Existen dos tipos principales de propagación del programa apoptogénico que dependen del tipo celular. En el tipo I, una fuerte respuesta señalizadora, que surge de la activación de las caspasas iniciadoras/señalizadoras, activa las caspasas ejecutoras. En el tipo II, es insuficiente la fuerza de la señal y se requiere un mecanismo de amplificación, en el que normalmente se encuentra implicada la mitocondria (45). Así, la modificación de ciertos miembros de la familia Bcl2, por ejemplo Bid, conduce a la molécula hacia la mitocondria donde un efecto sobre la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial va a originar la liberación del citocromo c y posiblemente de otras proteínas mitocondriales apoptogénicas. El citocromo c se une a una proteína citoplasmática apaf-1 y a la procaspasa 9 formando un complejo denominado apoptosoma. En presencia de ATP el apoptosoma sufre una hidrólisis, el complejo citocromo c-apaf-1 oligomeriza, conduciendo a la autoactivación de la procaspasa 9 (caspasa señalizadora), la cual a su vez activa la caspasa 3 (caspasa ejecutora). Una señal relativamente débil desde DISC (Tabla II y Figura 3) se amplifica por la mitocondria y el apoptosoma, para promover la fase ejecutora.

El proceso apoptogénico ha llegado a considerarse virtualmente sinónimo de dependencia de la caspasa, sin embargo, existe discrepancia y algunos investigadores piensan que existe apoptosis independiente de la caspasa (46). Aquí surge la pregunta si la activación de los miembros apoptogénicos Bcl2 y la ceramida llevan a la liberación de una flavoproteína oxidoreductasa intermembrana (AIF) y calcio de la mitocondria, los cuales pueden menos eficientemente promover la apoptosis en ausencia de caspasas, posiblemente por activación de calpains y catepsinas u otros procesos. En estas circunstancias, permanecen algunas características de la apoptosis, tales como la condensación y las protuberancias, pero no la fragmentación oligosómica del DNA y

TABLA II. Componentes del programa apoptótico.

TNF α , factor de necrosis tumoral α ; TRAIL, ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF; FAAD, proteína asociada al dominio de muerte Fas; TRADD, proteína asociada al dominio de muerte del receptor de TNF; AIF factor inductor de la apoptosis (42).

1. Complejo señalizador que induce la muerte (DISC)

Receptores de muerte (Familia genética TNF α): FAS, TNF-R1, TRAIL-R1 y R2
FADD y TRADD
Procaspasa 8

2. Caspasas

Señalización o propagación (caspasa 2,8,9,10)
Efecto o ejecutor (caspasa 3, 6, 7)

3. Mitocondria

ATP
Citocromo c
AIF, procaspasas 2 y 9
Permeabilidad transitoria (PT)

4. Apoptosoma

Apaf-1
Citocromo c
Procaspasa 9
ATP

5. Familia Bcl2

Pro-apoptótica (Bid, Bax, Bad)
Anti-apoptótica (Bcl2, Bcl-X_l)

6. Ceramida

la fosfatidilserina de la superficie. Como esta última señal es necesaria para la fagocitosis, en estas circunstancias, las células que han sufrido la apoptosis, permanecen *in situ* y sufren una necrosis secundaria.

Es probable que muchas de las causas intracelulares de la apoptosis y necrosis se encuentren en la mitocondria, bien directamente (metabolitos tóxicos de fármacos o especies reactivas de oxígeno), o indirectamente (vía activación de la señalización a través de miembros de la familia apoptogénica Bcl2).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se han implicado en la patogénesis de muchas formas de enfermedad hepática. Cuando las células he-

páticas se exponen a un exceso de ROS, muchas funciones celulares pueden resultar afectadas. Esto altera la expresión genética mediante la activación de factores de transcripción, por ejemplo del NFκB, conduciendo a la regulación de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, FasL, genes de supervivencia, etc., o puede inducir permeabilidad transitoria (PT) en la mitocondria con consecuencias letales (47). Aunque se ha publicado mucho acerca de la peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo, el papel específico de este proceso en la muerte celular no está claro. La PT puede ser inducida por lipoperoxidación producida en la misma mitocondria. La oxidación de las proteínas y del DNA son otras consecuencias del estrés oxidativo. Aunque estas consecuencias pueden servir como barómetros del estrés oxidativo y contribuir a la degeneración y al envejecimiento, la muerte celular puede ocurrir a bajas concentraciones de ROS, por un compromiso específico del programa apoptogénico, o a elevados niveles de ROS, por necrosis, por el efecto denominado «bomba de neutrones».

¿Cuáles son los principales responsables del estrés oxidativo? A nivel intercelular, las células fagocíticas activadas (células de Kupffer, macrófagos, neutrófilos), incrementando la actividad de la NADPH oxidasa, liberan ROS que pueden atacar las células vecinas. A nivel intracelular, todas las células tienen la capacidad de generar ROS, siendo el sitio principal la mitocondria. Así, el acoplamiento del transporte electrónico a la fosforilación oxidativa tiene «fugas» y los intermediarios en la cadena pueden generar superóxido. En las mitocondrias de los hepatocitos una parte del oxígeno consumido (del 2 al 5%) se convierte en ROS. Esta producción se eleva en presencia de TNFα, ceramida, ácidos biliares e isquemia/reperfusión. Todos estos estímulos manifiestan un bloqueo aparente en el transporte electrónico a nivel del complejo III, lo cual conlleva a un aumento de intermediarios reducidos que se autooxidan. En el proceso apoptogénico en el que se encuentra implicado el fenómeno de liberación del citocromo c, la interrupción del transporte electrónico ha de promover una situación secundaria de estrés oxidativo (48). De la misma manera la PT despolarizará y desacoplará la mitocondria y como consecuencia se producirá una situación secundaria de estrés oxidativo. Por tanto, es importante distinguir el estrés oxidativo causante de la apoptosis, del estrés oxidativo que es consecuencia de la apoptosis. En casos de estrés oxidativo débil o moderado, suficiente para mantener un número adecuado de mitocondrias funcionales y un nivel de ATP adecuado, puede ser inducida la apoptosis. En casos de estrés oxidativo severo, la mayoría de las mitocondrias sufrirán PT, esto conlleva un marcado descenso en los niveles de ATP y necrosis por lisis celular.

Está claro que la situación de estrés oxidativo puede generarse por una mayor producción de ROS por la mitocondria, pero también hay que considerar al citocromo P-450 microsómico, ya que este sistema puede bien espontáneamente o en presencia de sustratos y oxidasas peroxisómicas, generar ROS. Elevadas concentraciones de hierro o cobre pueden también promover estrés oxidativo.

El estrés oxidativo puede iniciar la apoptosis induciendo lesión oxidativa en el DNA lo cual conllevará a lo siguiente:

1. activación de p53,
2. activación de la expresión de FasL y Fas (hepatocitos fraticidas se mataran entre ellos)
3. promoviendo la PT.

Por otro lado, las ROS pueden amplificar o inhibir la apoptosis inactivando las caspasas o activando el factor de transcripción NFκB con la

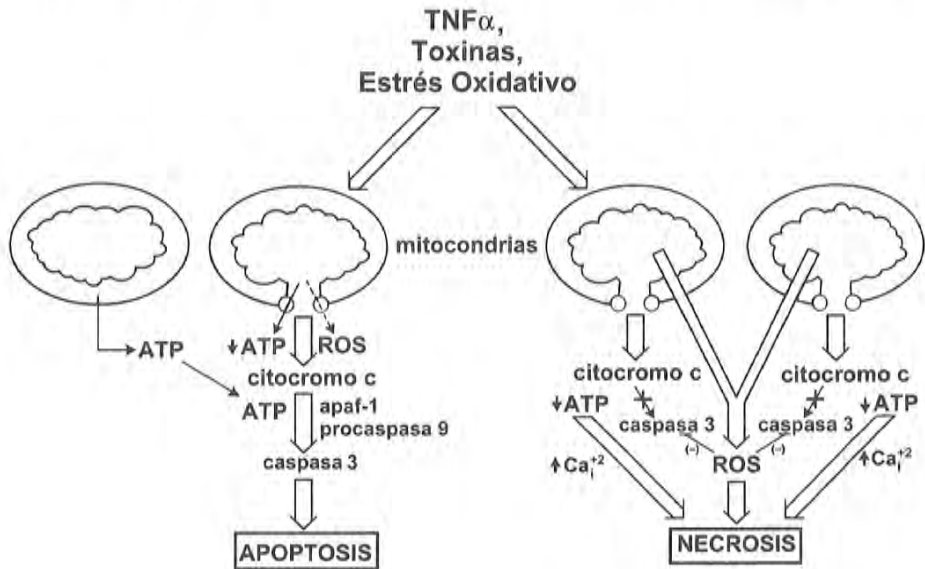


FIGURA 4. Desviación o cambio desde apoptosis a necrosis. Dos factores clave son suficientes para determinar el modo de muerte celular desde apoptosis a necrosis: (a) alteraciones en la mitocondria que disminuyan la concentración de ATP y (b) una situación de estrés oxidativo suficientemente severa para inactivar las caspasas. PT, permeabilidad transitoria; ROS, especies reactivas de oxígeno; TNF α , factor de necrosis tumoral α (42).

activación de genes de supervivencia. El estrés oxidativo es a veces un fenómeno secundario en la apoptosis que resulta de la pérdida mitocondrial del citocromo c, de los efectos desacoplantes de la PT o de una profunda disminución del GSH

Aunque al tipo de bomba de neutrones del estrés oxidativo letal, se le ha dado un amplio énfasis en estudios experimentales, son difíciles de identificar ejemplos relevantes en enfermedad hepática. La mayoría de las consecuencias importantes del estrés oxidativo a nivel clínico en enfermedad hepática, refleja alteraciones en la expresión de genes que promueven inflamación, fibrosis o carcinogénesis que desencadenan o amplifican la apoptosis.

Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inestable producido en el hígado en pequeñas proporciones por la NO sintasa constitutiva endotelial (eNOS) y en mayores proporciones por la NO sintasa inducible (iNOS) por lipopolisacárido y citoquinas en células parenquimáticas y no parenquimáticas. El NO puede ejercer efectos tóxicos o protectores (49). La eNOS juega un papel protector manteniendo la perfusión e inhibiendo la trombosis. La iNOS protege de la apoptosis inducida por LPS y TNF α por S-nitrosilación de las caspasas y también por un mecanismo en el que está implicada la estimulación por el GMP cíclico. Sin embargo, la producción de NO que depende de la iNOS contribuye a necrosis hepatocelular en isquemia/reperfusión y en shock. Un factor crítico es la producción simultánea de O $_2^{\cdot -}$, ya que el NO reacciona con este anión para generar la especie peroxinitrito con potente capacidad oxidante. Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna estrategia lógica para manipular la producción de NO en el tratamiento de enfermedades hepáticas

6. MUERTE CELULAR Y ENFERMEDAD HEPÁTICA

El papel de la apoptosis en la enfermedad hepática en humanos se ha reconocido principalmente en base a estudios histopatológicos. Sin embargo, la caracterización morfológica definitiva es arriesgada. En casos de lesión leve es posible detectar la aparición granulosa de los cuerpos apoptóticos. Pero en casos de lesión más severa la caracterización es más problemática. Esto ocurre principalmente en casos de apoptosis extensa o zonal, donde la capacidad de eliminar las células muertas puede exceder la

capacidad de los macrófagos y sobreviene necrosis secundaria, haciendo imposible determinar la contribución relativa de los dos procesos.

Aunque el interés de toxicólogos y hepatólogos se ha enfocado siempre en la lesión de los hepatocitos, es importante reconocer que la lesión y la muerte de las células no parenquimáticas puede jugar un papel fisiopatológico clave en la enfermedad hepática y puede ser un objetivo para la manipulación terapéutica. Por ejemplo, la lesión selectiva de las células endoteliales sinusoidales puede ser crítica en la patogénesis de la enfermedad veno-oclusiva, en la lesión inducida por isquemia/reperfusión y en la hepatitis fulminante inducida por Fas-L (50). En este panorama, los hepatocitos pueden estar implicados sólo en la medida en que la lesión de las células endoteliales conlleve una alteración en la perfusión o que la barrera endotelial sea eliminada, lo que permitirá que las células citotóxicas tengan libre acceso a los hepatocitos. Por otra parte, las células endoteliales sinusoidales expresan FasL, lo cual puede proporcionar a las células hepáticas un nivel de protección frente a las células inmunes. Queda por ver si esto puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedad hepática mediada por reacciones inmunes, a través de la selectiva activación de FasL en el endotelio. Hacer que los linocitos activados sean más susceptibles a la apoptosis, puede ser una estrategia útil para suprimir la fibrosis.

Restringir la muerte de las células dañadas a un modelo apoptótico, aminorando la necrosis, puede ser beneficioso, ya que las células lesionadas o no necesarias pueden ser eliminadas sin atender al trastorno creado por la necrosis. Así, en algunas circunstancias puede ser ventajoso minimizar la necrosis sin interferir con la apoptosis. La interferencia con el programa apoptogénico, sin embargo, conlleva el riesgo de redirigir hacia necrosis con consecuencias tales como inflamación, que pueden agravar la lesión.

Muchas hepatotoxinas (agentes terapéuticos, alcohol, etc) pueden actuar alterando la susceptibilidad a acciones letales mediadas por receptores de muerte. Por ejemplo, el alcoholismo crónico altera el transporte del GSH a la mitocondria, haciéndola más susceptible al estrés oxidativo inducido por el TNF α (51), y desencadenando la PT. La disminución de los macrófagos previene la lesión hepática inducida por acetaminofeno, a pesar de que permanezca la misma intensidad de enlace covalente con el metabolito reactivo, lo que indica que la unión covalente y la disminución del GSH en hepatocitos, hace a estas células más susceptibles a los mediadores tóxicos generados en las células no parenquimáticas.

7. CONCLUSIONES

El estudio de los mecanismos bioquímicos que se encuentran implícitos en la muerte celular tiene una importancia fundamental para conseguir medios efectivos frente a los numerosos agentes citotóxicos. Hasta la fecha, los intentos para la identificación de las reacciones celulares que tienen lugar en caso de intoxicación celular, se han encontrado entorpecidos por la gran variedad de alteraciones que tienen lugar en el interior de la célula cuando se lesionan los mecanismos reguladores de la homeostasis. Muchas de estas alteraciones van unidas a una pérdida de la viabilidad, sin que sean ellas mismas la causa de la muerte celular. Actualmente, mediante el uso de células aisladas se ha progresado mucho en la identificación de las reacciones bioquímicas directamente relacionadas con la muerte celular.

Inmediatamente después de la agresión tóxica, las células sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos. Una de las primeras respuestas de los hepatocitos frente al ataque de una gran variedad de hepatotoxinas, es la aparición de prominencias en la superficie de la membrana plasmática. Este fenómeno surge antes de que se observe cambio alguno en la permeabilidad celular y es irreversible. Se cree que la muerte celular sobreviene, en sus últimas consecuencias, por la rotura de estas prominencias con la consiguiente pérdida del contenido celular (52). Cada vez son más evidentes las pruebas que llevan a considerar que la perturbación de la homeostasis del calcio se asocia con la toxicidad de muchos compuestos. Sin embargo, no se sabe con certeza, cuáles son las reacciones que, una vez iniciadas por tal perturbación, propagan la lesión. Parece que podrían encontrarse involucrados en este proceso fenómenos tales como la disrupción del citoesqueleto, la activación de enzimas degradativos, como proteasas y la fosfolipasa A₂ y la estimulación de la endonucleasa y la poli-(ADP-ribosa) polimerasa. El estado actual de los conocimientos permite proponer el siguiente esquema:

- a) formación de especies químicas reactivas;
- b) disminución del glutathion y modificación de los tioles proteicos y estrés oxidativo y
- c) aumento del calcio citosólico.

De todo lo anteriormente expuesto la muerte hepatocelular inducida por muchos hepatotóxicos puede incluirse en un escenario general. El tóxico entra en el hepatocito y allí puede ser metabolizado para formar un inter-

mediario reactivo tóxico, que reacciona con enzimas mitocondriales críticos o con algún componente de los sistemas generadores de ATP, lo que conduce a una disminución en el contenido celular de ATP. Esto puede ocasionar la inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial o el desacople de la fosforilación oxidativa. Si la interacción es irreversible e irreparable, entonces la célula estará obligada a sufrir una secuencia de eventos que culminarán en la ruptura de las membranas y la muerte. La disminución de la permeabilidad celular compromete la actividad de la bomba de calcio dependiente del ATP de la membrana plasmática y debido a ello, la concentración de calcio intracelular se eleva. Diversos enzimas dependientes del calcio se activan, entre ellos las endonucleasas que rompen el DNA. Si las lesiones al DNA son pequeñas, pueden ser reparadas por sistemas reparadores de la célula, pero en casos de lesiones intensas la célula morirá. Señales extracelulares son enviadas para reclutar células inflamatorias que acuden para eliminar los hepatocitos lesionados.

Los procesos bioquímicos de la muerte celular inducida por agentes hepatotóxicos que causan necrosis son bastante similares a los procesos implicados en la apoptosis. Una de las características clave de la apoptosis es la condensación de la cromatina y la rotura del DNA en fragmentos nucleosómicos (53, 54). Aunque la apoptosis está bajo control genético más preciso y la degradación de la célula se verifica de manera más ordenada (suicidio), que la muerte celular por necrosis (accidente), ambos procesos implican la activación de endonucleasas dependientes del calcio y la temprana degradación del DNA. La diferencia cualitativa más importante entre las vías bioquímicas que intervienen en la apoptosis o en la necrosis inducidas por hepatotóxicos parece estar en los puntos de control molecular y en las señales extracelulares. El conocimiento de estos puntos de control y su regulación es una área de investigación activa en muchos laboratorios. Ese conocimiento podrá permitir el desarrollo de tratamientos para paliar la intoxicación por agentes químicos ambientales o terapéuticos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales M (1987) Hepatopatías experimentales. Estudio del metabolismo. En *Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones hepáticas* (eds M Cascales y F Ferrándiz) pp 9-26, CSIC, Madrid
2. Farrel G (1997) Drug-induced hepatic injury. *J Gastroenterol Hepatol* **12** (suppl) G242-G250
3. Kederis GL (1996) Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicol Pathol* **24**, 77-83.

4. Pessayre D, Bichara M, Feldman G, Degott C, Potet F y Benhamou JP (1989) Perhexiline malate-induced cirrhosis. *Gastroenterol* **76**, 170-177
5. Albert A (1973) Selective toxicity 5ª edición pp 420-432. Chapman & Hall, Londres
6. Ammon R, Berninger H, Haas y Ladsberg I (1967) Thioacetamide sulphoxide a metabolite of thioacetamide. *Arzneim Forsch* 521-523
7. Recknagel RO. (1983) Carbon tetrachloride hepatotoxicity, status quo and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* **4**, 129-131.
8. Mitchell JR y Jollow DJ. (1975) Metabolic activation of drugs and toxic substances. *Gastroenterology* **68**, 392-410.
9. Danan G, Truneyt P, Bernau J, Roche-Scot J Pessayre D, Rueff B y Benhamou JP (1985) Pirprophen-induced fulminant hepatitis. *Gastroenterol* **89**, 210-213
10. Commandeur JNM y Vermeulen PE (1990) Molecular and biochemical mechanisms of chemically induced nephrotoxicity: A review. *Clin Res Toxicol* **3**, 171-194
11. Pang KS, Xu X y St-Pierre MV. (1992) Determinants of metabolite disposition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**, 623-669.
12. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P y Orrenius S (1985) The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺ *J Biol Chem* **260**, 13035-13040
13. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G y Nicotera P (1989) Role of Ca²⁺ on toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 281-285
14. Nicotera P, Moore M, Mirabelli F, Bellomo G y Orrenius S (1985) Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca²⁺ ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS lett* **181**, 149-153.
15. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Willie AH y Orrenius S (1988) Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol lett* **42**, 123-130.
16. Jones AL (1990) Anatomy of the normal liver. En: *Hepatology. A textbook of liver disease* (eds. Zakim D y Boyer TD) **vol1** 2nd edn pp 3-30, WB Saunders Co, Filadelfia.
17. Tsokos-Kuhn JO (1989) Evidence in vivo for elevation of free Ca²⁺ in the liver after diquat, acetaminophen and CCl₄. *Biochem Pharmacol* **38**, 3061-3065
18. Cascales M, Martín-Sanz P, Alvarez A, Sanchez-Pérez, Díez-Fernández C y Boscá L (1992) Isoenzyme of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis. *Hepatology* **16**, 232-240

19. Thor H y Orrenius S (1980) The mechanisms of bromobenzene-induced cytotoxicity. Studies with isolated hepatocytes. *Arch Toxicol* **44**, 31-36
20. Kera Y, Sippel HW, Penttila KE y Lindros KO (1987) Acinar distribution of glutathione-dependent detoxifying enzymes. Low glutathione peroxidase activity in perivenous hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **36**, 2003-2006
21. Seeman P (1972) The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol Rev* **24**, 583-655
22. Wieland T y Faulstich H (1978) Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *Crit Rev Biochem* **13**, 185-260.
23. Pessayre D (1987) Mécanismes des hépatites médicamenteuses. *Med Sci* **2**, 373-379
24. Orrenius S y Nicotera P (1987) On the role of calcium in chemical toxicity. *Arch Toxicol* **11**, 11-19
25. Sies H (1985) Oxidative stress. Introductory remarks. En: *Oxidative Stress* (ed Sies H) pp 1-7. Academic Press, Londres
26. Tribble DL, Aw TY y Jones DP (1987) The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* **7**, 377-386.
27. Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski J y Hewitt WR (1985) Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **78**, 473-483.
28. Mehendale HM, Roth RA,, Gandolfi AJ, Klunig JE, Lemasters JJ y Curtis LR (1994) Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J* **8**, 1285-1295.
29. Harman AW, Mahar SO, Burcham PC y Madsen BW (1992) Level of cytosolic free calcium during acetaminophem toxicity. *Mol Pharmacol* **41**, 665-670
30. Lauterburg BH (1987) Early disturbance of calcium translocation accross the plasma membrane in toxic liver injury. *Hepatology* **7**, 1179-1183
31. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S (1990) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **82**, 449-470
32. McConkey DJ y Orrenius S (1991) Cellular signaling in thymocyte apoptosis. En: *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (eds Tomei LD y Cope FO) Cold Spring Harbor Lab Press, pp 227-246, Plainview, Nueva York
33. Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M (1996) Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca²⁺-dependent enzymes. *J Hepatol* **24**, 912-918
34. Orrenius S, McConkey DJ, Jones DP y Nicotera P (1988) Calcium activated mechanisms in toxicity and programmed cell death. *ISI Atlas Sci pharmacol* **1**, 319-324.

35. Jewel SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S y Smith MT (1982) Bleb Formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science* **217**, 1257-1259
36. Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svenson SA, Bellomo G y Orrenius S (1986) Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of a non lysosomal proteolytic system. *J Biol Chem* **261**, 14628-14635
37. Bars RG y Elcombe CR (1991) Dose-dependent acinar induction of cytochromes P-450 in rat liver. *Biochem J* **277**, 577-580
38. Popp JA y Catley RC (1991) Hepatobiliary system. En: *Handbook of toxicologic pathology* (eds Haschek WM y Rouseaux CG) pp 279-314, Academic Press, Londres
39. Bursch W, Oberhammer BF y Schulte-Hermann R (1992) Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 245-251
40. Cascales M (1997) Apoptosis, enfermedad y terapéutica. *Anal Real Acad Doctores* **1**, 31-54
41. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, et al. (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* **275**, G387-G392
42. Kaplowitz N (2000) Mechanisms of cell injury. *J Hepatol* **32**, 39-47
43. Thornberry NA y Lazebnik Y (1998) Caspase: enemis within. *Science* **281**, 1312-1316.
44. Yang X, Stennicke HR y Wang B (1998) Granzyme B mimics apical caspase. *J Biol Chem* **273**, 34278-34283
45. Scaffidi C, HY Fulda S, Srinivasan A et al., (1998) Two CD95 (APO1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-1687
46. Borner C y Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* **6**, 497-507
47. Kaplowitz N y Tsukamoto H (1996) Oxidative stress and liver disease. *Prog Liver Dis* **XIV**, 131-159
48. Cai J y Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 11401-11404
49. Li J y Billiar TR (1999) Nitric oxide IV determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* **276**, G1069-G1073
50. Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, Kolb SA, Hentze H, Tretz O et al., (1999) Inhibition of caspase activity prevents CD95-mediated hepatic microvascular perfusion failure and restores Kupffer cell clearance capacity. *FASEB J* **13**, 1239-1248
51. Collet A, García Ruiz C, Morales A et al., (1997) Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: Effect

- of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* **26**, 699-708.
52. Lemasters JJ, Digiuseppi J, Nieminen AL y Herman B (1987) Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* **325**, 78-81.
 53. Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D y Fromenty B (1999) Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol* **15**, 367-373
 54. Cascales M, Martín-Sanz P, Craciunescu DG, Mayo I, Aguilar A, Robles-Chillida EM y Cascales C (1991) Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis* **12**, 233-240

MONOOXIGENASAS MICROSÓMICAS DE FUNCIÓN MIXTA

SUMARIO

1. Introducción
2. Emergencia evolutiva de la superfamilia citocromo P450 (CYP)
3. Monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450
4. Citocromo P-450 y metabolismo de fármacos
5. Monooxigenasas dependientes de flavina
6. Inhibidores del citocromo P-450
7. Conclusiones
8. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

La biotransformación de las sustancias tóxicas se realiza principalmente en hígado y en menor proporción en riñón, plasma sanguíneo y otros órganos. El hígado posee diversos sistemas para la eliminación de toxinas tanto endógenas como exógenas, siendo el sistema enzimático de oxido-reducción más importante, el sistema monooxigenasa de función mixta, que depende del citocromo P-450. Este sistema microsómico transforma un 50% de las sustancias tóxicas que ingresan en el organismo, transformándolas en metabolitos reactivos que posteriormente se conjugan por acción de otros enzimas hepáticos. Los isoenzimas P-450 catalizan una amplia variedad de reacciones de monooxigenación entre las que se incluyen las siguientes: hidroxilación, epoxidación, N-desmetilación, O-dealquilación, S-oxidación, desaminación, sulfoxidación, desulfuración y deshalogenación oxidativa (1, 2, 3).

El citocromo P-450 cataliza, a veces, reacciones de deshidrogenación en vez de las de monooxigenación. Esto ocurre con el paracetamol (acetaminofeno), el cual por acción del citocromo P-450 se convierte en el derivado

N-acetil-p-benzoquinonaimina. El mecanismo de oxidación de este fármaco indica que una sustracción inicial de hidrógeno del grupo hidroxílico fenólico está favorecida sobre la sustracción de hidrógeno del grupo acetilamino. Se acepta que estas enzimas catalizan las reacciones de monooxigenación por inserción de un átomo de oxígeno en los sustratos, y en estas reacciones se generan especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos que pueden inactivar al propio sistema que los genera.

Otras monooxigenasas microsómicas son aquellas que poseen como grupo prostético la FAD (flavina adenin dinucleótido) y se denominan FAD monooxigenasas. Estos sistemas, al igual que los dependientes del citocromo P-450 producen una monooxigenación en una gran variedad de sustratos, que presentan entre sus características el ser nucleófilos débiles. Para su funcionamiento las FAD monooxigenasas requieren NADPH y oxígeno molecular.

2. EMERGENCIA EVOLUTIVA DE LA SUPERFAMILIA CITOCROMO P-450 (CYP)

La aparición de los genes que codifican el citocromo P450 se inició hace aproximadamente mil millones de años. A lo largo de la evolución, los animales han sido sometidos a una guerra biológica, cuando habiendo conquistado las tierras emergidas, comenzaron a alimentarse de plantas terrestres. Frente a aquella agresión, las plantas respondieron produciendo fitoalexinas, toxinas vegetales liposolubles, que los animales no podían eliminar por vía urinaria o biliar. La respuesta de los animales no se hizo esperar y se inició en ellos el desarrollo de sistemas capaces de metabolizar y eliminar dichas fitoalexinas. Por duplicación de un gen ancestral común en plantas y animales, surgido hace mil millones de años y la evolución de esos dos genes, los animales supervivientes consiguieron estar dotados con múltiples formas del citocromo P-450, que pueden metabolizar y eliminar una gran multitud de xenobióticos liposolubles ambientales y entre ellos los derivados de las plantas. Así, en los 400 millones de años últimos se inició una rápida aparición de genes codificadores de nuevas formas de P450 (4).

Antes de que ocurrieran estos acontecimientos, nuestro planeta tenía una atmósfera anaeróbica reductora. Entonces una serie de sustancias «abiogénicas» se encontraban formando asociaciones con los aminoácidos. La apoproteína P450 debía haber derivado de aminoácidos abiogénicos hace 2 o 3 mil millones de años. Debido a su bajo potencial de

oxido-reducción (alrededor de -350 mV), el citocromo P-450, podría funcionar exclusivamente en reacciones reductoras cuando la atmósfera estaba compuesta de hidrógeno, nitrógeno, metano, amoníaco, monóxido de carbono y dióxido de carbono. La reducción química o fotoquímica podría haber proporcionado electrones al citocromo P450 en ausencia de flavoproteínas y cofactores reductores. La ausencia de oxígeno en la atmósfera haría improbable la actividad oxidativa del P450, por tanto la actividad ancestral del P450 debía estar limitada a reacciones reductoras en condiciones anaeróbicas (5).

La aparición del oxígeno en la atmósfera, hace dos mil quinientos millones de años debió causar profundos efectos en los organismos anaerobios, y debió estar acompañada por la aparición del ozono en las capas elevadas de la atmósfera. La absorción por el ozono de la radiación ultravioleta permitió probablemente la evolución de los organismos fotosintéticos. La molécula de oxígeno ($\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$) es un biradical debido a la presencia de dos electrones desapareados en dos orbitales diferentes y es un buen agente oxidante, pero solo puede ser reducido aceptando cuatro electrones de manera secuencial. La adición del primer electrón (e^-) genera el radical anión superóxido (O_2^-). La adición de un segundo electrón y dos protones ($e^- + 2\text{H}^+$) genera la especie activa peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un tercer electrón produce el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que posee una elevada reactividad. El cuarto electrón genera agua (6)

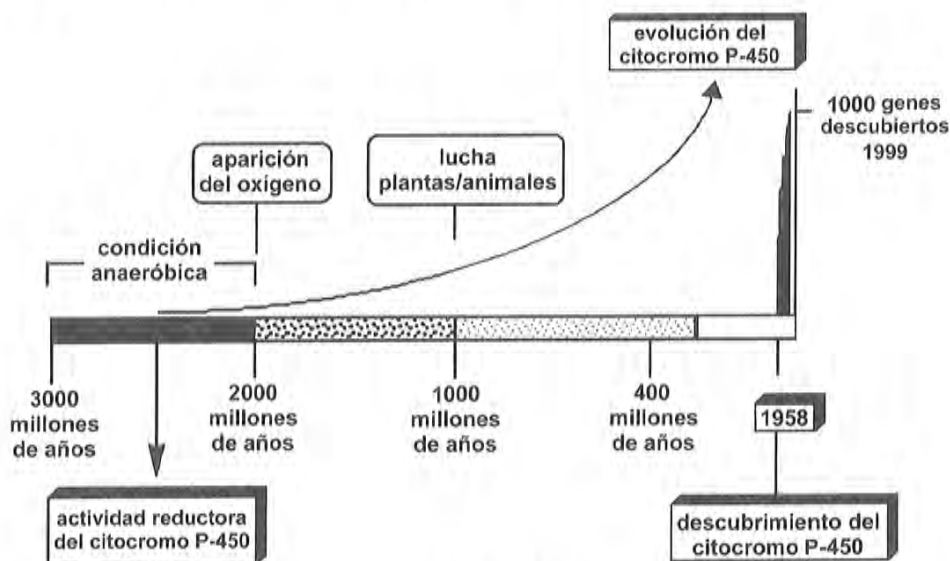


FIGURA 1. Emergencia evolutiva del citocromo P-450 (5).

El citocromo P-450 (P450) se refiere a un grupo de hemoproteínas que contienen hierro. La primera evidencia experimental de la existencia del citocromo P450 data de 1958, que es cuando se descubrieron los enzimas dependientes del P450 a partir de microsomas de rata y cerdo (7, 8), los cuales al ser tratados con ditionito y con monóxido de carbono mostraron un máximo de absorción a 450 nm. El «pigmento» responsable de esta absorción se denominó citocromo P-450 y posteriormente fue caracterizado, como una hemoproteína. En 1967 se caracterizaron las dos formas más importantes del P450: las inducibles por el fenobarbital y por el metilcolantreno (9). En 1987 se habían descrito 31 genes y sólo dos años más tarde se habían ya encontrado 71 (10). En 1990 la superfamilia P450 consistía en 154 genes diferentes en un total de 23 eucariotas y 7 procariotas, y en 1999 ya se habían identificado más de 1.000 genes y de ellas 30 subfamilias en humanos. Por tanto este sistema tan versátil y en continua expansión, es el sistema enzimático considerado más importante en el metabolismo de xenobióticos y endobióticos (5, 11, 12)

La clasificación de las numerosas isoformas del citocromo P-450 ha hecho que se las catalogue utilizando las letras CYP seguidas de números y letras referentes a las familias y subfamilias. El esfuerzo de Nerbert et al., (13) consiguió que se adoptase una nomenclatura basada en identidades de la secuencia proteica. Así que, aquellas proteínas P-450 con un 40% o más de identidad, se incluyen en la misma familia, designada por un número

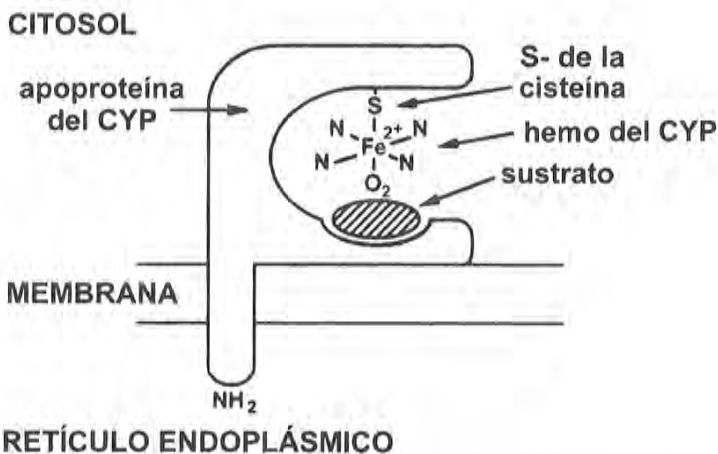


FIGURA 2. Estructura del citocromo P-450. La molécula de hemo, representada por los cuatro átomos de nitrógeno del núcleo tetrapirrol, está inserta a la proteína por un enlace tiolato entre el hierro del hemo y el azufre de un residuo cisteína de la apoproteína. La proteína, inserta en la membrana del retículo endoplásmico por un péptido N-terminal, se encuentra en su mayor parte en el compartimento citosólico (11).

arábigo, y aquellas con identidad superior al 55% se incluyen en la misma subfamilia, designada por una letra mayúscula. Por ejemplo, el citocromo que más se induce por el fenobarbital, ha sido asignado a la familia 2, subfamilia B y el gen y el enzima se designan *CYP2B4* y CYP2B4, respectivamente (14)

La mayoría de los isoenzimas CYP en eucariotas se encuentran en las membranas, principalmente en el retículo endoplásmico y en la mitocondria. El CYP microsómico hepático constituye el 20% de las proteínas microsómicas (del 2 al 3% del contenido proteico hepático). Los conceptos actuales de la topología membranaral para las monooxigenasas microsómicas P450 inducibles por fenobarbital se muestran en la Figura 3 (12)

3. MONOOXIGENASAS MICROSÓMICAS DEPENDIENTES DEL CITOCROMO P-450

Los microsomas hepáticos poseen monooxigenasas de función mixta, no específicas, dependientes del citocromo P-450, que catalizan la oxidación de una infinidad de agentes químicos. Como se comentó anteriormente, hace más de treinta años se demostró que el pigmento microsómico, que se une al monóxido de carbono, se trata de una hemoproteína de tipo b que interviene en la oxidación de xenobióticos y esteroides. La solubilización y

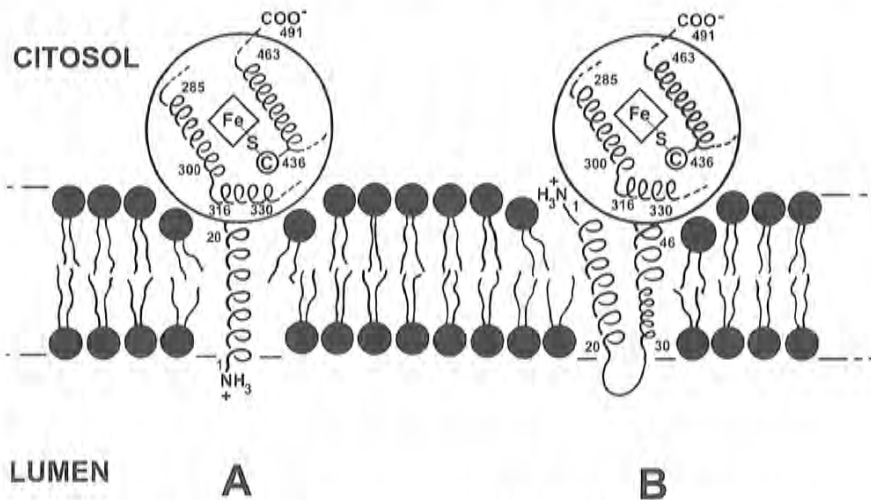


FIGURA 3. Topología del citocromo P-450 en el retículo endoplásmico. Las alternativas topológicas (A) y (B) se han representado utilizando el isoenzima hepático microsómico de conejo (12).

resolución de los componentes de este sistema enzimático, a partir de las membranas microsómicas y la reconstitución del complejo activo formado por el citocromo P-450, la NADPH citocromo P-450 reductasa y la fosfatidil colina, ha permitido la caracterización completa de estos constituyentes. Lo que se conoce hoy como una superfamilia genética citocromo P-450, codifica numerosos enzimas, cuya importancia radica en la variedad de reacciones químicas que catalizan y por el gran número de sustratos, polares y no polares, que transforman. No es exagerado decir que el citocromo P-450 es el sistema biológico más versátil que se conoce y en los últimos años se han llegado a caracterizar más de 1.000 isoformas. El nombre citocromo P-450, utilizado al principio para describir el pigmento rojo cuyo complejo Fe^{2+} -CO presentaba un máximo de absorción a 450 nm, no es el apropiado para expresar la función de este sistema, ya que en la mayoría de casos el P-450 actúa como una oxigenasa y no como un transportador electrónico.

El citocromo P-450 es una hemoproteína que consta de un grupo hemo y una cadena polipeptídica de 45-55 kDa. El grupo hemo consiste en una protoporfina IX con un átomo de hierro localizado en el centro del anillo-protoporfirínico, el cual tiene cuatro ligandos insertos a los grupos pirrólicos y dos ligandos axiales. Un ligando axial es un anión tiolato que parte de un residuo cisteína de la apoproteína. El otro ligando axial es un grupo hidroxilo procedente de un residuo aminoácido (Figura 2).

Nuestro conocimiento de la amplitud de reacciones catalizadas por el P-450 es aún bastante incompleto, ya que este citocromo se encuentra ampliamente distribuido en la Naturaleza. Animales, plantas y microorganismos lo poseen y en los mamíferos este sistema se encuentra en todos los tejidos examinados. El P-450 aparece predominantemente en las membranas del retículo endoplásmico y en la mitocondria y el órgano que lo posee en mayor cantidad es el hígado. Los sustratos del P-450 pueden ser sustancias de procedencia biológica, agentes químicos de síntesis y una variedad de esteroides y lípidos. Dentro del elevado número de agentes contaminantes ambientales, la mayoría son sustratos del citocromo P-450. Muchos de ellos pueden actuar como inductores o inhibidores de varias de sus isoformas. Consideradas las numerosas posibilidades de modificación y síntesis de xenobióticos, fármacos existentes y de nuevo diseño, no se puede poner límite al número de compuestos que pueden ser transformados por esta familia enzimática.

La mayoría de las moléculas farmacológicamente activas son lipofílicas y permanecen sin ionizar o solo parcialmente ionizadas a pH fisiológico. Después de la filtración glomerular en el riñón, vuelven a ser reabsorbidas

y permanecen en el organismo. La biotransformación significa que un xenobiótico o endobiótico liposoluble sea transformado y/o conjugado en metabolitos polares hidrosolubles que puedan ser excretados. Los productos metabólicos pueden ser a menudo menos activos que la droga de origen, sin embargo, algunos productos de la biotransformación (metabolitos) pueden presentar efectos tóxicos. Por tanto, la biotransformación puede incluir procesos de «destoxificación» y «toxificación».

Los enzimas del sistema microsómico dependiente del citocromo P-450, catalizan la oxidación de una amplia variedad de fármacos, pesticidas, carcinógenos, toxinas, agentes contaminantes ambientales, productos naturales vegetales (alcaloides y micotoxinas) y de microorganismos (antibióticos, etc.), como también compuestos endógenos (esteroides, ácidos grasos, vitaminas liposolubles, eicosanoides, etc.). Estas reacciones pueden agruparse en las siguientes categorías: hidroxilación de un carbono, oxigenación de un heteroátomo, liberación de un heteroátomo, deshidrogenación, epoxidación, transferencia de un grupo oxidado, peroxidación, desaminación, desulfuración, deshalogenación y reducción. Cualquiera de estas reacciones genera productos metabólicos del xenobiótico, cuya reactividad puede ocasionar a veces, la inactivación del propio sistema que los produce.

El sistema dependiente del citocromo P-450 cataliza también reacciones de reducción, y así como las reacciones oxidativas se basan en la sustracción de átomos de hidrógeno o electrones del sustrato por el hipervalente FeO^{3+} , y recombinación del hidroxilo con los radicales, las reacciones reductoras implican la transferencia electrónica a través del par ferroso/férrico. La mayoría de las reacciones comienzan con la transferencia de electrones desde el NADPH a la NADPH citocromo P-450 reductasa microsómica. Desde aquí los electrones pasan al citocromo P-450, lo cual conlleva la activación reductora del oxígeno molecular, seguida de la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato.

La mayoría de los sustratos son lipofílicos y no se sabe que existan interacciones en la carga de los sustratos que contribuyan a su unión con el citocromo. En el caso de xenobióticos, estos se transforman en compuestos más polares, que una vez conjugados con compuestos hidrosolubles, el glutatión o el ácido glucurónico, se excretan por vía biliar o urinaria.

La mayor parte de las isoformas del citocromo P-450 se encuentran ancladas en las membranas. La mayoría de ellas se localizan en las membranas del retículo endoplásmico (microsomas), excepto dos de ellas, que se

encuentran implicadas en la síntesis de esteroides (el P-450 11A1 y el P-450 11B1), se localizan en las mitocondrias de tejidos esteroideogénicos.

Los enzimas dependientes del citocromo P-450 juegan también un papel importante en el metabolismo de agentes terapéuticos, carcinógenos, esteroides, pesticidas, hidrocarburos y productos naturales. Los compuestos endógenos incluyen esteroides prostanoides, eicosanoides y ácidos grasos. Se ha demostrado la presencia de citocromo P-450 en hígado y glándulas adrenales donde cataliza la oxidación de esteroides y fármacos. También se ha observado que esta hemoproteína contiene un grupo tiolato fijo y un ligando agua reemplazable y que la presencia del ligando tiolato en posición *trans* con el monóxido de carbono daba como resultado el espectro de absorción poco usual de esta familia de proteínas (15, 16).

4. CITOCROMO P-450 Y METABOLISMO DE FÁRMACOS

El sistema enzimático P-450 consiste en dos componentes proteicos: la hemoproteína, denominada citocromo P-450 y una flavoproteína denominada NADPH citocromo P-450 reductasa (17, 18). El citocromo P-450 es el lugar de unión del sustrato y del oxígeno molecular en el sistema enzimático, mientras que la reductasa sirve como transportador electrónico enviando electrones desde el NADPH al complejo citocromo-P450-sustrato (Figuras 4 y 5)

Un inconveniente que presenta este sistema citocromo P-450 en su misión biotransformadora de xenobióticos, es que éstos pueden convertirse en metabolitos químicamente reactivos, radicales libres o metabolitos electrofílicos, potencialmente tóxicos, que atacan a constituyentes celulares vitales y pueden ser origen de necrosis, mutaciones y cáncer. La necrosis afecta principalmente al hígado, órgano principal en la destoxicación, que contiene las concentraciones más elevadas de citocromo P-450. Los metabolitos reactivos son generalmente muy inestables, poseen una vida media muy corta, pero debido a su elevada reactividad pueden reaccionar en el mismo lugar donde son generados. Cuando la tasa de formación del metabolito reactivo es considerable, los mecanismos de defensa intracelular resultan insuficientes y esto trae como consecuencia la alteración de diversas macromoléculas celulares y sobreviene la hepatitis tóxica (necrosis). Si la generación de metabolitos reactivos es moderada, no se producen lesiones tóxicas severas. Sin embargo, la fijación covalente del metabolito reactivo sobre las proteínas hepáticas puede modificar la identidad del propio organismo. En algunos casos, la presencia de estas proteínas modificadas por reacción con los metabolitos reactivos del agente tóxico, puede desencade-

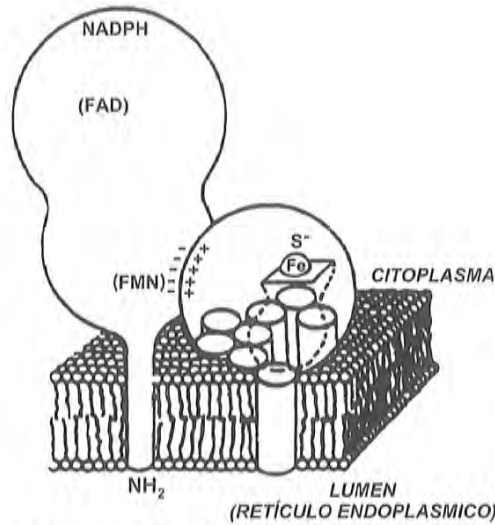


FIGURA 4. Interacción citocromo P-450 y NADPH citocromo P-450 reductasa. La porción unida al FAD se reconoce como el sitio de entrada de electrones en el enzima, mientras que la porción unida al FMN es el sitio donador de electrones al citocromo P-450 (17).

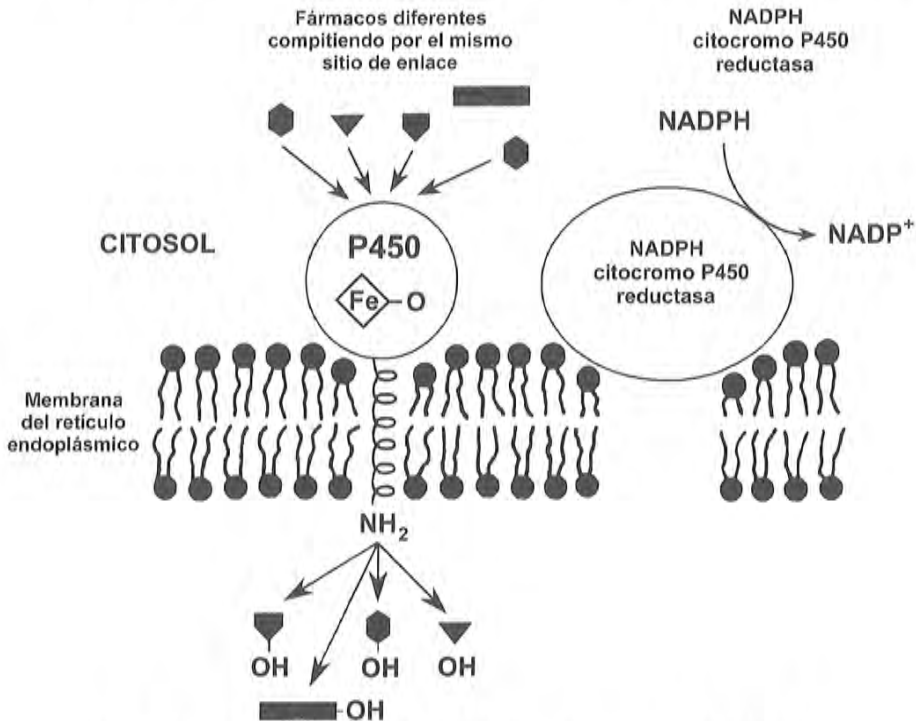


FIGURA 5. Competición de fármacos por el citocromo P-450 (18).

nar la aparición de hepatitis inmunoalérgica (19) (ver capítulo 7 de este volumen).

En los últimos diez años se ha avanzado mucho en el conocimiento del metabolismo de agentes terapéuticos en humanos y estos avances han permitido establecer cambios paradigmáticos relativos a la biotransformaciones oxidativas mediadas por la superfamilia de monooxigenasas que contienen hemo, colectivamente denominadas enzimas dependientes del citocromo P-450. (20). Gran parte de estos cambios tienen su base en la caracterización a nivel molecular de varias isoformas del P-450, respecto a especificidad por el sustrato y a determinantes reguladores. Se ha reconocido que de unas 30 isoformas caracterizadas en humanos, solo unas seis se encuentran implicadas en el metabolismo de la mayoría de fármacos. En humanos un isoenzima particular, que depende del citocromo P4503A4, juega un papel importante en la biotransformación de un número elevado de medicamentos, debido a su abundancia en hígado e intestino, y a su amplia especificidad por los sustratos. El CYP3A4 cataliza el metabolismo de un 60% de todos los fármacos y medicamentos que están en uso, incluyendo los esteroides contraceptivos, los agentes inmunosupresores, los antimicóticos imidazólicos y los antibióticos macrólidos (21 - 24)

El CYP3A4 humano se activa selectivamente e hígado e intestino. La expresión genética de CYP3A en ambos tejidos se induce notablemente en respuesta al tratamiento con una gran variedad de compuestos. Gran parte de los inductores más poderosos del gen CYP3A son frecuentemente utilizados en clínica, como el glucocorticoide dexametasona, el antibiótico rifampicina y al antimicótico clotrimazol. Esta inducibilidad de la expresión del CYP3A4, acoplada con la amplia especificidad por el sustrato del enzima CYP3A4 representa una base para muchas de las interacciones de agentes terapéuticos en pacientes sometidos a medicación múltiple. Por ejemplo, la rifampicina, al inducir la expresión del CYP3A4, estimula el metabolismo de una serie de agentes que son sustratos del CYP3A4 (ejemplo, los inhibidores de la HMG CoA reductasa, los inhibidores de la proteasa HIV, los esteroides contraceptivos, etc.).

El que uno de los CYP microsómicos en el hígado humano, el CYP3A4, participe en la biotransformación oxidativa de muchos fármacos, hace que la actividad de esta isoforma CYP sea fácilmente inhibida por muchas drogas. Tales interacciones pueden originar efectos tóxicos adversos en pacientes en los que esta situación se exacerba por la administración simultánea de varios medicamentos. Estudios clínicos han propuesto que una juiciosa selección de fármacos por terapia combinatoria podría ser un medio relati-

vamente simple para evitar las consecuencias adversas de la interacción de fármacos. Tales estudios tienen que contar con información básica obtenida a partir de estudios bioquímicos que muestren las preferencias de los CYP por los sustratos y de estudios moleculares de los factores que determinan los niveles de CYP en los pacientes. Recientemente está emergiendo cuantiosa información sobre la especificidad del CYP por los sustratos e inhibidores, por la estructura de las proteínas y también sobre la expresión génica del CYP en hígado en un momento dado. Con información de este tipo, será posible reconciliar la probabilidad de la interacción de fármacos producidas por combinaciones específicas de ellos y predecir aquellos que presentan riesgo de tales interacciones.

Otra isoforma del P-450 bien estudiada es la específica del etanol CYP2E1, descubierta como especie que mostraba afinidad por el cianuro después de la administración de etanol (25, 26). El papel del sistema microsómico de oxidación del etanol en el metabolismo hepático del etanol (MEOS) ha sido revisado por Lieber (27). La forma constitutiva, inducible por etanol, CYP2E1, oxida el etanol a acetaldehído en presencia de fosfolípidos y citocromo P-450 reductasa. El papel más significativo del CYP2E1 es su respuesta adaptativa frente a niveles elevados de etanol en sangre, que lleva consigo una aceleración del metabolismo oxidativo del etanol. La asociada generación de radicales libres, sin embargo, contribuye a la lesión hepática en los alcohólicos. Una capacidad peculiar del CYP2E1 es la de activar muchos xenobióticos a productos hepatotóxicos o carcinogénicos. La proliferación del retículo endoplásmico asociada con la inducción del CYP2E1 se acompaña por elevada actividad de otros CYP, lo que ocasiona un metabolismo acelerado y tolerancia a otros fármacos. La restricción calórica de la dieta actúa como mecanismo regulador, ya que disminuye la actividad del CYP2E1 humano (28).

Un problema importante en el desarrollo de nuevas entidades químicas como productos terapéuticos y de consumo, es la capacidad para inducir los sistemas hepáticos encargados de su metabolismo, particularmente los enzimas microsómicos dependientes del citocromo P-450. La inducción de isoformas específicas del CYP se ha asociado también con interacciones entre fármacos, incrementos en el peso del hígado (hiperplasia), proliferación del retículo endoplásmico en hepatocitos y hepatocarcinogenicidad no genotóxica. Además de los enzimas dependientes del CYP, los enzimas de la fase II, implicados en la conjugación de los xenobióticos y sus metabolitos, para facilitar su excreción, se han asociado también con la bioactivación de los xenobióticos en metabolitos tóxicos o carcinogénicos. Ejemplos de estos enzimas de la fase II incluyen las uridina difosfato-glu-

curonil transferasas, las glutation-S-transferasas y las sulfotransferasas. Los modelos *in vivo* se usan comúnmente para el estudio de la inducción de la expresión enzimática y la hepatotoxicidad. Como estos métodos son costosos y requieren mucho tiempo, además de grandes cantidades de material para el ensayo, se han desarrollado una serie de modelos alternativos (29).

La enfermedad yatrogénica es uno de los problemas más importantes que se derivan de la prescripción inapropiada. Por esto, las industrias farmacéuticas y químicas reconocen hoy el valor del desarrollo de técnicas *in vitro* para asegurar la inocuidad y eficacia de los fármacos y medicamentos en una fase temprana de su desarrollo. Las técnicas *in vitro* utilizadas para el estudio de la expresión de los enzimas hepáticos metabolizadores de fármacos y la citotoxicidad incluyen cultivos primarios de hepatocitos y líneas celulares inmortalizadas. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas sobre estos sistemas es limitada. Por ejemplo, las líneas celulares en continua división no pueden mantener su capacidad de expresar o inducir enzimas específicos de la fase I o II, que resultan ser muy bajas o ausentes para ser evaluadas. En células quiescentes se detecta una pérdida de más del 50% de la actividad enzimática total después de las 24 horas de cultivo.

A pesar de estos inconvenientes, se ha demostrado que los hepatocitos en cultivo primario en condiciones que restauran la morfología normal del hígado y la expresión genética específica del hígado, pueden responder a los xenobióticos con la inducción de enzimas dependientes del citocromo P-450 a niveles comparables a los conseguidos *in vivo*. Estudios sobre la toxicidad de la cocaína (30) y la ciclopoprina A (31) han comprobado la efectividad de los experimentos sobre hepatocitos de rata en cultivo. Estas condiciones de cultivo incluyen el uso de una matriz extracelular, medio de cultivo definido químicamente y a veces el cocultivo de hepatocitos con células no parenquimáticas.

La farmacología tradicional ha identificado una serie de xenobióticos que producen unos efectos biológicos característicos *in vivo*, pero que carecen de mecanismos moleculares de acción definidos. Entre estos xenobióticos están los proliferadores de peroxisomas, las tiazolidinedionas y una serie de compuestos que inducen la expresión de los genes del citocromo P-4503A y promueven el metabolismo de otros xenobióticos. Estas tres clases de compuestos se sabe que ejercen su acción por activación de miembros huérfanos de una familia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligandos. (32)

Los efectos colaterales de los fármacos se han estimado en los Estados Unidos, en dos millones de hospitalizaciones y 100.000 muertes al año (33). Muchas de estas reacciones adversas ocurren en pacientes que toman múltiples medicamentos, cuando un fármaco altera las propiedades de un segundo fármaco. Estas denominadas interacciones entre fármacos pueden también ocurrir cuando un fármaco actúa elevando o decreciendo la concentración efectiva de otro.

El sistema microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450 es un sistema generador de especies reactivas de oxígeno (O_2^- y H_2O_2) y metabolitos reactivos como subproductos de la oxigenación del agente químico. Los mecanismos catalíticos de todos los isoenzimas dependientes del citocromo P-450 parecen similares y la secuencia de reacciones para la oxidación del sustrato aparecen en la Figura 6. En la primera etapa el sustrato (RH) se une al P-450 oxidado (Fe^{3+}), lo cual perturba el equilibrio de la molécula citocromo P-450 y facilita la entrada del primer electrón y promueve el paso del complejo enzima sustrato a su forma reducida (Fe^{2+}). Esta segunda etapa está catalizada por la NADPH citocromo P-450 reductasa y transfiere un electrón desde el NADPH a la hemoproteína. Después de esta reducción el oxígeno (O_2) se une al hierro ferroso, lo que da lugar a un intermediario $Fe^{2+}(O_2)$ que se encuentra en equilibrio con su forma resonante $Fe^{3+}(O_2^-)$. Este complejo acepta un segundo electrón de la flavoproteína anteriormente mencionada o de la NADH citocromo b_5 reductasa, generándose el complejo férrico peróxido. El siguiente paso implica la rotura del enlace oxígeno-oxígeno, la incorporación de dos protones ($2H^+$) y la generación de *oxígeno activo* que permanece unido al hemo. Esta especie (FeO)³ es un poderoso oxidante en la forma responsable para la oxidación del sustrato. El otro átomo del oxígeno se libera en forma de agua. La transferencia del oxígeno desde el hemo al sustrato implica la sustracción de un átomo de hidrógeno del sustrato y la recombinación del oxígeno del hemo al radical sustrato (ROH). Esto da lugar a la oxidación del sustrato, que en la última etapa se disocia del sitio activo, completando con ello el ciclo catalítico. Estas reacciones resumen las etapas principales del ciclo catalítico de las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450 (34).

5. MONOOXIGENASAS MICROSÓMICAS DEPENDIENTES DE FLAVINA

La primera monooxigenasa dependiente de flavina, purificada a partir de microsomas hepáticos de cerdo (35), cataliza la oxidación de un excepcional rango de sustratos de naturaleza nucleofílica débil. La secuencia de

tiva activada por oxígeno. Algunos elementos de la estructura proteica estabilizan el enzima unido a la 4- α -hidroperoxiflavina y lo preservan de la destrucción por agua. Esta proteína con actividad monooxigenasa potente permanece así accesible a los xenobióticos. En la primera etapa, cualquier nucleófilo débil (S) que se ponga en contacto con el enzima en su forma peroxidada será oxidado. El producto (SO) se libera inmediatamente y en la segunda y tercera etapas se liberan secuencialmente agua y NADP⁺. La hidroperoxiflavina se regenera con la intervención de NADPH y O₂ en las etapas 4ª y 5ª, completandose así el ciclo catalítico (Figura 7).

Como el sustrato (xenobiótico) no es necesario para la activación del oxígeno, no se requiere la fijación precisa del sustrato al enzima y estos enzimas pueden así catalizar la oxidación de una enorme variedad de nucleófilos débiles orgánicos e inorgánicos. Los grupos funcionales que pueden sufrir la oxidación por las flavin monooxigenasas son los siguientes: aminas terciarias, aminas secundarias, hidrazinas, tioles y disulfuros, tioa-carbamidas y sulfuros. Las flavin monooxigenasas son los enzimas principalmente encargados de catalizar la N-oxidación de los fármacos con aminas terciarias a sus derivados N-óxidos y estos metabolitos son los productos principales encontrados en sangre de humanos tratados con clorpromazina y con otros antidepresivos tricíclicos (37), Cholerton y Smith (38) han descrito un polimorfismo genético en la oxidación de la trimetilamina y la

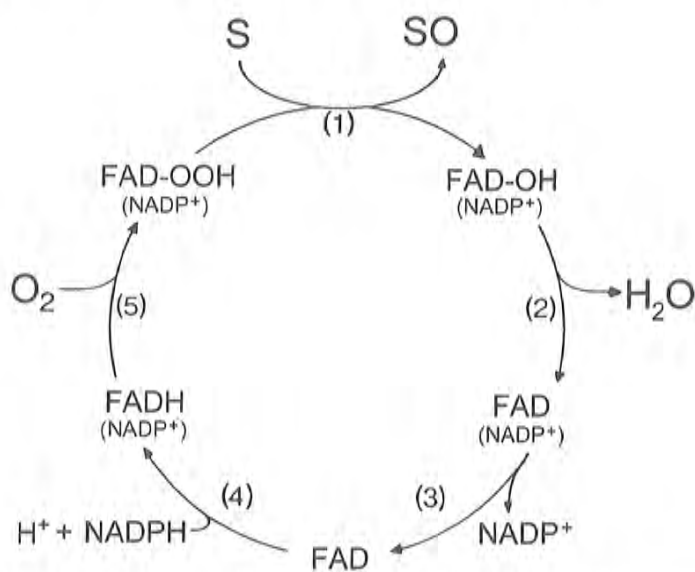


FIGURA 7. Ciclo catalítico de las monooxigenasas dependientes de flavina (36).

nicotina en humanos, que se debe aparentemente a un defecto en una o más de las FAD monooxigenasas. Este grupo ha clonado una FAD monooxigenasa que se expresa en hígado humano fetal, pero no en hígado adulto. Recientes estudios han demostrado que este sistema se induce en ratas por pretratamiento con fenobarbital y que la hepatotoxicidad de la tioacetamida (hepatotóxico metabolizado por esta monooxigenasa) se eleva notablemente debido a esta inducción (39)

6. INHIBIDORES DEL CITOCROMO P-450

Existen diversos mecanismos por los cuales los fármacos y los agentes químicos lipofílicos pueden modular la actividad de los sistemas dependientes del citocromo P-450. Estos puede funcionar produciendo inhibición reversible o irreversible. La inhibición reversible ocurre cuando un agente lipofílico se une estrechamente al sitio activo del citocromo, bien en la región de enlace del sustrato hidrofóbico o en la posición del sexto ligando del grupo hemo. Así, la obstrucción de sitio de enlace al sustrato hidrofóbico en la apoproteína o la activación por oxígeno del grupo hemo dan lugar a la inhibición transitoria de la actividad enzimática, incluso en casos de inhibición muy potente. Esta inhibición puede ser competitiva, no competitiva o mixta, lo cual ha sido interpretado en términos de unión a regiones proteicas hidrofóbicas, al hemo o a ambos. Sin embargo, estos sitios se encuentran muy próximos y muchos de los inhibidores más potentes interaccionan con los dos. Por ejemplo, los imidazoles son inhibidores que se unen al hemo y previenen la activación del O_2 . Sin embargo, incrementando el carácter hidrofóbico de estos agentes se influencia notablemente su potencia inhibidora, lo cual es incompatible con la unión exclusivamente al hemo. En cambio, parece que existe una unión al hemo combinada con una interacción secundaria a un sitio cercano de enlace al sustrato hidrofóbico (40).

Ciertos fármacos y xenobióticos son pro-inhibidores, tienen poca potencia y requieren activación enzimática para exhibir su capacidad inhibidora total, en la que está implicada uno o varios ciclos de activación del O_2 . Tales sustancias se convierten en especies reactivas que se unen estrechamente al propio CYP que cataliza su oxidación. Estos agentes provocan modificaciones irreversibles o quasi-irreversibles en el CYP que dan como resultado una prolongada inhibición. La inhibición irreversible ocurre cuando el CYP se inactiva, mientras la quasi-irreversible ocurre cuando un metabolito reactivo atrapa al CYP en un estado de complejo hipoactivo sin destruirlo. La inactivación y la formación de complejos conduce generalmente a una inhibi-

ción más selectiva que la que se observa por acción de los inhibidores reversibles (Figura 8).

Inhibidores reversibles

Los inhibidores selectivos y potentes del CYP se usan como modelos experimentales para definir el papel de las oxidaciones dependientes del CYP en los procesos celulares. Entre los agentes utilizados más frecuentemente están los heterociclos nitrogenados imidazol y piridina. A mayor carácter lipofílico y tamaño, mayor potencial inhibidor. Sin embargo, hay valores óptimos para estos parámetros más allá de los cuales la inhibición no se incrementa. En general, parece que los inhibidores reversibles muy potentes, tales como los imidazoles antimicóticos clotrimazol y miconazol, tienden a ser menos específicos que los análogos menos potentes tales como el cetoconazol. Este último se ha utilizado en numerosos estudios como un inhibidor selectivo del CYP3A4 humano, aunque se ha descubierto recientemente que esta selectividad aparente es a veces equívoca (41). La selectividad puede estar restringida a menores concentraciones del fármaco.

Los metabolitos de algunos fármacos pueden generarse rápidamente y eliminarse lentamente, de manera que se acumulan en el hígado. Así, el N-desmetildiltiazan y la norfluoxetina (metabolitos principales del diltiazan y la fluoxetina, respectivamente) son sustancialmente más potentes que los fármacos de procedencia, como inhibidores del CYP3A4 hepático (responsable de la generación de estos metabolitos inhibidores). Individuos con elevadas concentraciones de CYP3A4 pueden presentar mayor riesgo de interacciones farmacocinéticas durante la terapia.

Algunos inhibidores CYP reversibles pueden ser beneficiosos en situaciones clínicas. El tratamiento a largo plazo con ácido trans-retinoico, en pacientes con cáncer, lleva consigo elevadas tasas de eliminación de retinoides unido a la incapacidad de mantener concentraciones séricas adecuadas de retinoides y al fracaso de la terapia. Se han conseguido mejoras en dichas terapias por administración de inhibidores de la oxidación del retinoide por el CYP. Así, el liarozol se ha probado efectivo al disminuir las tasas de eliminación de retinoides, reteniendo así los efectos antiproliferativos de los retinoides en células MCF7 de cáncer de mama humano (42). Dada la probable implicación del CYP2C8 en la oxidación del retinoide, cabe ahora investigar si el liarozol es un inhibidor efectivo de este enzima. De la misma manera, el fadrozol y el vorazol son inhibidores imidazólicos del enzima CYP-aromatasa CYP19. Este CYP no está asociado con la oxida-

ción de fármacos, pero tiene un papel fisiológico importante en la biosíntesis de estrógenos y andrógenos. Sin embargo, la inhibición de la aromataza como tratamiento de los tumores de mama dependientes de estrógenos, subraya la relevancia de la inhibición del CYP en clínica.

Existen ejemplos en los cuales las interacciones farmacocinéticas son beneficiosas. El diltiazan ha sido usado para desequilibrar la eliminación de la ciclosporina, lo cual haría decrecer el coste de la terapia inmunosupresora. La sustitución del diltiazan por inhibidores farmacológicamente inertes del CYP3A4 podría ser una estrategia viable.

Inhibidores irreversibles

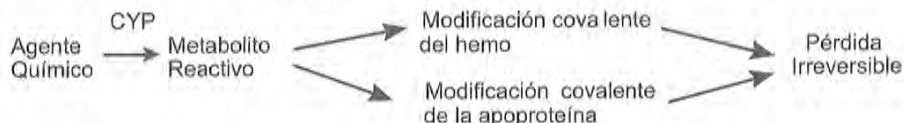
Los mecanismos en los que se basan los inhibidores CYP requieren al menos un ciclo de reacciones completo para su efecto inhibitorio. Al menos dos tipos fundamentales de procesos producen la inhibición irreversible de CYP: la inactivación autocatalítica y la formación de complejos con metabolitos intermediarios. La inhibición autocatalítica o proceso suicida, ocurre cuando un metabolito reactivo de un fármaco se une al CYP alterando su estructura y ocasionando la pérdida irreversible de su función (43). Como solo uno o unos pocos CYP generan el metabolito reactivo se observa una selectividad de inhibición mucho mayor que con los inhibidores reversibles.

La otra categoría de mecanismos en los que se basa la inhibición es la formación de complejos del CYP con metabolitos intermediarios, que ocurre cuando los metabolitos de los fármacos una vez formados se unen fuertemente al grupo hemo del CYP. La diferencia entre la inhibición autocatalítica y la relativa a la formación de complejos CYP-metabolito intermediario es que en esta última la hemoproteína se vuelve catalíticamente inerte, pero no se destruye.

Fármacos que inactivan al CYP por procesamiento suicida

Los fármacos que contienen grupos olefínicos o acetilénicos terminales (dobles o triples enlaces carbono-carbono al final de un grupo funcional) son probablemente sustratos suicidas. El metabolismo de estas sustancias lleva a la N-alkilación del hemo del CYP, a la modificación del anillo profirínico y a la formación de pigmentos anormales. La inactivación es un proceso incompleto: existe generalmente una división entre la formación de metabolitos y la destrucción del CYP, incluso aunque la inactivación se acerca a

INACTIVACIÓN AUTOCATALÍTICA



FORMACIÓN DE COMPLEJO

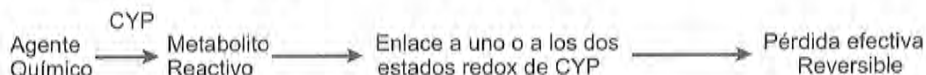


FIGURA 8. Esquema que muestra el papel de los metabolitos reactivos formados por CYP en la inactivación autocatalítica y en la formación de complejos inactivos CYP-metabolito reactivo (40).

estequiométrica en algunos casos. Así, la epoxidación de olefinas terminales por CYP acompaña la N-alkilación del hemo prostético. Como el epóxido no puede causar la alquilación del hemo directamente, la epoxidación y la alquilación del hemo han de ser divergentes antes de la formación del epóxido.

El inactivador clásico es la alilisopropilacetamida (AIA) y los estudios definitivos de Ortiz de Montellano (44) establecieron el mecanismo mediante el cual el CYP convierte la AIA en un metabolito destructor que modifica el hemo del CYP y su actividad. Los fármacos que contienen grupos funcionales insaturados son menos comunes pero incluyen la clorgilina, el gesto-den, el etinil estradiol, el etclorvinol y el secobarbital.

Una gama de grupos funcionales, aparte de los enlaces etilénicos y acetilénicos, en fármacos y xenobióticos pueden también ser activados por el CYP a intermediarios destructores. El antimineralcorticoide espironolactona se oxida en el átomo de azufre de su cadena lateral a un intermediario reactivo que inactiva el citocromo y provoca la formación de un aducto hemo-proteína. Otro inactivador que contiene azufre incluye los pesticidas fosforotioatos tales como el paration, el ácido tienílico uricosúrico, el disulfuro de carbono y los tioeteres tales como el dialil sulfuro. El mecanismo de inactivación del CYP mediada por el cloranfenicol ha sido estudiado y se ha observado que implica la oxidación de la cadena lateral dicloroacetamida con formación del intermediario muy reactivo cloruro de oxamilo, que modifica un sitio activo con residuo lisina en CYP. El antipsoriativo furocumarínico metosalen se activa por el CYP a un intermediario electrofílico que

se une al susceptible CYP. La furafilina es un fármaco antiasmático que contiene también el sistema furano y se ha demostrado que inactiva selectivamente el CYP1A2 humano con mucha eficiencia. Otra vez la versatilidad del CYP en la oxidación de sustratos es la responsable del rango de fármacos que son activados a metabolitos destructores.

Agentes que inactivan al CYP por formación de complejos con sus metabolitos intermediarios

La clase más significativa de agentes que forman los complejos CYP con sus metabolitos intermediarios son las alquilaminas, ya que este grupo funcional es muy común en muchos fármacos, entre los que se incluyen anti-depresores, antibióticos y antihistamínicos. Estudios con metabolitos intermediarios oxidados de estas alquilaminas han implicado a análogos nitrosos en la formación de complejos. Los nitroso metabolitos formados *in situ* se unen fuertemente al hemo del CYP, atrapando al citocromo en un estado hexacoordinado y previniendo la unión al oxígeno y con ello la activación. Incluso aunque los CYP en forma ferrosa son los atrapados y no degradados, la formación de complejos con los metabolitos intermediarios de los agentes alquilantes todavía provocan una prolongada inhibición del metabolismo de fármacos.

Los antibióticos macrolidos, como la troleandomicina y la eritromicina, que poseen macrociclos de 14 miembros, se han descrito por sus interacciones, especialmente con el CYP3A4. Los efectos adversos durante las terapias con estos macrolidos y otros fármacos metabolizados por el CYP3A4, incluyen ictericia con los contraceptivos orales que contienen estrógenos y toxicidad severa con la teofilina (45). El papel central del CYP3A4 en la oxidación de muchos agentes terapéuticos subraya la significación de la inhibición prolongada ocasionada por los macrólidos. La inhibición del CYP puede también ocurrir en casos de terapias con elevadas dosis de alguno de los macrólidos más recientes, tales como la josamicina (un macrolido de 16 miembros), la roxitramicina y la claritromicina (ambos poseen anillos de 14 miembros), pero un papel de sus metabolitos intermediarios para la formación de complejos con el CYP, no ha sido aún establecido. Otros macrolidos tales como la espiramicina, la roquitamicina, la ditromicina y la azitromicina no están asociados con interacciones significativas (45).

Los metabolitos intermediarios de algunos fármacos derivados alquilamina forman complejos con los CYP hepáticos en animales de laboratorio, pero no está claro si los CYP humanos se afectan de la misma manera. Por

ejemplo, los metabolitos intermediarios de la orfenadrina provocan un complejo con los CYP2B (los inducidos principalmente por el fenobarbital en hígado de rata) y desequilibra su propia eliminación después de múltiples dosis en pacientes. Además, la selectividad de la inhibición del CYP por la orfenadrina parece ser diferente en ratas y humanos. Esto puede relacionarse con el hecho que la inducción del CYP2B sea un requisito en la formación de complejos en hígado de rata. Como se mencionó anteriormente, y a pesar de la situación diferente en hígado de rata, el CYP2B6 humano puede no ser responsable de los agentes inductores similares al fenobarbital, y que la cantidad de CYP que puede generar complejos sea baja.

Los antidepresivos tricíclicos tipificados por la desipramina y la nortriptilina y los inhibidores selectivos de la incorporación de la serotonina, generan complejos en hígado de rata en algunas situaciones. Complejos análogos no han sido aún detectados en hígado humano. Esto muestra la necesidad de precaución en la aplicación, al estudio del CYP humano, de datos de inhibidores derivados de especies no humanas. Algunos agentes terapéuticos que contienen grupos alquilamina no forman complejos con CYP (46). La razón de esto se desconoce, pero es probable que existan vías alternativas de biotransformación para estos agentes que no conduzcan a la posibilidad de formar complejos. También es posible que los metabolitos intermediarios puedan ser inestables y se descompongan antes de haber podido formar complejos con el CYP. En algunos casos puede ocurrir que factores estéricos prevengan la formación de metabolitos nitrosos o su aproximación al grupo hemo del CYP.

7. CONCLUSIONES

La mayoría de agentes terapéuticos son oxidados a múltiples metabolitos a lo largo de vías que pueden involucrar a diferentes CYP. Sin embargo, si la biotransformación implica esencialmente sólo un CYP, entonces la inhibición de dicho CYP tendría un impacto mayor sobre la eliminación de dicho fármaco. Se ha demostrado que individuos del fenotipo con capacidad metabolizadora intensa para el CYP2D6 se convierten transitoriamente en individuos con capacidad metabolizadora pobre para este mismo CYP, después de la administración de inhibidores de CYP2D6, tales como los fármacos antipsicóticos y la quinolina antimalaria (47).

Un corolario de la capacidad del sistema CYP para la oxidación de gran cantidad de fármacos es su susceptibilidad a la inhibición por tales agentes. Terapias de múltiples fármacos pueden ser seleccionadas para aminorar las

interacciones farmacocinéticas de fármacos implicando inhibición del CYP. Las terapias personalizadas están siendo cada vez más posibles y pudieran ser iniciadas utilizando mezclas de sustratos CYP que no interaccionaran entre sí (48). Información de la actividad de los principales enzimas CYP metabolizadores de fármacos podrían obtenerse y utilizarse para seleccionar combinaciones de fármacos apropiadas para evitar tales interacciones. Estudios para comprender la relación entre las estructuras y la capacidad inhibidora de los diferentes CYP, facilitarían esta selección. Un ejemplo importante reconocido recientemente es que el inhibidor de la proteasa HIV ritonavir puede asociarse con interacciones adversas con fármacos coadministrados (49). Dada la posibilidad de combinación de terapias, otros inhibidores de la proteasa pueden ser preferidos al ritonavir. Estas consideraciones son importantes para reducir la incidencia de enfermedades yatrogénicas debidas a prescripciones inadecuadas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Martín-Sanz P y Cascales M (1990) Metabolismo de fármacos en hígado y sus alteraciones. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias* vol 13, pp 83-106 (eds Cascales M y Rodés J). CSIC, Madrid.
2. Jacoby, W.B. y Ziegler, D.M. (1990) The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* **266**, 13469-13472
3. Ziegler DM (1994) Detoxication: Oxidation and reduction. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. 3ª edición pp 415-427 (eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA y Shafritz DA) Raven Press, Ltd, Nueva York.
4. González FJ y Nebert DW (1990) Evolution of the P450 superfamily: animal-plant «warfare», molecular drive and human genetic differences in drug oxidation *Trends Genet.* **6**, 182-186
5. Goeptar AR, Scheerens H y Vermeulen NPE (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P-450. *Crit Rev Toxicol* **25**, 25-65.
6. Cascales M Estrés Oxidativo. Envejecimiento y Enfermedad (1999) Instituto de España. Madrid.
7. Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys* **75**, 376.
8. Garfinkel, D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different preparations. *Arch. Biochem. Biophys* **77**, 376
9. Alvares, A.P., Schilling, G., Levin, W., y Kuntzman R. (1967) Studies on the induction of CO-binding pigment in liver microsomes by phenobarbital and 3-methyl cholantrene. *Biochem Biophys Res Commun* **29**, 521

10. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J. et al. (1989) The P450 superfamily: uptodate listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* **8**, 1-13
11. Pessayre (1993) Cytochromes P450 et formation des métabolites réactifs. *Therapie* **48**, 537-548
12. Brown CA y Black SD (1989) Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**, 4442-4449
13. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., et al. (1991) The P450 superfamily: uptodate on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**, 1-14
14. Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ y Vaz ADN (1993) Cytochrome P-450: progress and predictions. *FASEB J* **6**, 669-673
15. Omura T y Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378
16. Omura T y Sato R, Cooper DY, Rosenthal O y Estabrook RW (1965) Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed Proc* **24**, 1181-1189.
17. Strobel HW, Fang WF, Takazaba RS, Stralka DJ, Newaz SN, Kurzban GP, Nelson DR y Beyer RS (1986) Cytochrome P-450 and the activation and inactivation of mutagens and carcinogens. *Basic Life Sci* **39**, 61
18. Meyer, U.A. (1996) Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinetics Biopharmaceutics* **24**, 449-459.
19. Beaume, P.H. y Lecour, S (1997) Immunotoxicology of the liver: adverse reactions to drugs *J Hepatol* **26**, 37-42.
20. Nerbert DW y González FJ (1987) P-450 genes: structure, evolution and regulation. *Annu Rev Biochem* **56**, 945-993
21. Maurel P (1996) En Cytochrome P-450: Metabolic and Toxicological aspects (Ed C.Ioanides) pp 241-270. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Fla.
22. Guengerich FP (1999) Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 1-17
23. Thummel KE y Wilkinson GR (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A
24. Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP y Shimada T (1998) Roles of cytochrome P-450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* **11**, 659-665
25. Comai K y Gaylor JL (1973) Existence and separation of three forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J Biol Chem* **248**, 4947-4955.
26. Hasumura Y, Teschke R y Lieber CS (1974) Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): dissociation from reduced nicotinamido adenine dinu-

- cleotide phosphate-oxidase and possible role of form 1 of cytochrome P-450. *Pharmacol Exp Ther* **194**, 469-474
27. Lieber CS (1997) Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev* **77**, 517-544
 28. Leclercq I, Horsmans Y, Desager JP, Pauwels S y Gubel AP (1999) Dietary restriction of energy and sugar results in a reduction in human cytochrome P450 2E1 activity. *Br J Nutr* **82**, 257-262
 29. Dávila J y Morris DL (1999) Análisis of cytochrome P450 and phase II conjugation enzyme expresión in adult male rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* **35**, 120-130
 30. Andrés D, Sanz N, Zaragoza A, Alvarez AM y Cascales M (2000) Developmental changes in antioxidant defence systems induced by cyclosporine a in rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* **59**, 1091-1100.
 31. Zaragoza A, Díez-Fernández C, Andrés D, Alvarez AM, y Cascales M (2000) Citotoxicidad de la cocaína: Especies reactivas de oxígeno y apoptosis. *Anal Real Acad Doctores* **4**, 137-170.
 32. Kliewer SA, Lehmann JM, Milburn MV y Willson TM (1999) The PPARs and PXR: Nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. *Recent Progress Hormone Research* **54**, 345-368
 33. Lazarou J, Pomeranz BH y Corey PN (1998) Incidence of adverse reaction in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* **279**, 1200-1205
 34. White RE y Coon JJ (1980) Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem* **49**, 315-356
 35. Ziegler DM y Mitchell CH (1972) Microsomal oxidases: IV Properties of a mixed function amine oxidase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **150**, 116-125
 36. Ziegler DM (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**, 171-191
 37. Midha KK, Jaworski TJ, Hawes EM, McKay G, Hubbard JW, Aravagiri M y Marder SR (1991) Radioimmunoassay and other methods for trace analysis of N-oxide compounds. En: *N-oxidation of drugs: biochemistry, pharmacology and toxicology* (eds Hlavica P y Damani LA) pp 37-55. Chapman y Hall, Nueva York.
 38. Cholerton S y Smith RL (1991) Human pharmacogenetics of nitrogen oxidation. En: *N-oxidation of drugs: biochemistry, pharmacology and toxicology* (eds Hlavica P y Damani LA) pp 107-131, Chapman y Hall.
 39. Zaragoza A, Díez-Fernández C, Alvarez AM, Andrés D y Cascales M (2000) Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defen-

- ce systems gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 14624, 1-13.
40. Murray M (1999) Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P-450 enzymes. *Int J Mol Med* 3, 227-238
 41. Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Satoh T, González FJ y Tsutsui M (1996) Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450 and human liver microsomes. *Xenobiotica* 26, 681-693.
 42. Wousters W, van Dun J, Dillen A, Coene MC, Cools V y De Coster R (1992) Effects of liarozole, a new antitumoral compound, on retinoic acid-induced inhibition of cell growth and on retinoic acid metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 52, 2841-2846.
 43. Ortiz de Montellano PR y Correia MA (1995) Inhibition of cytochrome P450 enzymes. En: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. 2ª edición (Ed Ortiz de Montellano PR) pp 305-364, Plenum Press, Nueva York.
 44. Ortiz de Montellano PR, Yost GS, Mico BA, Dinizo SE, Correia MA y Kumbara H (1979) Destruction of cytochrome P-450 by 2-isopropyl-4-pentenamide and methyl 2-isopropyl-4-pentenoate: mass spectrometric characterization of prosthetic heme adducts and non-participation of epoxide metabolites. *Arch Biochem Biophys* 197, 524-533.
 45. Periti P, Mazzei T, Mini R y Novelli A (1992) Pharmacokinetic drug interactions in macrolides. *Clin Pharmacokinetics* 23, 106-131.
 46. Bensoussan C, Delaforge M y Mansuy D (1995) Particular ability of cytochromes P-450 3A to form inhibitory P450-iron-metabolite complexes upon metabolic activation of aminodugs. *Biochem Pharmacol* 49, 591-602.
 47. Baumann P, Meyer JW, Amey M, Baetting D, Bryois C, Jonzier-Perey M, Koeb L, Monney C y Woggon B (1992) Dextromethorphan and mephenytoin phenotyping of patients treated with thioridazine or amitriptyline. *Ther Drug Monit* 14, 1-8
 48. Frye RF, Matzke GR, Adenoyin A, Porter JA y Branch RA (1997) Validation of the five-drug «Pittsburgh cocktail» approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 62, 365-376
 49. Eagling VA, Back DJ y Barry MG (1997) Differential inhibition of P450 isoforms by the protease inhibitors ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol* 44, 190-194

MECANISMOS DE DEFENSA HEPATOCELULAR

SUMARIO

1. Introducción
2. Mecanismo de defensa frente a radicales de oxígeno
3. Glutation
 - 3.1. Síntesis hepática del glutatión
 - 3.2. Ciclo redox del glutatión hepático
 - 3.3. Recambio del glutatión
4. Sistemas enzimáticos antioxidantes.
5. Proteínas del estrés y hepatotoxicidad
6. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

La célula en general y el hepatocito en particular, poseen una serie de mecanismos que confluyen para prevenir la toxicidad de los metabolitos reactivos originados en la biotransformación de los agentes tóxicos. Uno de los medios de defensa que debe considerarse en primer lugar es la *inactivación del citocromo P-450* por el metabolito recién formado, bien por uniones covalentes de este metabolito con la apoproteína del citocromo, con un nitrógeno de su grupo hemo o bien por formar un complejo estable con el átomo de hierro del hemo. De esta manera el propio metabolito reactivo puede inactivar al citocromo P-450 y con ello inhibir su propia formación y autolimitar su propia toxicidad.

Otra vía protectora es la *conjugación* de los metabolitos reactivos con el glutatión, catalizada por la glutatión S-transferasa. El *glutatión*, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, junto con las vitaminas E y C concurren para limitar la peroxidación lipídica incrementada por los radicales libres. La *superóxido dismutasa* y la *catalasa* actúan concertadamente para

eliminar especies activas de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, evitando con ello la formación de otros radicales de oxígeno de reactividad mucho más elevada y extraordinariamente tóxicos, como el radical hidroxilo.

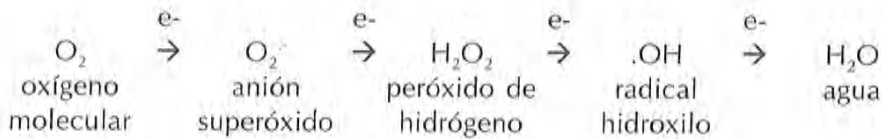
Gracias a estos y a otros mecanismos protectores, los xenobióticos que ingresan normalmente en el organismo son bien tolerados. Sin embargo, cuando estos xenobióticos se ingieren en cantidades elevadas, las defensas celulares pueden ser superadas y es entonces cuando se originan las lesiones moleculares que darán lugar a la enfermedad hepática. Entre todas estas defensas, el tripéptido tiólico glutation juega un papel central por su gran capacidad de reacción y por intervenir como sustrato en una serie de reacciones enzimáticas que intervienen en la detoxificación.

2. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A RADICALES DE OXÍGENO

Gershman et al (1) en 1954 fueron los primeros en proponer que los efectos tóxicos del oxígeno se debían a la formación de radicales libres de oxígeno. Muchos años después, en 1969, la propuesta de McCord y Fridovich (2) acerca de la formación de radicales de oxígeno como parte integral del metabolismo celular normal, no fue apenas tomada en serio. Hoy se tiene la certeza, confirmada experimentalmente, de la participación de estos radicales en numerosos procesos patológicos y también en procesos fisiológicos útiles.

La paradoja del oxígeno es que los organismos aerobios no pueden vivir sin este elemento, sin embargo, el oxígeno lleva consigo un peligro inherente para su existencia. Los efectos tóxicos del oxígeno se deben a la formación de subproductos que se generan, en el proceso de su reducción tetraivalente a través de la cadena mitocondrial de transporte electrónico. En su reducción, la molécula de oxígeno incorpora cuatro electrones y cuatro átomos de hidrógeno y se convierte en agua. Este proceso, aparentemente seguro, origina intermediarios derivados de la reducción univalente del oxígeno que poseen una vida media muy corta (milisegundos) y elevada reactividad. Estos intermediarios reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (ROS reactive oxygen species). El radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son los productos comunes del ambiente aerobio, responsables de la toxicidad del oxígeno (3, 4)

La reducción del oxígeno molecular en todas las células eucariontes aerobias origina los intermediarios que se muestran a continuación en el siguiente esquema:



Para sobrevivir en el medio aerobio los organismos han desarrollado una serie de sistemas cuyo papel es interceptar, neutralizar o inactivar las ROS para evitar que dichas especies reaccionen con las macromoléculas celulares y den lugar a lesiones celulares y tisulares. Los sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos son de gran importancia para la supervivencia celular ya que debido a su posibilidad de ser inducidos, la célula puede adaptarse a la fluctuante generación de las ROS. Estos sistemas se encuentran ubicados estratégicamente en los orgánulos subcelulares y proporcionan a la célula eficiente protección. Por *estrés oxidativo* se conoce aquella situación en la cual la producción de ROS excede la capacidad de los sistemas antioxidantes celulares. Esta situación conlleva que las ROS, al no ser convenientemente eliminadas, reaccionan con las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y DNA). El estrés oxidativo se origina mediante un exceso en la producción de ROS o una deficiencia en la actividad de las defensas antioxidantes endógenas o por ambas cosas a la vez (5).

Las defensas biológicas frente a los radicales libres incluyen los sistemas antioxidantes enzimáticos, anteriormente mencionados, tales como las superóxido dismutasas, la catalasa y la glutathion peroxidasa, que actúan concertadamente para eliminar el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, evitando la formación del radical hidroxilo: el glutathion, un tripéptido endógeno sustrato de la glutathion peroxidasa, y otros factores exógenos juegan un papel previniendo la agresiones de las ROS a las macromoléculas. Tales factores exógenos, denominados antioxidantes, son las y las vitaminas A, C y E, el selenio, los flavonoides, etc (6).

Antioxidante es aquel compuesto químico que inhibe o previene la oxidación de un sustrato. Halliwell y Gutteridge (7) consideran que antioxidante es la sustancia que, cuando se encuentra en pequeñas concentraciones, comparadas con aquellas de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de tal sustrato. Krinsky (8) define como antioxidante aquel compuesto que protege los sistemas biológicos frente a los efectos potencialmente perjudiciales de procesos o reacciones que causan excesivas oxidaciones.

Los sistemas de defensa antioxidante reciben diferentes nombres: antioxidantes, agentes atrapadores de radicales libres, agentes reductores, etc.

Los antioxidantes responsables de la protección celular frente al estrés oxidativo se encuentran tan diversificados como los mismos radicales. Para proporcionar el máximo de protección, las células contienen una variedad de sustancias capaces de eliminar muchas especies de radicales entre los que se incluyen los lipoperóxidos, y los radicales orgánicos centrados en carbono. Los antioxidantes se encuentran ubicados estratégicamente en los organulos subcelulares. Por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX), se encuentran distribuídas tanto en el citosol como en la mitocondria; mientras que la catalasa se distribuye entre el citosol y los peroxisomas. Además de la integración de las defensas intracelulares, la interacción cooperativa entre los diversos antioxidantes en el plasma es de importancia crucial para la máxima supresión de las reacciones de los radicales libres en el compartimento extracelular (6).

3. GLUTATION

El glutatión (L-gamma-glutamil-L-cisteinil-glicocola) es el derivado tiólico más abundante en la naturaleza. Existe en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG), se encuentra en concentraciones elevadas en casi todos los seres vivos aerobios y puede sintetizarse en todas las células del organismo. El hígado es el órgano que lo posee en mayor concentración (5 - 7 mM) y dentro del hígado, los hepatocitos periportales contienen unas dos veces más de glutatión que los hepatocitos perivenosos. El glutatión interviene en una serie de reacciones de detoxificación: es el sustrato específico de la glutatión peroxidasa y de la glutatión S-transferasa y, como reactivo nucleofílico, participa en la eliminación de metabolitos electrofílicos y de radicales libres (9 - 11).

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicocola. Es el tiol de bajo peso molecular más abundante en la mayoría de células de mamíferos. La concentración intracelular puede llegar a alcanzar en hígado, valores de 10 mM. En el estado redox normal de la célula, menos de un 5% del glutatión total existe en su forma oxidada (GSSG). El GSH se caracteriza por su grupo tiólico reactivo y su enlace γ -glutamilo al que se debe su resistencia al ataque de las peptidasas. Por sus propiedades químicas presenta una gran versatilidad que le permite ser a la vez nucleófilo y reductor efectivo. Puede reaccionar con muchos compuestos electrofílicos y oxidantes, tales como H_2O_2 , O_2^- y $\cdot OH$, y como eficaz reductor el GSH juega un importante papel en una variedad de procesos de detoxificación. Entre estos se incluye la anulación del daño peroxidativo, como se evidencia por la depleción del GSH. Esta depleción

eleva la susceptibilidad del organismo a los agentes citotóxicos y afecta la intervención de fármacos en enfermedades neoplásicas.

El hígado es el órgano que se caracteriza por su elevada capacidad de sintetizar glutatión a través de la vía de la cistationina, cuya misión es generar cisteína a partir de la metionina de la dieta. Esta vía, operativa sólo en el hígado, capacita a este órgano para suministrar a diversos tejidos extrahepáticos productos derivados del GSH o GSSG, que les aportan cisteína como precursora de la síntesis del tripéptido. En hígado existen dos reservorios de glutatión: el citosólico y el mitocondrial. El glutatión citosólico se encuentra sometido a un intenso recambio (*turnover*), mientras que el glutatión mitocondrial no (12).

La disminución de la concentración hepática de GSH, inducida por agentes químicos hepatotóxicos, favorece la peroxidación lipídica y la lesión celular. El GSH actúa principalmente sobre el H_2O_2 generado en el curso de la biotransformación de xenobióticos y otras vías y como coenzima de la glutatión peroxidasa. También el GSH se utiliza como sustrato por la glutatión-S-transferasa para la conjugación y eliminación de xenobióticos (13).

El GSH reacciona también con los radicales libres, especialmente con el radical hidroxilo y con los radicales centrados en carbono cediéndoles un átomo de hidrógeno. Tales reacciones neutralizan la reactividad del radical hidroxilo, el cual se considera como la fuente más importante de lesión debida a radicales libres de oxígeno. Tal inhibición se relaciona con la vitamina E, la cual sufre una serie de reacciones en las que esta implicada la regeneración del GSH (Figuras 1 y 2) (13)

Aunque se han hecho muchos esfuerzos para encontrar la concentración precisa de GSH a la cual se inician los procesos lesivos, hasta la fecha no puede responderse a esta pregunta. Por un lado, el «pool» intracelular de GSH está compartimentalizado, y por otro lado, se ha puesto de manifiesto que la pérdida de tioles proteicos, acompañada por la pérdida total del GSH, puede jugar un papel clave en la viabilidad celular, pero que solo la pérdida del GSH no conduce necesariamente a la lesión y muerte celulares. A favor de este punto de vista se ha observado que existe una disociación entre la depleción del GSH celular y la pérdida de la viabilidad celular. Por ejemplo, los agentes quelantes del hierro o los antioxidantes que previenen la peroxidación lipídica, son capaces de inhibir el incremento en la permeabilidad de la membrana y la muerte celular sin afectar la concentración del GSH. A la misma conclusión se puede llegar a partir del hecho que el estrés oxidativo, inducido por xenobióticos en presencia de un inhibidor de

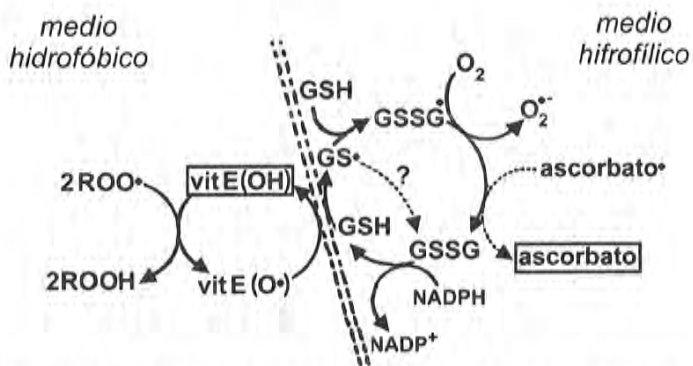


FIGURA 1. Interacción entre las vitaminas E y C y el glutatión. Posible papel de los radicales de glutatión (GS•) en la regeneración de las vitaminas C y E.

la disminución del GSH, conlleva una pérdida extrema de la viabilidad celular y sólo a un modesto incremento en la peroxidación lipídica. A pesar de estos resultados contradictorios, se acepta por la mayoría de los investigadores, que es importante mantener elevado el cociente GSH/GSSG para prevenir la secuela de acontecimientos que lleva consigo la depleción de los grupos tiólicos celulares: peroxidación lipídica, aparición de protuberancias en la superficie celular, alteraciones en la homeostasis del calcio, etc. A este respecto, la continuada generación de GSH, a partir del GSSG, por acción de la glutatión reductasa en presencia de equivalentes reductores, en forma de NADPH, es esencial para preservar la integridad celular (8 -10).

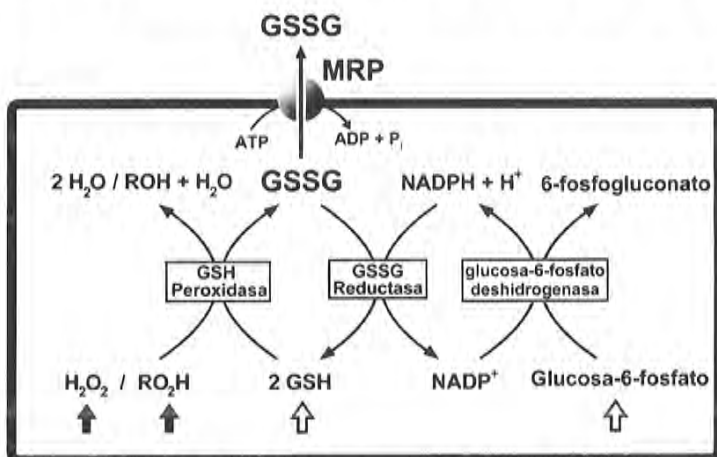


FIGURA 2. Ciclo redox del glutatión. Los enzimas implicados en la defensa antioxidantes actúan concertadamente con el par GSH/GSSG.

La N-acetilcisteína (NAC) *per se* no tiene propiedades antioxidantes, pero incrementa la disponibilidad del GSH, ya que actúa como reservorio de la cisteína y precursor del GSH. La NAC reduce el envenenamiento por plomo en el ratón y protege las neuronas del hipocampo después de la isquemia en ratas. La NAC muestra *in vitro* una gran capacidad antiapoptogénica, observada en cultivos de células PC12 donde previene la apoptosis inducida por glutamato.

La función más importante del glutatión es, probablemente, la de reducir al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la acción de la glutatión peroxidasa. El H_2O_2 es un subproducto del metabolismo oxidativo, ya que se estima que un 5% del consumo de oxígeno por la mitocondria genera H_2O_2 . La glutatión peroxidasa parece que juega un papel más importante que la catalasa en la reducción del peróxido de hidrógeno, debido a que la catalasa se encuentra restringida al compartimento peroxisómico. Por ello, el glutatión es un compuesto fundamental en la defensa del organismo frente a la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, por romper la cadena de reacciones que van desde el anión superóxido hasta los radicales hidroxílicos peroxidantes de la membrana, a través del intermediario H_2O_2 . El glutatión tiene también gran importancia en la modulación del envejecimiento. Las reacciones catalizadas por las glutatión transferasas representan otra función importante del glutatión. La destoxicación de los metabolitos electrofílicos producto de los xenobióticos, supone uno de los ejemplos que pone de manifiesto la función protectora del hígado frente a la acción tóxica del acetaminofeno-quinonaimina y la destoxicación de los epóxidos hidrocarburos policíclicos. Por tanto, estos procesos que dependen del glutatión juegan un papel vital en la prevención de la lesión celular y del cáncer. Se ha reconocido que el glutatión se encuentra también involucrado en la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos.

La relación entre las dos formas del glutatión, reducida (GSH) y oxidada (GSSG) ejerce una gran influencia sobre el estado redox de los grupos tiólicos de las proteínas. Se considera que el cociente GSH/GSSG actúa a modo de tercer mensajero que modula las actividades de una serie de procesos relacionados con la catálisis enzimática, la síntesis proteica y el enlace a los receptores. El glutatión puede ser sintetizado en casi todas las células, pero es el hígado el único órgano capaz de utilizar la metionina para su síntesis, y el único órgano que puede exportarlo a otros tejidos a una velocidad cercana a la de su biosíntesis hepática (14)

3.1. Síntesis hepática del glutatión

El mantenimiento del glutatión hepatocelular es un proceso dinámico que se consigue mediante un equilibrio entre la velocidad de su síntesis y la velocidad de su utilización y/o exportación. La síntesis está catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa, a partir de los aminoácidos precursores (ácido glutámico, cisteína y glicocola), o por la glutatión reductasa, a partir del glutatión oxidado y NADPH (equivalente reductor, nicotinamida adenin dinucleótido fosfato). Su utilización se realiza a través de la glutatión peroxidasa (por oxidación del GSSG), de la glutatión-S-transferasa (por conjugación) y por la velocidad de salida de los hepatocitos del GSSG formado en exceso (15).

Los enzimas responsables de la biosíntesis del glutatión a partir de los aminoácidos constituyentes, L-glutamato, L-cisteína y L-glicocola, se describieron por primera vez por Blösch. Son dos enzimas que requieren ATP, el primero de ellos, la γ -glutamil cisteína sintetasa, cataliza la formación de la γ -glutamil cisteína, y el segundo, la glutatión sintetasa, cataliza la formación del enlace peptídico entre la γ -glutamil cisteína y la L-glicocola en presencia de 1 mol de ATP. La síntesis del glutatión hepático está limitada por la disponibilidad del precursor L-cisteína. Este aminoácido se encuentra en hígado en concentraciones que fluctúan entre 0,2 y 0,5 mM, un orden de magnitud menor que el del glutatión (5 mM), que coincide con la K_m de la γ -glutamilcisteína sintetasa para la L-cisteína. En condiciones fisiológicas, la cisteína deriva en gran parte de la dieta o de la degradación de las proteínas. La cisteína puede derivar también de los aportes dietéticos de metionina, que suponen una fuente importante de cisteína hepática, a través de la vía de la trans-sulfuración o ciclo de la cistationina. El suministro de precursores para la síntesis de glutatión hepático se consigue experimentalmente por exposición de los hepatocitos a cisteína o metionina. La cisteína es difícil de manipular, debido a su rápida autooxidación y se utiliza un derivado de la tiazolidina (L-2-oxo-tiazolidina -4-carboxilato) el cual en el interior de los hepatocitos se convierte en cisteína libre. Este derivado consigue mantener la concentración celular de glutatión frente a agentes que lo consumen, como el dietilmaleato o el acetaminofeno. Se ha demostrado que la tasa de glutatión intracelular puede elevarse mediante la administración de sus precursores en forma de ésteres (18). El tratamiento de ratones con ésteres del glutatión produce una elevación sustancial en el glutatión hepático y renal. Parece ser que los derivados monometil y monoetil del glutatión pueden fácilmente incorporarse a los hepatocitos donde se hidrolizan y liberan glutatión. Por este medio se ha conseguido duplicar la concentración hepatocelular de este tripéptido dos horas después de la administración

a ratón de estos ésteres tiólicos. Se ha demostrado también que estos ésteres mantienen la concentración de hepática de glutatión en presencia de acetaminofeno. Se ha suministrado glutatión directamente a las células, por vía intravenosa, mediante liposomas transportadores, observándose que la concentración intracelular de este tripéptido se mantiene frente a dosis elevadas de acetaminofeno. Este técnica es muy útil para estudiar la hepatoprotección del glutatión frente a la toxicidad inducida por fármacos o medicamentos, ya que el glutatión apenas puede, por sí mismo, incorporarse al hígado. El glutatión libre administrado por vía intravenosa se hidroliza en el riñón donde se libera cisteína al plasma, la cual puede ser utilizada por el hígado. Sin embargo, la administración del glutatión en forma vesiculada ejerce una mayor hepatoprotección (16 - 18).

El hígado es el único órgano que posee la capacidad de utilizar la metionina para la síntesis del glutatión. Esta capacidad se debe a la presencia en hígado de un mecanismo de trans-sulfuración o «vía de la cistationina», que no existe o es insignificante en otros sistemas encargados de sintetizar GSH, propios de tejidos normales o transformados (Figura 3).

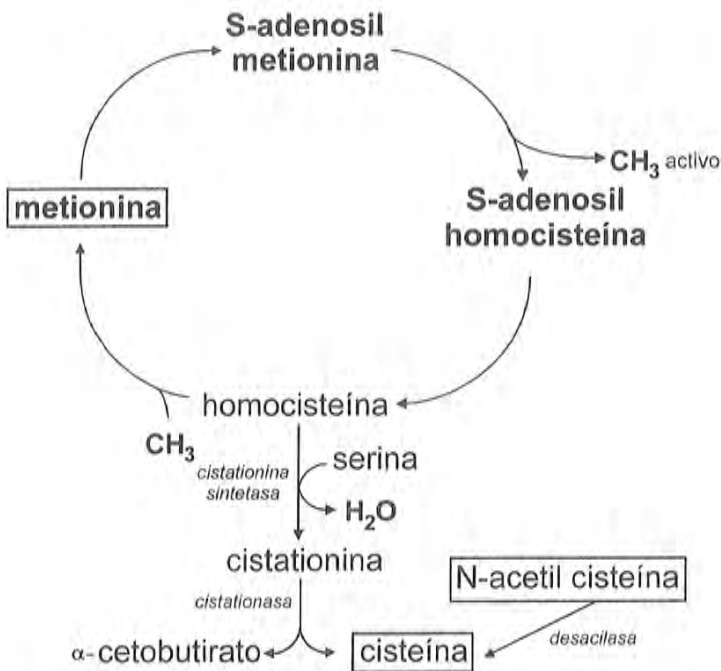


FIGURA 3. La vía de la cistationina operativa en hígado sintetiza cisteína a partir de la metionina, por un mecanismo de trans-sulfuración.

3.2. Ciclo redox del glutation

Las dos formas del glutation, GSH y GSSG, forman el sistema de óxido-reducción tiólico más importante de la célula y por ello el estado redox de este par se considera crítico para el funcionamiento celular normal. El estado redox celular es consecuencia de la distribución del glutation entre sus formas reducida y oxidada y las mezclas de disulfuros. Las reacciones de oxidación-reducción y el intercambio tiol-disulfuro, debidas a alteraciones toxicológicas, pueden ocasionar la redistribución de alguna de estas formas. El glutation hepático se mantiene en su mayor parte en forma reducida, de forma que el cociente GSH/GSSG en condiciones normales es aproximadamente igual a 200. El valor de este cociente se mantiene merced al eficiente sistema glutation peroxidasa/glutacion reductasa acoplado al par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. La oxidación del GSH a GSSG ocurre normalmente por la reducción del H_2O_2 catalizada por la glutacion peroxidasa. A expensas del NADPH celular, el GSSG se reduce a GSH por efecto de la glutacion reductasa, manteniéndose así el equilibrio tiólico (Figura 4). Por tanto, la glutacion reductasa, unida al par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, tiene gran capacidad para proteger las células de la toxicidad del oxígeno procedente de las especies activas endógenas como el H_2O_2 y el O_2^- . Se ha demostrado que este enzima se induce en hígado de rata por efecto del selenio de la dieta paralelamente con la γ -glutamil cisteina sintetasa. El papel hepatoprotector de la glutacion reductasa y su importancia en mantener el equilibrio redox tiólico celular se ha verificado utilizando un potente inhibidor del enzima, el 1,3-bis (2-cloroetil) -1-nitrosourea (BCNU) (23). La inhibición de la reductasa por BCNU potencia el efecto tóxico de la adriamicina en ratas, posiblemente por elevación de la peroxidación lipídica debida a la depleción del glutation citosólico y mitocondrial (9 - 11, 12).

En caso de estrés oxidativo el GSSG puede acumularse en el interior de la célula y ejercer efectos perniciosos sobre diversos procesos metabólicos y sobre la integridad de la membrana celular. Por ejemplo, la homeostasis del calcio en el hepatocito se afecta de manera alarmante cuando se acumula glutation en forma oxidada, ya que el glutation en forma reducida, al prevenir la oxidación de los grupos tiólicos necesarios para mantener la actividad de la ATPasa dependiente de calcio, juega un papel crítico en la protección del secuestro del Ca^{2+} microsómico y en la liberación del Ca^{2+} de la membrana plasmática. El efecto protector de otros tioles como el ditiotretitol refuerza la evidencia de estos fenómenos. Se ha prestado también atención a la significación de las proteínas disulfuro y al papel regulador de las proteínas enzimáticas con grupos tiólicos de la membrana. En

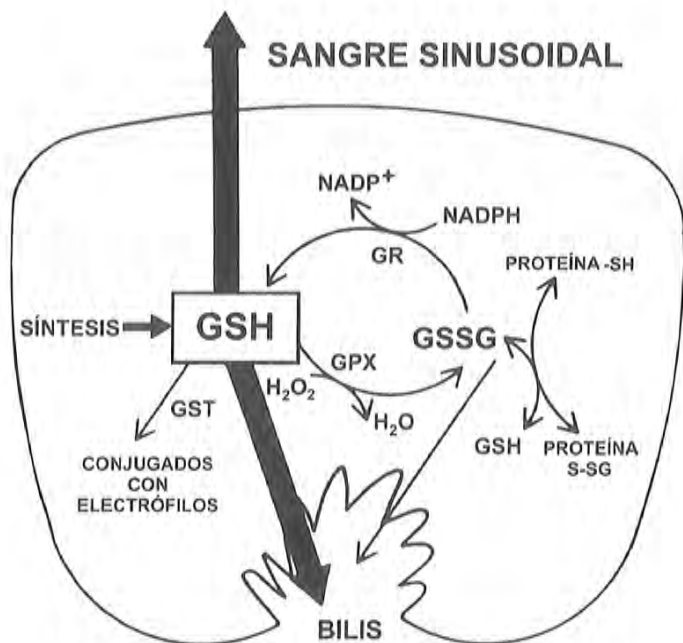
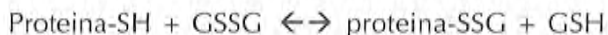


FIGURA 4. *Metabolismo del glutatión en el hepatocito.*

la reacción catalizada por la tior transferasa se forman proteínas disulfuro de acuerdo con la siguiente reacción:



Se ha demostrado que existe una relación lineal entre el GSSG celular y las proteínas disulfuro. Si se eleva el GSSG intracelular con paraquat o nitrofurantoina, se observa un incremento paralelo en proteínas disulfuro (GSSG/proteína disulfuro = 1). Se ha encontrado también que una de las consecuencias de la mayor formación de GSSG provocada por el paraquat, es la disminución del cociente NADPH/NADP⁺ de 5:1 a 2:3. Un aumento de las proteínas disulfuro puede ocasionar cambios en las funciones reguladoras de enzimas tales como las deshidrogenasas generadoras de NADPH del ciclo de los pentosa fosfatos.

El ciclo redox GSH/GSSG es operativo siempre que exista un continuo suministro de NADPH. La producción de NADPH depende en su mayor parte de la presencia de glucosa y de su flujo a través del ciclo de los pentosa fosfatos. Por tanto, los cambios en la actividad de este ciclo tienen que ejercer influencia sobre el suministro de NADPH y sobre el estado redox GSH/GSSG. La actividad del ciclo de los pentosa fosfatos se controla, tanto

por el suministro de glucosa como por el estado redox del par NADPH/NADP. La inhibición por NADPH de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, puede ser paliada por GSSG. Esta vía de los pentosa fosfato se estimula por el paraquat y por la tioacetamida. El mayor consumo de NADPH, inducido por el paraquat vía ciclo redox GSSG/GSH, puede ocasionar un descenso a un 50% de la concentración necesaria de NADPH para mantener el metabolismo normal. Se cree que la toxicidad del paraquat se debe, en parte, a la alteración del estado redox de los nucleótidos de piridina. En estudios previos se había observado que la producción mitocondrial de NADPH puede de hecho mantener las reacciones catalizadas por el citocromo P-450 que dependen del NADPH, en caso en que disminuya la velocidad del flujo del ciclo de los pentosa fosfatos. Sin embargo, la tioacetamida, sustancia hepatotóxica que estimula notablemente las actividades de dos enzimas generadores de NADPH, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el enzima málico (malato deshidrogenasa descarboxilante EC 1.1.1.40), no ocasiona descensos en la tasa de NADPH, ya que el estado redox del par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ citosólico, calculado por el cociente $(\text{CO}_2)/(\text{piruvato})/(\text{malato})$ se inclina hacia un estado más reducido.

3.3. Recambio del glutatión hepático

En condiciones normales las reservas hepáticas de glutatión se consumen a la misma velocidad que se reponen, con lo cual se mantiene su homeostasis. Este equilibrio dinámico se logra merced a un continuo recambio (síntesis-degradación) del glutatión. La vía más importante que consume un 90% del glutatión sintetizado por el hepatocito, es su salida a través de las membranas sinusoidal y canalicular. El eflujo sinusoidal supone un 80% del eflujo total, siendo el otro 10% el correspondiente al biliar. Del 5 al 10% del glutatión que sale del hígado se utiliza en reacciones de conjugación (catalizadas por las glutatión-S-transferasas), reacciones de oxidación (catalizadas por la glutatión peroxidasa) o degradación enzimática. El enzima que hidroliza al glutatión es la γ -glutamil transferasa, que se encuentra orientado fuera de la célula y su presencia en hígado de rata en condiciones normales es relativamente baja. Las glutatión-S-transferasas (GST) son proteínas, que al igual que la albúmina, tienen una gran tendencia a unirse a compuestos hidrofóbicos, pero pueden también unirse al glutatión. Es probable que por efecto de esta unión el grupo -SH del glutatión adquiere una nucleofilia más acusada. Cualquier molécula que posea un centro electrofílico reacciona con el anión tiolato activado, dando lugar al conjugado de glutatión. Existe un gran número de GST, cada una de ellas con una amplia especificidad (9 - 11, 19).

Las GST son dímeros de subunidades de 25 kDa. En ratas y humanos se ha visto que son productos de tres familias multigénicas, que catalizan una serie de reacciones de conjugación que dependen del glutatión. Estas son la conjugación del GSH con metabolitos electrofílicos y la reducción por el GSH de hidroperóxidos de lípidos. Cada subunidad posee especificidad característica del sustrato y una particular distribución tisular. Pueden variar durante el desarrollo, estar bajo control hormonal, inducirse por efecto de xenobióticos y sufrir cambios en su expresión durante la carcinogénesis química o el tratamiento con fármacos quimioterapéuticos. Las GST poseen también actividad GSH peroxidasa independiente del selenio e intervienen en la reparación de las lesiones del DNA producidas por especies activas de oxígeno (19).

Los isoenzimas de la GST catalizan la adición nucleofílica del tiol del glutatión a aceptores electrofílicos, como haluros arílicos o alquílicos, olefinas, peróxidos orgánicos, quinonas y ésteres sulfato. Entre los sustratos más interesantes están aquellos productos generados en la lesión tóxica. Por ejemplo, la peroxidación lipídica de las membranas biológicas generan alquenos reactivos, epóxidos, hidroperóxidos y aldehídos. El colesterol -óxido, los hidroperóxidos de los ácidos araquidónico y linoléico son sustratos de la GST. Los 4- hidroalquenes, productos muy citotóxicos derivados de la peroxidación lipídica son también sustratos de la GST. Las GST juegan además un papel importante protector de los tejidos del estrés oxidativo.

Para muchos xenobióticos tóxicos, incluyendo los carcinógenos, la GST representa una vía de detoxificación. El conjugado-glutatión se convierte en conjugado-cisteína después de la eliminación secuencial por hidrólisis del glutamato y la glicocola. El conjugado-cisteína se metaboliza de dos formas: por acetilación a mercapturato o por hidrólisis (β -liasa) a mercaptano (Figura 5). El mercaptano, a su vez, puede formar un tio-glucurónido por unión con el ácido glucurónico o metilarse para dar un derivado metil-tiólico del metabolito. La excreción por orina de los derivados mercaptúricos, metil-tiólicos, $\text{CH}_3\text{SO}-$ y CH_3SO_2- del metabolito, es un índice de la formación *in vivo* de los glutatión S-conjugados. La β -liasa del conjugado de cisteína se encuentra en hígado, en riñón, en la microflora del intestino y en algunos microorganismos. y cataliza la hidrólisis del carbono en β de la cisteína, dando lugar a piruvato, amonio y el derivado tiol. La β -liasa de la microflora parece que tiene una especificidad más amplia que la de los tejidos por lo que se piensa que su intervención es importante en el metabolismo de los conjugados de cisteína. (Figuras 5 y 6).

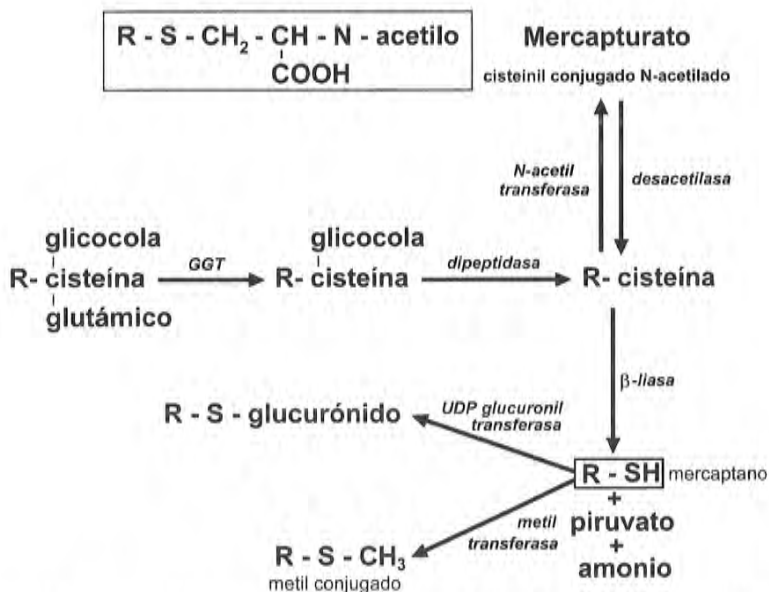


FIGURA 5. Formación de mercapturatos y mercaptanos. GGT = γ glutamil transferasa.

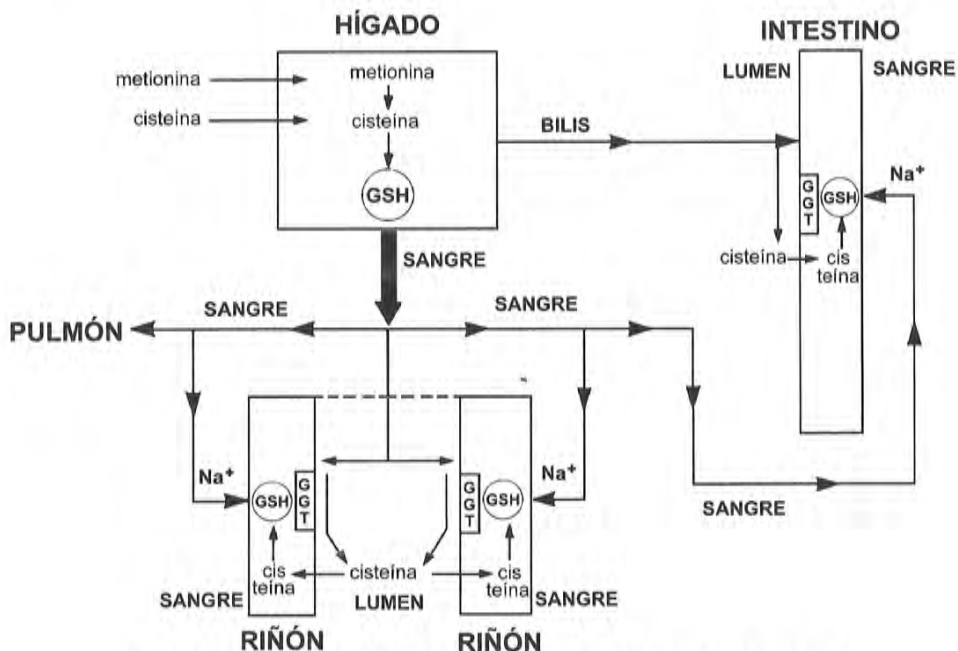
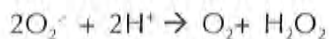


FIGURA 6. Recambio del glutation hepático con otros órganos (10).

4. SISTEMAS ENZIMÁTICOS ANTIOXIDANTES

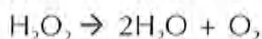
Diversos enzimas han emergido a lo largo de la evolución, cuya función primaria es disminuir los niveles intracelulares de las ROS en el organismo y por tanto, proporcionar una función protectora frente a los oxidantes biológicos. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: las superóxido dismutasas dependientes de cobre y cinc (Cu,ZnSOD) y manganeso (MnSOD), la catalasa (CAT), la glutathion peroxidasa (GPX), la glutathion reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En el esquema de la Figura 1 se muestra la actuación y coordinación de estos sistemas y su relación con el ciclo redox del glutathion.

Superóxido dismutasa (SOD).—Este enzima fue descubierto por McCord y Fridovich (2) y desde entonces ha proporcionado a biólogos y bioquímicos la posibilidad de entrar en el campo de los radicales libres y estudiar la formación y metabolismo de las ROS, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:

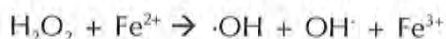
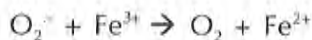


La velocidad de dismutación enzimática es 10^4 veces mayor que la dismutación química. La familia SOD consiste en cuatro metaloenzimas: dos contienen cobre y cinc, una manganeso y otra hierro. La Cu,ZnSOD se encuentra en el citosol de las células eucariotas, una forma diferente de Cu,ZnSOD (EC) aparece en los fluidos extracelulares. La MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial de eucariotas y en bacterias, mientras que la forma FeSOD se encuentra en muchas bacterias aerobias. Las formas dependientes de Mn y Fe comparten gran homología en sus aminoácidos y son muy diferentes de las formas dependientes de Cu,Zn. Un exceso de SOD que no vaya acompañado por la catalasa, puede resultar perjudicial, ya que en este caso se acumula el peróxido de hidrógeno. Esta situación sucede en pacientes con el síndrome de Down, que poseen trisomía en el cromosoma 21 que es donde se encuentra el gen que codifica la Cu, ZnSOD.

Catalasa.—Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. Uno de los productos de la acción de la superóxido dismutasa es el H_2O_2 . Esta molécula puede ser eliminada por varios enzimas tales como la catalasa y la glutathion peroxidasa, que catalizan la siguiente reacción:

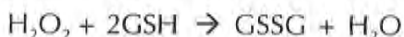


En ausencia de la catalasa se acumula H_2O_2 , el cual, en presencia de metales de transición tales como hierro o cobre, genera el radical hidroxilo que posee elevada reactividad para reaccionar con las macromoléculas:



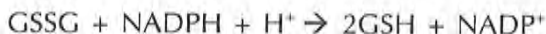
La mayor parte de las células contienen catalasa, y en animales se encuentra presente en los principales tejidos del organismo, apareciendo especialmente concentrada en hígado, riñón y eritrocitos. A nivel subcelular la catalasa se encuentra en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%).

Glutation peroxidasa.—La glutacion peroxidasa (GPX) fue descubierta en 1957 por Mills y cataliza la oxidación del GSH a GSSG a expensas del H_2O_2 o de peróxidos orgánicos:



Por su dependencia del selenio (Se), la GPX puede dividirse en dos formas: dependiente e independiente de selenio. La forma no dependiente del Se tiene un peso molecular menor, es dimérica y solo elimina los ROOH. En rata se ha demostrado que la GPX no dependiente de Se, se corresponde con isoformas de la glutacion transferasa, enzima implicada en la destoxificación de xenobióticos. Se ha caracterizado recientemente, otra GPX dependiente del Se que actúa sobre los hidroperóxidos de fosfolípidos, que se encuentra distribuída en numerosos tejidos.

Glutation reductasa.—La glutacion reductasa fue observada por primera vez por Hopkins y Elliot en 1931 y posteriormente aislada de hígado de conejo por Mann en 1932 (20). Este enzima cataliza la reacción que restaura el glutacion en su forma reducida a expensas de equivalentes reductores en forma de NADPH:



Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.—La existencia de una vía oxidativa para la oxidación de la glucosa-6-fosfato se demostró por primera vez en extractos de levadura en 1936. Sin embargo, la purificación no se consiguió hasta 1961. En el rango de pH 7 a 8 y con baja fuerza iónica, la G6PDH

de eritrocitos humana existe en equilibrio entre el tetrámero de 210 kDa y el dímero de 105 kDa. Las subunidades son idénticas en carga. La reacción de la G6PDH asociada a los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante tiene como misión regenerar el coenzima NADPH, que quedó en su forma oxidada NADP⁺ por acción de la glutatión reductasa. La reacción catalizada por la G6PDH es la siguiente:



5. PROTEÍNAS DEL ESTRÉS Y HEPATOXICIDAD

Entre los mecanismos de defensa celular se encuentran una serie de proteínas las «proteínas del estrés» que juegan un papel fundamental en un gran número de procesos biológicos. Las proteínas del estrés, se denominan también proteínas del choque térmico (heat shock proteins HSP), debido a su descubrimiento frente a la elevación de la temperatura como agente estresante (21). El pretratamiento hipertérmico se ha visto que desarrolla resistencia, no sólo a posteriores incrementos de la temperatura, sino también frente al estrés oxidativo generado por una situación de isquemia reperfusión. Esta resistencia se debe a la inducción de la transcripción de las HSP. En particular la HSP70 se considera que contribuye al mecanismo protector frente a una serie de situaciones estresantes (calor, estrés oxidativo, etc) y esta resistencia se debe a la superexpresión de la HSP70 (22)

El estudio de los mecanismos que intervienen en la respuesta al estrés, presenta un gran interés en el campo de la toxicología. Con el objetivo de descubrir ensayos rápidos así como de reducir el uso de animales, los toxicólogos tratan de utilizar los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, en células *in vitro*, como indicadores sensibles y fiables de los efectos tóxicos de determinados xenobióticos. Mediante el recurso de las técnicas de DNA recombinante, se han construido líneas celulares «chivatas» para el estrés, que han de poder utilizarse en un futuro muy próximo para detectar riesgos biológicos. En estas células, las secuencias de DNA que controlan la actividad de los genes de proteínas anti-estrés se han unido a un gen que determina la síntesis de un enzima, por ejemplo, la β -galactosidasa. Cuando las células experimentan algún tipo de estrés metabólico y producen más proteínas anti-estrés de lo normal, sintetizan el enzima chivato, el cual se detecta fácilmente con una prueba bioquímica. Una aplicación de ese tipo de tecnología es el desarrollo de animales transgénicos preparados para esa respuesta. Por ejemplo, el control del promotor de una proteína de choque térmico para conducir la expresión de un gen tal como la luciferasa o la β -

galactosidasa, puede utilizarse en la monitorización de contaminantes ambientales (23). Aunque todas estas propuestas se encuentran aún en investigación y requieren ser validadas, la explotación de los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, así como de otros productos de los genes asociados con daño células (metalotioninas, sistema del P-450) podrían ser de gran aplicación en el campo de la toxicología (24). Las HSP pueden jugar un papel importante en la síntesis proteica, regeneración y carcinogénesis hepáticas, puesto que la expresión de las HSP 25, 60, 70 y 90 se han identificado en hígado. La HSP 70 se induce en ratas hepatectomizadas y en hepatocitos proliferantes y la HSP 25 se sobreexpresa en adenocarcinoma en el hígado (25).

Se ha estudiado el efecto de la hipertermia *in vivo* sobre la expresión y regulación de los genes *hsp* en hígado, encontrándose una rápida respuesta en la transcripción de la HSP 70 (26). También se ha encontrado que la transcripción de la HSP 70 se induce notablemente en el estadio prereplicativo de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial, lo cual involucra a estas proteínas en los estadios tempranos de la regeneración hepática (27). La lesión lipoperoxidativa causada por la exposición de hepatocitos aislados a 4-hidroxinonenal se ha observado que induce la expresión de la proteína HSP 31 dependiendo de la dosis (28). Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que una de las HSP más abundantes, la HSP 72, se induce en hígado de ratas por efecto de sustancias hepatotóxicas tales como el halotano. Este anestésico altera la distribución subcelular de las HSP entre citoplasma y núcleo, la cual se ha podido detectar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis de Western-blot con anticuerpos anti-HSP 70, que reconocen, tanto la forma constitutiva HSP 73, como la inducible HSP 72, ha revelado que la HSP 72 se induce y transloca al núcleo en aquellas células expuestas a halotano previo tratamiento con fenobarbital y en condiciones de hipoxia (29). Trabajos más recientes han puesto de manifiesto que existe una relación entre la lesión oxidativa del DNA y la translocación de la HSP 70 al núcleo (30). Andoh *et al* (31) han detectado la presencia de la HSP 70 en hígado de rata con necrosis y regeneración inducida por tioacetamida. Con anticuerpos específicos estos autores han observado que no es en el núcleo de los hepatocitos destinados a sufrir la necrosis, en la región venosa del acino, donde se concentra la HSP.

La HSP 70 se encuentra fuertemente asociada a estructuras citoesqueléticas que se lesionan por el etanol y aparece en hepatocitos de alcohólicos, lo que apunta la intervención de esta HSP en la patogénesis alcohólica y en la desestabilización del citoesqueleto. La naturaleza del papel de la HSP 70 no está clara, pero la presencia de otra HSP, la ubiquitina, que se conjuga

con proteínas lesionadas por efecto del etanol, marcándolas para su rápida proteólisis hace pensar en una posible implicación de la HSP 70 en la eliminación de proteínas alteradas. Objetivos de la ubiquitina son a menudo las proteínas citoesqueléticas lesionadas de los cuerpos de Mallory (32).

En pacientes con hepatitis alcohólica, Koshinas *et al.* (33) han demostrado que la HSP 60 aparece en el citosol de los hepatocitos, de manera difusa y que en estas condiciones de intoxicación aguda se elevan los niveles circulantes del anticuerpo IgA de la HSP 60, lo cual puede apuntar hacia un mecanismo patogénico que subyace en el desarrollo y progresión de la lesión hepática alcohólica. En este caso se demuestra que las HSP, normalmente protectoras, pueden ser inmunogénicas. En un estudio previo (34) se identificó una HSP 70 en hígado de pacientes con enfermedad hepática alcohólica, pero no se detectaron anticuerpos circulantes frente a dicha HSP 70. El reciente hallazgo de que las HSP se expresan en las membranas en condiciones de estrés es de importancia crítica en el contexto de un anticuerpo IgA circulante (35). Diversos factores que estimulan la expresión de las HSP se generan en los alcohólicos: el factor de necrosis tumoral TNF α y las especies reactivas de oxígeno. Ambos se producen en áreas de inflamación. El metabolismo hepático del etanol al elevar el consumo de oxígeno induce una hipoxia localizada, lo cual supone un estímulo potente para la expresión de las HSP selectivamente localizada en la región centrilobular.

Otra HSP encontrada en hígado es la HSP 47, una glicoproteína cuya expresión se induce en células de mamíferos, que posee la capacidad de unirse a colágeno nativo tipos I y IV y que en hígado se expresa en los lipocitos (36). Los lipocitos (células Ito o células hepáticas estrelladas) se encuentran estrechamente asociados al metabolismo del colágeno lo que hace pensar que la HSP 47 puede actuar en ellas a modo de carabina específica para el procolágeno. La expresión preferente de la HSP 47 en estas células parece relacionarse con su capacidad para producir colágeno, ya que esta HSP no aparece en otras células hepáticas, como los hepatocitos o las células de Kupffer.

Los clofibratos son una familia de compuestos hipolipidémicos que inducen una variedad de respuestas *in vivo*, incluyendo la proliferación de peroxisomas en células parenquimales hepáticas, la hepatomegalia y la hepatocarcinogénesis. Estos compuestos no son mutagénicos *per se*, por lo que se ha propuesto que la hepatocarcinogénesis inducida por clofibrato puede resultar de las alteraciones metabólicas relacionadas con la proliferación de peroxisomas. En estudios en los que se aislaron proteínas de unión al clofibrato, se demostró que esta clase de compuestos interacciona espe-

cíficamente con la HSP 70 en sus dominios de unión al ATP o cercano a éstos (37). Hasta el momento se desconocen las consecuencias de tales interacciones, pero es posible que los éteres del ftalato puedan interferir con la función de la HSP 70 y por tanto, inhibir la biogénesis organular.

La inducción de los genes del estrés en las células eucarióticas tiene lugar por la unión al HSE (heat shock element) del HSF (heat shock factor) que es activado bajo un choque térmico y que permanece inactivo en condiciones no estresantes, probablemente por pequeñas cantidades de HSP 70 constitutivamente presentes en el citoplasma. Este ejemplo de regulación negativa es bastante similar al control negativo llevado a cabo por el inhibidor I κ B sobre el factor de transcripción NF κ B. En cultivos tisulares el NF κ B puede ser activado por H₂O₂ y otras especies de oxígeno, así como también por el choque térmico. La exposición del hígado de ratas a altas temperaturas activa además del HSF, al NF κ B estando la activación de éste a diferencia del primero, mediada por la producción y liberación de IL-1 (38). Se ha demostrado que el tratamiento con ésteres del forbol da lugar a una resistencia en las células tumorales a la acción citotóxica del factor de necrosis tumoral, contribuyendo a la supervivencia de las células tumorales *in vivo*, y se ha observado que es la HSP 70 la que protege a las células tumorales de la citotoxicidad del TNF- α incluso en ausencia del estrés (39).

Recientes trabajos en nuestro laboratorio han estudiado la inducción de la HSP70 en hepatocitos incubados en presencia de ciclosporina A. La inducción de la HSP70 fue paralela a la generación de peróxidos y a la citotoxicidad inducidas por la ciclosporina A. La adición al medio de cultivo de vitamina E en forma de succinato, no solo hizo disminuir de manera significativa la citotoxicidad de la ciclosporina A sino que disminuyó la concentración de peróxidos y la expresión de la HSP70. Hay también que destacar, que la vitamina E aumentó la apoptosis. Sobre la base de estos resultados, el efecto de la vitamina E tiene que ser discutido en un doble aspecto. Al desviar el modo de muerte celular desde una necrosis preferente a una apoptosis más predominante, la vitamina E está preservando a las células remanentes de las consecuencias inflamatorias de la necrosis. Sin embargo, la acción de esta vitamina disminuyendo la expresión génica de la HSP70, y por consiguiente el nivel de esta proteína en el interior de la célula, puede considerarse que es la eliminación de un mecanismo protector, lo que conduce a la apoptosis (40)

El efecto antioxidante de la N-acetilcisteína y de la desferroxamina es bien conocido. El primero por ser un agente precursor del glutatión, y el segundo por ser un inhibidor de la lipoperoxidación. Estos dos agentes se

han ensayado sobre un modelo de citotoxicidad inducida por la cocaína en cultivos primarios de hepatocitos de rata. El efecto protector de estas dos sustancias sobre la citotoxicidad indica que las especies activas de oxígeno se encuentran implicadas en los mecanismos de toxicidad inducidos por la cocaína. También la N-acetilcisteína y la desferroxamina influyen sobre las alteraciones en el potencial mitocondrial transmembrana y en los niveles de apoptosis, siendo los efectos protectores más pronunciados en el caso de la desferroxamina (41).

HSP, hígado y envejecimiento

Un aspecto crucial del envejecimiento es la acumulación de lesiones, a medida que las moléculas, las células y los tejidos sufren la agresión continuada de agentes físicos o químicos a lo largo de la vida. Alguna de estas agresiones se produce de manera endógena por las mismas células lesionadas, que perpetúan así un ciclo de acontecimientos potencialmente patogénico.

Es un hecho conocido que los organismos senescentes tienen una capacidad limitada para responder a situaciones de estrés y para mantener la homeostasis. Se cree que en un organismo envejecido la falta de respuesta a la agresión es en gran parte la responsable del incremento en la morbilidad y mortalidad observada a medida que el organismo envejece (42). Esta serie de modificaciones pueden comprometer seriamente la capacidad de responder a cambios ambientales. Por ello, la edad influye en la capacidad de las células para expresar las proteínas del estrés y así, los trabajos de Heydari et al.(43 - 46), muestran que las ratas viejas poseen menor capacidad para expresar la HSP 70 en respuesta al calor (47). Debido a esta característica del envejecimiento, se ha estudiado el comportamiento de células procedentes de animales viejos y de células procedentes de animales jóvenes, frente a la hipertermia y la expresión de las HSP. En hepatocitos aislados de ratas viejas, de 26 a 28 meses de edad, se ha detectado una menor capacidad de expresar las HSP 70 en respuesta a un choque térmico, siendo la síntesis de estas proteínas un 50% menor de aquella encontrada en hepatocitos aislados de ratas de 4 a 6 meses de edad. La inducción del mRNA de la HSP 70 también se encuentra reducida y ello se debe a la menor capacidad de los hepatocitos de convertir el HSF1 inactivo en su forma oligomérica activa (46). Los hepatocitos de ratas viejas al poseer menor concentración de HSF activo, es menor en ellas la cantidad de HSF que puede unirse al promotor del gen *hsp 70*, con lo cual resulta disminuida la transcripción de dicho gen. La disminución de la actividad del HSF para unirse al HSE puede surgir de una menor activación traduccional (oligomerización) del

HSF por el agente que origina el estrés. Un posible mecanismo que explique la menor actividad de unión del HSF al HSE, es que a medida que transcurre la edad se acumula una forma de HSF «anormal». Evidencias experimentales han mostrado que pueden acumularse enzimas «alterados» en células senescentes (48). Estas alteraciones surgen de cambios conformacionales, no de errores en la traducción. Los cambios conformacionales en las proteínas de organismos senescentes ocurren a través de modificaciones post-traduccionales (oxidación, racemización de aminoácidos, desaminación, etc.) Estos cambios dan lugar a alteraciones sutiles que a veces no se reflejan en la actividad enzimática. Una acumulación de moléculas «anormales» de HSF, que presentan una capacidad disminuida para oligomerizarse en respuesta al estrés, puede explicar por qué las células de los organismos senescentes pierden su capacidad de responder al estrés y expresar las HSP. Esta disminución en la capacidad de las células a expresar HSP, dependiente de la edad, puede ser uno de los factores que contribuya a la mayor incidencia de muerte en personas ancianas frente al estrés térmico o tóxico.

Por otro lado, la restricción calórica es la única manipulación experimental conocida que retrasa el envejecimiento e incrementa la supervivencia de animales de laboratorio. La restricción calórica podría revertir el efecto del envejecimiento en la inducción de la transcripción de la HSP 70 en respuesta al choque térmico previniendo la acumulación de moléculas HSF1 alteradas que normalmente existen en ratas de avanzada edad alimentadas *ad libitum* (45).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P y Fenn WO. (1954) Oxygen poisoning and X-radiation. A mechanism in common. *Science* **119**, 623-629.
2. McCord JM y Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6050.
3. Crawford DR y Davies KJA. (1994) Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* **102 (suppl 10)**, 25 - 28.
4. Davies KJA. (1995). Oxidative Stress: The paradox of aerobic life. En: *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food additives* (ed Rice-Evans C, Halliwell B y Lunt GG) *Biochem Soc Symp* **61**, 1 -31.
5. Gille G y Sigler K. (1995) Oxidative Stress and living cells. *Folia Microbiol* **40**, 131-152.
6. Cascales M (1999) Respuestas celulares a la agresión oxidativa. En: *Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad*. (ed Cascales M), pp 47-89, Instituto de España. Madrid.

7. Halliwell B y Gutteridge JM (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Rad Biol Med* **18**, 125-126
8. Krinsky NI (1992) Mechanism of action of biological antioxidants *PSEBM* **200**, 248-254
9. Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* **35**, 713-722.
10. Reed DJ (1990) Glutathione: Toxicological Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **30**, 603-631.
11. Meister A (1988) Glutathione Metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208.
12. Meister A (1995) Glutathione metabolism its biosynthesis and inhibition. *Methods Enzymol.* **252**, 17205-17208.
13. Moldeus P y Quanguan J (1987) Importance of the glutathione cycle in drug metabolism. *Pharmacol Ther.* **33**, 37-40.
14. Yu BP. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, **74**, 139-161,
15. Kaplowitz N, Aw TY y Ootkens M (1985) The regulation of hepatic glutathione. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 715-744.
16. Snoke JE y Bloch K (1952) Formation and utilization of γ -glutamyl cysteine in glutathione metabolism. *J. Biol. Chem.* **199**, 407-414.
17. Snoke JE, Yanan S y Bloch K (1953) Synthesis of glutathione from γ -glutamyl cysteine. *J. Biol. Chem.* **201**, 573
18. Richman PG y Meister A (1975) Regulation of γ -glutamyl cysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**, 1422-1426.
19. Sato K (1988) Glutathione-S-transferase and hepatocarcinogenesis. *Japan J Cancer Res* **79**, 556-572
20. Mann PJG (1932) The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem J* **26**, 785-790
21. Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573
22. Morimoto RI y Santoro MG (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacological targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* **16**, 833-838.
23. Welch WJ (1993), How cells respond to stress. *Scientific American* **268**, 56-62.
24. Witzmann FA, Fultz C y Lipscomb J (1995), Comparative 2D-electrophoretic mapping of human and rodent hepatic stress proteins as potential biomarkers. *Appl Theor Electrophor* **5**, 113-117.

25. Benjamin IJ (1993), Stress proteins: is their application in clinical medicine on the horizon? *Hepatology* **18**, 1532-1534.
26. Schiaffonatti L, Tachini L y Pappalardo C (1994), Heat Shock response in the liver: Expression and regulation of the HSP70 gene family and early response genes after in vivo hyperthermia. *Hepatology* **20**, 975-983.
27. Konishi T, Karasaki Y, Nomoto M, Ohmori H, Shibata K, Abe T, Shimizu K, Itoh H y Higashi K (1995), Induction of heat shock protein 70 and nucleolin and their intracellular distribution during early stage of liver regeneration. *J Biochem* **117**, 1170-1177.
28. Cajone F y Bernelli-Zazzera A (1998) Oxidative stress induces a subset of heat shock proteins in rat hepatocytes and MH₁C₁ cells. *Chem Biol Interactions* **65**, 235-246.
29. Lin WQ, Van Dyke RA, Marsh HM y Trudell JR (1994), Nuclear translocation of heat shock protein 72 in liver cells of halothane-exposed rats. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 647-652.
30. Abe T, Konishi T, Hirano T, Kasai H, Shimizu K, Kashimura M y Higashi K (1995), Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock 70 protein into the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 548-555
31. Andoh H, Itoh H, Koyama K, Sato Y y Tashima Y (1994), Heat shock protein 70 in rat liver with necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *J Gastroenterol* **29**, 293-298.
32. Otha M, Marcean N, Perry G, Manetto V, Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Metzals J et al (1988), Ubiquitin is present on the cyokeratin intermediate filaments and mallory bodies of hepatocytes. *Lab Invest* **59**, 848-856.
33. Koskinas J, Winrow Vr, Bird GLA, Lau JYN, Portmann BC, Blake DR, Alexander GJM y Williams R (1993), Hepatic 60-kD heat-shock protein responses in alcoholic hepatitis. *Hepatology* **17**, 1047-1051.
34. Omar R, Pappolla M y Saran B (1990), Immunocytochemical detection of the 70-kd heat shock protein in alcoholic liver disease. *Arch Pathol Lab Med* **114**, 589-592.
35. Kauffman SHE (1990), Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today* **11**, 129-136.
36. Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, Inoue M, Nakatani K, Kaneda K y Nagata K (1996), Expresion of heat-shock protein 47 in mouse liver. *Cell Tissue Res* **284**, 341-346.
37. Alvarez K, Carrillo A, Yuan PM, Kawano H, Morimoto RI y Reddy JK (1990), Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP 70 protein family. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 5293-5297.

38. Pogliaghi G, Tacchini L, Anzon E, Radice L y Bernelli-Zazzera A (1995), Heat shock activation of NF κ B in rat liver is mediated by interleukin-1. *FEBS Letters* **372**, 181-184.
39. Jäättelä M, Wissing D, Bauer PA y Li GC (1992), Major heat shock protein hsp 70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity, *EMBO J* **11**, 3507-3512.
40. Andrés D, Alvarez AM, Díez-Fernández C, Zaragoza A y Cascales M (2000) HSP70 induction by cyclosporine A in cultured rat hepatocytes: effect of vitamin E succinate. *J Hepatol* **33**, 570-579.
41. Zaragoza A, Díez-Fernández C, Alvarez AM, Andrés D y Cascales M (2001) Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine. *Br J Pharmacol* **132**, 1063-1070.
42. Díez-Fernández C y Cascales M (1997) Proteínas del estrés y hepatotoxicidad. En *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo* (ed M Cascales) pp 157-181
43. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R y Richardson A (1993), Expression of heat shock protein 70 is altered by age diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* **13**, 2909- 2918.
44. Heydari AR, Takahashi R, Gutsamann A, You S y Richardson A (1994), HSP70 and aging. *Experientia* **50**, 1092-1098.
45. Heydari AR, Conrad CC y Richardson A (1995), Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J Nutr* **125**, 410- 418.
46. Heydari AR, You S, Takahashi R, Gutschmann A, Sarge KD y Richardson A (1996), Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat Shock transcription factor 1. *Developmental Genetics* **18**, 114-124.
47. Wu B, Gu MJ, Heydari AR y Richardson A (1993), The effect of age on the synthesis of two heat shock proteins in the HSP70 family. *J Geront* **48**, B50
48. Rothstein M (1979) The formation of altered enzymes in ageing animals. *Mech Ageing Dev* **9**, 197-202

MECANISMOS MOLECULARES DE LA COLESTASIS Y TRANSPORTE HEPATOBILIAR

SUMARIO

1. Introducción
2. Bases moleculares de la formación de la bilis
3. Transportadores de la membrana sinusoidal
4. Transportadores de la membrana canalicular
5. Modulación del hígado durante la colestasis
6. Colestasis inducida por agentes hepatotóxicos y terapéuticos
7. Otras alteraciones
8. Implicaciones terapéuticas
9. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

El transporte hepatobiliar es esencial para que el hígado lleve a cabo dos de sus funciones clave: la producción de bilis y la secreción biliar de muchas sustancias endógenas y exógenas. Tanto los hepatocitos como los colangiocitos participan en este transporte, pero los hepatocitos son los responsables de la formación de la bilis primaria y de la mayor parte de la función excretora del hígado, mientras que los colangiocitos intervienen en el transporte colangiocelular y sirven principalmente para diluir, modificar y alcalinizar la bilis primaria.

El término colestasis, en contraste al previamente utilizado de «ictericia obstructiva», indica que los defectos en la secreción de la bilis pueden ser debidos no sólo a obstrucción mecánica de la bilis, sino también a anomalías en su formación y en los mecanismos excretores a nivel del hepatocito. La formación de la bilis es un fenómeno de importancia vital y su

desequilibrio por efecto de fármacos, infecciones o alteraciones autoinmunes, metabólicas o genéticas, conducen al síndrome colestático. La secreción de bilis depende de la función de un número de sistemas transportadores de membrana en los hepatocitos y colangiocitos (células epiteliales del conducto biliar) y de la integridad funcional y estructural de la maquinaria secretora de bilis

Los hepatocitos expresan sistemas de transporte polarizados en los dominios sinusoidal (basolateral) y canalicular (apical) de la membrana plasmática, los cuales funcionan y se regulan de manera coordinada para servir de transporte a muchas sustancias, desde la sangre a la bilis. Muchos de estos transportadores han sido ya clonados y se han identificado una serie de alteraciones hereditarias en el transporte hepatobiliar.

En la colestasis causada por disfunción canalicular, los ácidos biliares se acumulan en el hepatocito y regurgitan a través de la membrana basolateral hasta el espacio de Disse. Si el árbol biliar se obstruye en espacios extrahepáticos, los ácidos biliares pueden continuar siendo secretados en el canaliculo, y desde aquí regurgitan en el plasma a través de las uniones paracelulares de los conductos biliares o posiblemente por una ruta transcelular a través de las células biliares epiteliales. En ambas situaciones, los ácidos biliares plasmáticos se elevan muchas veces sobre su valor normal.

2. BASES MOLECULARES DE LA FORMACIÓN DE LA BILIS

La formación de la bilis es un proceso secretorio osmótico conducido por la concentración activa de los constituyentes de las sales biliares en el canaliculo biliar. El transporte de los solutos desde la sangre a la bilis se realiza mediante sistemas transportadores en la membrana plasmática de la superficie basolateral, que conecta con el espacio de Disse y el sinusoides y la superficie apical o canalicular de los hepatocitos (Figura 1).

La membrana sinusoidal del hepatocito posee una batería de sistemas de transporte altamente especializados que extraen de la sangre compuestos no polares unidos a la albúmina. Numerosos fármacos y compuestos lipofílicos endógenos ingresan en el hepatocito por esa vía, se transforman en su interior y posteriormente se excretan por vía biliar o urinaria. Las sales biliares representan los mayores constituyentes de la bilis y su continua secreción vectorial desde la sangre a la bilis es la principal fuerza conductora para la formación de la bilis (1)

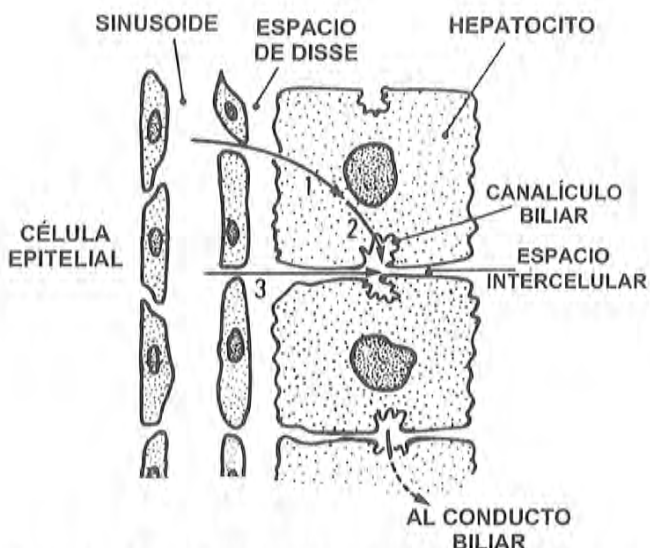


FIGURA 1. Los solutos pueden entrar en la bilis a través de vías transcelulares después de la incorporación y el transporte por el hepatocito (1), y secreción por la membrana canalicular (2), o a través de un mecanismo paracelular vía uniones intercelulares (3)

Los transportadores de la membrana plasmática sinusoidal (basolateral), que median la incorporación de las sales biliares y otros aniones orgánicos, pueden dividirse en sistemas *dependientes o independientes de sodio*. El transporte dependiente de sodio cuenta con la acción de la ATPasa sodio/potasio, que es la que se encarga de mantener el gradiente de sodio: más sodio fuera que dentro de la célula y más potasio dentro que fuera de la célula. La ATPasa sodio/potasio junto, con un canal de potasio, ayuda además a generar un potencial eléctrico transmembrana de aproximadamente 35 mV. Estos potenciales químicos y eléctricos se utilizan para el mantenimiento de los iones intracelulares y la homeostasis del pH, proporcionando la energía para la extrusión de protones, por un mecanismo de intercambio sodio-hidrógeno y para la entrada de bicarbonato por un mecanismo de transporte sodio-bicarbonato, como también para la incorporación electrogénica, dependiente de sodio, de sales biliares conjugadas o ácidos biliares (2). Las sales biliares son los solutos más abundantes en la bilis. Su transporte desde el plasma hasta el interior de los hepatocitos se verifica predominantemente por el cotransportador sodio-taurocolato (NTCP). Por el contrario, las sales biliares conjugadas, la sal biliar colato no conjugada, el anión orgánico bromosulfoftaleína y otros numerosos compuestos lipofílicos unidos a la albúmina, se transportan desde el plasma a los hepatocitos por

sistemas de transporte independientes del sodio, entre los que se incluye el polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). El transporte independiente de sodio está dirigido por mecanismos de intercambio aniónico.

En condiciones fisiológicas, el transporte activo de los solutos a través de la membrana canalicular de los hepatocitos, representa la vía limitante de la formación de bilis. Esta vía limitante es unidireccional, y cuenta con una disposición de bombas exportadoras dependientes de ATP que pertenecen a una familia ABC (ATP-binding cassette) de transportadores de membrana. El primero de estos transportadores canaliculares localizados y caracterizados fue la P-glicoproteína de multiresistencia a fármacos 1 (MDR1), que media la excreción canalicular de cationes lipófilos tales como fármacos antineoplásicos, bloqueantes de canales de calcio, ciclosporina A y otros agentes terapéuticos (3). Sin embargo, el papel fisiológico de esta P-glicoproteína en la formación de la bilis permanece incierto, porque su nivel de expresión en hígado es relativamente bajo y se desconoce la concentración de su sustrato endógeno. Por el contrario, puede asignarse a la P-glicoproteína de multiresistencia 3 (MDR3; *mdr2* en roedores), una función específica clara en la formación de la bilis. La P-glicoproteína 3 es un transportador de fosfolípidos que transloca fosfatidilcolina, desde la parte interna a la parte externa de la membrana canalicular, donde puede ser extraída selectivamente por sales biliares intracaniculares y segregada en la bilis como vesículas y micelas mezcladas (4)

Otra bomba exportadora hepatobiliar importante es el transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos, el cual es una isoforma canalicular de la proteína asociada a multiresistencia (MRP2). MRP2 media la excreción canalicular dependiente del ATP de una amplia diversidad de sustratos aniónicos anfipáticos, incluyendo el leucotrieno C₄, glutatión-S-conjugados, glucurónidos y sulfato conjugados, y es responsable de la generación de flujo biliar independiente de las sales biliares en el interior del canaliculo biliar. Por último, otro transportador dependiente del ATP se encuentra también implicado en la secreción canalicular de sales biliares. Sin embargo, a pesar de la importancia cuantitativa de las sales biliares de la bilis, la identificación definitiva molecular de este transportador de sales biliares canalicular del hígado de mamíferos, se ha quedado relegada a otros transportadores canaliculares mencionados anteriormente. Aunque la ATPasa canalicular se ha propuesto como un posible candidato, otros investigadores han proporcionado pruebas de que el transportador canalicular de sales biliares puede ser también una proteína transportadora del tipo ABC «ATP-binding cassette». Esta asunción ha sido confirmada por el clonaje de una P-glicoproteína denominada «la hermana de la P-glicoproteína» (*spgp*) (5).

3. TRANSPORTADORES DE LA MEMBRANA SINUSOIDAL

Las sales biliares son eliminadas eficientemente de la circulación portal por transportadores localizados en el dominio sinusoidal del hepatocito. La membrana sinusoidal posee una batería de sistemas de transporte muy especializados que extraen de la sangre los compuestos no polares unidos a la albúmina. Numerosos fármacos y compuestos lipofílicos endógenos son biotransformados en el interior del hepatocito y posteriormente excretados por vía biliar o urinaria. Las sales biliares representan los mayores constituyentes de la bilis y su continua secreción vectorial desde la sangre a la bilis, es la fuerza conductora principal para la formación de bilis.

Los transportadores de la membrana plasmática sinusoidal, que median la incorporación de las sales biliares y otros aniones orgánicos, pueden dividirse en sistemas *dependientes o independientes del sodio*. El transporte dependiente del sodio se lleva a cabo por el gradiente de este elemento, que se mantiene por la ATPasa sodio/potasio de la membrana plasmática basolateral. El transporte independiente del sodio se realiza por los mecanismos de intercambio iónico.

Transporte dependiente del sodio

Los potenciales eléctricos y químicos mantienen la homeostasis iónica y del pH y proporcionan energía para la extrusión de los protones, por un mecanismo de intercambio sodio-hidrógeno, y para la entrada del bicarbonato por un mecanismo de influjo sodio-bicarbonato. También proporcionan energía para la incorporación electrogénica, dependiente de sodio, de las sales biliares conjugadas (ácidos biliares). Las sales biliares son los compuestos solubles más abundantes en la bilis.

Las vías implicadas en el transporte dependiente del sodio, que suponen más de un 80% de la incorporación hepatocelular de las sales biliares conjugadas, son las derivadas del taurocolato. El principal sistema de transporte para la incorporación basolateral de las sales biliares conjugadas es el polipeptido cotransportador del taurocolato- Na^+ (NTCP). En hígado humano este polipéptido contiene 349 aminoácidos (2), se expresa exclusivamente en hígado y se relaciona estructuralmente con el transportador de sales biliares del intestino (IBAT), que media también la incorporación dependiente de sodio de las sales biliares (6) y que se expresa en el ileón, en el riñón y en los colangiocitos (7). La especificidad para el sustrato del NTCP se limita a sales biliares y a ciertos esteroides sulfatados (Figura 2).

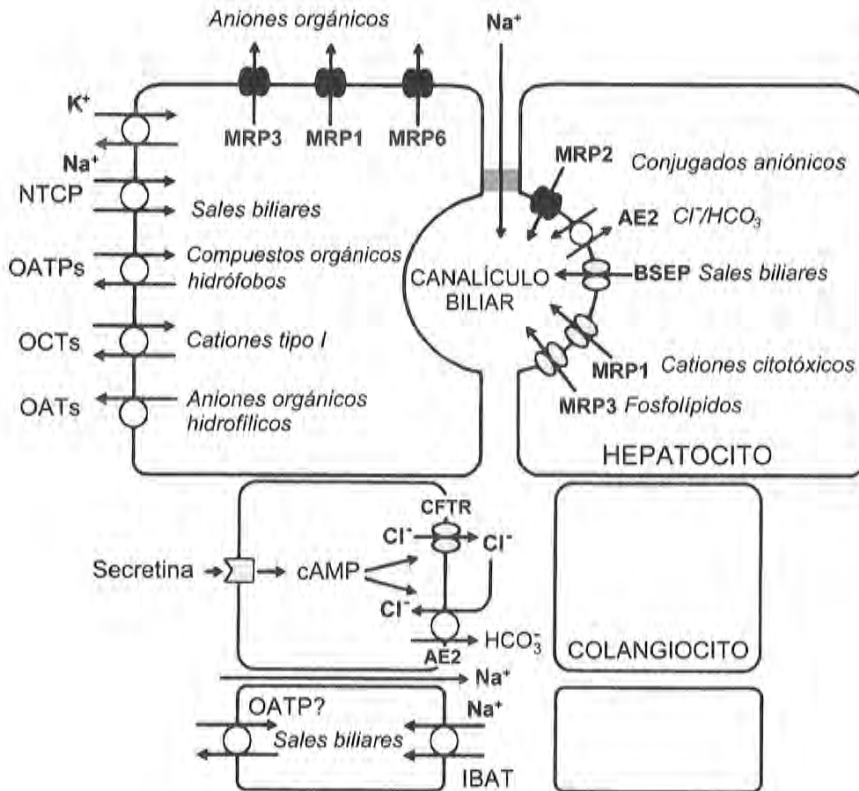


FIGURA 2. Transporte hepatocelular y colangiocelular de proteínas implicadas en la formación de la bilis. La membrana basolateral del hepatocito expresa el sistema predominante que incorpora las sales biliares, el polipéptido cotransportador de taurocolato- Na^+ (NCTP), como también proteínas representativas transportadoras de aniones orgánicos (OATP) y los transportadores de cationes orgánicos (OCT)- El eflujo basolateral de los aniones orgánicos vía las proteínas de multiresistencia MRP1 y MRP3, se encuentra alterado en la colestasis. El eflujo de las sales biliares, conjugados del glutatión y del ácido glucurónico a través de la membrana canalicular está mediada por la bomba exportadora de sales biliares (BSEP) y MRP2, respectivamente. El producto genético de multiresistencia MDR3 es crítico para la secreción biliar de fosfolípidos, mientras que MDR1 está implicado en el transporte de cationes citotóxicos. El intercambio cloruro/bicarbonato está mediado por el intercambiador aniónico 2 (AE2). La bilis ductular está modificada por canales de cloruro tales como el regulador transmembrana en fibrosis cística (CFTR) y por el intercambiador cloruro/ bicarbonato (AE2). Las sales biliares conjugadas son parcialmente reabsorbidas en el árbol biliar vía el transportador de sales biliares dependiente de sodio IBAT (30).

La incorporación, dependiente de sodio, del taurocolato se encuentra disminuída en modelos experimentales de colestasis, tales como ligamento de los conductos biliares (8), la endotoxemia (9) y la hepatectomía parcial (10). También se encuentra reducida en cultivos primarios de hepatocitos y

está ausente en diversas líneas celulares de hepatoma. En pacientes con atresia biliar extrahepática el mRNA del cotransportador NTCP está notablemente disminuído. Al contrario, esta actividad transportadora se eleva en ratas postparto y en ratas suplementadas con prolactina. Esta elevación se atribuye a un incremento en la translocación nuclear del STAT5 fosforilado (un miembro de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción), que se une a la secuencia activada del IFN γ (elementos GAS-like) localizados en la región promotora *Ntcp* y actúa así estimulando la transcripción genética del cotransportador (11).

La tasa de incorporación, dependiente del sodio, de las sales biliares a través de la membrana plasmática del hepatocito no está regulada solo a nivel transcripcional, sino también por mecanismos post-transcripcionales. El AMP cíclico, actuando a través de la proteína quinasa A (PKA), eleva la incorporación de taurocolato sódico y estimula su máxima velocidad de transporte. Esta estimulación a corto plazo, mediada por el AMP cíclico, se potencia por mecanismos dependientes de calcio/calmodulina y se desequilibra por agonistas de la proteína quinasa C (12).

Sin embargo, la transcripción del gen *Ntcp* no se afecta por cicloheximida, lo cual apoya la operatividad de mecanismos post-traduccionales. Estudios relativamente recientes proponen que el NTCP se trasloca desde un compartimento endosómico a la membrana basolateral por un mecanismo dependiente de la proteína quinasa A (13). El NCTP después de ser sintetizado, se envía desde el compartimento endosómico hacia la membrana plasmática, mediante una vía dependiente de microtúbulos. Su inserción en la membrana plasmática se verifica por un mecanismo que depende del microtúbulo y del AMP cíclico.

Estudios con hepatocitos aislados y con vesículas de membrana sinusoidal procedentes de colestasis experimental inducida por administración de etinil estradiol a ratas, han mostrado una reducida incorporación de taurocolato dependiente de sodio. También la ciclosporina A inhibe directamente la incorporación de taurocolato en las mismas condiciones experimentales (14). El taurolitocolato se ha observado que inhibe reversiblemente la incorporación, dependiente de sodio, del taurocolato en hepatocitos (15).

La ATPasa sodio/potasio juega un papel central en el transporte activo secundario del taurocolato en hepatocitos e influencia la traslocación de otros transportadores tales como el ion intercambiador sodio/hidrógeno, el sodio/calcio, el sodio/bicarbonato, e incluso transportadores canaliculares. Una serie de modelos de colestasis, inducida por etinil estradiol, clorproma-

zina, endotoxina, hipotiroidismo, adrenalectomía y protoporfirinas, se asocia con una actividad disminuída en la actividad de la bomba sodio/potasio.

Un número de situaciones fisiopatológicas, como la intoxicación etílica, la regeneración hepática y la colestasis, alteran selectivamente la composición lipídica y la fluidez de la membrana sinusoidal. El ejemplo mejor estudiado de fluidez disminuída, asociada a la colestasis, es el del etinil estradiol. En este modelo, la administración del estrógeno sintético se asocia a descensos reversibles, dependientes del tiempo, en la fluidez sinusoidal, en la sodio/potasio ATPasa y en la incorporación de taurocolato dependiente del sodio (16)

Transporte independiente del sodio

En contraste a las sales biliares conjugadas, la sal biliar no conjugada el colato, el anión orgánico bromosulfoftaleína y numerosos otros compuestos lipofílicos unidos a la albúmina, son transportados desde el plasma a los hepatocitos por sistemas de transporte independientes del sodio. La incorporación hepatocelular de sales biliares independiente del sodio, no puede ser atribuída a la función de una simple proteína transportadora, sino que está mediada por una familia de proteínas transportadoras denominadas «polipéptidos transportadores de aniones orgánicos» (OATPs) (Figura 2)

En hepatocitos de rata se han identificado al menos dos miembros de la familia Oatp. La OATP1 fue aislada en base a su capacidad para transportar bromosulfoftaleína (BSP) (17). El OATP1 es un transportador multiespecífico que media también la incorporación hepatocelular de sales biliares, esteroides conjugados y diversos fármacos. El OATP1 puede mediar el transporte bidireccional de la bromosulfoftaleína y el intercambio aniónico taurocolato/bicarbonato. Un estímulo importante para la incorporación de aniones orgánicos vía el OATP1 parece ser el contratransporte del GSH (18). El OATP2 es un homólogo cercano al OATP1, que transporta sales biliares, glucósidos cardiotónicos y péptidos cíclicos. Los OATP1 y 2 se localizan en la membrana basolateral de los hepatocitos. El transportador recientemente identificado LST1 media la incorporación del taurocolato en hepatocitos de rata y es un miembro nuevo de la familia OATP (19). El primer OATP identificado en hígado humano, es el que media el transporte basolateral de las sales biliares, los aniones orgánicos, como el BSP, los esteroides conjugados, cationes tipo II y numerosos fármacos. El primer OATP humano, el OATP-A es una proteína de 670 aminoácidos con 12 dominios transmembrana, que se expresa en hígado, cerebro, riñón, pulmón y testículos. El gen

OATP-A se ha localizado en el cromosoma 12p12. Se han identificado dos miembros adicionales de la familia del OATP en humanos: un transportador con 34% de identidad y 643 aminoácidos «transportador de prostaglandina» y un transportador específico (LST1) de 691 aminoácidos que transporta esteroides conjugados, eicosanoides, hormona tiroidea y taurocolato. El LST1 exhibe un 42% de identidad con el OATP-A. El LST1 representa el OATP-C de la familia humana. En resumen, la familia de transportadores OATP juega un papel central en el transporte de aniones orgánicos hepatocelulares y en la eliminación de fármacos.

La regulación del OATP1 se ha estudiado en modelos de colestasis inducida por el etinil estradiol y por la ligación del conducto biliar. Durante la regeneración hepática post hepatectomía, los niveles del mRNA del OATP disminuyen a pesar del incremento en los niveles de proteínas. Sin embargo, en el caso del OATP2, disminuyen, tanto el mRNA como las proteínas. La preservación de los niveles de las proteínas OATP1 y 2 después de la hepatectomía parcial, puede compensar la marcada disminución en la expresión de *Ntcp* y asegura la incorporación basolateral en curso de las sales biliares y de otros aniones orgánicos (20). La incorporación de sales biliares mediada por el OATP puede estimularse por el incremento en las concentraciones de glutatión (GSH) encontradas en hígado durante la regeneración hepática, que son resultado de la disminución de la secreción canalicular del GSH durante este proceso regenerativo. El único *Oatp* que se ha caracterizado hasta la fecha a nivel genómico, es el OATP-A humano. El promotor del gen *OATP-A* confiere una fuerte actividad en varias líneas celulares (21). En células de la línea celular de hepatoma HepG2, transfectadas con el promotor del gen *OATP-A*, la actividad promotora se estimuló por la sal biliar taurocolato. En hígado humano, la expresión del *OATP-A* parece estar preservada o algo estimulada en ciertas formas de colestasis, tales como la colangitis primaria esclerosante.

La membrana basolateral posee también diversas bombas de eflujo dependientes del ATP que pertenecen a la familia de proteínas de multiresistencia a fármacos (MRP). La MRP2 es la única representante asociada a la superfamilia de transportadores localizada apicalmente, mientras que las MRP1, 3, 5 y 6 son proteínas sinusoidales o laterales (Figura 2). La bomba MRP3 media el eflujo basolateral de los aniones orgánicos estradiol-17 β -D-glucurónido y *S*-(2,4-dinitro-fenil-)glutatión, de las sales biliares y de los fármacos antineoplásicos metotrexato y etopósido. No se ha identificado aún una función fisiológica para MRP5 y MRP6. La bomba MRP3, que se expresa a niveles bajos, se encuentra en mayores proporciones en el síndrome de Dubin-Johnson y en la cirrosis biliar primaria (22). La expresión de

MRP1 es muy baja en hepatocitos normales, pero aparece incrementada en células de hepatoblastoma humano HepG2 y en hepatocitos inmortalizados con el antígeno T grande SV40 (23). También MRP1 puede ser inducida en células en cultivo tratadas con prooxidantes que exhiben elevadas concentraciones intracelulares de ROS. Esta inducción se previene por GSH en células transfectadas con el gen de la γ -glutamilcisteína sintetasa, indicando que la expresión de *MRP1* se activa por ROS (incrementados en colestasis extrahepática) y se inhibe por GSH (incrementado por administración de S-adenosil metionina y N-acetilcisteína). La caracterización de la región promotora del gen *MRP1* ha demostrado que una pérdida de la función del tipo silvestre de p53 y/o un incremento en la actividad Sp1, eleva la expresión del gen *MRP1* en células tumorales (24).

4. TRANSPORTADORES DE LA MEMBRANA CANALICULAR

En condiciones fisiológicas el transporte activo de solutos a través de la membrana canalicular de los hepatocitos representa la vía limitante en la formación de la bilis. Esta vía unidireccional se lleva a cabo por una serie de bombas de eflujo dependientes del ATP que pertenecen a una familia de transportadores de membrana dependientes del ATP. Hasta hace relativamente poco no se habían identificado transportadores activos primarios dependientes de ATP en la superficie canalicular.

Además del producto del gen de multiresistencia, se han demostrado funcionalmente presentes en las vesículas de la membrana canalicular los transportadores de ácidos biliares dependientes de ATP y los transportadores de aniones multiorgánicos también dependientes de ATP.

La identificación de los transportadores dependientes del ATP en el dominio canalicular, se debe en gran parte al gradiente de sales biliares entre el citosol del hepatocito y el canalículo biliar. La obstrucción extrahepática de los conductos biliares disminuye el transporte de ácidos biliares en las vesículas de la membrana canalicular en asociación con el descenso en la inmunodetección de la proteína de 100 kDa que posteriormente se identificó en la superficie sinusoidal (25). La ligadura de los conductos biliares y el tratamiento con α -naftiltioisocianato induce la expresión del gen de multiresistencia *MDR* (26). Algunos agentes colestáticos, etinil estradiol y ciclosporina A inhiben el transporte de sales biliares dependiente del ATP

Secreción de sales biliares

La secreción canalicular de sales biliares está mediada por un homólogo de la P-glicoproteína MDR, denominada originalmente «hermana de la p-glicoproteína» y ahora denominada «bomba exportadora de sales biliares» o Bsep (5). Este proceso transportador depende enteramente del ATP y las características funcionales del transporte del taurocolato en vesículas de células Sf9 de insectos, que expresan la Bsep de rata (Km aparente para el taurocolato 5,3 μ mol/l), son idénticas a las encontradas en estudios previos sobre el transporte del taurocolato en vesículas de membrana plasmática canalicular de hígado de rata (Km aparente 2,1 μ mol/l). Así, la Bsep parece representar el sistema de eflujo predominante de las sales biliares de la membrana canalicular del hepatocito. Se expresa exclusivamente en el hígado y se localiza en las microvellosidades canaliculares y vesículas subcanaliculares. El transcrito de 5.036 kb codifica para una proteína de 1321 aminoácidos con una masa molecular de 160 kDa.

El papel de la Bsep en la patogénesis de la colestasis se ha hecho evidente en análisis genéticos de colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 2 (PFIC2). La identificación de la BSEP humana, como la candidata posicional en esta enfermedad, indica claramente un defecto en el transporte canalicular de sales biliares como la causa de la PFIC2 (Figura 3). Curiosamente, el gen *Bsep* está superexpresado en ratones C57L genéticamente susceptibles a sufrir cálculos. Estos ratones exhiben un incremento en la incorporación de colesterol vía SR-BI (ver después) y como consecuencia una excreción canalicular incrementada de colesterol y ácidos biliares. El hecho de que el incremento de la excreción biliar de colesterol sea más acusado que el incremento en la secreción de ácidos biliares, parece ser la causa de la relativa hipersecreción de colesterol en la bilis y de la supersaturación de la bilis con colesterol (27).

Secreción de colesterol

La bilis representa la vía principal para la eliminación del colesterol del organismo. La mayor fuente del colesterol biliar parece derivar de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las partículas HDL se unen al receptor atrapador (Scavenger Receptor) de la clase BI (SR-BI) y la incorporación selectiva de HDL-colesterol se estimula en ratones que superexpresan SR-BI por transferencia del gen *SR-BI* mediada por adenovirus. Estos ratones exhiben elevada concentración de colesterol biliar, lo que indica que SR-BI regula, no sólo las HDL plasmáticas, sino también las concentraciones de

colesterol biliar (28). Aunque hasta la fecha no se ha identificado ninguna proteína transportadora, es muy probable que un transportador canalicular definido medie el eflujo transmembrana del colesterol en el canalículo biliar. La reciente identificación de mutaciones en el gen *ABC1* como la base patogénica del eflujo defectivo del colesterol desde los macrófagos hasta las partículas HDL en la enfermedad de Tángier, surge de la posibilidad que *ABC1* (ATP Binding Cassette) se encuentre implicado en la secreción canalicular del colesterol (29).

Secreción de fosfolípidos

El principal lípido secretado en la bilis junto al colesterol es la fosfatidilcolina. La constante reposición de moléculas de fosfatidilcolina desde la lámina interna hasta la externa de la membrana canalicular, está mediada por la acción concertada de «flipasas» dependientes e independientes del ATP. La flipasa dependiente del ATP se ha identificado como una clase III de glicoproteína multiresistencia MDR, *mdr2* en ratón y *MDR3* en humanos (Figura 3), que es una proteína canalicular de 170 kDa (30).

Secreción de aniones orgánicos

La secreción de aniones orgánicos (no sales biliares) en la bilis está mediada por la proteína canalicular de multiresistencia 2, *MRP2*, un miembro de la familia de proteínas de multiresistencia de transportadores pertenecientes a la ABC (ATP-binding cassette). La proteína *MRP2* tiene una masa molecular de 190 kDa y la proteína humana exhibe un 46% de identidad con la *MRP1* humana. Ambas *MRP2* humana y de rata se expresan predominantemente en el hígado, con localización exclusiva en la membrana canalicular (Figura 3). El espectro de aniones orgánicos transportados por la *MRP2* es cuantitativamente similar a de la *MRP1* e incluye conjugados de glutation, glucurónidos, leucotrieno C_4 y sales biliares divalentes pero no monovalentes. Se ha demostrado también un papel para *MRP2* en la excreción canalicular de GSH, para el mantenimiento del flujo biliar independiente de las sales biliares (31). Las mutaciones en el gen *MRP2* que conllevan la síntesis de una proteína truncada no funcional, se han identificado como la base patogénica de la hiperbilirrubinemia conjugada hereditaria (Figura 4).

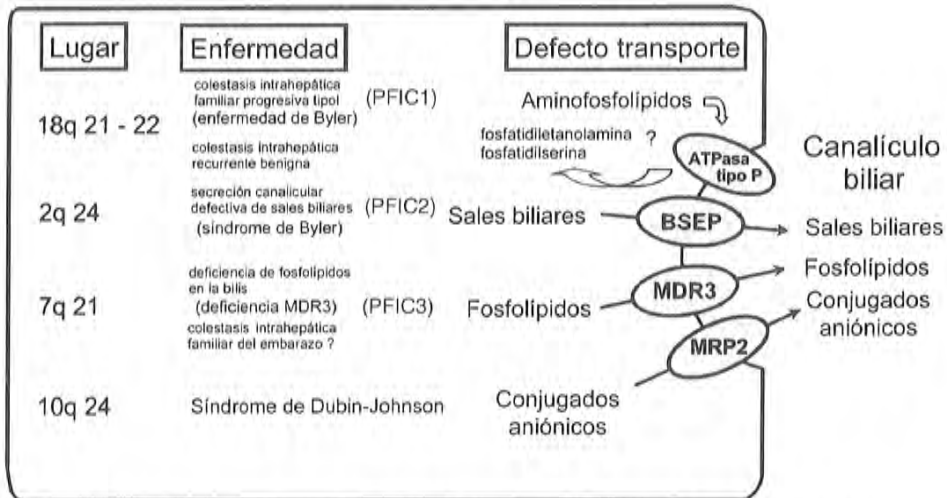


FIGURA 3. Bases genéticas de síndromes colestáticos hereditarios (30)

Secreción de bicarbonato

Los hepatocitos expresan en su membrana apical el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - AE2 (anion exchanger 2), que es un mediador clave de la secreción de bicarbonato y de la coleresis (Figura 2). La expresión reducida de este intercambiador en hepatocitos de pacientes con cirrosis biliar primaria se eleva después del tratamiento con ácido ursodesoxicólico (32)

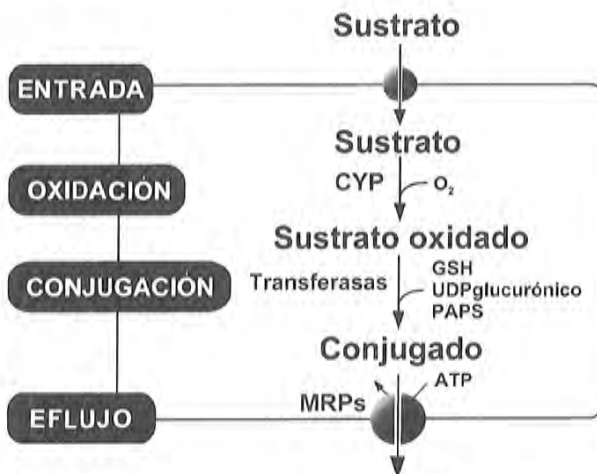


FIGURA 4. Mecanismo de acción del transportador canalicular proteína de multiresistencia MRP.

5. MODULACIÓN DEL HÍGADO DURANTE LA COLESTASIS

Estudios por microscopía óptica de la morfología de la colestasis, muestran una acumulación de pigmentos biliares en los dilatados canalículos y también en el citoplasma de los hepatocitos, una característica denominada «bilirubinostasis» (33). Esta acumulación empieza en el área perivenosa y solo en casos de colestasis intrahepática de larga duración o en obstrucción extrahepática aparece en áreas periportales. La bilirubinostasis puede encontrarse en los canalículos dilatados, en los hepatocitos e incluso en las células de Kupffer.

Por el contrario la *colato-estasis*, que comienza como una hinchazón hidrópica y vacuolización de los hepatocitos y termina en necrosis se localiza predominantemente en el área periportal. Como en esta región acinar la concentración de ácidos biliares es más elevada, se cree que presenta toxicidad a los ácidos biliares, de aquí su designación como «colato-estasis».

La colestasis de larga duración conduce a alteraciones fenotípicas en hepatocitos y en colangiocitos. Los hepatocitos forman rosetas colestáticas también descritas como disposiciones tubulares de hepatocitos (34). Tales hepatocitos expresan las citoqueratinas que normalmente se encuentran en células epiteliales del conducto biliar. Este fenómeno se denomina metaplasia ductular para distinguirla de la proliferación ductular. La última se cree que es el producto de células ductulares preexistentes y ocurre en respuesta a elevada presión biliar. Esta ganando cada vez más adeptos la posibilidad de que la proliferación ductular sea el producto de células precursoras, las denominadas *células ovals* (ver capítulo 9 de este volumen) (35). Las señales inductoras de la proliferación ductular permanecen aún sin aclarar, se ha responsabilizado al incremento en la presión biliar como factor mecánico. Comienza a sugerirse que algún factor humoral ha de estar también implicado, ya que se ha observado la expresión del factor del crecimiento epidérmico en conductos biliares proliferantes después de la ligadura del conducto biliar (36). Los conductos biliares son los objetivos de los ataques inmunológicos en diferentes enfermedades, particularmente en la cirrosis biliar primaria y en el rechazo crónico después del trasplante hepático. La naturaleza del infiltrado linfocítico, purulento, mezclado o fibrótico proporciona importantes pistas de la etiología de la enfermedad (37)

Una serie de anormalidades ultraestructurales pueden ser visualizadas por microscopía electrónica o de barrido. La característica de la mayoría de las formas de colestasis es la dilatación de los canalículos y la pérdida de

las microvellosidades de los hepatocitos. El pliegue marginal se encuentra a menudo desocupado. La tortuosidad de los canalículos, como también un mayor número de lúmenes canaliculares se ha ascrito a la formación de nuevos canalículos en casos de obstrucción extrahepática de los conductos biliares. Se observan también alteraciones citoesqueléticas tales como engrosamiento de los microfilamentos pericanaliculares que apuntan hacia disfunción de dichos microfilamentos como una causa de colestasis. Otra característica importante de la disfunción del citoesqueleto es la formación de los cuerpos de Mallory, que están compuestos principalmente por filamentos intermediarios (16).

Existen también otro tipo de alteraciones ultraestructurales en orgánulos no implicados directamente con la formación de bilis. Así, existe desgranulación del retículo endoplásmico rugoso e hipertrofia del retículo endoplásmico liso. Las mitocondrias pueden llegar a alterarse en colestasis a largo plazo y en casos de obstrucción de los conductos biliares se ha observado proliferación de las mitocondrias, quizás como una respuesta adaptativa. La elongación de las mitocondrias y la formación de cristas circulares puede ser reproducida por una excesiva producción de sales biliares. Los peroxisomas se encuentran en mayor cantidad en hígado de rata y de humanos con colestasis (16).

En colestasis de larga duración de origen extra o intrahepático, las células hepáticas parenquimáticas sufren una serie de cambios, que pueden ser considerados como mecanismos adaptativos de los hepatocitos frente a un fallo secretorio biliar. Estos cambios incluyen:

- a) reversión de la polaridad secretora;
- b) formación de nuevos canalículos;
- c) rosetas colestáticas en células hepáticas;
- d) metaplasia ductular de los hepatocitos; y
- e) en fases tardías, características adicionales de lesión hepatocelular en hepatocitos periportales, referidos como colato-estasis.

Reversión de la polaridad secretora

Una reversión de la polaridad secretora de los hepatocitos se refleja en un cambio en los mecanismos secretores normales de la bilis (34). La dife-

renciación asimétrica normal de los dominios canalicular y sinusoidal de la membrana plasmática se encuentran alterados. La elevación en el dominio sinusoidal de enzimas normalmente presentes en el canaliculo hicieron pensar en una reversión de la polaridad secretora de la bilis. En estudios más recientes esta sugerencia ha sido confirmada y ampliada por la observación que la proteína transportadora de las sales biliares en el canaliculo, localizada en el dominio canalicular, se encuentra desviada en su forma activa funcional hacia el dominio basolateral de la célula hepática en casos de colestasis. Dos antígenos específicos de membrana del dominio canalicular muestran también una marcada redistribución.

Las uniones estrechas (tight junctions) entre las células parenquimales muestran notables alteraciones en el número y disposición de las fibrillas integrantes de tales uniones, sugiriéndose un incremento en la permeabilidad de estas estructuras en la colestasis, lo cual va a llevar a la disipación de los gradientes osmóticos y eléctricos canaliculo-sinusoidales. Se ha comprobado un incremento en la permeabilidad, al detectar el paso a través de estas uniones, de molecular marcadoras que en hígado normal no atraviesan fácilmente estas fuertes barreras. Los cambios en estas uniones pueden también jugar un papel en la redistribución de proteínas en los dominios canalicular y sinusoidal de la membrana plasmática.

Los niveles anormalmente incrementados de «enzimas colestáticos», como la fosfatasa alcalina no específica, en pacientes con colestasis hicieron pensar que eran debidos a la regurgitación del compartimento biliar. Un origen alternativo puede proceder del dominio sinusoidal de la membrana plasmática hepatocelular, que muestra un incremento en la detección histoquímica de estos enzimas en casos de colestasis. La fosfatasa alcalina en suero de pacientes con colestasis es un isoenzima de elevado peso molecular inserto a fragmentos circulantes de membranas que contienen también actividades 5' nucleotidasa, γ -glutamyl transferasa y L-leucil- α -naftil amidasa formando un complejo «koinozima». Probablemente, tales enzimas unidos a fragmentos de membrana son liberados de la membrana plasmática sinusoidal mediante la acción detergente de ácidos biliares concentrados cerca de la superficie celular (38). Parece que en la colestasis, el hepatocito cambia sus vías secretoras biliares, desde el polo canalicular hacia el dominio sinusoidal, preservando así el funcionamiento de rutas secretoras paracelulares y transcelulares y evitando, al mismo tiempo, la acumulación intracelular de compuestos colefílicos. Esta modulación adaptativa, aparentemente útil para la supervivencia de los hepatocitos, es perjudicial para el organismo y da como resultado la «regurgitación de la bilis» y síntomas de colestasis.

Nueva formación de canalículos

En la mayoría de las formas de colestasis humana y experimental se observa una notable heterogeneidad en la morfología canalicular. Esto se debe, en parte, al hecho de que los cambios canaliculares inducidos por la colestasis no son estáticos. Se desarrollan nuevos canalículos entre los hepatocitos colestáticos (39), siguiendo una secuencia similar a la diferenciación de los canalículos en hígado fetal y neonatal y en cultivo de hepatocitos. Tal formación de canalículos *de novo* puede considerarse un fenómeno de adaptación en un intento de reestablecer un compartimento biliar funcional.

Rosetas colestáticas

En casos de colestasis de larga duración, algunos canalículos asumen una configuración especial y es que están recubiertos por hepatocitos y adquieren a menudo un diámetro considerable. Esta nueva reordenación de los hepatocitos, a partir de las placas de una célula típica del hígado normal, en forma de túbulos, recibe el nombre de *rosetas colestáticas* o disposiciones tubulares de hepatocitos

La tinción selectiva inmunohistoquímica de las queratinas ha revelado la expresión de citoqueratinas del tipo de células del conducto biliar en las rosetas colestáticas, sugiriéndose un estadio temprano de metaplasia ductular en los hepatocitos implicados. Algunos o todos los hepatocitos que recubren las rosetas pueden mostrar características de degeneración debida a una reabsorción o retención de compuestos biliares.

La reordenación tubular, junto con las características de uniones intercelulares de las células colestáticas propone la existencia de un cambio de un tipo celular isotónico secretorio a un tipo celular hipertónico secretorio o absorptivo. Desde un punto de vista estructural esto indica un retorno del hígado a una arquitectura parenquimática más primitiva (38).

Metaplasia ductular de los hepatocitos

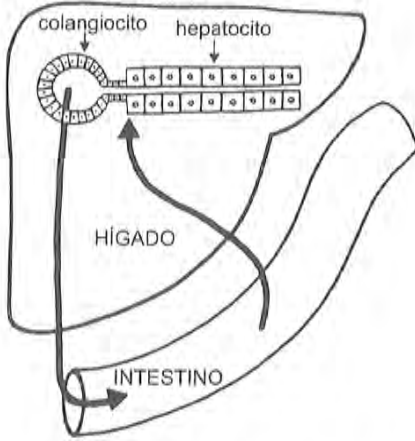
Una metaplasia ductular de las láminas (placas) de hepatocitos de la zona acinar periportal, en estructuras del tipo de conducto biliar (denominada proliferación ductular atípica), se observa en colestasis obstructiva de larga duración, como también en cirrosis biliar primaria y en colangitis

primaria esclerosante. Una transformación de la muralia parenquimática en ductulos se visualiza mejor por inmunohistoquímica de los filamentos intermedarios de queratina. La metaplasia ductular de los hepatocitos periportales contribuye a un incremento en el número y en el área de las estructuras ductulares, posiblemente incrementando el número de células provistas de las propiedades secretoras y absortivas de las células ductulares. Las estructuras metaplásicas ductulares muestran, a menudo, características de reabsorción: las estructuras que las recubren muestran vacuolización y contienen gránulos pigmentados de lipofucsina y/o bilirubina. Estudios autoradiográficos, utilizando taurocolato tritiado, han demostrado la reabsorción de los constituyentes biliares en los dúctulos durante la colestasis. Lo mismo se aplica para la ferritina después de la inyección retrógrada en el árbol biliar. Estas observaciones sugieren que el incremento en la masa ductular puede aumentar la capacidad de absorción de la población de células ductulares. La reabsorción ductular de los constituyentes de la bilis conduce al envío de estos componentes hacia los hepatocitos a través del plexo peribiliar que drena en los sinusoides hepáticos. De esta manera, el ciclo colehepático de las sales biliares y otros constituyentes biliares en la colestasis reemplaza el ciclo enterohepático de los componentes en el estado normal (Figura 5).

El ciclo colehepático durante la colestasis obstructiva permite a los hepatocitos continuar la secreción antegradado en los canalículos evitando la acumulación intracelular de los ácidos biliares detergentes a elevadas concentraciones tóxicas. La metaplasia ductular de los hepatocitos periportales como un medio de aumentar la masa celular disponible para el ciclo colehepático de los componentes de la bilis potencialmente tóxicos, puede ser considerada como una reacción adaptativa de las células hepáticas a una nueva condición de sobrecarga de ácidos biliares, creando una válvula de seguridad que por algún tiempo proteja a los hepatocitos restantes de la intoxicación biliar y la lesión (35, 38). Los efectos colaterales negativos de esta adaptación del hígado incluye lo siguiente:

1. Una reacción inflamatoria en el tejido conjuntivo portal debido a las propiedades flogísticas de los ácidos biliares reabsorbidos y otros componentes de la bilis (leucotrienos) y
2. una relativa reducción de la masa funcional parenquimática.

Ciclo entero-hepático de los ácidos biliares en hígado normal



Ciclo cole-hepático de los ácidos biliares en hígado colestático

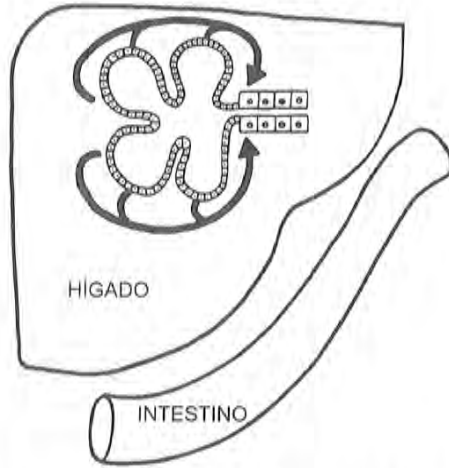


FIGURA 5. Ciclo entero-hepático de los ácidos biliares. A en hígado normal. B en hígado con colestasis de larga duración. En hígado normal, los ácidos biliares segregados por los hepatocitos alcanzan los conductos biliares interlobulares a través de los canaliculos biliares. La bilis dreña vía el arbol biliar hacia el intestino. Los ácidos biliares son reabsorbidos en el ileon y alcanzan el parénquima hepático a través de la vena porta. En colestasis de larga duración los conductos biliares interlobulares han desaparecido. La proliferación ductular proporciona una superficie incrementada de epitelio. Los constituyentes biliares reabsorbidos retornan al parénquima vía el plexo vascular peribiliar (38).

Colato-estasis

Los hepatocitos de la zona periportal aseguran la tasa más alta del transporte de ácidos biliares en el estado normal. No sorprende, por tanto, que sean estas células, las profesionales más cualificadas en el transporte de los ácidos biliares, las primeras en sufrir la intoxicación de los ácidos biliares en caso de obstrucción del flujo biliar. La intoxicación biliar de la zona periportal ocasiona daño celular reflejado por cambios morfológicos referidos como colato-estasis.

Reacción ductular

Como el sistema intrahepático de conductos biliares juega un papel en la producción de bilis, tanto por la secreción de fluidos y electrolitos como por la reabsorción, se puede esperar que estas estructuras sufran alteraciones notables en la colestasis.

Virtualmente todas las condiciones colestáticas, especialmente las crónicas, se caracterizan por un incremento en el número de estructuras ductulares en la periferia de los tractos portales. El origen de este incremento ductular ha sido tema de debate; si deriva de la proliferación de ductulos preexistentes o de la transformación de placas de células hepáticas en estructuras de tipo biliar. Aparentemente se verifican ambos, fenómenos, pero a diferentes velocidades y en diferentes condiciones,

Como se mencionó anteriormente, la metaplasia ductular de los hepatocitos periportales juega un papel en la obstrucción incompleta y crónica del flujo biliar. Por el contrario, la proliferación ductular por mitosis de las células de epitelio biliar, predomina en colestasis completa aguda, tales como la causada por ligadura del conducto biliar común. La proliferación ductular y la metaplasia ductular pueden contribuir al incremento en la masa celular ductular observada en la colestasis crónica y juega un papel en el ciclo cole-hepático de los constituyentes de la bilis. El incremento en las estructuras ductulares se acompaña por inflamación portal y periportal, con progresiva deposición de nuevos componentes de la matriz, dando origen a fibrosis periductular y periportal. Esta secuencia compleja de cambios se denomina «reacción ductular» y establece un incremento notable en las ramificaciones terminales del árbol biliar. El incremento en la masa celular ductular que modula el árbol biliar hacia una estructura más compleja de ramificaciones, permanece reversible durante largo tiempo. La eliminación de la causa de la colestasis produce la remodelación de árbol biliar hacia su modelo original, con desaparición de los ductulos nuevamente formados mediante apoptosis (38).

Destrucción de los conductos portales

En la obstrucción crónica extrahepática, y también en las alteraciones colestáticas intrahepáticas asociadas con la destrucción de los conductos biliares, se desarrolla una fibrosis progresiva y concéntrica alrededor de los segmentos ductulares próximos a la obstrucción. La fibrosis periductular interfiere con el suministro de sangre del plexo capilar periductular, lo que ocasiona una atrofia progresiva y desaparición de los conductos. De esta manera la condición de colestasis crónica induce un círculo vicioso en el que los propios efectos de la colestasis originan su gravedad (38).

6. COLESTASIS INDUCIDA POR AGENTES HEPATOTÓXICOS Y TERAPÉUTICOS

Aunque la patogénesis de la colestasis inducida por fármacos tiene que ser estudiada más profundamente por estudios farmacocinéticos, se han identificado hasta la fecha algunos ejemplos de agentes terapéuticos que producen inhibición directa de los transportadores. Así, en la colestasis inducida por *ciclosporina* parece que está involucrada una inhibición directa del transporte canalicular de sales biliares. En un escenario clínico, la colestasis inducida por ciclosporina ocurre particularmente durante la administración parenteral de este fármaco inmunosupresor en el periodo inicial post-transplante. En ratas, la administración de ciclosporina por vía parenteral induce colestasis por inhibición de la secreción de sales biliares y del flujo biliar independiente de las sales biliares (40).

Después de un transplante hepático ortotópico a ratas, la síntesis de sales biliares disminuyó a un 50% y también el nivel de sal biliar total. En vesículas de membrana plasmática aisladas de la bomba exportadora de sales biliares (Bsep), el transporte de taurocolato, dependiente del ATP, resultó inhibido con un valor K_i de $0,3 \mu\text{mol/l}$ (41) Este valor está en el rango del obtenido en vesículas de la membrana plasmática canalicular de hígado de rata (42). La inhibición del transporte canalicular de sales biliares vía Bsep se ha demostrado también con fármacos tales como la rifamicina y la rifampicina, indicando que la inhibición de la Bsep representa un mecanismo importante en ciertas formas de colestasis inducida por agentes terapéuticos.

La colestasis inducida por *clorpromazina* supone un problema clínico de significativo interés que se presenta en el 1-2% de los pacientes tratados con este fármaco (43). En humanos la clorpromazina induce colestasis debido a la hipersensibilidad o reacción idiosincrásica. Las alteraciones en la morfología de los hepatocitos y/o elevaciones en las transaminasas y fosfatasa alcalina ocurre en el 50% de los pacientes durante el tratamiento con clorpromazina

El α *naftilisotiocianato* ha recibido una gran atención porque produce hepatitis colangioliítica en animales. La fisiopatología de este compuesto se parece a la que ocurre esporádicamente en humanos durante la terapia con ciertos fármacos. A las 24 horas de la administración, el α naftilisotiocianato produce colestasis acompañada por una lesión en las células que rodean el terminal portal, que se refleja por elevaciones en las actividades de las aspartato y alanina aminotransferasas en suero. Se registra también una marcada lesión en las células epiteliales del conducto biliar, que se refleja

por un incremento en la actividad de la γ -glutamyl transferasa sérica. Después de administración continuada, este agente hepatotóxico conduce a un cuadro de colangitis, mientras que la lesión temprana se caracteriza por lesión hepatocelular (34). La toxicidad de este fármaco se relaciona con su activación por el citocromo P-450. La colestasis inducida por el α naftilisotiocianato se caracteriza por un incremento en la permeabilidad biliar a solutos inertes. A largo plazo puede llegar a producir un tipo biliar de cirrosis. Esta sustancia es de interés particular, ya que en contraste con otras hepatotoxinas, parece que afecta en primer lugar a los conductos biliares.

La colestasis inducida por *estrógenos* ha sido tema de intensas investigaciones por su importancia clínica relacionada con la colestasis intrahepática del embarazo. Es esta una enfermedad que se caracteriza por prurito y colestasis bioquímica. La elevada prevalencia regional —en países como Chile y Suecia— y familiar y la susceptibilidad a colestasis inducida por contraceptivos orales, implica uno o más rasgos genéticos en la patogénesis.

En vesículas de membrana plasmática canalicular de ratas tratadas con etinil estradiol, el transporte canalicular del taurocolato, dependiente del ATP, se encuentra muy disminuído (44). Esto se atribuye a la reducción de los niveles de la proteína Bsep que se observa después de cinco días de tratamiento con etinil estradiol (45). Sin embargo el principal factor patogénético en la colestasis inducida por el etinil estradiol parece ser la inhibición del transporte de la proteína Bsep por el metabolito colestático del etinil estradiol, el estradiol 17β -D-glucurónido, que es un sustrato de la MRP2 (46, 47). Probablemente este metabolito *trans*- inhibe la función de Bsep desde el interior del lumen canalicular, ya que las razas de ratas deficientes en *mrp2*, que son incapaces de segregar el estradiol 17β -D-glucurónido en el canálculo biliar, no desarrollan colestasis.

De acuerdo con estas observaciones se ha demostrado que la función de la proteína Bsep no se inhibe ni en las vesículas de membrana plasmática canalicular de hígado de rata deficiente en *mrp2*, ni en las vesículas de células Sf9 infectadas con baculovirus que expresan Bsep, lo que indica que la función intacta de *mrp2* es un prerequisite para el desarrollo de la colestasis inducida por el estradiol 17β -D-glucurónido. Puede especularse que un polimorfismo del gen *BSEP*, hasta ahora no identificado, puede conferir un riesgo genético individual para el desarrollo de la colestasis inducida por estrógenos. En contraste con la colestasis inducida por endotoxina, la disfunción de *mrp2* no representa un factor patogénico en el desarrollo de la colestasis inducida por etinilestradiol (30, 48).

La *enfermedad hepática alcohólica* puede ocasionalmente presentar un cuadro colestático. A elevadas concentraciones el alcohol ejerce un efecto colestático por sí mismo en hígado perfundido. Esto se asocia con una menor excreción de aniones orgánicos y menor transcitosis de la peroxidasa. Parece que existe una relación entre las alteraciones inducidas por alcohol en el citoesqueleto (formación de cuerpos de Mallory) y la colestasis. Una explicación alternativa es que los linfocitos estimulados por alcohol en casos de hepatitis alcohólica, producen un factor o una citoquina con propiedades colestáticas. Por último, la adaptación homoviscosa inducida por alcohol podría ser la causa de la colestasis por inhibición de la ATPasa sodio, potasio (16).

Colestasis postoperativa

Este tipo de colestasis es un problema frecuente en cirugía. El síndrome se debe a factores fácilmente identificables tales como hepatotoxicidad, sepsis, nutrición parenteral total, entre otros.

Colestasis extrahepática

Un modelo establecido de colestasis extrahepática en ratas es el que se consigue por ligamento del conducto biliar, cuya correlación clínica incluye obstrucción del conducto biliar por colelitiasis, neoplasmas y colangitis esclerosante. El ligamento del conducto biliar altera, a nivel estructural y funcional, la polaridad de superficie de los hepatocitos y da como resultado una acumulación de vesículas pericanaliculares que contienen proteínas de la membrana apical. Un factor del mayor riesgo para la lesión hepatocelular durante la obstrucción del conducto biliar, es el incremento de la concentración intracelular de sales biliares potencialmente tóxicas (49). El intento de los hepatocitos de contrarrestar la acumulación intracelular de sales biliares, se refleja en la regulación del sistema principal de incorporación basolateral, el NTCP. El promotor del gen *Ntcp* en rata contiene un elemento que es homólogo al «elemento de respuesta a las sales biliares» identificado originalmente en el promotor del gen de la colesterol 7A-hidroxilasa (CYP7A), enzima P-450 microsómico, que cataliza el paso limitante de la síntesis de sales biliares. En el caso del gen *CYP7A* de rata, la actividad transcripcional está suprimida por sales biliares hidrofóbicas como el tauroquenodesoxicolato (50)

El quenodesoxicolato se une a un receptor nuclear para las sales biliares identificado recientemente como receptor farnesoide X (FXR), el cual sufre

un cambio conformacional que incrementa su actividad para la proteína coactivadora SRC-1 (51). La activación de FXR por las sales biliares lleva a la formación de un complejo transcripcional activo que suprime la transcripción de CYP7A y, activa en el ileon, a la proteína de enlace a las sales biliares (I-BABP) (52). Se puede especular que en la colestasis, la inhibición del Nctp por elevación intracelular de las sales biliares, puede ocurrir por mecanismos similares.

En el polo canalicular la expresión de la bomba exportadora de las sales biliares, Bsep, está disminuida a un 50% a nivel de la proteína y a un 32% a nivel del mRNA (45). Así que, la expresión de Bsep se preserva relativamente bien si se compara con la notable reducción en la expresión del transportador de aniones orgánicos canalicular multiespecífico mrp2 (53). La preservación relativa de la expresión de Bsep durante la ligadura del conducto biliar, sirve para mantener el flujo canalicular de las sales biliares.

La colestasis extrahepática tiene también un efecto profundo sobre la expresión de sistemas transportadores multiespecíficos de aniones orgánicos, de la membrana del hepatocito, aunque este efecto es secundario y no contribuye a la aparición de la colestasis. En hígado de rata, la expresión del polipéptido basolateral transportador de aniones orgánicos, Oatp, se inhibe notablemente un día después de la ligadura del conducto biliar y se recupera en un cierto grado al 3^{er} día. Por el contrario, la expresión del Oatp2 permanece inalterada en estas mismas condiciones. En el polo canalicular, la ligadura del conducto biliar hace disminuir los niveles de las proteínas de los principales sistemas de flujo de los aniones orgánicos (no sales biliares) mrp2.

7. OTRAS ALTERACIONES

La mayoría de las enfermedades colestáticas en humanos y en animales se asocian con cambios profundos en el citoesqueleto de los hepatocitos. Entre estos cambios cabe destacar: disrupción de microtúbulos, incremento de los filamentos intermediarios y acumulación de haces de actina, microfilamentos en el dominio pericanalicular. Estos cambios citoesqueléticos dan como resultado la pérdida de las «gap junctions» entre las células (54). Algunas formas de colestasis familiar severa, se asocian a grandes incrementos en microfilamentos pericanaliculares reminiscentes, aunque no idénticos, a la colestasis inducida por faloidina (55).

La colestasis inducida experimentalmente en ratas está también asociada con la disrupción de la integridad estructural y funcional de las «tight

junctions» hepatocelulares. Esta anomalía es causa de incrementos en la permeabilidad paracelular, regurgitación de los constituyentes biliares en el plasma y reducción de los gradientes osmóticos en el canalículo biliar. Estos gradientes son los que constituyen la fuerza que conduce la secreción de la bilis. La localización y expresión hepáticas de las proteínas integrantes de las *tight junctions*, que normalmente forman las barreras de conexión, tales como la *zonula occludens 1*, y la ocludina, están alteradas en ratas que han sufrido ligadura del conducto biliar o tratamiento con etinil estradiol.

Agregados de la *zonula occludens 1* a lo largo de los bordes del canalículo, se distorsionan y se acumulan en el citoplasma. También se alteran durante la colestasis los componentes de la membrana, la transcitosis y la exocitosis de las vesículas canaliculares, dando lugar a la retención de los transportadores canaliculares (apicales) en la superficie basolateral de los hepatocitos y a un retraso en el transporte vesicular hacia el canalículo biliar. La acumulación de vesículas dentro de la región pericanalicular de los hepatocitos, es una característica morfológica encontrada en muchas formas de colestasis (Figura 4). Elevadas concentraciones de sales biliares, como el ácido quenodesoxicólico, inhiben la función de los motores moleculares, tales como la quinesina y la dineína, que mueven las vesículas a lo largo de los microtúbulos. La alteración en el movimiento de las vesículas durante la colestasis causa una disminución en el número de transportadores funcionales en la membrana canalicular, lo cual conduce a la colestasis.

La señalización por calcio, dentro de y entre los hepatocitos, está alterada en la colestasis. Las proteínas de las «gap junctions», las conexinas 32 y 26, desaparecen antes de la 24 horas después del ligamento del conducto biliar en rata, lo cual origina una disminución en la migración de los vainas del calcio entre los hepatocitos. Este declinar puede disminuir las contracciones ordenadas del canalículo biliar y desequilibrar los procesos de microperistalsis que facilitan, en condiciones normales, el movimiento de la bilis desde el canalículo terminal, hacia los conductos biliares en los tractos portales, en dirección contraria a la del flujo sanguíneo (56). La señalización intracelular mediada por el AMP cíclico en hepatocitos está también alterada después de la ligadura del conducto biliar, como consecuencia de la alteración en la expresión y localización subcelular de las proteínas G heterotriméricas. Estos cambios, junto con alteraciones en la composición de los lípidos de la membrana y el efecto detergente de las sales biliares, pueden contribuir a la alteración de la actividad de la adenilato ciclasa y a la disminución de los efectos estimulantes del glucagón y del

péptido vasoactivo intestinal sobre la secreción biliar. Por el contrario, en los colangiocitos, la expresión del gen del receptor de la secretina se activa después del ligamento del conducto biliar y esto puede contribuir al incremento en el efecto colerético de la secretina, que se detecta, en ratas, después de la proliferación de los conductillos biliares. La activación de la secreción del bicarbonato por los colangiocitos, junto con la inhibición del transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos, que excreta bilirubina, puede influir en la complicación clínica bien conocida de «bilis blanca» que ocurre durante la prolongada obstrucción de los conductos biliares.

8. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

El ácido ursodesoxicólico (ursodiol) es actualmente la terapia aceptada para pacientes con cirrosis biliar primaria, ya que puede ampliar la expectativa de vida retrasando la progresión de la enfermedad (57). Este agente terapéutico puede producir efectos beneficiosos en ciertas indisposiciones hepáticas colestáticas, como la colangitis primaria esclerosante, la colestasis intrahepática del embarazo y la fibrosis quística. Sin embargo, no se han llevado a cabo hasta el momento, suficientes ensayos entre pacientes con estas enfermedades y en un estudio relativamente reciente de colangitis primaria esclerosante, el ursodiol no produjo efecto beneficioso alguno respecto a la supervivencia (58).

Algunos mecanismos moleculares son dignos de ser tenidos en cuenta, respecto a las acciones beneficiosas del ursodiol. Tiene la capacidad de reemplazar en suero, hígado y bilis, las sales biliares hidrofóbicas y tóxicas. El conjugado de ursodiol se absorbe en la interfase de la membrana plasmática, en el espacio extracelular, donde puede prevenir la extracción de lípidos de membrana por las sales biliares más hidrofóbicas (59). En pacientes con secreción biliar defectiva en fosfolípidos (colestasis progresiva familiar intrahepática tipo 3), el efecto beneficioso del ursodiol puede relacionarse con el enriquecimiento en la bilis y la modulación de la composición biliar de sales biliares a favor de sales biliares hidrofílicas, que no son tóxicas al epitelio biliar, a pesar de la ausencia de fosfolípidos en la bilis. El ursodiol inhibe también la expresión de moléculas anormales del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en los hepatocitos periporales de pacientes con cirrosis biliar primaria, mientras que no afecta la expresión de moléculas anormales del MHC clase II, en células del epitelio biliar. Sin embargo, no está claro si estos efectos representan propiedades específicas inmunomoduladoras del ursodiol, o son debidas a mejora de la

lesión hepática colestática, que también eleva la expresión de moléculas de MHC de clase I en hepatocitos (53)

Experimentos en ratas han indicado, que los conjugados de taurina con el ácido ursodesoxicólico, la forma principal de este ácido en el organismo, pueden incrementar la capacidad excretora de las células hepáticas colestáticas, por estimulación de la exocitosis apical. Este incremento, a su vez, debe inducir la inserción de proteínas de transporte en la membrana canalicular e incrementar la capacidad de excretar en la bilis sales biliares más hidrofóbicas, reduciendo así la lesión hepatocelular. Los resultados de los análisis cinéticos de la excreción biliar, de derivados sintéticos de sales biliares, en pacientes con cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria, sostienen la idea que la terapia con ursodiol incrementa la capacidad del hígado de excretar sales biliares (60). Se ha descrito la activación de la expresión del intercambiador aniónico cloruro/bicarbonato isoforma 2, en pacientes con cirrosis biliar primaria, que fueron tratados con ursodiol. Este agente actuó directamente estimulando la secreción de cloruro en células de vesícula biliar humana por activación del canal de cloruro sensible al calcio, un efecto que puede beneficiar a pacientes con fibrosis quística (61).

Los rápidos avances en el conocimiento molecular y celular de la secreción biliar han podido profundizar en la fisiopatología de la lesión causada por alteraciones colestáticas hereditarias y adquiridas, las cuales han de conducir al desarrollo de medidas preventivas más efectivas y nuevas estrategias terapéuticas para la amplia variedad de enfermedades hepáticas colestáticas que hoy día no tienen un tratamiento eficaz.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Nathanson MH y Boyer JL (1991) Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* **14**, 551-566.
2. Hagenbuch B y Meier PJ (1996) Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* **16**, 129-136
3. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I y Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7735-7738
4. Elferink RPJ, Tytgat GNJ, Groen AK (1997) Hepatic canalicular membrane 1: the role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J* **11**, 19-28

5. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B et al., (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* **273**, 10046-10050
6. Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* **269**, 1340-1347
7. Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA et al (1997) Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* **100**, 2714-2721
8. Green RM, Gollan JL, Hagenbuch R, Meier PJ y Beier D (1997) Regulation of hepatocyte bile salt transporters during hepatic regeneration. *Am J Physiol* **273**, G621-G627.
9. Bolder U, Ton-Un H-T, Scheingart CD, Frick E, Hofmann AF (1997) Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterol* **112**, 214-225
10. Liang D, Hagenbuch B, Stieger B y Meier PJ (1993) Parallel decrease of Na⁺-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* **18**, 1162-1166
11. Ganguly TC, O'Brien ML, Karpen SJ, Hyde JF, Suchy FJ y Vore M (1997) Regulation of the rat liver sodium-dependent bile acid cotransporter gene by prolactin. *J Clin Invest* **99**, 2906-2914.
12. Grune S, Engelking LR y Anwer MS (1993) Role of intracellular calcium and protein kinases in the activation of hepatic Na⁺/taurocholate cotransport by cyclic AMP. *J Biol Chem* **268**, 17734-17741.
13. Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ y Anwer MS (1997) cAMP increases liver Na⁺-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol* **273**, G842-G848.
14. Compton R, Wright P, Sutherland E, Iwahashi M, Alexander A y Simon FR (1991) Functional alterations of hepatic sinusoidal membrane domains contribute to cyclosporine A induced cholestasis. *Clin Res* **39**, 168A
15. Zaccaro L, Sutherland E, Iwahashi M, Burnett R et al., (1989) Acute cholestasis with taurolithocholate is due to direct reversible non-competitive inhibition of sodium-dependent taurocholate uptake. *Gastroenterol* **96**, 675
16. Reichen J y Simon FR (1994) Cholestasis. En: *The liver Biology and Pathobiology*. 3ª edición (eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB y Schachter DA y Shafritz) pp 1291-1326, Raven Press, Ltd, Nueva York.
17. Jaquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW y Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na⁺-independent organic anion transporter *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 133-137
18. Li L, Lee TK, Meier PJ y Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for Oatp, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184-16191

19. Kakyo M, Unno M, Tokui T, Nakagoni R, Nishio T, Iwasati H et al. (1999) Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rLst-1. *Gastroenterology* **117**, 770-775.
20. Vos TA, Ros JE, Habinga R, Moshage H, Kuipers F, Jansen PLM et al., (1999) Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology* **29**, 1833-1889.
21. Kullak-Ublick G, Beuers U, Fahney C, Hagenbuch B, Meier PJ y Paumgartner (1997) Identification and functional characterization of the promoter region of the human organic anion transporting polypeptide gene. *Hepatology* **26**, 991-997
22. König J, Rost D, Cui Y y Keppler D (1999) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **29**, 1156-1163
23. Roelofsen H, Vos TA, Schippers JJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H et al., (1997) Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology* **112**, 511-521.
24. Wang Q y Beck WT (1998) Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild type p53. *Cancer Res* **58**, 5762-5769
25. Fricker PJ, Landmann L y Meier PJ (1989) Extrahepatic obstructive cholestasis reverses the bile salt secretory polarity of rat hepatocytes. *J Clin Invest* **84**, 876-885.
26. Arias IM (1990) Multidrug resistance genes, P-glycoprotein and the liver. *Hepatology* **12**, 159-165
27. Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Hishina PM, Wang DQ, Chen HW et al., (1995) Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7729-7733
28. Fluiter K, Sattler W, De Beer MC, Connell PM, van der Wesrhuyzen DR y van Berkel TJ (1999) Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J Biol Chem* **274**, 8893-8899
29. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette J-C, et al., (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP binding cassette transporter. I. *Nature Genetics* **22**, 322-325
30. Kullak-Ublick G, Beuers U y Paumgartner G (2000) Hepatobiliary transport. *J Hepatol* **32 (supl 1)**, 3-18
31. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL et al., (1999) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-1128
32. Medina JF, Martínez A, Vazquez JJ y Prieto J (1997) Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **25**, 12-17

33. Bianchi L (1983) Liver biopsy interpretation in hepatitis. Part I. Presentation of critical morfologic features used in diagnosis. *Pathol Res Pract* **178**, 2-19
34. Desmet VJ (1986) Current problems in diagnosis of biliary disease and cholestasis. *Semin Liver Dis* **6**, 233-245
35. De Vos R y Desmet VJ (1992) Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathological livers specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* **140**, 1441-1450
36. Oguey D, Martí U, Reichen J (1992) Epidermal growth factor receptor: its possible implication in the maintenance of hepatocellular mass in biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Cell Biol* **59**, 187-195
37. Ludwig J (1987) New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* **7**, 293-301
38. Desmet VJ (1992) Modulation of liver disease in cholestasis. *J Gastroenterol & Hepatol* **7**, 313-323
39. Stammler L, Bianchi L y Landmann L (1989) Evidence for *de novo* formation of bile canaliculi in obstructive cholestasis. A stereological analysis. *J Hepatol* **9**, S229
40. Chan FKL, Zhang Y, Lee SS y Shaffer EA (1998) The effects of liver transplantation and cyclosporine on bile formation and lipid composition: an experimental study in the rat. *J Hepatol* **28**, 329-336
41. Stieger B, Meier PJ y Landmann L (1994) Effect of obstructive cholestasis on membrane traffic and domain specific expression of plasma membrane proteins in rat liver parenchymal cells. *Hepatology* **20**, 201-212
42. Böhme M (1994) Cholestasis caused by inhibition of the adenosine triphosphate-dependent transport in rat liver. *Gastroenterol* **107**, 255-265
43. Elias E y Boyer JL (1979) Clorpromazine and its metabolites alters polymerization and gelation of actin. *Science* **206**, 1404-1406
44. Bossard R, Stieger B, O'Neill B, Fricker G y Meier (1993) Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest* **91**, 2714-2720
45. Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ y Boyer JL (1999) The molecular expression of the bile salt export pump, sister of P-glycoprotein (spgp) in experimental models of cholestasis. En: *Bile acids and cholestasis* (eds Paumgartner G Stiehl A Gerok W Keppler D, Leuschner U) pp 123-128. Kluwer Acad Pub. Dordrecht, Boston, Londres
46. Vore M, Liu Y y Huang L (1997) Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug Metab Rev* **29**, 183-203
47. Takikawa H, Yamazaki R Sano N y Yamanaka M (1996) Biliary excretion of estradiol-17 beta glucuronide in the rat. *Hepatology* **23**, 607-613
48. Koopen NR, Wolters H, Havinga R, Vonk RJ, Jansen PLM, Müller et al., (1998) Impaired activity of the bile canalicular organic anion transporter (mrp2/cmoat)

is not the main cause of ethynilestradiol-induced cholestasis in the rat. *Hepatology* **27**, 537-545

49. Hofmann AF (1999) Bile acids: the good, the bad and the ugly. *News Physiol Sci* **14**, 24-29
50. Stroup D, Crestani M y Chiang JYL (1997) Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene *CYP7A*. *Am J Physiol* **273**, G508-G517
51. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A et al., (1990) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362-1365
52. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA et al., (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **284**, 1365-1368
53. Trauner M, Meier PJ y Boyer JL (1998) Molecular pathogenesis of cholestasis. *New Engl J Med* **339**, 1217-1227
54. Anderson JM (1996) Leaky junctions and cholestasis. A tight correlation. *Gastroenterology* **110**, 1662-1665
55. Weber AM, Tuchweber B, Yousef I et al., (1981) Severe familial cholestasis in North American Indian children. A clinical model of microfilament dysfunction. *Gastroenterology* **81**, 653-662
56. Nathanson MH y Schlosser SE (1996) Calcium signaling mechanisms in liver in health and disease. En: *Progress in liver disease*, vol 14, pp 1-27 (eds Boyer JL y Ockner RK), Saunders, Philadelphia.
57. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R y Heathcote EJ (1997) Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol* **113**, 884-890
58. Lindor KD (1997) Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. *New Engl J Med* **336**, 691-695
59. Guldutuna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You TG y Leuschner U (1993) Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterol* **104**, 1736-1744
60. Jazrawi RP, De Caestecker JS, Goggin PM et al., (1994) Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterol* **106**, 134-142
61. Shimokura GH, McGill JM, Schlenker T y Fitz JG (1995) Ursodeoxycholate increases cytosolic calcium concentration and activates Cl⁻ currents in a biliary cell line. *Gastroenterol* **109**, 965-972.

FIBROSIS HEPÁTICA

SUMARIO

1. Introducción
2. Naturaleza y patogénesis de la fibrosis
3. Unificación de conceptos
4. Aspectos estáticos y dinámicos del hígado fibrótico
5. Papel de los lipocitos en la fibrosis
 - 5.1. Iniciación de la activación de los lipocitos
 - 5.2. Perpetuación de la activación de los lipocitos
6. Estrés oxidativo y fibrogénesis
7. Modelos experimentales de fibrosis hepática
8. Objetivos terapéuticos
9. Conclusiones
10. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

El hígado reacciona de diferente manera ante la agresión aguda o crónica. Las lesiones producidas por agresión aguda, aunque sean graves, se resuelven completamente con restauración de la arquitectura normal del tejido. La naturaleza del proceso que conduce a la completa resolución en la lesión aguda no está determinado por la intensidad del daño. La estructura hepática normal se consigue restaurar, tanto experimentalmente después de un daño severo causado por agentes necrogénicos en animales de laboratorio, como en hígado de pacientes que han sufrido hepatitis fulminante. La restauración completa de la arquitectura hepática en estos casos agudos se verifica en parte, porque los hepatocitos a medida que proliferan van alineándose en un andamiaje suministrado por la matriz extracelular, lo cual facilita la reordenación del tejido. La proporción célula/matriz puede alterarse en las etapas tempranas de regeneración, pero retorna a la norma-

lidad al completarse el proceso. Parece ser que la normalización de dicha proporción es uno de los factores que constituye la señal para la finalización del crecimiento.

La situación es muy diferente en casos de lesión hepática crónica producida por estímulos persistentes o por múltiples episodios de agresión aguda. Incluso cuando la agresión inicial es relativamente débil y no implica alteraciones importantes en la capacidad proliferativa de los hepatocitos, si es repetida o crónica desarrolla fibrogénesis, formación de cicatrices y distorsión de la arquitectura normal del tejido. Todo esto unido a alteraciones en la vascularización, hace que se complique aún más el cuadro patológico, ya que los hepatocitos que proliferan no pueden disponerse en estructuras lobulares, sino que van formando nódulos rodeados por tejido fibroso. La perpetuación de estas anomalías constituye el síntoma más característico de la cirrosis.

La acumulación progresiva de tejido conjuntivo en hígado, proceso dinámico y complejo denominado *fibrosis*, es un acontecimiento frecuente, que surge como consecuencia de una agresión repetida o crónica de suficiente intensidad, que desarrolla una reacción similar a la de la cicatrización de las heridas. En el proceso fibrótico intervienen diversas células y diferentes factores, que van a ocasionar una excesiva deposición fibrosa con alteraciones en los contactos e interacciones intercelulares y en la composición de la matriz extracelular. Las células de Kupffer, unidas a células sanguíneas mononucleares reclutadas (neutrófilos), y a los lipocitos, van a jugar los papeles más importantes en la fibrogenesis hepática. El diálogo entre estas tres clases de células se favorece por la acción de una serie de mediadores químicos, entre los que juega un papel prominente el factor transformante del crecimiento beta (TGF β). Tanto la expresión como la síntesis de esta citoquina inflamatoria y profibrogénica, se encuentran principalmente modulada por reacciones sensibles al estado de oxido-reducción celular. La intervención de especies reactivas y de oxígeno y de productos derivados de la peroxidación lipídica, puede demostrarse claramente en eventos fundamentales de la fibrogénesis hepática, como la activación de los lipocitos y la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores específicos. El resultado importante de estudios acerca de la patogénesis de la fibrosis hepática deriva de la observación de una situación consistente de estrés oxidativo en la mayoría de las enfermedades crónicas que afectan el tejido hepático. Por tanto, las especies reactivas de oxígeno contribuyen probablemente a la iniciación y progresión de la fibrosis inducida por alcohol, agentes terapéuticos, virus, sobrecarga de cobre o hierro, colestasis, congestión hepática, etc.

2. NATURALEZA Y PATOGÉNESIS DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática, sea cual fuere la causa que la origina, se caracteriza por un incremento en los constituyentes de la matriz extracelular, que juntos forman una cicatriz hepática. Esta cicatriz está formada por colágenos del tipo I y III que forman fibrillas y por glicoconjugados, entre los que se incluyen los proteoglicanos, la fibronectina y el ácido hialurónico. El hígado cirrótico puede contener colágenos y proteoglicanos en cantidades seis veces superiores a las del hígado normal. Aunque la cantidad de matriz en el hígado es similar en las diferentes formas de lesión, su distribución relativa dentro del lóbulo hepático es variable según el lugar y la naturaleza de la agresión. Por ejemplo, después de la inflamación predominantemente periportal de la hepatitis vírica, se inicia una deposición fibrosa en las zonas periportales, mientras que en el caso de la enfermedad hepática alcohólica, tanto la lesión inicial como la fibrosis son mayoritariamente perivenosas. Una agresión periportal o perivenosa continuada puede eventualmente conducir a fibrosis panlobular. Sea cual fuere la localización intrahepática de la lesión, la fibrosis se desarrolla sólo después de lesión crónica; como ejemplo se muestra su ausencia en pacientes que se recuperan de hepatitis fulminante.

El incremento total de la cantidad de matriz extracelular hepática es importante, pero de igual importancia son los cambios iniciales en la composición de la matriz dentro del espacio subendotelial de Disse (1). Este espacio se extiende desde el lado no luminal de la célula endotelial sinusoidal hasta las microvellosidades de la membrana celular del hepatocito. En hígado normal el espacio subendotelial contiene una matriz basal de constituyentes de membranas, que no es electron densa, mientras que en tejido lesionado esta puede reemplazarse por una matriz llena de fibrillas formadas por colágeno y fibronectina. Esta acumulación subendotelial de colágeno, denominada «capilarización» del sinusoides, se asocia en clínica con la enfermedad hepática. A nivel celular, la fibrosis subendotelial es la causa del funcionamiento alterado de los hepatocitos, de la pérdida de poros endoteliales (fenestras), y de la activación de los lipocitos productores de la matriz. La fibrosis puede también impedir el rápido intercambio de solutos entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos (Figura 1)

Tomando como base una serie de evidencias experimentales, se ha sugerido que los mecanismos que conducen a la fibrogenesis, son similares en enfermedad hepática temprana o avanzada. En ambos casos, participan en la fibrogenesis la mayor parte de las células del hígado, pero es el lipocito la célula efectora principal. Los cambios iniciales son reversibles,

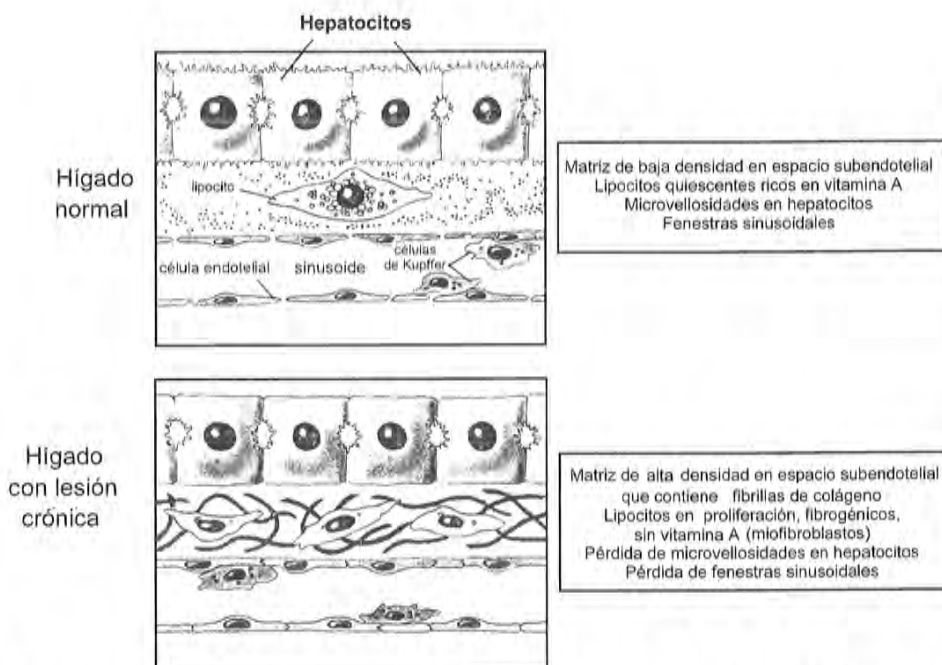


FIGURA 1. Cambios en el espacio subendotelial hepático durante fibrosis hepática. Las alteraciones celulares y en la matriz, en el espacio de Disse, son eventos tempranos y críticos en la patogénesis de la fibrosis hepática. La activación de los lipocitos, caracterizada por proliferación y fibrogénesis incrementada, se asocia con el reemplazo de la matriz normal de baja densidad por una matriz de elevada densidad. Estas alteraciones van unidas a la pérdida de las fenestras (poros) endoteliales y de las microvellosidades de los hepatocitos, que son típicas de la lesión hepática crónica (1).

sin embargo, en tanto en cuanto la lesión se mantiene durante largo tiempo y se hace crónica, va adquiriendo características típicas de entrecruzamientos de colágeno y nódulos regenerativos («cirrosis») y se hace irreversible. Por esta razón es muy importante, desde el punto de vista clínico, profundizar en el conocimiento de los mecanismos que conducen a la iniciación de la fibrosis.

La fibrosis hepática es una consecuencia de lesión hepática crónica originada por diferentes causas, intoxicación etílica crónica, fármacos hepatotóxicos, infecciones víricas, y alteraciones metabólicas. A nivel morfológico la fibrogénesis hepática está considerada como un exceso en la generación de tejido conjuntivo. Sin embargo, teniendo en cuenta el conocimiento cada vez mayor de la estructura y función de las proteínas de la matriz extracelular hepática y de los enzimas que degradan dicha matriz, se puede

hoy considerar a la fibrosis como un proceso dinámico consistente en una alteración de la homeostasis fisiológica de la matriz extracelular, resultante de un desequilibrio entre su síntesis (fibrogénesis) y su degradación (fibro-lisis).

Durante la fibrogénesis hepática existe una mayor deposición de proteínas de la matriz extracelular en los espacios perisinusoidal y periportal. Un proceso fundamental en el conocimiento de las bases moleculares de la fibrogénesis, ha sido la identificación de las fuentes celulares de los componentes de la matriz en el hígado. Esto ha sido posible gracias a los avances en el aislamiento y caracterización de las células hepáticas y las técnicas *in situ*. En un principio se debatió si eran los hepatocitos o las células no parenquimáticas las responsables directas de la acumulación de la matriz. Han sido ya identificados los lipocitos activos, como la fuente primaria de la síntesis de la matriz durante la fibrogénesis hepática (2, 3).

La significación patogénica de los lipocitos se basa en su capacidad de activarse y transformarse en células miofibroblásticas, que tienen la posibilidad de producir elevadas cantidades de proteínas de la matriz extracelular. Esta activación de los lipocitos ocurre en dos etapas descritas como *iniciación* y *perpetuación*. En la etapa de iniciación el lipocito quiescente sufre diversos cambios fenotípicos hacia un estado de transición que contiene menor número de gotitas de lípidos, el retículo endoplásmico hipertrofiado y filamentos de actina del músculo liso. En la etapa de perpetuación esta célula de transición exhibe receptores para varios factores del crecimiento. Las principales citoquinas implicadas en el proceso de activación, que inducen la proliferación y la síntesis de la matriz extracelular, son las *citoquinas proliferativas* como el factor del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y las *citoquinas fibrogénicas* como el factor transformante del crecimiento β (TGF β) (4). Las células miofibroblásticas responden a la endotelina-1 y a los eicosanoides contrayéndose, lo cual hace pensar en una función vasoreguladora adicional de los lipocitos durante la lesión hepática (Figura 2) (5).

Se ha demostrado que, además del complejo de citoquinas, otros factores adicionales no peptídicos, como el acetaldehído, el lactato, productos de la peroxidación lipídica, hierro, etc., estimulan la producción de la matriz en cultivos de lipocitos. En la perpetuación de la activación de los lipocitos se encuentran involucrados mecanismos paracrinos y autocrinos. Las fuentes paracrinas de los factores de iniciación pueden ser los mismos hepatocitos, los linfocitos, las plaquetas y posiblemente las células biliares epiteliales.

ACTIVACIÓN DE LOS LIPOCITOS

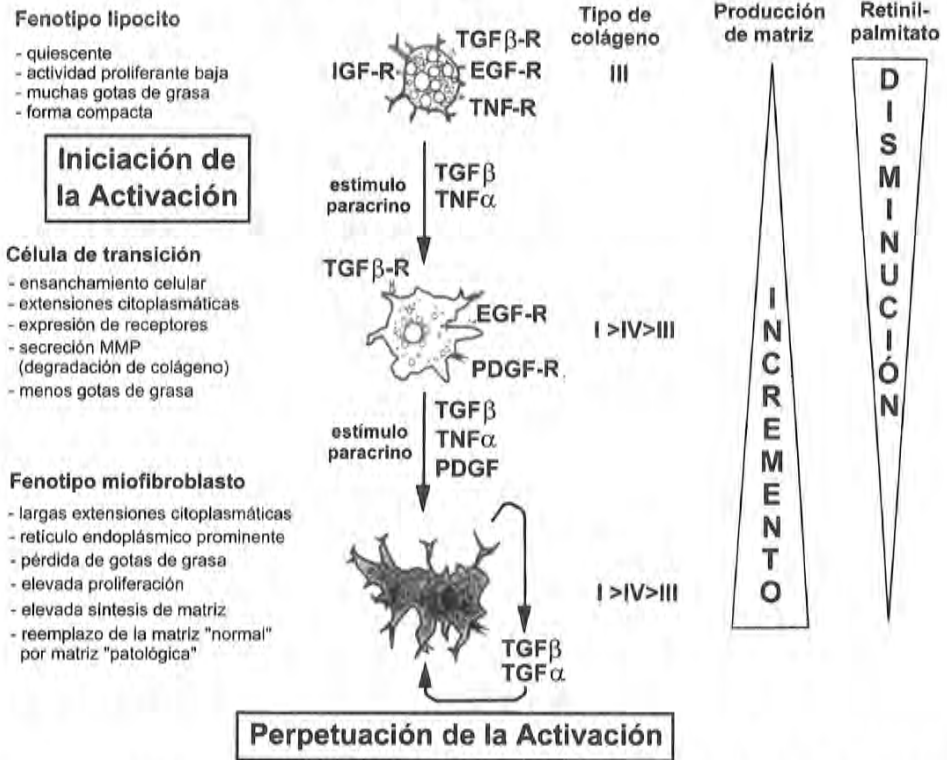


FIGURA 2. Modelo de activación de los lipocitos. La activación de los lipocitos (iniciación y perpetuación) está mediada por los factores TGFβ y TNFα y otras citoquinas liberadas por macrófagos y plaquetas (estimulación paracrina). Durante la transformación cambia el fenotipo de las células, disminuye el contenido de retinoides y se eleva la producción de la matriz y la proliferación. Se modula la expresión de los factores del crecimiento y sus respectivos receptores y las células adquieren la capacidad de estimularse a sí mismas (estimulación autocrina). MMP metaloproteinasas de la matriz (2, 3).

En el contexto de la fisiopatología del hígado, la hipótesis es que las células situadas en la vecindad sinusoidal de los lipocitos, se comunican con los lipocitos. La lesión del hepatocito, como base de todas las enfermedades fibróticas crónicas, puede considerarse un importante punto de comienzo, similar a lo que ocurre en la cicatrización de las heridas. Es todavía materia de debate si la inflamación es o no necesaria para que se inicie la activación de los lipocitos. La mayor parte de las formas de lesión hepática crónica en humanos presentan un prominente componente inflamatorio, particularmente en las enfermedades alcohólica y vírica. Sin embargo, la

necrosis parenquimática por sí misma, puede activar los lipocitos vía peróxidos lipídicos formados después de la lesión de membranas

3. UNIFICACIÓN DE CONCEPTOS

Ya hemos visto que la fibrosis hepática es una respuesta común a una lesión hepática crónica, debida a diversas causas: intoxicación etílica, persistentes infecciones con virus o parásitos, sobrecarga hereditaria de metales, etc. Las evidencias experimentales sugieren que los mecanismos celulares de la fibrosis hepática están compartidos entre las diferentes agresiones.

El desarrollo de técnicas de aislamiento y caracterización de las células hepáticas, unido a los progresos de la biología de las citoquinas y la matriz extracelular, han permitido conocer algo más sobre las bases celulares y moleculares de la fibrosis hepática. En particular, los lipocitos (células de Ito, células estrelladas o acumuladoras de grasa), han sido caracterizadas como la fuente celular primaria de los componentes de la matriz en lesión hepática crónica.

Los tejidos están organizados como grupos de células insertas a una matriz extracelular y rodeadas por un entramado de vasos sanguíneos. La homeostasis tisular se mantiene por coordinación entre la proliferación celular y la producción y recambio de la matriz extracelular. Las células adquieren esta coordinación por constante señalización a ellas mismas (autocrina) o a otras células (paracrina), por medio de polipéptidos denominados citoquinas o factores del crecimiento. La acción de las citoquinas puede ser positiva o negativa, dependiendo de la influencia de otras citoquinas, del estado fisiológico de las células y de la matriz extracelular que las rodea. Esta variabilidad en la acción de las citoquinas proporciona a las células y tejidos un amplio rango de respuestas potenciales a cualquier estímulo. Las citoquinas regulan todos los aspectos de la remodelación planificada de los tejidos, como la embriogénesis y el desarrollo, o no planificada, como la carcinogénesis y la reparación tisular después de la lesión.

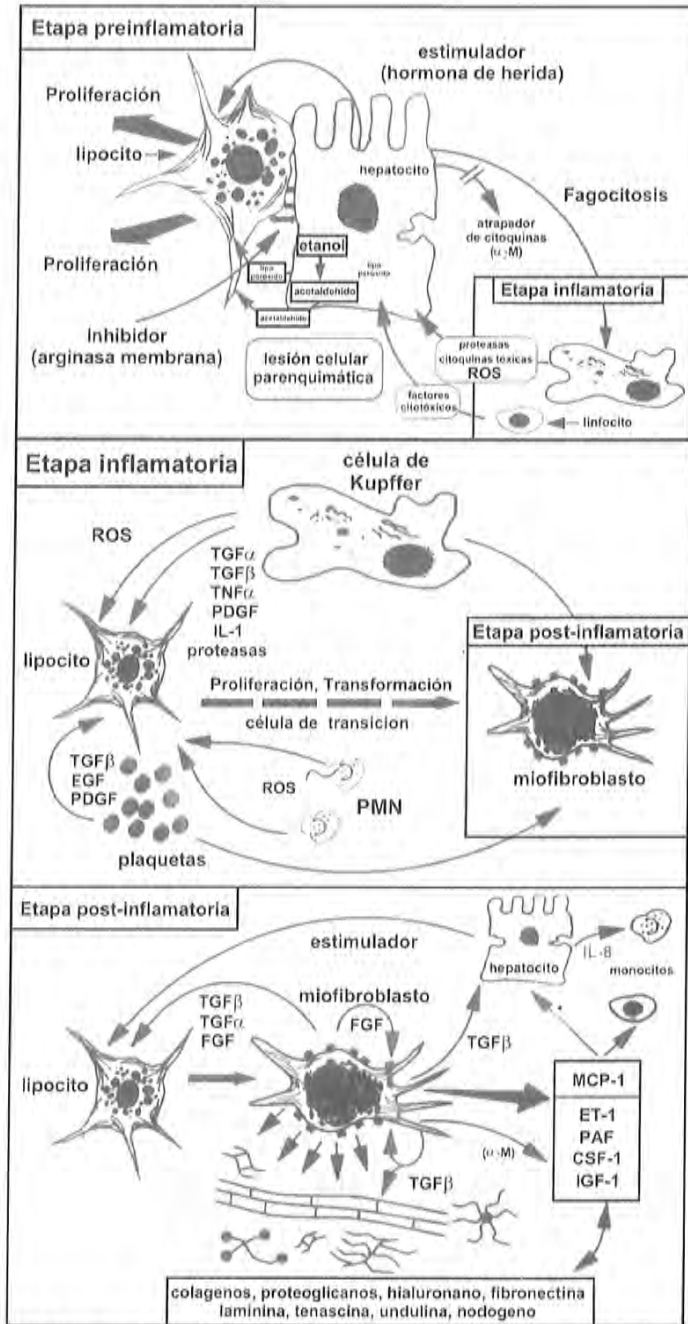
El TGF β (factor transformante del crecimiento β) es una citoquina multifuncional aislada de las plaquetas (6). El nombre deriva de la observación de su capacidad para estimular el crecimiento de células normales cultivadas en agar-agar cuando son transformadas por virus. En mamíferos la citoquina tiene tres formas TGF β 1, 2 y 3, cuyas propiedades biológicas son casi idénticas. El gen *TGF β 1* se regula en respuesta a la lesión del tejido y la proteína TGF β 1 es la isoforma más implicada en la fibrosis.

El TGF β 1 se sintetiza como un precursor de 391 aminoácidos, que se rompe por proteólisis y libera fragmentos peptídicos y una subunidad de 112 aminoácidos. El TGF β 1 activo es una proteína dimérica de 25 kDa compuesta por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. El TGF β 1 se segrega en forma inactiva (latente) que requiere activación antes de ejercer efectos biológicos

Unificando los conceptos de la activación de los lipocitos y la cascada de reacciones que conducen a la fibrogénesis, Gressner y Bachem (3) proponen un modelo de activación que implica un diálogo secuencial entre los lipocitos, los hepatocitos, las células de Kupffer, las plaquetas, las células endoteliales y los miofibroblastos (lipocitos transformados). Este modelo de activación de los lipocitos se compone de tres etapas bien diferenciadas (Figura 3)

Las tres etapas son las siguientes: pre-inflamatoria, inflamatoria y post-inflamatoria. En la pre-inflamatoria la lesión hepatocelular, de mayor o menor severidad, facilita la liberación de mitógenos paracrinos, los cuales inician la proliferación de los lipocitos. Por ejemplo, el etanol, al ser metabolizado por los hepatocitos, genera acetaldehído y lipoperóxidos, que estimulan la expresión de los genes de la matriz extracelular en los lipocitos cercanos, antes de que los mediadores inflamatorios se tornen efectivos. La proliferación de los lipocitos adyacentes a los hepatocitos, puede iniciarse también por una disminución de la actividad arginasa de la membrana, que surge como consecuencia del daño hepático. Se ha demostrado que la arginasa inhibe poderosamente la proliferación y la síntesis proteica de los lipocitos. En la fase inflamatoria las citoquinas procedentes de las células de Kupffer y de los macrófagos activos (TGF β , TGF α , TNF α) y de las plaquetas desintegradas (TGF β , EGF y PDGF), estimulan la proliferación de los lipocitos y su transformación en miofibroblastos. La activación de las células de Kupffer y de los monocitos invasores, se inicia parcialmente cuando estas células eliminan por fagocitosis los restos celulares en el lugar de la necrosis. Las células de Kupffer y los monocitos, una vez activos, pueden inducir daño hepatocelular por liberación de proteasas, citoquinas tóxicas (TNF α) y especies reactivas de oxígeno. Los metabolitos tóxicos del oxígeno generados por los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) atraídos y activados por la interleuquina 8 (IL-8), producida por los hepatocitos metabolizadores del etanol, pueden contribuir a la formación de un círculo vicioso patogénico. En la fase inflamatoria el TGF β , prototipo de citoquina fibrogénica, influye poderosamente sobre la transformación de los lipocitos en miofibroblastos. Los miofibroblastos son estimulados durante la fase post-inflamatoria mediante una interacción autocrina generada por los factores TGF α ,

FIGURA 3. La activación de los lipocitos se verifica en tres etapas: preinflamatoria, inflamatoria y post-inflamatoria. En la preinflamatoria, la lesión de los hepatocitos libera estimuladores de la proliferación de los lipocitos y disminuye los inhibidores asociados a membrana (arginasa). En este caso, el metabolismo del etanol a acetaldehído y la generación de lipo-peróxidos, inician la expresión de los genes de la matriz. En la etapa inflamatoria, las citoquinas liberadas por las células de Kupffer y las plaquetas desintegradas son los estimuladores más potentes de la proliferación de los lipocitos y su conversión en miofibroblastos. Las células de Kupffer, pueden lesionar la membrana de los hepatocitos mediante la liberación de proteasas, citoquinas (TNF α) y ROS. En la fase post-inflamatoria los miofibroblastos liberan citoquinas y factores del crecimiento que estimulan a los lipocitos no transformados y a sí mismos. Las citoquinas interaccionan con los componentes de la matriz extracelular segregados por los miofibroblastos.



MCP-1 péptido quimiotáctico de los monocitos; ET-1, endotelina 1; PAF, factor activador de las plaquetas; CSF-1, factor estimulador de colonias de macrófagos 1; α_2M , macroglobulina α_2 ; PMN leucocitos polimorfonucleares(3).

TGF β y FGF, expresados y segregados por los propios miofibroblastos. En combinación con posteriores estímulos paracrinos dirigidos hacia los lipocitos no transformados todavía, la fase post-inflamatoria contribuye poderosamente a la *autoperpetuación* de la fibrogénesis, incluso después de haber sido eliminado el estímulo iniciador. La matriz formada por los miofibroblastos puede, a su vez, modular la actividad de las citoquinas y de los factores del crecimiento (TGF β), que han sido segregados y han formado un depósito de citoquinas que proporciona un suministro sostenido. Además, las α_2 -macroglobulinas producidas por los hepatocitos y también por los miofibroblastos, pueden actuar como atrapadores pleiotrópicos de las citoquinas (TGF β , TNF α , PDGF). El concepto propuesto atribuye a los hepatocitos lesionados y a los miofibroblastos papeles directos en la activación secuencial de los lipocitos (3, 7, 8) (Figura 3).

4. ASPECTOS ESTÁTICOS Y DINÁMICOS DEL HÍGADO FIBRÓTICO

Los conocimientos adquiridos durante los últimos años sobre la estructura y composición de la matriz extracelular hepática, indican que la definición original de fibrosis como «la presencia de exceso de colágeno debida a la formación de nuevas fibras» dada por un grupo de expertos en 1978 (9), tiene que ser redefinida por completo debido a dos importantes razones: *primera*, la matriz extracelular del hígado es una estructura muy complicada formada por colágeno y componentes diferentes al colágeno, que presenta una distribución no uniforme en el tejido; y *segunda*, los cambios fibróticos suponen una alteración mucho más compleja de la matriz extracelular y no pueden considerarse como un mero incremento en colágeno y otros componentes.

Entre los colágenos, los más ubícuos son los del tipo I y III, seguidos por los del tipo IV (de la membrana basal), V y VI. Los últimos tipos junto con el colágeno del tipo VIII, que se sospecha en el hígado, forman solo fracciones menores del contenido total de colágeno. Existen interacciones moleculares entre los diferentes colágenos y las glicoproteínas estructurales, entre las cuales se encuentran la fibronectina, la laminina, la undulina, el nidógeno (entactina), la tenascina y la vitronectina. Estas glicoproteínas interaccionan con receptores específicos de la superficie celular (integrinas), mediante secuencias de aminoácidos (arg-gli-asp) (10). Las integrinas son una familia de receptores heterodiméricos que tienen un dominio extracelular, otro transmembrana y el tercero corto y citoplasmático. Después de su unión con el ligando transmiten señales, a través del dominio citoplasmático, a los componentes del citoesqueleto o activan la fosforilación de la tirosina. Entre los proteoglicanos (glicoconjugados que consisten en una

proteína sustituida covalentemente por un número de glicosaminoglicanos y ocasionalmente con *N*- u *O*- oligosacáridos) (11), el heparan sulfato es el glicosaminoglicano dominante (12). La mayor fracción de heparan sulfatos está organizada en sindecanos y glipicanos anclados al glicosilfosfatidilinositol y asociados a la membrana celular. Otra especie, como el perlecan, está presente en las membranas. Además del heparan sulfato, los isómeros del condroitín sulfato y el dermatan sulfato constituyen las mayores fracciones de los glicosaminoglicanos hepáticos. El biglicano y la decorina son proteoglicanos importantes que tienen insertos estos tipos de glicosaminoglicanos. Como puro carbohidrato, el hialuronano (ácido hialurónico) se encuentra presente en la matriz normal hepática en pequeñas cantidades.

La fibrosis hepática comprende las siguientes alteraciones:

- (i) incremento de 3 a 6 veces en el contenido de la matriz extracelular;
- (ii) elevación desproporcionada de los cinco tipos de colágeno, de los diferentes proteoglicanos (preferentemente en dermatan/condroitín sulfato) y de las glicoproteínas estructurales;
- (iii) cambios sutiles en la microestructura de ciertas moléculas de la matriz; y
- (iv) redistribución topográfica de la matriz con deposición preferente en los espacios perivenular y perisinusoidal, donde forma una membrana basal incompleta (capilarización de los sinusoides).

El reordenamiento de la matriz en el hígado fibrótico aumenta las barreras de difusión entre los hepatocitos y el flujo sanguíneo sinusoidal y altera en gran medida la microcirculación en el tejido. Además, las alteraciones en la matriz pueden afectar la expresión génica y la respuesta a hormonas, factores del crecimiento, citoquinas y quimioquinas, en aquellas células atrapadas entre las moléculas de la matriz.

Los cambios en la matriz en hígado lesionado crónico son consecuencia de la pérdida de los mecanismos homeostáticos que controlan la formación de la matriz (fibrogénesis) y su degradación (fibrolisis). La producción estimulada de la matriz (fibrogénesis) en hígado con lesión crónica es el mecanismo principal de acumulación de la matriz. La inhibición de la degradación de la matriz (fibrolisis) puede respaldar una neta deposición de ciertas moléculas de la matriz. Se asume que los cambios cualitativos de la matriz extracelular fibrótica, están mediados por el potencial destructor de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) cuyas actividades están estrechamen-

te reguladas a nivel de transcripción, secreción y activación proteolítica. Los genes que codifican las MMP se expresan de manera diferente en hígado fibrótico facilitando la degradación preferente de ciertas moléculas de la matriz. Además, la actividad de las MMP está controlada por los inhibidores tisulares de dichas MMP, los cuales, a su vez, se expresan de manera diferente y exhiben afinidades selectivas para cada uno de los miembros de la familia de estas enzimas. En combinación con la elevada producción *de novo* de virtualmente todos los componentes de la matriz extracelular, la regulación específica de las MMP y de sus respectivos inhibidores puede explicar los reordenamientos cualitativos e histológicos de la matriz extracelular fibrótica (13)

5. PAPEL DE LOS LIPOCITOS EN LA FIBROGÉNESIS

Las fases iniciales de la cascada fibrogénica se inicia en el espacio subendotelial. Por ello, los esfuerzos para identificar las fuentes celulares de la matriz se han encaminado hacia las células que se ubican en esta región, las células endoteliales, los lipocitos y los hepatocitos. Los lipocitos son la mayor fuente de matriz extracelular en casos de lesión hepática.

Es hoy un hecho demostrado que los lipocitos son el principal tipo celular productor de la matriz en hígado lesionado. Se localizan en el espacio de Disse (espacio perisinusoidal) y sus protuberancias citoplásmicas dendríticas abrazan el límite endotelial del sinusoides. En hígado normal los lipocitos exhiben baja actividad mitótica. Están presentes en una proporción 3 a 6 lipocitos/100 hepatocitos, proporción que se denomina «índice lipocito». Su mayor misión reside en su capacidad para almacenar en grandes gotas ricas en triglicéridos, más del 80% del contenido total de vitamina A del hígado (ésteres retinilo), que es sintetizada por los hepatocitos. La significación patogénica de este tipo celular cuenta en su capacidad de ser «activado» en áreas de necroinflamación. Existen pruebas evidentes de la existencia de una heterogeneidad lobular en la población de lipocitos y de una respuesta heterogénea a la lesión (14)

Estudios morfológicos en animales y en humanos han demostrado que la lesión progresiva conlleva que los lipocitos, células ricas en vitamina A, sean reemplazados por células miofibroblásticas también denominadas *células de transición*, que poseen un aparato secretor activo de proteínas y sólo escasas gotitas de lípidos. Tales células de transición se encuentran en estrecha asociación con la matriz extracelular. En estudios de inmunolocalización *in situ* e hibridación del mRNA, se ha demostrado, que estas células

de transición o miofibroblastos son lipocitos activos. En hígado lesionado estas células contienen colágenos de tipos I, III y IV, los mRNA que codifican estos colágenos y laminina. Cuando la hibridación de los mRNA se comparó en células de hígado normal y de hígado lesionado, la expresión de los genes de la matriz resultó incrementada en lipocitos de hígado lesionado. El incremento fue menor en células endoteliales. Esta inducción preferente de los genes de la matriz en lipocitos se ha demostrado en distintos modelos de lesión, incluyendo aquellas inducidas por tetracloruro de carbono, obstrucción biliar y sobrecarga de hierro (2, 15, 16)

El desarrollo de técnicas para el cultivo de lipocitos de roedores ha puesto en claro el fenotipo activo generador de matriz. El espectro de moléculas de la matriz producidas por los lipocitos incluyen al menos cinco tipos de colágeno, heparan sulfato, dermatan y condroitin sulfato, proteoglicanos, laminina, fibronectina, tenascina, decorina y biglicano.

Los lipocitos pueden considerarse análogos a las células perivasculares de otros órganos, debido a su fenotipo citoesquelético, su orientación alrededor del sinusoide y su relación con el endotelio. Los lipocitos en la mayoría de especies expresan desmina, un filamento citoesquelético característico de las células musculares. Estudios morfológicos en animales y humanos han demostrado que a medida que progresa la lesión, estas células ricas en vitamina A son reemplazadas por células miofibroblásticas, que poseen un aparato secretor activo para proteínas y solo escasas gotas de vitamina A.

5.1. Iniciación de la activación de lipocitos

La activación de los lipocitos supone un acontecimiento crítico en los momentos iniciales de la fibrosis hepática. Una vez que los lipocitos se han reconocido como las células principales en la producción de la matriz en enfermedad hepática crónica, la atención se ha dirigido al estudio de los mecanismos implicados en su activación. Los mecanismos iniciales que conducen a la activación de los lipocitos comienzan hoy a ser conocidos. Los compuestos derivados de la reacción inflamatoria juegan un papel esencial, y se ha propuesto, como esquema general de activación de los lipocitos, que la agresión de las células biliares o de los hepatocitos es el origen de la inflamación (Figuras 2 y 3).

El proceso de activación de los lipocitos, hoy reconocido y caracterizado como el acontecimiento clave patogénico en la iniciación de la fibrogenesis, incluye *in vivo* las siguientes etapas:

1. agrandamiento celular con pérdida de las gotas de grasa y ganancia de retículo endoplásmico rugoso. Esto supone una transformación fenotípica que va a dar lugar a las denominadas células de «transición»
2. estimulación de la proliferación de los lipocitos, puesta en evidencia por incorporación de timidina tritiada; (15)
3. fibrogénesis incrementada evaluada por el incremento en la expresión genética y secreción de un amplio espectro de proteínas de la matriz, glicoconjugados y glicosaminoglicanos (hialuronano) (16) y
4. adquisición de capacidad contráctil en respuesta a la endotelina 1 y eicosanoides por expresión de características específicas del músculo liso, α -actina y filamentos delgados prominentes (17). Esta capacidad hace que estas células sean importantes en la vasoregulación durante la lesión hepática

Los modelos de cultivo primario de lipocitos están ofreciendo un medio para penetrar en los mecanismos celulares que conducen a la activación de estas células inducida por la lesión. Estos modelos han puesto énfasis en dos destacables características de la activación *in vivo*: la proliferación celular y la fibrogénesis. Estas dos características nos llevan a pensar que la producción incrementada de matriz, característica de lesión hepática, es probable que sea reflejo, por un lado, de un número incrementado de células productoras de matriz y por otro, de una mayor síntesis de la matriz en células individuales

Los acontecimientos iniciales de la activación de los lipocitos son objetivos importantes para la intervención terapéutica. Las células de Kupffer, como macrófagos residentes en el hígado, son un foco de estudio porque las interacciones entre los macrófagos y las células mesenquimáticas son esenciales para muchos modelos de lesión tisular incluyendo la fibrosis del pulmón y riñón y la aterosclerosis. En modelos de lesión hepática experimental, la infiltración de macrófagos precede a la activación de los lipocitos (18). La exposición de cultivos de lipocitos a medios condicionados, obtenidos a partir de cultivos de células de Kupffer, acelera el proceso de activación de la proliferación y de la fibrogénesis. La actividad estimuladora de las células de Kupffer procedentes de hígado lesionado es mayor que la de las procedentes de hígado normal. Entre los factores segregados por las células de Kupffer, que intervienen en la iniciación de la activación, el TGF β parece ser el más destacado. Los hepatocitos, los linfocitos y las plaquetas son también fuentes de factores iniciadores (2, 3) (Figuras 2 y 3).

La mayor parte de las enfermedades crónicas del hígado tienen un componente inflamatorio, particularmente en enfermedades víricas, helmínticas y alcohólicas. Sin embargo, en ciertas fibrosis hepáticas, tales como la que sobreviene al curso de la hemocromatosis, se detecta poca o ninguna inflamación. Esta observación lleva a la sugerencia que pueden existir otros factores activadores de los lipocitos. En este contexto, el papel del estrés oxidativo ha sido el objetivo de investigaciones recientes. Los hepatocitos, así como las células no parenquimáticas, son capaces de producir derivados reactivos de oxígeno y generar cantidades sustanciales de peróxidos que pueden mantener la lesión una vez que los mecanismos antioxidantes se han agotado. Una explicación alternativa de la fibrosis en ausencia de inflamación visible, puede ser que sea tan sutil para ser reconocida o que los leucocitos o las células de Kupffer puedan liberar mediadores sin evidencia morfológica de inflamación.

La regulación de los receptores de las citoquinas proliferativas y fibrogénicas es el acontecimiento principal e inicial en la activación de los lipocitos. Por ejemplo, en los momentos iniciales de la activación de los lipocitos incubados en medio condicionado de células Kupffer, se induce la isoforma β del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, haciendo que las células se vuelvan responsables a esta citoquina proliferativa. Estos receptores se inducen también en lipocitos activos *in vivo*. De igual manera, la activación de los lipocitos inducida en cultivos se acompaña por un incremento en la unión al TGF β 1, citoquina con actividad fibrogénica (2, 3) (Figuras 2, 3 y 4).

5.2. Perpetuación de la activación de los lipocitos

Una vez que los lipocitos se han inducido para expresar los receptores de las citoquinas, una serie de citoquinas bien caracterizadas puede actuar estimulando y sosteniendo la proliferación y la fibrogénesis. El factor del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es la citoquina más potente proliferativa para los lipocitos, mientras que el factor transformante del crecimiento beta (TGF β) es el mediador fibrogénico más potente. Las fuentes paracrinas de estos compuestos incluyen las plaquetas y las células de Kupffer. Parece que se encuentran también implicadas vías autocrinas, ya que se ha observado que el medio obtenido de cultivos de lipocitos activos, acelera la activación de lipocitos todavía quiescentes y que un factor autocrino identificado en este medio es el TGF β . Sin embargo, la actividad de esta citoquina *in vivo*, parece que se encuentra controlada a diversos niveles (2).

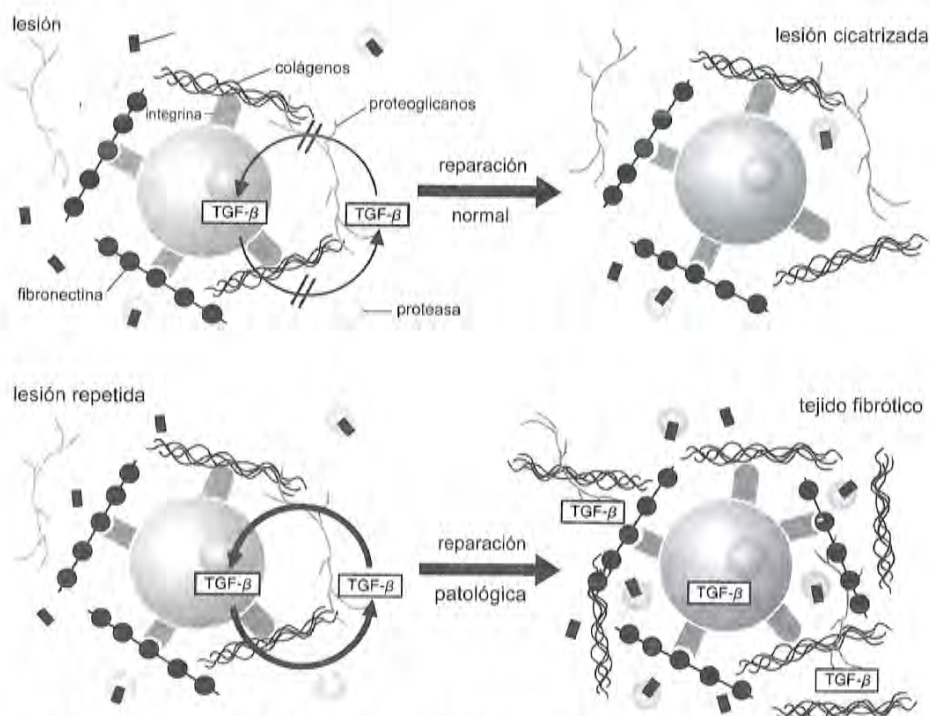


FIGURA 4. Superproducción de $TGF\beta$ en la fibrogénesis. En la reparación del tejido normal, la producción de matriz extracelular finaliza por un mecanismo desconocido una vez que el tejido lesionado resulta reparado. En pacientes con enfermedad crónica, la lesión celular repetida y/o un defecto en la regulación del $TGF\beta$, conduce a la producción continua de $TGF\beta$ y matriz extracelular, dando como resultado la fibrosis tisular (4).

Además de los mediadores peptídicos, otras sustancias solubles pueden sostener la activación de los lipocitos, mediante vías que son específicas para un tipo particular de agresión. En lesión hepática alcohólica, por ejemplo, es el acetaldehído, el primer producto de la oxidación del etanol, el que estimula la producción de colágeno en los lipocitos, por activación de la transcripción (19). Sin embargo, la actividad fibrogénica del acetaldehído en cultivos parece estar confinada a células que son activas. Además del acetaldehído, los productos de la peroxidación lipídica generados por efecto del etanol, puede también perpetuar la fibrogénesis por los lipocitos.

Los lipocitos, como cualquier otra célula mesenquimática, responde a cambios en su microambiente. Cuando se mantienen en cultivo sobre un gel, cuya composición se asemeja a la matriz extracelular subendotelial del hígado normal, los lipocitos permanecen en estado quiescente durante períodos prolongados de tiempo. Por el contrario, cultivando las células sobre

colágeno tipo I, el componente predominante de la matriz extracelular en hígado lesionado, se promueve su activación.

El microambiente hepático normal puede alterarse por la liberación, por parte de los lipocitos activos, de una metaloproteínasa que degrada el colágeno de tipo IV, uno de los mayores componentes de la matriz normal. Estudios preliminares sugieren que las células de Kupffer pueden ser también capaces de degradar el colágeno tipo IV. En enfermedad hepática crónica, la matriz subendotelial puede ser degradada como resultado de la mayor secreción de colagenasa de tipo IV por los lipocitos activos. La actividad de esta proteínasa puede ser posteriormente aumentada como resultado de la menor secreción, por los lipocitos, del inhibidor tisular de la metaloproteínasa, un inhibidor específico de la proteínasa (20). Como parte de este proceso, los lipocitos activos van reemplazando progresivamente la matriz normal de baja densidad por una rica en colágenos formadores de fibrillas, que tiende a perpetuar el fenotipo activo. Aunque la degradación de la matriz por los lipocitos y posiblemente por las células de Kupffer, es probable que juegue un papel importante en la fibrogénesis hepática, se desconoce aún la relación que existe entre la producción de metaloproteinasas de la matriz, sus inhibidores y sus sustratos.

¿Qué papel juegan los retinoides?

Los lipocitos ejercen una misión importante y claramente definida, en el almacenamiento de retinoides en hígado normal. Sin embargo, se desconoce la relación entre la pérdida de los retinoides celulares y la activación de los lipocitos durante la lesión hepática.

Existe una importante paradoja clínica respecto a los retinoides y la activación de los lipocitos. En la mayoría de formas de lesión hepática experimental y humana, la concentración de vitamina A en el hígado disminuye, probablemente debido a la pérdida de los ésteres retinilo de los lipocitos. Por otro lado, parece ser que la fibrosis hepática puede también deberse a la toxicidad de la esta vitamina A y parece que a veces se asocia con un marcado incremento de vitamina en el hígado y con abundantes gotas de retinoides en los lipocitos. Los retinoides, además, pueden potenciar el efecto tóxico del alcohol y de determinados fármacos en el hígado (21, 22).

Aunque se han estudiado los efectos biológicos de los retinoides sobre los lipocitos, está sin aclarar aún el papel que juegan en su activación. Esto

puede ser debido a que sólo se han examinado hasta la fecha, los efectos de los retinoides sobre células ya activas por cultivos o subcultivos primarios prolongados con sustratos que promueven la respuesta a la lesión. No se sabe, por tanto, si los retinoides juegan algún papel más bien en la iniciación de la activación que en su perpetuación (23)

6. ESTRÉS OXIDATIVO Y FIBROGÉNESIS

La elevada deposición de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular es una característica de muchas enfermedades crónicas que afectan al hígado, pulmón, arterias y el sistema nervioso. En los estudios sobre la patogénesis de la fibrosis tisular se está dando recientemente una atención muy particular a la frecuente asociación de la fibrosis con incrementos en la peroxidación lipídica y con alteraciones en los sistemas de defensa antioxidante (24).

La rotura oxidativa de los lípidos de membrana puede iniciarse por acción de una variedad de radicales libres. Durante la propagación del proceso, esta rotura oxidativa se caracteriza por una mayor generación de especies reactivas de oxígeno y de radicales orgánicos intermediarios (25). Este proceso mediado por radicales libres está a menudo implicado en el cambio del equilibrio redox intracelular hacia la situación de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se asocia con la fibrosis hepática y con la activación de los lipocitos (26 - 28). Evidencias experimentales emergentes parecen indicar que la situación de estrés oxidativo tiene que representar una conexión común entre los tipos diferentes de lesión hepática crónica y la fibrosis hepática. De hecho, la peroxidación lipídica se ha asociado con la fibrosis hepática causada por la sobrecarga de hierro (29), alcohol (30), tetracloruro de carbono ((31), tioacetamida (32, 33), etc

Baroni et al., (28) han demostrado que los hepatocitos lesionados juegan un importante papel en la activación de los lipocitos y en la síntesis del colágeno. Los hepatocitos cultivados en presencia de un agente prooxidante, liberan productos que estimulan la proliferación de los lipocitos y la acumulación del colágeno. Estas observaciones *in vitro* pueden simular situaciones profibrogénicas *in vivo*, ya que los lipocitos se activan en presencia de lesiones mínimas de los hepatocitos y en ausencia de una reacción inflamatoria evidente.

Son muchas las evidencias de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en situaciones crónicas experimentales y clínicas. La intervención de las reac-

ciones mediadas por radicales libres se ha descrito en diversas enfermedades causadas por defectos hereditarios o por exposición crónica a agentes químicos ambientales, a agentes terapéuticos, todos ellos capaces de perpetuar la respuesta inflamatoria simultánea a una incrementada deposición de colágenos y otras proteínas de la matriz extracelular. Es interesante destacar que, tanto la lista de las enfermedades fibróticas como el interés biomédico van en aumento. Los resultados más recientes concernientes a los cambios redox en diversas condiciones fibróticas están siendo considerados en base a las teorías más avanzadas sobre el papel patogénico de las reacciones inducidas por radicales libres en la deposición excesiva del tejido conjuntivo.

Es un hecho aceptado que el daño oxidativo juega un papel relevante en la patogénesis de las enfermedades fibróticas y que incluso la mayor concentración de esas especies oxidativas son resultado de la lesión tisular y no la causa de ellas. Una superproducción secundaria de especies reactivas de oxígeno ocurre cuando se desencadena la inflamación, se libera hierro de sus lugares de secuestro o se agotan los antioxidantes (34). En las condiciones patológicas, que se citan a continuación, se ha encontrado que existe una conexión estrecha entre la peroxidación lipídica y la fibrogénesis: cirrosis y fibrosis hepática, consumo crónico de etanol, colestasis crónica, etc. También se ha encontrado esta conexión en condiciones experimentales como la administración crónica de tetracloruro de carbono a ratas.

Estrés oxidativo y activación de factores de transcripción

Un área nueva de la biología de los radicales libres se ha abierto con el reconocimiento que ciertos factores de transcripción son sensibles a variaciones en el equilibrio intracelular de óxido-reducción. La activación de estos factores de transcripción parece ser un elemento clave en reacciones celulares frente a estímulos patológicos. En células animales se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la activación de al menos dos familias de factores de transcripción: el factor nuclear NFκB y la proteína activadora AP-1. El NFκB se encuentra en el citosol como heterodímero inactivo formando complejo con una proteína inhibidora que impide la localización nuclear y la unión al DNA. Muchos de los diversos estímulos capaces de activar al NFκB (luz ultravioleta, choque térmico y peróxido de hidrógeno), muestran en común la producción de ROS en el citoplasma. La secuencia de AP-1 está presente en una serie de genes eucariotas y se activa por interacción con homo y heterodímeros de la familia de proteínas nucleares fos y jun. La activación dependiente de la oxidación

de NF κ B y AP-1 conlleva una activación transcripcional, incluyendo genes que codifican citoquinas inflamatorias o fibrogénicas. Los sitios de enlace del NF κ B están en la región promotora del GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) (35), TNF β (36), IL-6 (37) y factores del crecimiento relevantes para la inflamación, mientras que la activación genética del TGF β , la citoquina más fibrogénica, junto con el PDGF, ocurre mediante la unión del AP-1 (38).

Quimioatracción y activación de fagocitos por aldehídos derivados de la peroxidación lipídica

Se ha propuesto un mecanismo alternante por el cual la peroxidación lipídica puede modular las enfermedades fibro-proliferativas. Los productos aldehídicos finales de la degradación de los lípidos peroxidados, que pertenecen a la clase de 4-hidroxi-2,3-alquenes, tales como el hidroxinonal (HNE), son capaces de ejercer actividad quimiotáctica hacia los neutrófilos como también de inducir su migración a concentraciones muy bajas, en el rango μ M a pM. Los niveles basales normales del HNE se encuentran en el rango nanomolar en una variedad de tejidos y en el rango μ M (mil veces más) en exudados inflamatorios. En un modelo de inflamación aguda aséptica en ratas, se ha confirmado que el HNE induce la quimiotaxis de los neutrófilos. En este modelo se ha demostrado también, que el HNE puede generarse por los mismos neutrófilos que generan elevadas cantidades de ROS en el proceso del estallido respiratorio (39, 40). Por tanto el HNE y posiblemente otros hidroxialquenes pueden actuar, por un lado, reclutando nuevos neutrófilos en el punto inflamatorio y, por otro lado, generando más HNE lo cual va a amplificar la respuesta inflamatoria. Este efecto puede contribuir a la autoperpetuación de la inflamación en enfermedades fibro-proliferativas.

7. MODELOS EXPERIMENTALES DE FIBROSIS HEPÁTICA

No existe hasta la fecha un modelo experimental que simule completamente el espectro de los síntomas de enfermedad fibrogénica en humanos. El modelo animal ideal debería tener:

- (a) características morfológicas similares a la enfermedad humana a ser estudiada;
- (b) progresión gradual de cambio en la patología hepática;

- (c) elevada reproducibilidad;
- (d) reversibilidad o irreversibilidad, dependiendo de la naturaleza del estudio;
- (e) desarrollo de secuelas fisiopatológicas.

Aunque un modelo experimental perfecto para el estudio de fibrosis y cirrosis hepáticas de todas las etiologías no se ha desarrollado aún, se han realizado contribuciones significativas que han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de estas enfermedades y ensayar la eficacia de diversos agentes terapéuticos utilizando la rata como modelo experimental. En nuestro laboratorio se han realizado estudios con el hepatotóxico tioacetamida administrado a largo plazo (tres meses) en los que se ha conseguido un cuadro de noduligénesis hiperplásica (33, 41) (Figura 5).

Los modelos experimentales de fibrosis y cirrosis hepáticas pueden caracterizarse por su factor etiológico, entre los que cabe destacar:

Hepatotoxinas (tetracloruro de carbono, acetaminofeno, tioacetamida, etc.);

Nutricional (alcoholismo crónico, dietas deficientes en colina, etc.);

Fibrosis inducida por tetracloruro de carbono

Uno de los más antiguos y más ampliamente utilizados agentes hepatotóxicos en fibrosis hepática inducida experimentalmente es el tetracloruro de carbono. Este agente ha sido utilizado como antihelmíntico y también en tintorería por sus propiedades como disolvente. Dadas sus propiedades hepatotóxicas en la actualidad se utiliza como modelo experimental de fibrosis, administrándolo a ratas por vía gástrica, por inyección subcutánea o por inhalación (31, 32).

La hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono (CCl_4) se debe a su biotransformación por las monooxigenasas microsómicas hepáticas, que liberan el radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$). Este radical libre puede sustraer un átomo de hidrógeno de los lípidos insaturados de la membrana y así iniciar la peroxidación lipídica con todas sus consecuencias. También el radical triclorometilo puede reaccionar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas. La hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono se potencia por efecto de

agentes que inducen los isoenzimas del citocromo P-450, tales como el fenobarbital o el etanol.

Un método muy reproducible para desarrollar fibrosis severa y cirrosis micronodular que se asemeja sistémica e histológicamente a la cirrosis alcohólica de humanos es el modelo crónico de CCl_4 en ratas, de Proctor y Chatambra (42). El CCl_4 se administra de tal manera que produzca un daño repetitivo, que se manifieste entre una hepatitis reversible a muerte por fallo agudo hepático. Dosis de $40\mu\text{l}$ de CCl_4 /rata de 250 g, se administran por vía gástrica durante 8 a 10 semanas a ratas pretratadas con fenobarbital.

Este método es un modelo muy reproducible, que desarrolla un hígado típico de cirrosis micronodular.

Noduligénesis hiperplásica inducida por tioacetamida

Una de las hepatotoxinas más frecuentemente estudiadas por su capacidad para inducir experimentalmente fibrosis, cirrosis y cáncer, es la tioacetamida. Dosis elevadas (500 mg/Kg rata) de este compuesto dan lugar a intoxicación aguda manifestada por necrosis hepática perivenosa. Las dosis bajas y continuadas dan lugar a lesión crónica que se manifiesta por fibrosis, cirrosis y cáncer (33, 41).

La hepatotoxicidad crónica se manifiesta por apariciones fibrosas de los tractos portales, con formación de septa portal-portal y proliferación colangiocelular. Las lesiones fibróticas persisten después de un periodo de tiempo después de la eliminación de la tioacetamida. Este modelo de fibrosis hepática es útil en estudios en los que el cáncer hepático se encuentra asociado a la fibrosis

En la figura 5 se muestra el aspecto de los hígados de ratas obtenidos en nuestro laboratorio a distintos períodos de la administración intraperitoneal diaria de tioacetamida en dosis de 50 mg/Kg/día. El aspecto oscuro y charolado del hígado normal va cambiando, adquiriendo un color más pálido y superficie rugosa a medida que la intoxicación se hace crónica. A los 60 días de tratamiento pueden detectarse nódulos (noduligénesis hiperplásica) (41).

La figura 6 muestra cortes semifinos de hígado de rata tratada por nuestro grupo durante 5 meses (tres inyecciones semanales) con tioaceta-

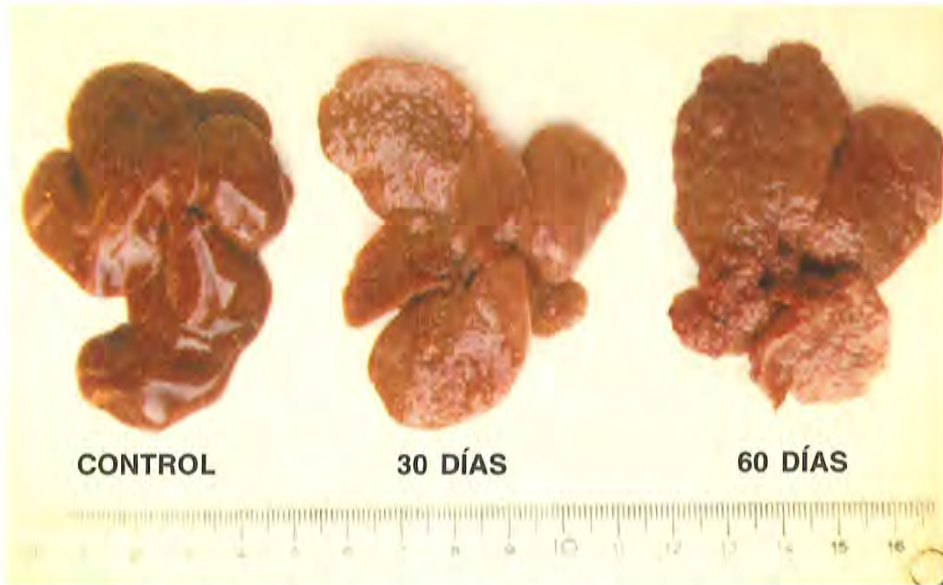


FIGURA 5. Morfología del hígado de rata con fibrosis inducida por tioacetamida. La tioacetamida se administró por vía intraperitoneal a ratas en dosis de 50 mg/Kg/día. En la fotografía se muestran hígados de ratas después de 30 y 60 días del tratamiento, frente a hígado control (41).

mida en dosis de 100 mg/Kg. Las muestras una vez procesadas se tiñeron con el tricrómico de Masson y se examinaron al microscopio óptico. En estas fotografías (6A) puede observarse como la arquitectura hepática aparece notablemente alterada por abundante tejido fibroso. Los nódulos de diferente tamaño incluyen hepatocitos rodeados por densos puentes fibrosos de colágeno, que se extienden entre dos terminales porta próximos. En los septa fibrosos que rodean el parénquima hepático se detecta la proliferación de las células de los conductos biliares (colangiocitos). En la Figura 6B, puede observarse a mayor aumento, la proliferación de las células ductulares entre las fibras de colágeno. La Figura 6C muestra una vista panorámica de los hepatocitos dentro de los nódulos, que aparecen hinchados, con núcleo edematoso y prominente nucleolo (33).

La excesiva ingestión de bebidas alcohólicas, *el alcoholismo crónico*, es una de los factores etiológicos más frecuentes en la incidencia de fibrosis hepática y cirrosis en humanos. Debido a la aversión de la mayoría de animales al etanol y a la incapacidad de controlar el estado nutricional y mantener un nivel elevado de alcohol en sangre, se han presentado problemas a la hora de establecer un modelo experimental apropiado de fibrosis

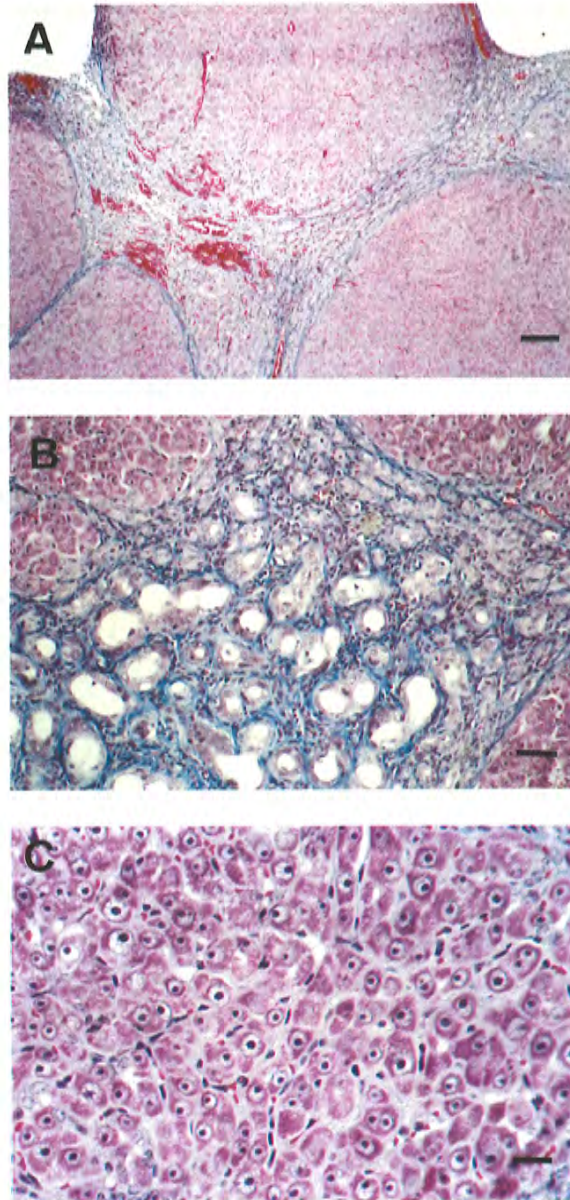


FIGURA 6. Estudio histológico de hígado de ratas después de cinco meses de tratamiento con tioacetamida 50 mg/Kg tres veces por semana. A. Los cortes de hígado se tiñeron con tricrómico de Masson. (A) Aparecen puentes fibrosos de colágeno entre dos terminales porta cercanos y pueden también observarse zonas hemorrágicas. Se observan también nódulos de tamaño diferente (barra 50 μ m). (B) Esta fotografía muestra un detalle de (A), en la cual se detectan células ductulares proliferativas en el interior de los puentes fibrosos (barra 20 μ m). (C) Los hepatocitos en el interior de los lóbulos aparecen hinchados y con nucleolos hipertrofiados (barra 12 μ m) (33).

inducida por etanol. Tsukamoto et al., (31) han establecido un modelo en rata mediante la implantación de un catéter gástrico por el que se administra una dieta rica en etanol (45% del contenido calórico), unido a un contenido elevado en grasa. Con este modelo ha sido posible un control completo e independiente de la incorporación de nutrientes. Se consiguió así una lesión hepática alcohólica progresiva y reproducible, desde el hígado graso pasando por necrosis centrilobular (perivenosa) e inflamación y fibrosis perivenosa y pericelular.

Otro agente que potencia el efecto del alcohol es el hierro. Con la infusión intragástrica de la dieta rica en etanol, el suplemento de hierro exacerbó la lesión hepática fibrogénica y la cirrosis.

La *fibrosis hepática y cirrosis nutricional* se inducen en ratas alimentadas con dieta elevada en grasa y pobre en colina y proteínas (31, 32). A lo largo de seis meses con tal dieta fueron apareciendo los siguientes cuadros patológicos: esteatosis o degeneración grasa centrilobular debida a la deficiencia en colina, y esteatosis periportal debida a la deficiencia de diversos aminoácidos. En un período de 6 - 12 semanas aparece la fibrosis hepática desde los terminales central-central o central-portal. A partir de los 24 meses se desarrolla la cirrosis.

8. OBJETIVOS TERAPÉUTICOS

El mejor medio de prevenir la progresión de la fibrosis hepática es eliminar el estímulo que incita la aparición de la fibrosis. Esto es particularmente cierto en casos de sobrecarga hereditaria de hierro o cobre, en los cuales la prevención o reversión de la excesiva deposición de metal conlleva el advenimiento de la cirrosis. De manera similar, la terapia antihelmíntica en el curso del tratamiento de la esquistosomiasis; la abstinencia de alcohol en las fases iniciales de fibrosis alcohólica; la descompresión biliar en casos de obstrucción de conductos biliares; y la eliminación de fármacos hepatotóxicos, tales como elevadas dosis de metotrexato; pueden revertir la fibrosis, incluso en casos de elevada deposición de matriz extracelular. Por razones similares, el aclaramiento de agentes infecciosos es el mejor remedio de la terapia antivírica en pacientes con hepatitis vírica.

Los *agentes antioxidantes* pueden teóricamente limitar la actividad de los lipocitos, bloqueando la acción de las especies reactivas de oxígeno. El suplemento de vitamina E a ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono se ha observado que previene parcialmente la aparición de necrosis y fibrosis

(43). La vitamina E disminuye la actividad del factor de transcripción NFκB (44), y reduce la expresión genética de los procolágenos y del TGFβ en los lipocitos (45). La S-adenosilmetionina, como precursora del glutation, puede también actuar previniendo la iniciación de la fibrosis.

Los *interferones* α, β y γ son bien conocidos y ampliamente utilizados por sus propiedades antivirales e inmunomoduladoras. Disminuyen la proliferación celular de las células miofibroblásticas humanas en cultivo, la expresión de la α-actina y de los procolágenos I y III (46, 47).

Otras terapias utilizadas en la actualidad para detener o revertir la fibrosis suelen ser poco efectivas ya que no se dirigen a elementos específicos de la cascada fibrogénica. En base a los conocimientos adquiridos en los últimos años, están emergiendo nuevas posibilidades de intervención terapéutica antifibrotica, tales como: inhibición de la síntesis de la matriz (inhibidores de la prolil hidroxilasa), aumento de la degradación de la matriz (proteasas), inhibición de la activación de los lipocitos por interferencia con las citoquinas mediante anticuerpos que las neutralicen y terapia génica

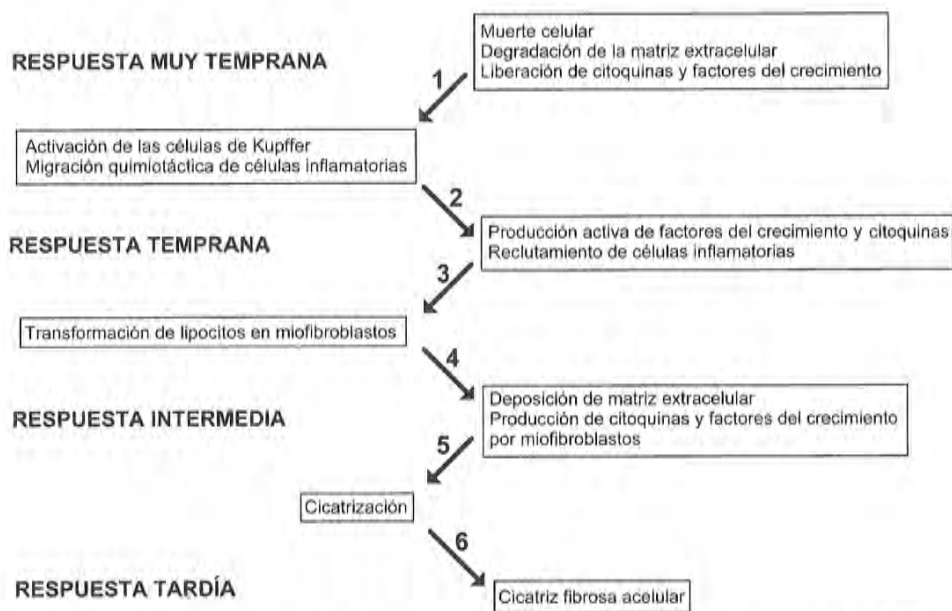


FIGURA 7. Esquema que muestra la representación de las etapas que conducen a la fibrosis. Cada una de ellas incluye un numero de sucesos que comienzan con la lesión hepática y finalizan con la cicatrización. Aunque se indica un orden cronológico, algunos eventos pueden ser simultáneos y otros mantenerse durante todo el proceso. No se indica el papel de los fragmentos de la matriz extracelular, pero se discute en el texto (53).

9. CONCLUSIONES

En resumen, la fibrogénesis hepática, según Greenwell et al., (53) puede dividirse en cuatro etapas, que se muestran en el esquema de la Figura 7. La primera corresponde a la *respuesta muy temprana* del tejido frente a un agente agresivo hepatotóxico. La segunda corresponde a la *respuesta temprana* del hígado a la lesión, la cual origina la activación de las células de Kupffer y el reclutamiento de las células inflamatorias, por activación de los lipocitos y su transformación en miofibroblastos, y por exceso de la producción de la matriz extracelular. En la *tercera*, las citoquinas inducen la proliferación de los miofibroblastos y los monocitos, y promueven la deposición de colágeno por los miofibroblastos y la maduración de los monocitos en macrófagos. Además, las citoquinas liberadas por las distintas células ejercen dramáticos efectos sobre la proliferación y función de los hepatocitos. La *etapa final* corresponde a la maduración de la cicatriz. Las cicatrices viejas contienen manojos de fibras de colágeno retraídas y no contienen células. En esta fase no existe la posibilidad de remodelación ya que no existen células que segreguen enzimas que degraden la matriz extracelular. Sin embargo, es posible que antes que la cicatriz pierda las células (lipocitos), éstas produzcan los enzimas degradativos. La producción de las metaloproteinasas (MMP), inducida por fragmentos de la matriz extracelular, es la que va a determinar la reversibilidad del proceso, ya que las metaloproteinasas (fibrolisis) se producirán mientras la fibrogénesis sea activa. Los lipocitos expresan también un inhibidor potente de las (MMP), por tanto, son una vez más los lipocitos las células que regulan la degradación de la matriz extracelular mediante (a) la activación de la MMP latente, (b) a nivel transcripcional y (c) segregando inhibidores de la MMP.

Teniendo en cuenta los conocimientos adquiridos en los últimos tiempos sobre el metabolismo del tejido conjuntivo (47), se intenta el diseño de nuevas perspectivas para una terapia antifibrótica específica. La intervención terapéutica propuesta por estos autores va dirigida a: 1. Inhibición de la síntesis de la matriz; 2. Inducción de la degradación de la matriz; 3. Inhibición de la activación de los lipocitos; 4. Interferencia con las citoquinas con anticuerpos y terapia génica somática.

Existen muchas preguntas que resolver, pero sólo el desarrollo de intensas investigaciones en este campo, pueden ayudar a resolverlas en el futuro.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bissell DM (1990) Cell-matrix interaction and hepatic fibrosis. *Prog Liver Dis* **9**, 143-155
2. Friedman SL (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis. *New Engl J Med* **328**, 1828-1835
3. Gressner AM y Bachem MG (1995) Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* **56**, 335-346
4. Border WA y Noble NA (1994) Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *New Engl J Med* **331**, 1286-1292
5. Friedman SL (1990) Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Semin Liver Dis* **10**, 20-29
6. Roberts AB y Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming Growth factor β (TGF β). *Growth factors* **8**, 1-9
7. Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell K-M y Gressner AM (1992) Activation of rat perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from miofibroblast like cells: a potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* **89**, 19-27.
8. Gressner AM, Lofti S, Gressner G, Haltner E y Kropf J (1993) Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat-storing cells (perisinusoidal lipocytes) *J Hepatol* **19**, 117-132
9. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ y Sobin LH (1978) The morphology of cirrhosis. *J Clin Pathol* **31**, 395-414
10. Hynes RO (1992) Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
11. Hardingham TE y Fosang AJ (1992) Proteoglycans - Many forms and many functions. *FASEB J* **6**, 861-870
12. Gressner AM y Bachem MG (1990) Cellular sources of non-collagenous matrix proteins. Role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis* **10**, 30-46.
13. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F, Burroughs AK y Surrenti C (1994) Differential expression of matrix metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* **144**, 528-537
14. Greenwel P, Rubin J, Schwartz M, Hertzberg EL y Rojkind M (1993) Liver fat storing cell clones obtained from CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6 and connexin-43. *Lab Invest* **69**, 210-216
15. Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, Wisse E (1991) Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* **13**, 1193-1202

16. Bissell DM (1992) Lipocyte activation and hepatic fibrosis. *Gastroenterology* **102**, 1803-1805
17. Housset C, Rockey DC y Bissell DM (1993) Endothelin receptors in rat liver - Lipocytes as a contractile target for endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **90**, 9266-9270.
18. Johnson SJ, Hines JE y Burt AD (1992) Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J Pathol* **166**, 351-358
19. Casini A, Cunningham M, Rojkind M y Lieber CS (1991) Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism. *Hepatology* **13**, 758-765
20. Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJP (1992) Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1: implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* **90**, 282-287
21. Lieber CS (1990) Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogens and vitamins. *Alcohol* **25**, 157-176
22. Wang XD (1999) Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev* **57**, 51-59
23. Eng FJ y Friedman SL (2000) Fibrogenesis I. New concepts into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, 67
24. Poli G y Parola M (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Rad Biol Med* **22**, 287-305
25. Slater TF (1994) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* **222**, 1-15
26. Montosi G, Garutti C, Gualdi R, Ventura E, Pietrangelo A (1996) Paracrine activation of hepatic stellate cells during oxidative stress-associated hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* **25**, 74
27. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Fischì M et al. (1997) Neutrophil-derived superoxide anions induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **25**, 361-367
28. Baroni GS, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A (1998) Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **27**, 720-726
29. Gualdi R, Casalgrandi G, Montosi G, Ventura E y Pietrangelo A (1994) Excess iron into hepatocytes is required for activation of collagen type I gene during experimental siderosis. *Gastroenterology* **107**, 1118-1124
30. Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Villanueva J, Ruebner B y Halsted CH (1995) Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation and fibrogene-

- sis in a micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **22**, 1208-1214.
31. Tsukamoto H, Matsuoka M y French SW (1990) Experimental models of hepatic fibrosis: A review. *Semin Liver Dis* **10**, 59-65
 32. Wasser S y Tan CEL (1999) Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med Singapore* **28**, 109-111
 33. Sanz N, Díez-Fernández C Y Cascales M (1995) Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* **16**, 1585-1595
 34. Halliwell B, Gutteridge JM y Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**, 598-620
 35. Schreck R y Baeuerle PA (1990) NF-kappa B as inducible transcription activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* **10**, 1281-1286
 36. Messer G, Weiss EH y Baeuerle PA (1990) Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B transcription factor to high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine* **2**, 1-9
 37. Libermann TA y Baltimore D (1990) Activation of the interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* **10**, 1-9
 38. Kim SJ, Dehnez F, Kim KY, Hoilt JT, Sporn MB y Roberts AB (1989) Activation of the second promoter of the transforming growth factor β 1 gene by the transforming growth factor β 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J Biol Chem* **264**, 19373-19378
 39. Schaur RJ, Dussing G, King E, Schauenstein E, Posch E, Kukovetz E y Egger G (1994) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal is formed by - and is able to attract - rat neutrophils in vivo. *Free Rad Res* **20**, 365-373.
 40. Cascales M (1999) Inmunosenescencia. En: *Estrés Oxidativo. Envejecimiento y Enfermedad*, pp 169-192, Instituto de España. Madrid
 41. Cascales M (1987) En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones hepáticas*, (ed Cascales M y Ferrándiz F), pp 9-26, CSIC, Madrid
 42. Proctor E y Chatambra K (1982) High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* **83**, 1183-1190.
 43. Parola M, Leonarduzzi G, BIASI F, Albano E, Biocca ME, Poli G et al. (1992) Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* **16**, 1014-1021
 44. Liu SL, Degli Esposti S, Yao T Diehl AM y Zern MA (1995) CCl₄-induced hepatic injury in mice associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* **22**, 1474-1481

45. Parola M, Muraca R, Dianzani U, Barrera G, Leonarducci G, Bendinelli P et al. (1992) Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor β 1 gene expression in the rat liver. *FEBS lett* **308**, 267-270
46. Blanc JF, Bioulac-Sage P y Rosenbaum J (1997) Cellules étoilées du foie et fibrogénese hepatic. *Gastroenterol Clin Biol* **21**, 720-726.
47. Baroni GS, D'Ambrosio L, Ferretti G, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, Benedetti A (1996) Interferon Gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* **23**, 1189-1199.
48. Strobel D y Hahn EG (1997) Pathogenesis of liver fibrogenesis *Digestion* **58** (suppl1), 37-38
49. Friedman SL (1997) Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* **32**, 424-430
50. Maher JJ (1999) Leukocytes as modulators of stellate cell activation *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 917-921
51. Olaso E y Friedmann SL (1998) Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* **29**, 836-847
52. Poli G (2000) Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Asp Med* **21**, 49-98
53. Greenwel P, Geerts A, Ogata I, Solis-Herruzo JA y Rojkind M (1994) Liver Fibrosis. En: *The liver Biology and Pathology* (eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA y Shafritz DA) pp 1367-1381. Raven Press, Ltd., Nueva York.

HEPATITIS PRODUCIDAS POR FÁRMACOS

SUMARIO

1. Introducción
2. Fármacos y hepatotoxicidad
 - 2.1. Hepatitis aguda
 - 2.2. Hepatitis inmunoalérgica
3. Enfermedad hepática y hepatotoxicidad de fármacos
4. Mecanismos celulares y moleculares de lesión hepática inflamatoria
5. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

La lesión hepática inducida por fármacos es uno de los problemas más importantes con los que se enfrenta la clínica, las agencias de salud y la industria farmacéutica. La expresión clínica es polimorfa, siendo la hepatitis aguda la forma predominante. El diagnóstico es a veces difícil debido a la ausencia de signos especiales en la mayor parte de los casos y hay que buscar la exclusión de otras causas. La hepatitis aguda es particularmente severa debido al riesgo de hepatitis fulminante o de un curso más insidioso que conduce a la fibrosis y a la cirrosis. La hepatitis inmunoalérgica, aunque menos frecuente, tiene su origen en el desencadenamiento de una respuesta inmune en los hepatocitos, que lleva consigo una respuesta tóxica con lesión hepática. La hepatotoxicidad cruzada es otro de los fenómenos que se pueden presentar. Ante estos casos se debe evitar la readministración de los agentes causales y también la de otros medicamentos pertenecientes a la misma familia o que posean una estructura química relacionada.

La predicción de la hepatotoxicidad de nuevos fármacos debe ser investigada con especial precaución de aquellos que poseen una estructura química crítica y pertenecen a familias de hepatotoxicidad preestablecida. El

desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y terapéutica está mejorando el tratamiento y prognosis de la mayoría de enfermedades, pero está también asociado con la aparición de nuevas enfermedades iatrogénicas. Se admite que un porcentaje elevado de pacientes padecen alteraciones de origen iatrogénico (1, 2, 3). A pesar del desarrollo y mejora de los estudios toxicológicos y de la seguridad del análisis de los ensayos clínicos, la frecuencia de la hepatotoxicidad inducida por medicamentos no ha decrecido en los últimos años. El espectro de la lesión hepática causada por fármacos es muy amplio y en él pueden encontrarse, además de los hepatocitos, los colangiocitos o células del conducto biliar las células endoteliales y los lipocitos (Figura 1).

Además, en los últimos años se han obtenido numerosas evidencias experimentales acerca de la intervención de las células de Kupffer, (macrófagos residentes en hígado) y de los neutrófilos (macrófagos circulantes), en la patogénesis de la lesión hepática inflamatoria en diversas toxicidades por agentes químicos. Los mecanismos del secuestro de neutrófilos en la vasculatura hepática, la extravasación y la citotoxicidad dependiente de la adherencia, se han estudiado utilizando modelos de lesión hepática inducida por isquemia-reperfusión y por endotoxina. En estos procesos intervienen una diversidad compleja de mediadores inflamatorios entre los que se incluyen citoquinas, quimioquinas y compuestos de naturaleza

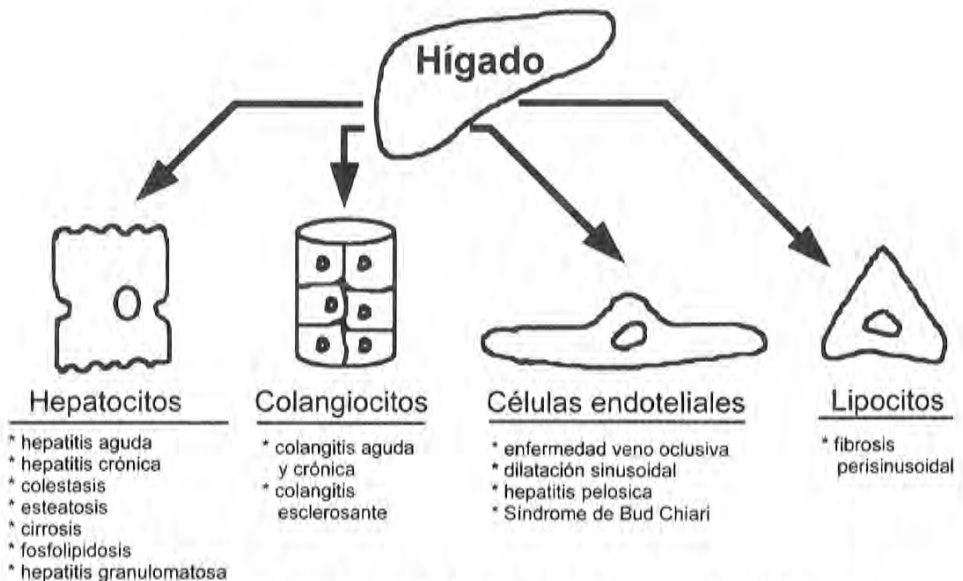


FIGURA 1. Células implicadas en la hepatotoxicidad inducida por fármacos (1).

lipídica. Los mediadores citotóxicos derivados de los neutrófilos tales como las especies reactivas de oxígeno y las proteasas, intervienen en los mecanismos moleculares de la lesión de los hepatocitos. En estos mecanismos de inflamación juegan también un importante papel las interacciones de los neutrófilos y la actividad contráctil de los lipocitos sobre el flujo sanguíneo microvascular.

2. FÁRMACOS Y HEPATOTOXICIDAD

Los efectos tóxicos de los medicamentos sobre el hígado se han ignorado, o al menos infraestimado durante mucho tiempo. Para algunos medicamentos bien conocidos y utilizados muy frecuentemente, el descubrimiento de su hepatotoxicidad ha sido mucho después de su primer uso. Por ejemplo, ese lapso de tiempo se ha contabilizado en 100 años para la aspirina, 40 años para la papaverina y 25 años para la amiodarona. Para otros medicamentos, como ocurre con el acetaminofeno o la isoniazida, en los que se conoce su hepatotoxicidad desde hace años, su uso por sobredosis o por hipersensibilidad, se asocia con hepatitis fulminante y muerte, que puede prevenirse conociendo los primeros síntomas. Las relaciones cronológicas entre la ingestión del medicamento y la iniciación de la lesión hepática son las consideraciones más importantes en el diagnóstico. En el caso de otros fármacos, como la cocaína, su hepatotoxicidad está siendo objeto de estudios, especialmente cuando se potencia en casos de alcoholismo (4). La ciclosporina A, agente farmacológico inmunosupresor utilizado en la terapia de los trasplantes, se sabe que presenta efectos adversos hepato y nefrotóxicos. Se realizan en la actualidad intensos estudios encaminados al conocimiento del mecanismo de acción de este fármaco para encontrar la forma de paliar sus efectos adversos (5)

El metabolismo y destoxificación de los fármacos o medicamentos liposolubles y de los esteroides endógenos se verifica en su mayor parte en la fracción microsómica de la célula hepática. En estos procesos se encuentra implicado el sistema monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450 (6, 7). En muchos casos la biotransformación de estos xenobióticos genera metabolitos tóxicos reactivos, que pueden unirse covalentemente a macromoléculas hepáticas de importancia vital y producir necrosis celular (8). La hepatotoxicidad de los metabolitos reactivos depende de un equilibrio entre la actividad hepática del citocromo P-450 y el contenido hepático de glutatión (9). Se ha demostrado que la deficiencia de glutatión altera la función inmune y la cicatrización de las lesiones y eleva la incidencia de fallo orgánico multisistémico.

TABLA 1. Principales mecanismos de hepatotoxicidad (1)

<i>Enfermedades hepáticas</i>	<i>Mecanismos</i>
Hepatitis aguda (necrosis)	Toxicidad mediada por metabolitos reactivos Inmunoalergia y/o autoinmunidad mediada por metabolitos
Colestasis aguda Esteatosis macrovacuolar Esteatosis microvesicular	Inhibición de la secreción biliar Disminución secreción de lipoproteínas
Fosfolipidosis	Inhibición de la beta-oxidación de ácidos grasos mitocondriales
Hepatitis crónica Desaparición de los conductos biliares	Reacción inmune mediada por metabolitos reactivos Destrucción autoinmune de conductos biliares pequeños Anormalidad en el sistema de multiresistencia de fármacos
Colangitis esclerosante Enfermedad veno-oclusiva	Isquemia biliar causada por lesiones arteriales Lesiones endoteliales mediada por metabolitos reactivos
Fibrosis perisinusoidal	Activación de lipocitos

Tanto el citocromo P-450 como el glutatión son muy sensibles a la ingesta. El glutatión es susceptible a la malnutrición proteica (10, 11, 12), de tal modo que un corto periodo de ayuno desciende en rata la tasa de glutatión a un tercio del valor control (13).

2.1. Hepatitis aguda

El hígado es un objetivo frecuente de la hepatitis inducida por fármacos. Esta hepatitis puede clasificarse en dos categorías: la más común de ellas es la *hepatitis aguda*, que es aquella en la que el fármaco o su metabolito alcanza un objetivo vital en la célula y lo lesiona, y la otra, menos común es la *hepatitis inmunoalérgica* en la cual el fármaco desencadena una respuesta inmune adversa dirigida contra el propio hígado. La lesión hepática se manifiesta por muerte hepatocelular de distinta intensidad de acuerdo con la dosis del fármaco y la agresividad de los productos de su biotransformación. Tanto en la hepatitis aguda como en la inmunoalérgica, la formación de metabolitos reactivos y la reacción de éstos con los nucleófilos celulares son a menudo los acontecimientos desencadenantes de la enfer-

medad. Un buen ejemplo del primer tipo lo tenemos en la hepatotoxicidad asociada a sobredosis de paracetamol (14 - 17). Ejemplos de la hepatitis inmunoalérgica es la causada por el halotano, el ácido tienílico, anticonvulsivos, etc. (18).

A pesar de los avances registrados en los últimos veinte años, los mecanismos de hepatotoxicidad de la mayoría de fármacos permanecen sin esclarecer. Un simple medicamento puede presentar diversos efectos tóxicos sobre el hígado, o puede producir hepatitis tóxica o alérgica en pacientes diferentes

Las diversas formas de citocromo P-450 poseen el mismo grupo activo, el hemo, y difieren por sus apoproteínas. Debido al hecho de la multiplicidad de las formas del citocromo P-450, del carácter inducible de algunas de ellas, y a que cada una puede metabolizar muchos xenobióticos, el citocromo P-450 representa un sistema muy versátil capaz de oxidar una extraordinaria variedad de xenobióticos liposolubles. En esta capacidad reposa la multiplicidad de formas que dependen del citocromo P-450. Este sistema, por tanto, permite la eliminación del organismo de sustancias tóxicas de naturaleza liposoluble, entre los que se incluyen una gran parte de los fármacos y medicamentos. El funcionamiento de este sistema puede entrañar inconvenientes, ya que en el proceso de biotransformación y eliminación de estas sustancias se generan metabolitos reactivos que pueden ocasionar lesiones moleculares desencadenantes de cuadros clínicos de hepatitis tóxicas o inmunoalérgicas (19, 20).

La formación de metabolitos reactivos es relativamente frecuente (21) y a pesar de los mecanismos de defensa protectores, ello puede conducir a la reacción covalente de estos metabolitos con proteínas, la peroxidación de lípidos por los radicales libres, y la oxidación y depleción del glutatión. El enlace covalente a proteínas que supongan objetivos vitales de la célula, puede ser uno de los mecanismos desencadenantes de la hepatotoxicidad aguda o de la formación de autoanticuerpos responsables de las reacciones inmunológicas adversas (22) (Figura 2). Todo esto va unido a una serie de lesiones funcionales y estructurales, entre las que se incluye un sostenido incremento del calcio citosólico y por último la muerte hepatocelular.

El papel de los metabolitos reactivos derivados de la oxidación de los fármacos está bien establecido en su hepatotoxicidad. Sin embargo, dicha hepatotoxicidad no está restringida a la activación metabólica, ya que se ha demostrado que la esteatosis microvesicular o la esteohepatitis, se induce por efecto de diversos fármacos tales como algunos antidiabéticos triclicli-

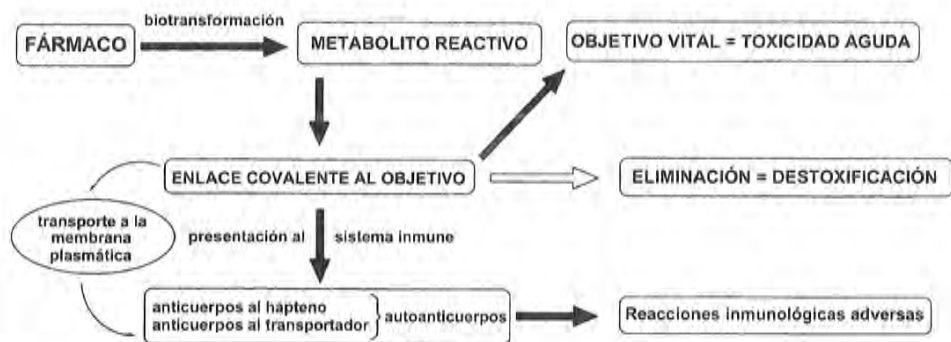


FIGURA 2. Activación metabólica de metabolitos reactivos desencadenantes de la hepatotoxicidad.

cos, la tetraciclina y el ácido acetilsalicílico, los cuales actúan inhibiendo la β oxidación de los ácidos grasos (23, 24).

Son muchos los factores que pueden influenciar el riesgo de enfermedad hepática inducida por medicamentos. Para los medicamentos hepatotóxicos dependientes de la dosis, como el acetaminofeno (paracetamol) o el metotrexato, estos factores incluyen: la dosis ingerida, el nivel del medicamento en la sangre, y la duración de su ingestión. Otros factores son también relevantes como la edad, el género, los factores genéticos, el estado nutricional, la exposición a otras sustancias y las enfermedades concomitantes. Por ejemplo, la ingestión crónica de alcohol disminuye el umbral de la dosis y eleva la severidad de la hepatotoxicidad del acetaminofeno. También incrementa el riesgo y severidad de la hepatitis inducida por isoniazida y predispone a la fibrosis hepática inducida por metotrexato.

El *acetaminofeno* es un agente terapéutico usado ampliamente como eficiente analgésico, que resulta inocuo cuando se administra en las dosis terapéuticas recomendadas. La hepatotoxicidad de sobredosis de este analgésico se conoce desde hace más de 30 años y a pesar de la efectividad de los antidotos, como la N-acetilcisteína, el acetaminofeno es la causa más común de lesión hepática iatrogénica en la mayoría de los países y una causa importante de hepatitis fulminante. Entre los alcohólicos, las dosis diarias de 2 - 6 gramos se han asociado con hepatotoxicidad fatal. El factor de riesgo del alcohólico se debe a que su situación puede hacer variar la dosis letal del acetaminofeno, bien incrementando su letalidad o disminuyendo su actividad terapéutica (ver capítulo 10 de este volumen). El autoenvenenamiento con acetaminofeno es más frecuente en mujeres jóvenes, pero los pronósticos fatales son más frecuentes en hombres debido al alcoholismo y a la presentación tardía, la cual es un factor crítico para el éxito

Tabla 2. Factores que ejercen influencia sobre el riesgo de lesión hepática inducida por fármacos. (21)

Factor	Ejemplos	Influencia sobre el riesgo
Edad	Isoniazida, nitrofurantoína, halotano, flucloxacilina	Se eleva la severidad > 60 años
Género	Acido valproico Halotano, metildopa, nitrofurantoína	Mayor en niños Hepatitis aguda y crónica mas frecuente en mujeres
Dosis	Azatioprina Acetaminofeno, aspirina	Más frecuente en hombres Lesión proporcional al nivel sanguíneo
Factores Genéticos	Tetraciclina tacrina, oxipenicilinas	Reacciones impredecibles
	Metotrexato, vitamina A	Dosis, frecuencia y duración
	Halotano, fenitoína Ácido valproico	Múltiples casos familiares Deficiencias enzimas mitocondriales
Reacción otros fármacos	Halotano, enflurano, eritromicinas, diclofenac, ibuprofen ácido tiaprofénico	Sensibilidad cruzada entre estos fármacos, son raras.
Otros fármacos	Acetaminofeno Ácido valproico	Rebaja el umbral de dosis Incrementa riesgo anticonvulsivos
Alcoholismo	Fármacos anti neoplásicos Acetaminofeno	Toxicidad vascular interactiva Rebaja el umbral de dosis
Obesidad	Isoniazida, metotrexato Halotano, metotrexato	Eleva el riesgo de lesión Incrementa riesgo de lesión y fibrosis
Anorexia	Acetaminofeno	Incrementa riesgo de lesión
Diabetes mellitus	Metotrexato	Incrementa riesgo de fibrosis
Fallo renal	Tetraciclina, metotrexato	Incrementa riesgo de lesión y fibrosis
Transplantes	Azatioprina, tioguanina, busulfan	Incrementa riesgo toxicidad vascular

de la terapia con N-acetilcisteína, un precursor del glutatión hepático, (25, 26). La N-acetilcisteína previene la lesión hepática inducida por el acetaminofeno, si se administra dentro de las 12 horas de la ingestión del fármaco. Otro factor de riesgo es el tratamiento simultáneo del acetaminofeno con agentes que inducen el citocromo P-450, como el fenobarbital, la fenitoína, la isoniazida y la zidovudina. El mecanismo mediante el cual el alcohol y estos fármacos incrementan la hepatotoxicidad del acetaminofeno se debe a que al inducir el sistema enzimático responsable de la oxidación del acetaminofeno elevan la formación del metabolito reactivo hepatotóxico la

N-acetil-p-benzoquinonaimina. Este metabolito se genera por acción de diferentes subunidades del citocromo P-450: el citocromo P4502B1, inducido por el fenobarbital; por el citocromo P-4502E1, inducido por la isoniazida y el etanol; por el citocromo P-4503A4, inducido por la fenitoina; o compitiendo con las vías de glucuronidación, en el caso de la zidovudina. El alcohol y el ayuno presentan efectos dobles según eleven la expresión de los genes CYP2E1 o actúen disminuyendo la concentración intracelular de glutatión (GSH) hepático. El ayuno puede también alterar el mecanismo de conjugación a través de las vías de glucuronidación (27).

La reacción tóxica del acetaminofeno se debe a su metabolito reactivo la N-acetil-p-benzoquinonaimina, que se une covalentemente a proteínas y otras macromoléculas celulares y causa lesión hepatocelular. A dosis bajas (terapéuticas) la N-acetil-p-benzoquinonaimina se destoxifica eficientemente por conjugación con el glutatión, una reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa (GST-Pi). Experimentos recientes de Henderson et al., (28) han identificado nuevos caminos en los cuales la GST puede modular la sensibilidad celular a los efectos tóxicos del acetaminofeno y sugieren que la concentración de GST-Pi puede ser un factor que contribuya a la sensibilidad de los pacientes intoxicados con este fármaco. Otros estudios han demostrado que la respuesta inflamatoria asociada con la hepatotoxicidad al acetaminofeno se modula por la inducción paralela del gen de la hemooxigenasa 1 (29).

Los siguientes síntomas son índices de la hepatotoxicidad del acetaminofeno: coma hepático, acidosis, alteraciones severas y sostenidas de la síntesis del factor de coagulación y fallo renal como reflejo de necrosis tubular aguda de síndrome hepatorenal. Lesión miocárdica se ha atribuido también a la toxicidad del acetaminofeno. La muerte ocurre entre los 4 y los 18 días, generalmente por edema cerebral que se complica con fallo hepático y de múltiples órganos. Casos de hepatotoxicidad aparente crónica se atribuyen a ingestión continuada de acetaminofeno de 2 a 6 gramos/día, particularmente en casos de susceptibilidad, tales como el alcoholismo crónico o una enfermedad hepática preexistente no reconocida.

La lesión hepática severa debida al acetaminofeno revierte totalmente cuando se administra N-acetilcisteína dentro de las 12 a 16 horas de la intoxicación. Después de las 16 horas, la administración del derivado tiólico no es probable que afecte la necrosis hepatocelular, ya que la oxidación del acetaminofeno a su metabolito activo y la consiguiente oxidación de los grupos tiólicos es completa. A pesar de ello, la N-acetilcisteína puede disminuir el riesgo de muerte, aunque sea administrada hasta 36 horas después de la intoxicación, posiblemente porque la N-acetilcisteína estabiliza la

reactividad vascular. Recientemente se ha descrito otro derivado de la cisteína, la ribosa cisteína, la cual además de su acción protectora sobre el hígado, puede también proteger el riñón de las lesiones ocasionadas por el acetaminofeno (30). Respecto a la interacción de fármacos, un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento continuado con el clofibrato, agente que promueve la proliferación de los peroxisomas, utilizado en clínica como agente hipolipidemiante, ejerce un efecto protector frente a la hepatotoxicidad inducida por el acetaminofeno. Este efecto protector está mediado por activación de un receptor, PPAR α (peroxisoma proliferator.activated receptor alfa), el cual por mecanismos aún no esclarecidos impide la depleción del glutatión y la arilación de las proteínas citosólicas, inducidas por acetaminofeno, en ratones pretratados con clofibrato (31).

El transplante hepático se recomienda como opción terapéutica en pacientes de sufrieron fallo hepático después de una sobredosis de acetaminofeno. La selección de los casos está influenciada por prospección de rehabilitación psicológica. Un promedio del 60% de los pacientes han sido transplantados con tasas de supervivencia del 70%.

2.2. Hepatitis inmunoalérgica

Las características clásicas asociadas a la hepatitis aguda tales como elevada frecuencia, intervalo corto entre la administración del tóxico y la respuesta a la dosis, están ausentes en la hepatitis inmunoalérgica. Por el contrario, se han observado ciertas características específicas, entre las que cabe destacar las siguientes (22, 32):

- (a) baja frecuencia, menos del 1 por 1000;
- (b) severidad no dependiente de la dosis y la enfermedad puede aparecer a dosis terapéuticas;
- (c) aunque es el hígado el órgano que se lesiona más fácilmente, se presentan también otras señales, como la eosinofilia, que muestran que el sistema inmune se encuentra implicado;
- (d) retraso en la aparición de la lesión, de semanas a meses después de la administración del fármaco;
- (e) menor retraso en la aparición de la lesión en casos de recaída (sensibilización)

- (f) frecuente presencia de autoanticuerpos frente a proteínas séricas modificadas.

Las lesiones hepáticas que se manifiestan más comunmente en casos de hepatitis inmunoalérgica son necrosis en el área perivenosa con presencia de infiltrado inflamatorio. Generalmente la respuesta inmune con sus consecuencias de lesión hepática se resuelven cuando el fármaco deja de administrarse, pero en algunos casos se han observado síntomas de hepatitis aguda o crónica. Cinco ejemplos de medicamentos clásicos que producen hepatitis inmune son los siguientes: el anestésico halotano, el diurético ácido tienílico, el fármaco antihipertensivo dihidralazina, los agentes anticonvulsivos carbamazepina, fenitoina y fenobarbital, y el inhibidor de la mono amino oxidasa iproniazida. Los síntomas clínicos tienen ciertas similitudes con las características antes mencionadas.

El *halotano* ($\text{CF}_3\text{-CHClBr}$) es un compuesto polihalogenado utilizado como anestésico volátil desde 1956, cuya administración puede causar dos tipos de hepatitis en humanos: una leve, no percibida a nivel clínico, mediada por un mecanismo de toxicidad directa y la otra forma, mucho menos común, pero más severa. Se conocen las vías del metabolismo del halotano, como también las de sus derivados, *enflurano* e *isoflurano*.

Se han descrito con claridad dos etapas en su metabolismo, una reductora que genera un radical libre $[\text{CF}_3\text{CHCl}]^\cdot$, responsable probablemente de la forma benigna de hepatitis y la otra oxidativa que genera un derivado muy reactivo $[\text{CF}_3\text{COCl}]^\cdot$, capaz de reaccionar con el grupo NH_2 en ϵ de la lisina, para formar aductos con las proteínas. Se han identificado diversas proteínas capaces de formar estos aductos cuando se incubaron con halotano en condiciones oxidativas (32). Algunas de estas proteínas del retículo endoplásmico son solubles y otras integrales (33). Después de la exposición a halotano los aductos trifluoroacetato aparecen también en proteínas de la membrana plasmática de los hepatocitos (34). Se desconoce hasta la fecha el mecanismo de presentación de estos aductos al sistema inmune, sin embargo, es interesante destacar que estos aductos están presentes sobre la membrana y que la mayoría de las proteínas trifluoroacetiladas pueden tener una vida media larga. Finalmente el halotano puede ser almacenado en el tejido adiposo y ello le hace poder generar aductos por largos períodos de tiempo.

Se ha demostrado que el $[\text{CF}_3\text{COCl}]^\cdot$ es capaz de destruir el P450 en hígado de rata por ataque a su grupo prostético. El P450 humano también puede ser inactivado por este radical por un mecanismo de tipo suicida (35). El $[\text{CF}_3\text{COCl}]^\cdot$ puede unirse covalentemente a otras proteínas, o sustraer un

protón de los ácidos grasos insaturados, iniciando así la peroxidación lipídica y causando daño celular irreversible. Se han detectado anticuerpos en suero de pacientes que fueron capaces de reconocer tanto a las proteínas trifluoroacetiladas como a las proteínas nativas que simulan estos aductos.

Los anticuerpos procedentes de modelos animales o de pacientes con hepatitis inducida por halotano reaccionan con proteínas específicas en animales expuestos a este anestésico (36). Las proteínas hepáticas reconocidas por estos anticuerpos son de peso molecular similar en conejos, cobayas, ratas y humanos. Estudios inmunohistopatológicos han localizado estos neoantígenos en la zona perivenosa del acino hepático. Se están realizando esfuerzos considerables para identificar las proteínas con las que el halotano forma aductos, en un intento de determinar las proteínas clave que son inactivadas o transformadas en antigénicas, posiblemente mediante la puesta en funcionamiento de una cascada de eventos en respuesta de hipersensibilidad.

Aunque se han identificado antígenos y anticuerpos después de la exposición a halotano, no se ha demostrado que la presencia de estos antígenos o anticuerpos incrementen la hepatotoxicidad del halotano, como se observa en estudios de hepatotoxicidad aguda (18). Experimentos con diferentes tiempos de exposición y con intervalos entre las exposiciones y el pretratamiento, no han conseguido producir hepatotoxicidad adicional. Otros intentos han incluido el uso de una cepa de ratón proclive a la hepatitis autoinmune, para demostrar que el halotano perpetúa una agresión autoinmune subyacente. Desgraciadamente, estos estudios no han producido un definitivo esclarecimiento de las relaciones causa-efecto.

Otros estudios han conseguido identificar otro posible mecanismo. El epítipo trifluoroacetilado puede ser remedado por un sustrato endógeno. Gut et al., (38) han demostrado que dos proteínas, de 52 y 64 kDa, reaccionan con anticuerpos de animales expuestos a halotano o de suero de pacientes con hepatitis inducida por halotano. La proteína de 64 kDa se ha identificado como la subunidad E-2 de la piruvato deshidrogenasa. Más específicamente, es la lipoamida (ácido lipoico) la que remeda el grupo trifluoroacetilo. Es posible que exista alteración en la autotolerancia hacia estas dos proteínas en pacientes con hepatitis inducida por el halotano, que pueda relacionarse con su susceptibilidad. Virtualmente todos los pacientes tienen la capacidad de biotransformar el halotano a su intermediario cloruro $[CF_3COCl]$, que se une a las proteínas hepáticas. Sin embargo, sólo en los pacientes con una especial propensión a alterar su autotolerancia se manifestará la lesión.

Otros anestésicos volátiles utilizados en la actualidad, el enflurano ($\text{CHF}_2\text{-O-CF}_3\text{CHFCl}$) y el isoflurano ($\text{CHF}_2\text{-O-CHCl-CF}_3$) se han asociado con lesión hepática post-anestesia, pero la incidencia es considerablemente menor que la observada con halotano (37). Ambos anestésicos poseen la capacidad de ser biotransformados a intermediarios que pueden acetilar las proteínas hepáticas. De hecho, se ha demostrado que la exposición a enflurano puede originar la formación de aductos con proteínas hepáticas. Algunas veces los aductos son similares a los formados por el halotano, aunque también resultan marcadas otras proteínas (37). Por técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que el isoflurano forma aductos en el área perivenosa del hígado. Esto tiene importancia porque, cuando se necesitan múltiples tratamientos con anestesia, un planteamiento que se utiliza en clínica es cambiar el anestésico, pero los anticuerpos generados por el halotano pueden interactuar con los neoantígenos producidos por el enflurano, produciéndose una respuesta cruzada de hipersensibilidad.

Resumiendo, la hepatotoxicidad aguda originada por las proteínas aciladas y la hepatotoxicidad retrasada originada por hipersensibilidad, que se observa con los anestésicos volátiles tiene importancia relativa a los efectos de la exposición a los derivados clorofluorocarbonos. El reemplazo potencial entre compuestos de estructura similar al halotano va a causar reactividad cruzada y sensibilización porque los aductos producidos son idénticos a los producidos por el halotano.

El *ácido tienílico* es un diurético uricosúrico comercializado en Europa y en los Estados Unidos a finales de los setenta. Su potencial hepatotóxico en humanos se hizo entonces evidente, aunque esta reacción adversa fue raramente observada (0,1 al 0,7 %) (39). Presenta todas las características de una enfermedad inmune ya que no depende de la dosis, no aparece inmediatamente (el retraso es de dos semanas a varios meses), en el caso de recaída la iniciación de la enfermedad es mucho más rápida y la enfermedad va acompañada a veces por signos de eosinofilia y prurito. Las biopsias presentan una necrosis centrilobular o mediozonal con infiltrado inflamatorio. En muy pocos casos, la enfermedad hepática inicial da lugar a hepatitis fulminante, hepatitis crónica y/o cirrosis. Finalmente, la característica de la hepatitis inmune inducida por el ácido tienílico, es la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a los microsomas denominados anti LKM2 (anti-liver-kidney microsomes type 2) en suero de pacientes afectados (22).

Presentación de péptidos modificados por alquilación por moléculas de histocompatibilidad (HLA)

Para estimular inicialmente a los linfocitos T auxiliares, los péptidos inmunogénicos han de ser presentados por los antígenos de histocompatibilidad de la clase II que se muestran en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC): células de Kupffer, células endoteliales y linfocitos B. El mecanismo esquematizado en la Figura 3A muestra el mecanismo de inmunización inducido por proteínas modificadas por metabolitos reactivos. En cualquier renovación de los hepatocitos, bien fisiológica o acelerada por una discreta toxicidad inducida por un medicamento, las proteínas hepáticas pueden ser fagocitadas y degradadas por las células presentadoras de antígenos, lo que conduce a la expresión de péptidos específicos de estas proteínas en las membranas de las células presentadoras. Estos péptidos son los antígenos de histocompatibilidad de la clase II (HLAII). Si el paciente ha ingerido un medicamento que promueve la modificación de ciertas proteínas hepáticas, la degradación de estas proteínas va a conllevar la presentación por los HLAII de los péptidos modificados. Como dichos péptidos modificados son extraños al organismo, pueden ser reconocidos por los receptores de ciertos linfocitos T auxiliares (TCR). La unión del péptido modificado con el TCR estimula a los linfocitos T a segregar citoquinas que promuevan la expansión clonal de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos B productores de antígenos.

Por otro lado, los hepatocitos pueden presentar en su superficie moléculas HLA de clase I, las cuales pueden presentar péptidos modificados en la superficie de los hepatocitos (Figura 3B)

3. ENFERMEDAD HEPÁTICA Y HEPATOTOXICIDAD DE FÁRMACOS

Una de las preguntas más comunes que se hacen los hepatólogos es aquella concerniente a los riesgos que el uso de fármacos hepatotóxicos puede acarrear a pacientes que ya sufren enfermedad hepática. Un ejemplo típico es la del paciente con tuberculosis y con pruebas hepáticas alteradas (debidas quizás al alcohol o a hepatitis C), que necesita tratamiento con isoniazida, rifampicina o pirazinamida. ¿Pueden usarse estos fármacos? (39, 40). Se sabe que la mayor parte de los fármacos se metabolizan en hígado y muchos de ellos son excretados por el propio hígado. Por ello, en casos de disfunción hepática la dosis de los fármacos ha de requerir un ajuste para evitar reacciones adversas que no pueden ser previstas. Una serie de ejemplos en los que se encuentra implicado el uso de agentes terapéuticos con potencial

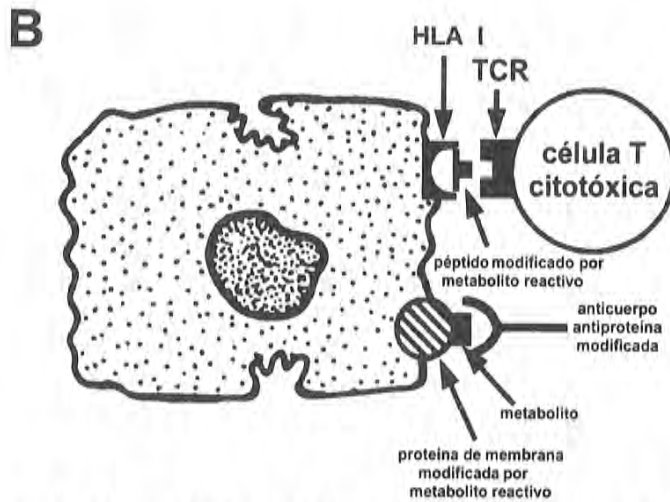
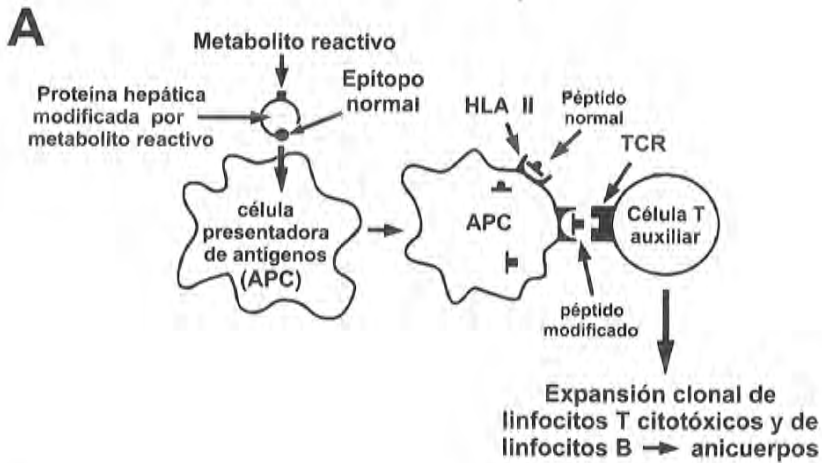


FIGURA 3. Mecanismo de citotoxicidad por proteínas modificadas por fijación covalente de un metabolito reactivo. (A) Antígenos de histocompatibilidad II (HLA II) aparecen en la superficie de los macrófagos presentadores de antígenos. (B) Moléculas de HLA I en la superficie de los hepatocitos pueden presentar las proteínas modificadas por un metabolito reactivo el cual puede unirse al TCR en la superficie de un linfocito T y desencadenar una respuesta inmune. Por otro lado, una proteína de membrana modificada por la unión covalente con un metabolito reactivo, puede inducir la formación de un anticuerpo frente a la proteína modificada (8).

hepatotoxicidad (pirazinamida, tolcapone, troglitazone) en pacientes con previa disfunción hepática, se han citado como casos de contraindicación

Primero: Los pacientes con enfermedad hepática han de resultar significativamente afectados por la hepatotoxicidad inducida por fármacos, la cual

puede predecirse dependiendo de la dosis y sólo con fármacos con un índice terapéutico bajo. El ajuste de dosis para agentes que son eliminados por el hígado ha de mitigar este problema.

Segundo: La lesión hepática idiosincrásica inducida por fármacos ha de incrementarse teóricamente en casos de enfermedad hepática previa cuando el hígado está sensibilizado

Tercero: La presencia de enfermedad hepática puede elevar algunos aspectos farmacodinámicos (sensibilidad tisular) de la toxicidad a fármacos (NSAID, aminoglicosidos)

Cuarto: el principal efecto de los fármacos sobre pacientes con enfermedad hepática es la suma de los efectos adversos

4. MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES DE LESIÓN HEPÁTICA INFLAMATORIA

En los últimos 25 años se ha avanzado mucho en el área de la hepatotoxicología, gracias al desarrollo de la investigación tecnológica, que ha permitido aislar y mantener hepatocitos en cultivo, con lo cual gran parte de la investigación toxicológica sobre estas células, ha encontrado respuesta a muchos aspectos de la lesión hepática. Sin embargo, el hígado no está compuesto sólo de hepatocitos, sino que contiene otros tipos celulares, como las células de Kupffer, las células endoteliales, los lipocitos, etc. Estas células residentes en el hígado se encuentran en estrecha asociación, tanto con los hepatocitos, como con las células sanguíneas que fluyen por los sinusoides. No hace mucho se ha descubierto la importancia de la relación de estas células no parenquimáticas con las sanguíneas en la génesis de la lesión hepatocelular (42).

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son células sanguíneas bien conocidas por su papel en las respuestas inflamatorias y especialmente en la fagocitosis de organismos patogénicos. Para llevar a cabo estas funciones, los neutrófilos emplean una serie de mediadores que promueven la inflamación y lesionan el tejido hepático y a los hepatocitos (Figura 4). Diversas situaciones que producen lesión hepática, como la isquemia-reperfusión, el shock endotóxico y la toxicidad del α -naftilisotiocianato, tienen un componente común que depende de los neutrófilos. Por ejemplo la exposición sistémica de ratas a la endotoxina de bacterias gram negativas, conlleva la lesión hepática. Esta lesión hepática incluye la muerte por necrosis de los

hepatocitos y en el interior de las zonas necrosadas se concentran los neutrófilos. Estos leucocitos se acumulan en el hígado en momentos previos a la iniciación de la lesión y aparecen después dentro de las lesiones y en las áreas que las rodean. Si se inhibe la actividad de los neutrófilos, se previene, no sólo su acumulación, sino que se reduce de manera notable cualquier signo de lesión hepatocelular. Por todo ello, se considera hoy que los neutrófilos se encuentran implicados en la génesis de la lesión hepatocelular.

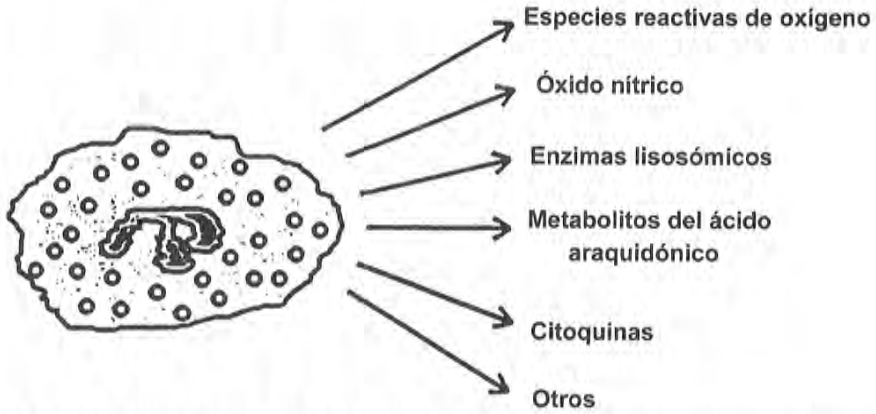


FIGURA 4. Factores derivados de los neutrófilos que son potencialmente citotóxicos.

Para que tal lesión ocurra tienen que verificarse una serie de acontecimientos:

1. La acumulación de los neutrófilos en el hígado. Esto implica un cambio en la relación entre los neutrófilos y las células de la microvasculatura hepática, que va a permitir a los neutrófilos detenerse y adherirse a la superficie de las células endoteliales. La migración de los neutrófilos a través del endotelio, los coloca en contacto con otras células.
2. Se necesita un estímulo que active a estos fagocitos para liberar mediadores que conduzcan directa o indirectamente a la destrucción de las células parenquimáticas (hepatocitos)

Los neutrófilos cuando se encuentran en estado quiescente, fluyen a través de los sinusoides y ruedan a lo largo de la superficie de las células endoteliales (Figura 5) Este fenómeno se controla por moléculas de adhesión denominadas selectinas. Uno de los mayores estímulos que conducen a la migración de los neutrófilos hacia un lugar determinado, es la expresión de moléculas de adhesión, por parte de los neutrófilos y de las células endotelia-

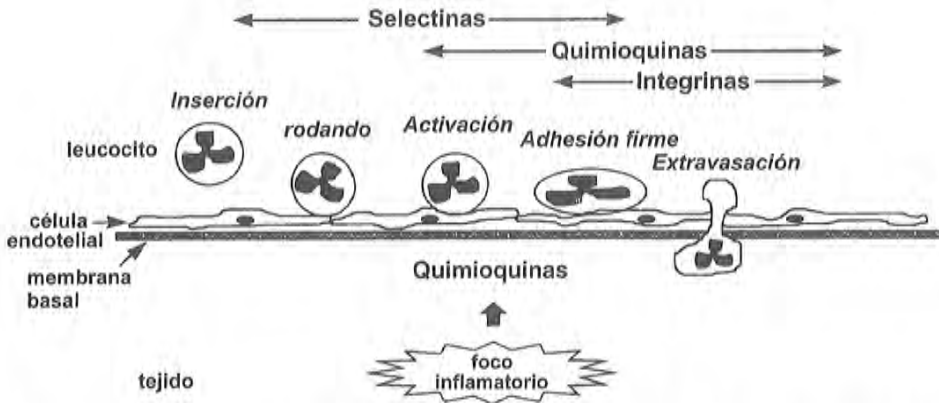


FIGURA 5. Proceso de extravasación de los neutrófilos desde la sangre hacia el tejido inflamado. En la secuencia del proceso intervienen los siguientes eventos: inserción, rodamiento, activación, adhesión firme y extravasación (52).

les. En las interacciones neutrófilo-célula endotelial intervienen tres familias de moléculas de adhesión: las *selectinas*, las *integrinas* y la superfamilia de las *immunoglobulinas*. Las dos etapas en las que se sostiene la migración transendotelial son, en primer lugar, el estímulo proinflamatorio inducido por liberación de la selectina CD62-L y en segundo lugar, la expresión incrementada de la $\beta 2$ integrina CD11b/CD18 en la superficie de los neutrófilos. La expresión alterada de estas moléculas de adhesión puede así influenciar la migración de los neutrófilos y llevar a una liberación inapropiada de especies reactivas de oxígeno que inician la lesión tisular. En hepatitis alcohólica severa se ha observado que existe una asociación entre la activación de los neutrófilos y alteraciones de las citoquinas proinflamatorias (43).

Para que tal lesión ocurra es necesario que tengan lugar los acontecimientos siguientes:

1. Los neutrófilos han de acumularse en el hígado. Esto implica un cambio en la relación entre neutrófilos y las células microvasculares que permiten a los neutrófilos detenerse y adherirse a las paredes celulares.
2. La migración a través del endotelio pone en contacto a los neutrófilos con otras células; este contacto puede ser un requisito importante para la muerte celular *in vivo*.
3. Posteriormente se necesita un estímulo que active estos neutrófilos (fagocitos) para liberar mediadores que conduzcan directa o indirectamente a la lesión tisular.

tamente a la muerte celular de las células parenquimáticas. La mayoría de las evidencias sugieren que todas estas etapas se necesitan para llegar a la lesión hepática.

Los neutrófilos quiescentes no solo fluyen por el sinusoides, sino que tienden a rodar por la superficie de las células endoteliales. Este rodar está controlado por las moléculas de adhesión denominadas selectinas (Figura 5). La relación entre los neutrófilos y el endotelio puede cambiar con una alteración en los tipos de moléculas de adhesión expresadas por estas células, de tal modo que la expresión de integrinas lleva a la parada y migración de los neutrófilos en los lechos vasculares. Aunque las interacciones entre las células endoteliales y los neutrófilos, mediadas por moléculas de adhesión, pueden ser críticas para la patogénesis de la enfermedad hepática inflamatoria, evidencias recientes sugieren que los neutrófilos se relacionan también con los lipocitos contribuyendo a su capacidad para contraerse y alterar el flujo sanguíneo sinusoidal.

Se ha demostrado que en la patogénesis de la lesión hepática las células de Kupffer y los neutrófilos pueden contribuir significativamente en diversas toxicidades inducidas por agentes químicos. En ausencia de estímulo inflamatorio el contacto de los neutrófilos con el endotelio se verifica al azar y los neutrófilos circulantes no se adhieren al endotelio vascular. Sin embargo, cuando existe un foco inflamatorio, la emigración de los neutrófilos ocurre en las vénulas postcapilares, una región especializada del árbol vascular sistémico. El primer evento es la disminución de la velocidad de los neutrófilos (marginación), en el interior de la vénula, donde los leucocitos ruedan a lo largo de la pared del vaso, sobre la superficie del endotelio, a velocidades de 50 mm/s. La marginación de los neutrófilos o el rodar sobre el endotelio, se verifica por mediación de tres miembros de la familia de selectinas y sus respectivos ligandos. Después de rodar, muchos neutrófilos se adhieren firmemente al endotelio, se activan y cambian la forma de esférica a aplastada. A menudo se observan agregados neutrófilo-neutrófilo o neutrófilo-plaqueta. Para que la adhesión de los neutrófilos resulte firme, se requiere la activación de la familia de integrinas C18, resultando en la unión a una de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1). Una vía importante para la activación de las integrinas, es la interacción de los neutrófilos con moléculas estimuladoras de la superficie de las células endoteliales, tales como el factor activador de las plaquetas (PAF) y la interleuquina 8 (IL-8). El PAF, que se encuentra presente en la superficie endotelial, puede activar a los neutrófilos y regular a Mac-1 (integrina dominante en los neutrófilos) (44). Los neutrófilos adherentes migran entonces, a través de las uniones de las células endoteliales, al

interior de la región entre el endotelio y su membrana basal en el espacio de Disse. Después de una breve pausa en su localización los neutrófilos migran al interior del tejido que los rodea. Esta trans migración depende de las integrinas $\beta 2$ (LFA-1, Mac-1) y la molécula intercelular de adhesión (ICAM-1)(45).

La interacción colectiva entre las células se encuentra mediada por diferentes familias de ICAM, que son miembros relacionados estructuralmente con la superfamilia genética de las inmunoglobulinas y son ligandos de las integrinas $\beta 2$, presentes en los neutrófilos. De las cinco ICAM identificadas, la ICAM-1 es la más estudiada. Aunque la ICAM-1 se expresa constitutivamente en las células endoteliales y en algunos linfocitos y monocitos, su expresión puede elevarse en presencia de citoquinas y especies reactivas de oxígeno. Dependiendo del tipo celular, la ICAM-1 participa en una serie de funciones tales como: el tráfico de las células inflamatorias, la interacción célula-célula durante la presentación del antígeno, la patogénesis microbiana y la transducción de señales (46) (Figura 6).

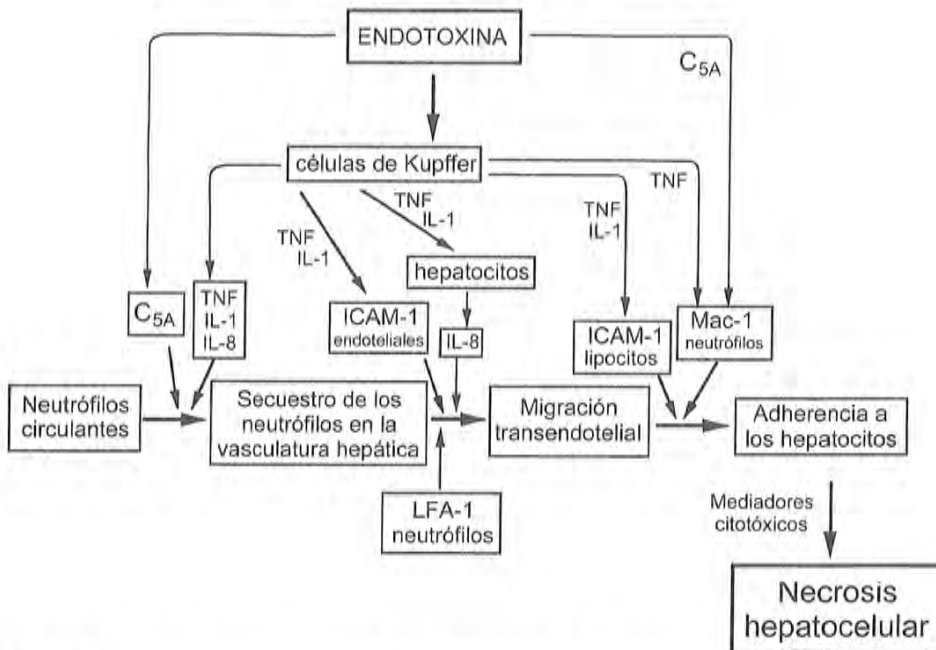


FIGURA 6. Lesión hepática inducida por exposición a la endotoxina. C5A, complemento; TNF, factor de necrosis tumoral; IL-1 e IL-8, interleuquinas 1 y 8; LFA-1, Integrina dominante en los neutrófilos; ICAM-1 = molécula de adhesión intercelular; Mac-1, integrina dominante en los neutrófilos.

En resumen, la lesión hepática inducida por los neutrófilos *in vivo* es un proceso multiescalonado que comprende las siguientes etapas:

1. regulación de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM),
2. secuestro de los neutrófilos en la vasculatura hepática,
3. extravasación y
4. citotoxicidad dependiente de la adherencia (42)

Lipocitos y enfermedad hepática inflamatoria

La respuesta a la lesión tisular comprende una serie de eventos relativamente similares en todos los tejidos, aunque cada órgano contiene células especializadas y distintas matrices extracelulares que imparten especificidad. El reclutamiento de células inflamatorias es el primer acontecimiento que ocurre después de la lesión y se dirige a neutralizar los agentes lesivos y eliminar el tejido necrótico. A esto le sigue la proliferación y la migración de las células miofibroblásticas que penetran en la zona lesionada (herida) y segregan la matriz extracelular. En una tercera fase la matriz extracelular se remodela y la regeneración de las células parenquimáticas reconstituye la arquitectura normal del tejido. En casos de lesión crónica prolongada estas tres etapas ocurren simultáneamente y sin coordinación dando lugar a inflamación crónica con disfunción del órgano. El hígado puede considerarse como un ejemplo clásico de modelo de cicatrización del tejido (47).

Después de una hepatitis aguda, el hígado retorna a su arquitectura y función normales una vez que son eliminados el virus o la hepatotoxina desencadenantes. Por el contrario en la hepatitis crónica o durante el alcoholismo crónico, la presencia concomitante de inflamación y deposición de matriz extracelular, unidas a un proceso de regeneración anormal, conducen a fibrosis y cirrosis.

La participación de los lipocitos en la respuesta de cicatrización de la lesión se ha reconocido cuando estas células se identificaron como responsables de la producción de matriz extracelular en hígado lesionado. La regulación de la secreción de la matriz depende de la transición desde un fenotipo quiescente acumulador de grasa a células proliferantes activas similares a miofibroblastos responsables de diversos mediadores solubles en un

proceso denominado «activación» (48). En fechas posteriores se ha esclarecido que los lipocitos desempeñan otros papeles importantes en la fisiopatología hepática. Así, los lipocitos regulan el flujo sanguíneo sinusoidal, debido a sus propiedades contráctiles y pueden contribuir a la hipertensión portal durante la enfermedad hepática crónica. Además, se ha descrito también la posible activación de los lipocitos durante la carcinogénesis hepática (49).

La capacidad de los lipocitos de modular la inflamación hepática es un aspecto relativamente nuevo que se puede relacionar con otros papeles de estas células, especialmente con aquellos relacionados con la fibrogénesis hepática. Los lipocitos están situados en el espacio de Disse, espacio situado entre el revestimiento endotelial y los hepatocitos, una localización que es compatible con un papel en el reclutamiento de leucocitos y su objetivo hacia los hepatocitos lesionados. La infiltración de los leucocitos en un tejido es un proceso complejo y multiescalonado (Figura 5). En respuesta a la lesión, los leucocitos se encuentran insertos en la pared de los vasos mediante adhesiones lábiles, que les permite rodar en dirección al flujo sinusoidal. Este proceso es único y está mediado por moléculas de adhesión de la familia de las selectinas localizadas en las células endoteliales. Las selectinas contienen un dominio lectina y reconocen un carbohidrato sialilado determinante de su contrareceptor expresado por los neutrófilos (50). La interacción dependiente de selectina de baja afinidad se convierte en unión de elevada afinidad mediante la acción de las quimioquinas (citoquinas quimiotácticas), que se producen en el lugar de lesión tisular. Las quimioquinas establecen un gradiente que rodea el foco inflamatorio y pueden ser retenidas sobre los componentes de la matriz extracelular y sobre la superficie de las células endoteliales (51). La interacción de los neutrófilos con las quimioquinas activa los receptores de las integrinas, lo cual produce una adherencia firme y una extravasación vía unión a las moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que funcionan como ligandos de las integrinas. Una característica clave de este proceso es que las interacciones entre selectinas-carbohidrato, quimioquina-receptor e integrina-inmunoglobulina se verifican secuencialmente, no en paralelo, proporcionando así las bases para la especificidad del reclutamiento de los neutrófilos para un estímulo dado, que depende del panel de moléculas que se han activado (52) (Figura 5).

En las reacciones de inflamación se verifican una serie de acciones complejas entre los mediadores proteicos (citoquinas) y los mediadores derivados de lípidos. Un evento importante en la inflamación es la generación de anión superóxido, hecho relacionado con la actividad microbicida y con la lesión tisular (53).

La iniciación, desarrollo, duración y resolución de la respuesta inflamatoria depende en su mayor parte de un grupo de mediadores que se producen a nivel tisular cuando surge «irritación» y daño o también por infiltración de leucocitos (54). La identificación de estos mediadores y el conocimiento de su papel en la inflamación son la base de los intentos, en el pasado y en el presente, para conseguir desarrollar fármacos efectivos en la manipulación inmunofarmacológica de la inflamación en las enfermedades humanas. Los dos tipos de mediadores que han despertado mayor interés son las citoquinas y los ácidos grasos como el ácido araquidónico y los productos de su metabolismo. Hasta el momento no se ha apreciado la relación entre estos dos mediadores con respecto a su capacidad para modificar los efectos de unos y otros sobre las respuestas funcionales de los leucocitos

En algunos tipos de inflamación, especialmente en aquellos asociados con infecciones, el reclutamiento y activación de los neutrófilos, con producción de anión superóxido, contribuye a la lesión tisular. A su vez, la interacción del anión superóxido con el óxido nítrico origina el peroxinitrito un poderoso oxidante. El hallazgo de anticuerpos específicos de la nitrotirosina en pulmón de humanos, que han muerto de síndromes respiratorios y neumonía, apoya el concepto que el anión superóxido juega un papel en la patogénesis de estas enfermedades. Además, los oxidantes pueden activar la fosfolipasa A_2 con liberación de ácido araquidónico

Las citoquinas son los mayores reguladores de la respuesta inflamatoria del organismo. Actúan sobre los receptores de la superficie celular para inducir una variedad de actividades características de una reacción inflamatoria. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) es una de las citoquinas con efectos pleiotrópicos, a la que se ha acreditado la propiedad de alterar la actividad de los leucocitos fagocíticos. Durante la estimulación celular, como resultado de la activación de la fosfolipasa A_2 , se genera ácido araquidónico. Una serie de investigaciones han demostrado que el ácido araquidónico ejerce una gran influencia en las respuestas de los leucocitos, estimulando la producción de radicales de oxígeno, la liberación de los enzimas de los gránulos, elevando la adherencia y la lesión del endotelio e inhibiendo la migración celular (50). Cuando los neutrófilos se tratan con TNF y ácido araquidónico, se observa una respuesta sinérgica sobre la generación de superóxido, lo cual puede representar un mecanismo amplificador de la respuesta inflamatoria

¿Por qué mecanismos los neutrófilos producen citotoxicidad en los hepatocitos, cuando alcanzan el parénquima hepático? En los mecanismos

por los cuales los neutrófilos estimulados causan lesión en los hepatocitos, intervienen los mediadores liberados por los propios neutrófilos después de la activación. Las especies reactivas de oxígeno liberadas por acción de la NADPH oxidasa de la membrana de los neutrófilos activos no son capaces por sí solas de lesionar los hepatocitos, ya que estas células se encuentran muy bien equipadas con mecanismos de defensa antioxidante. Tampoco la protección del glutatión impidió la agresión citotóxica de los neutrófilos. Se sugirió que el óxido nítrico fuera el mediador de la citotoxicidad, pero la inhibición o la inducción de la síntesis del NO no mostró efecto alguno sobre la citotoxicidad. Incluso se observó que la formación de NO *in vivo* resultaba beneficiosa por mejorar el flujo sanguíneo microvascular (55). Otro candidato, el TNF α , fue eliminado como único candidato de la respuesta citotóxica de los neutrófilos, ya que la neutralización de la actividad de esta citoquina mediante su anticuerpo no alteró la respuesta citotóxica (56).

Los neutrófilos contienen unos gránulos (de ahí su denominación de granulocitos), que acarrean enzimas proteolíticas, los cuales tienen la capacidad de lesionar proteínas intracelulares o componentes de membrana. Es probable que una o más de estas proteasas sean importantes en la citotoxicidad de los neutrófilos, porque el ensayo *in vitro* con un inhibidor de una proteasa neutra, atenuó la respuesta citotóxica de neutrófilos activados con el éster de forbol PMA (57). Entre los tres enzimas específicos lisosómicos derivados de los neutrófilos: la mieloperoxidasa, la catepsina G y la elastasa, ensayados por Ho et al., (58), se descartó la mieloperoxidasa. Fracciones de las otras dos proteasas: la catepsina G y la elastasa fueron citotóxicas para los hepatocitos y sus toxicidades fueron aditivas.

De todos estos resultados puede concluirse que, cuando los neutrófilos se activaron *in vitro* con PMA, su potencial citotóxico no fue debido a las especies reactivas de oxígeno, ni al NO ni al TNF α . La catepsina G y la elastasa, dos enzimas proteolíticas, fueron los factores que contribuyeron a la lesión, aunque los otros factores pueden estar también implicados (Figura 7).

Una parte de la respuesta celular a las toxinas, a las situaciones de estrés físico y a las citoquinas inflamatorias ocurre a través de la vía de las proteína quinasas activadas por el estrés (SAPK stress activated protein kinases) y por las vías que reactivan la quinasa p38. Esto ocasiona la modificación de la expresión genética celular. Estas vías proteína quinasas que responden a situaciones de estrés son estructuralmente similares, pero funcionalmente diferentes del arquetipo proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK o ERK). La vía ERK es una cascada jerárquica que se origina en la membrana

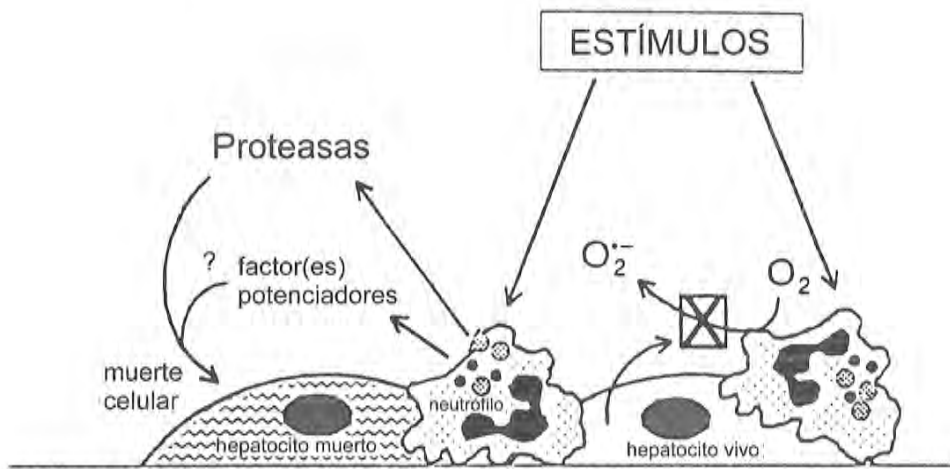


FIGURA 7. Posibles mecanismos de la citotoxicidad de los hepatocitos *in vitro* mediada por neutrófilos. La activación de los neutrófilos de rata por adición de un estímulo, causa la liberación de enzimas proteolíticos contenidos en los gránulos de los neutrófilos. Estos enzimas actúan concertadamente con otros factores para lesionar los hepatocitos. Por otro lado los hepatocitos sanos (vivos) liberan factores que inhiben la capacidad de los neutrófilos para responder al estímulo con la liberación del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$).

celular con receptores para mitógenos o factores del crecimiento, las cuales reclutan, vía proteínas adaptativas y factores de intercambio, a la pequeña guanosina trifosfatasa (GTPasa), producto del gen *ras*. Ras activa a raf, una quinasa de serina y treonina, que a su vez activa a MEK (MAPK/ERK quinasa). MEK fosforila y activa a ERK1 y ERK2 que se traslocan al núcleo y activan a factores de transcripción, que actúan sobre la expresión de genes implicados en la promoción del crecimiento, en la diferenciación o en la mitosis. Mediante la transducción de señales a través de una cascada de kinasas, se introducen diversas opciones para amplificar y/o modificar la señal de salida. Las vías de la SAPK y la p38 se disponen también de manera jerárquica, pero se sabe menos de los componentes anteriores y de los efectos posteriores de estas vías. Entre los procesos modulados por las vías que responden al estrés están la apoptosis, el desarrollo, la activación inmune, la inflamación y la adaptación a cambios ambientales

La inflamación aguda es una respuesta múltiple que se desencadena frente a la invasión microbiana o a la pérdida de la integridad tisular. Para la iniciación, progresión y resolución de la inflamación se requieren: cambios en la permeabilidad vascular; reclutamiento y activación de células inflamatorias e inmunes; generación de intermediarios activos de oxígeno y digestión de la matriz intercelular y su reparación. Las cascadas de proteína

quinasas activadas por el estrés en conjunción con otras vías señalizadoras tales como la vía ERK (extracellular regulated kinase) y las NFκB, juegan papeles prominentes en la iniciación y propagación de la inflamación.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Larrey D (2000) Drug-induced liver disease. *J Hepatol* **32** (suppl 1) 77-88
2. Larrey D y Pageaux GP (1997) Genetic predisposition to drug-induced hepatotoxicity. *J Hepatol* **26**, 12-21
3. Pessayre D (1995) Mecanisme des hepatites medicamenteuses. *Gastroenterol Clin Biol* **19**, B47-B56
4. Cascales M, Zaragoza A, Díez-Fernández C y Fernández-Simón L (1997) Metabolismo oxidativo de la cocaína en hígado. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (ed Cascales M), **Monografía IV**, pp 287-309. Real Academia de Farmacia y Fundación José Casares Gil. Madrid
5. Sanz N, Andrés D y Cascales M (1997) Hepatotoxicidad de la Ciclosporina A, Fármaco de elección en la terapia de los trasplantes. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (ed Cascales M), **Monografía IV**, pp 311-335. Real Academia de Farmacia y Fundación José Casares Gil. Madrid
6. Omura T, Sato R y Cooper DY (1965) Function of cytochrome P-450 on microsomes. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* **24**, 1181-1189
7. Remmer H (1972) Induction of drug metabolising enzyme system in the liver. *Eur J Clin Pharmacol* **5**, 116-136
8. Pessayre D. (1993) Cytochromes P-450 et formation de metabolites reactifs. *Therapie* **48**, 537-548.
9. Colomb V, Petit J, Matheix-Fortunet, Hecketsweiler B, Kaeffer N, Lerebours E, Colín R y Lemeland JF. (1995) Influence of antibiotics and food intake on liver glutathione and cytochrome P-450 in septic rats. *Br J Nutr* **734**, 99-110
10. Edwards S y Westerfeld WW (1952) Blood and liver glutathione during deprivation. *Proc Soc Exp Biol Med*, **79**, 57-59.
11. Pessayre D, Dolder A., Artigou JY y Wandsheer JC (1979) Effect of fasting on metabolite-mediated hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology* **77**, 264-271
12. Hum S, Koski KG y Hoffer LJ (1992) Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *J Nutr* **122**, 2010-2018.
13. Cho EI, Sahyoun N y Stegink LD (1981) Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J Nutr* **111**, 914-922.
14. Lee WM (1995) Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* **333**, 1118-1127
15. Makin AJ, Wendon J, Williams R (1995) A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993) *Gastroenterol* **109**, 1907-1916

16. Whitcomb DC y Block GD (1994) Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA* **272**, 1845-1850
17. Crippin JS (1993) Acetaminophen hepatotoxicity: potentiation by isoniazid. *Am J Gastroenterol* **88**, 590-592
18. Clarke JB, Lind RC y Gandolfi AJ (1992) Mechanisms of hepatotoxicity of volatile anesthetics. En, *Advances in Anesthesia* (eds Stoelting RK, Barash PG Y Gallagher TJ) **vol 10**, pp 219-246, Mosby-Year Books Inc., St Louis Missouri.
19. Nebert DW, Nelson DR, Conn MN et al., (1991) The cytochrome P-450 superfamily: uptodate on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* **10**, 1-14.
20. Ballet F (1997) Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions *J Hepatol* **26**, 26-36.
21. Farrell GC (1997) Drug-induced hepatic injury. *J Gastroenterol & Hepatol* **12 (suppl.)**, S242-250
22. Dansette PM, Bonierbale E, Minoletti C, Beaune PH, Pessayre D y Mansuy D (1998) Drug-induced immunotoxicity. *Eur J Drug Metabolism & Pharmacokinetics* **23**, 443-451
23. Berson A, Fromenty B, Lettéron P, Pessayre D (1998) Rôle des mitochondries dans l'hépatotoxicité des médicaments. *Gastroenterol Clin Biol* **22**, 59-72
24. Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D y Fromenty B (1999) Hepatotoxicity due to mitochondrial disfunction. *Cell Biol Toxicol* **15**, 367-373
25. Harrison PM, Wendon JA, Gimson AES, Alexander GJM, Williams R (1991) Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* **324**, 1852-1857.
26. Broughan TA y Soloway RD (2000) Acetaminophen hepatotoxicity. *Dig Dis Sci* **45**, 1553-1558
27. Zimmerman HJ y Maddrey WC (1995) Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instance of therapeutic misadventure *Hepatology* **22**, 767-773,
28. Henderson CJ, Wolf CR, Kitteringham N, Powell H, Otto D y Park BK (2000) Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione transferase Pi. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **97**, 12741-12745.
29. Bauer I, Vollmar B, Jaeschke H, Rensing H, Kraemer T, Larsen R y Bauer M (2000) Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J Hepatol* **33**, 395-406.
30. Lucas AM, Hennig G, Dominick PK, Whiteley HE y Roberts JC (2000) Ribose cysteine protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Toxicol Pathol* **28**, 697-704

31. Chen C, Hening GE, Whiteley HE, Corton JC y Manautou JE (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha null mice lack resistance to acetaminophen hepatotoxicity following clofibrate exposure. *Toxicol Sci* **57**, 338-344
32. Beaune PH y Lecoeur S (1997) Immunotoxicology of the liver: adverse reactions to drugs. *J Hepatol* **26** (suppl 1) 37-42
33. Kenna JG, Martin JL y Pohl LR (1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver microsomal fraction from halothane-treated rats. *Biochem Pharmacol* **44**, 621-629.
34. Satoh H, Gillette JR, Davies HW, Schulick RD y Pohl LR (1985) Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P450 in the liver of halothane-treated rats. *Mol Pharmacol* **28**, 469-474.
35. Manno M, Ferrara R, Cazzaro S, Rigotti P y Ancona E (1992) Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane in vitro. *Pharmacol Toxicol* **70**, 13-18.
36. Mehendale HM, Roth RA, Gandolfi AJ, Klaunig JE, Lemasters JJ y Curtis LR (1994) Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J* **8**, 1285-1295
37. Clarke JB, Chen ML, Thomas C y Gandolfi AJ (1993) Enflurane produces cytosolic and microsomal liver adducts in the guinea pig crossreactive with halothane induced antibodies. *Toxicologist* **13**, 359
38. Gut J, Christen U Y Huwyler J (1993) Mechanisms of halothane toxicity: novel insights. *Pharmacol & Ther* **58**, 133-155.
39. Poupon R, Homberg JC, Abuaf N, Petit J, Bodin F y Darnis F (1980) Atteintes hépatiques dues á l'acide tiénilique. Six observations avec présence d'anticorps antireticulum endoplasmique. *Nouv Presse Med* **9**, 1881-1884.
40. Westphal JF y Brogard JM (1997) Drug administration in chronic liver disease. *Drug Safety* **17**, 47-73.
41. Schernker S, Martin RR y Hoyumpa AM (1999) Antecedent liver disease and drug toxicity. *J Hepatol* **31**, 1098-1105
42. Jaeschke HJ, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE y Roth RA (1996) Mechanisms of inflamatory liver injury: Adhesión molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol & Applied Pharmacol* **139**, 213-226.
43. Taïeb J, Mathurin P, Elbim C, Cluzel P, Arce-Vicioso M, Bernard B et al., (2000) Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticoids. *J Hepatol* **32**, 579-586.
44. Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ y Gauldie J (1994) Cytokine expression by neutrophils and macrophages *in vivo*: Endotoxin induces tumor necrosis factor- α , macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 β , mRNA expression in acute lung inflammation *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 148-153

45. Smith CW (1992) Transendotelial migration. En: *Adhesion: its role in inflammatory diseases* (eds Harlan JM y Liu DY) pp 85-115. Freeman, Nueva York.
46. Hubbard AK y Rothlein R (2000) Interceliular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Rad Biol Med* **28**, 1379-1386.
47. Marra F (1999) Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* **31**, 1120-1130
48. Friedman SL (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* **328**, 84-92
49. Olaso E, Santisteban A, Bidaurrezaga J, Gressner AM, Rosenbaum J y Vidal-Vanaclocha F (1997) Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* **26**, 634-642
50. Rosen SD (1993) Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immunol* **5**, 237-247
51. Luster AD (1998) Chemoquines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**, 436-445
52. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314
53. Li Y, Ferrante A Poulos A y Harvey DP (1996) Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono polyunsaturated fatty acids. *J Clin Invest* **97**, 1605-1609
54. Gallin JI, Goldstein IM Y Snyderman R (1988) *Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates*. p 995. Raven Press Ltd, Nueva York.
55. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A y Jaeschke H (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* **4**, 282-288
56. Hewett JA, Jean P, Kunkel SL y Roth RA (1993) Relationship between tumor necrosis factor- α and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *Am J Physiol* **265**, G1011-G1015
57. Ganey PE, Bailie MB, VanCise S, Madhukar BV, Robinson JP y Roth RA (1994) Activated neutrophils from rat injured isolated hepatocytes. *Lab Invest* **70**, 53-60
58. Ho JS, Buchweitz JP, Roth RA y Ganey PE (1996) Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes. *J Leukocyte Biol* **59**, 716-724

REGENERACIÓN HEPÁTICA

SUMARIO

1. Introducción
2. Regeneración hepática inducida por hepatotóxicos
3. Factores implicados en la transición al estado proliferativo
4. Ciclo de división celular
5. Células progenitoras en la regeneración hepática
6. Factores de transcripción y expresión de genes tempranos inmediatos
7. Mecanismos reguladores de la proliferación celular. Factores del crecimiento
8. Modulación de la matriz extracelular durante la regeneración hepática
9. Perspectivas futuras
10. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

La regeneración hepática es un proceso surgido a lo largo de la evolución para proteger a los animales de los catastróficos resultados de la necrosis hepática causada por efecto de las toxinas de las plantas que les servían de alimento. Este extraordinario proceso ha sido objeto de la curiosidad de los científicos de todos los tiempos. Ya en la antigua Grecia, el mito de Prometeo encadenado en las montañas del Cáucaso, mientras un águila le devoraba cada día las entrañas, que se regeneraban durante la noche, tiene su base en el reconocimiento entonces de la regeneración hepática.

El hígado puede regular de manera precisa su crecimiento y su propia masa. La resección quirúrgica de los lóbulos hepáticos o la pérdida de los hepatocitos causada por agresión tóxica o vírica, desencadena la replicación de los hepatocitos, mientras que la hiperplasia hepática se corrige por apoptosis. Los hepatocitos poseen una gran capacidad replicativa que les permite restaurar con gran rapidez la población celular perdida. Cuando

esta capacidad de replicación se bloquea o simplemente se retrasa, células similares a las progenitoras pueden proliferar.

La capacidad del hígado para regenerarse después de lesión severa grave inducida por agentes necrogénicos o por hepatectomía parcial, ha supuesto un tema de gran interés para los investigadores. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la proliferación hepática, pero se desconoce aún la naturaleza exacta de los estímulos implicados en la iniciación y progresión del ciclo celular y en el cese de la proliferación.

Las resecciones quirúrgicas en humanos tienen lugar en casos de trasplantes o de eliminación de tumores. El trasplante de un hígado pequeño a un recipiendario adulto es un ejemplo de deficiencia funcional hepática (1). Los ejemplos más típicos de deficiencia funcional derivan de la necrosis celular y tisular, sin alteración de la masa hepática, que ocurre en casos de muerte masiva de los hepatocitos ocasionada por la acción de agentes hepatotóxicos (fármacos y xenobióticos) o de virus (2). En todas estas condiciones los hepatocitos quiescentes experimentan una transición al estado proliferativo, replican su DNA y se dividen para restaurar la capacidad funcional del hígado y su masa, en caso de resección quirúrgica. La capacidad funcional, es sin embargo, un parámetro relativo, ya que la regulación del crecimiento se basa en el cociente entre la masa hepática y la masa corporal. El valor óptimo de este cociente indica que el hígado ha alcanzado un estado en el cual puede realizar el trabajo metabólico necesario para atender las demandas funcionales del organismo.

La regulación de la masa y función hepáticas no se manifiesta solamente por control del crecimiento, ya que cuando la masa excede de los requerimientos funcionales del organismo, el hígado ha de perder dicha masa (células), para restaurar el cociente hígado/cuerpo. Esto sucede en casos de hiperplasia o hipertrofia inducida por fármacos estimuladores del crecimiento celular (fenobarbital), una vez que finaliza el tratamiento terapéutico. La eliminación del estímulo del crecimiento causa la muerte celular por apoptosis de los hepatocitos en exceso, hasta la restauración de la masa normal.

2. REGENERACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR HEPATOTÓXICOS

La propiedad del hígado de regular el número de sus células y su crecimiento es única y especialmente notable porque los hepatocitos son células quiescentes, que en estado normal se dividen muy poco. Sin embargo,

a pesar de ello, el hígado no pierde su capacidad proliferativa y su adaptabilidad a demandas metabólicas variables. Son muchas las situaciones en las que tienen lugar alteraciones de la masa hepática. Pérdidas de esta masa ocurren en casos de eliminación quirúrgica del tejido hepático (hepatectomía) y pérdida de células hepáticas acompañada por una deficiencia funcional es la causada por agentes químicos hepatotóxicos y por virus.

La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en el hígado cuando una hepatotóxina ingresa en el organismo puede resumirse de la siguiente manera:

AGENTE TÓXICO (FÁRMACO) →
BIOTRANSFORMACIÓN →
ESPECIE QUÍMICA REACTIVA + ROS →
MUERTE CELULAR (APOPTOSIS Y/O NECROSIS) →
TRANSICIÓN DEL ESTADO QUIESCENTE AL PROLIFERATIVO →
PROLIFERACIÓN HEPATOCELULAR →
REGENERACIÓN TISULAR →
RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

El primer paso en esta secuencia es la biotransformación del tóxico en especies químicas reactivas producto de la acción de las monooxigenasas microsomales de función mixta dependientes del citocromo P-450 o de flavina. Estas especies son las que van a desencadenar la toxicidad. Entre estas especies cabe distinguir:

- (a) los compuestos electrofílicos, productos de la biotransformación de hepatotóxicos tales como la tioacetamida, el acetaminofeno, etc;
- (b) radicales libres derivados de sustancias como el tetracloruro de carbono y
- (c) especies activas de oxígeno (ROS) formadas por adición de electrones al oxígeno molecular.

La forma básica de la respuesta hepática ante la presencia de un tóxico es la inducción de los sistemas enzimáticos relacionados con su metabolismo lo cual acelera su transformación y con ello su hepatotoxicidad. La

generación de especies reactivas promueve la disminución del glutatión intracelular, la elevación del calcio citoplasmático, la peroxidación lipídica de las membranas y una serie de reacciones encadenadas que traen consigo la desaparición del glucógeno, la disminución del ATP y el descenso del estado energético de la célula hepática. Esta serie de eventos origina, previa activación de proteasas y lipasas, la destrucción de la membrana y la muerte celular. La elevación sostenida del calcio citoplasmático se asocia con la activación de enzimas dependientes del calcio, como la fosfolipasa A₂, la glucógeno fosforilasa, las endonucleasas, etc, que provocan la ruptura de la membrana plasmática y la fragmentación de la molécula del DNA (apoptosis). Por otro lado, las elevaciones transitorias del calcio intracelular intervienen en la progresión de la división celular en las transiciones G1 → S y G2 → M. Inmediatamente después de la muerte celular se inicia la proliferación hepatocelular para restablecer las poblaciones celulares que han sido destruidas y con ello restaurar la función hepática. En caso de ausencia de proliferación celular, la lesión celular progresa y puede conducir a la muerte del organismo (Figura 1).

2. FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSICIÓN AL ESTADO PROLIFERATIVO

El hígado puede restaurar la pérdida de sus propias células mediante el mecanismo de regeneración hepatocelular, capacidad considerada de relevancia fisiológica en numerosas enfermedades hepáticas, tales como hepatitis aguda, vírica y alcohólica, alteraciones metabólicas o cirugía hepática. El modelo de regeneración hepática mejor estudiado se basa en la hepatectomía parcial de un 70% del hígado en ratas (3). En este modelo los hepatocitos remanentes sufren una transición desde el estado quiescente al proliferativo y entran en el ciclo celular de manera sincrónoma. La síntesis del DNA comienza a las 12 - 16 horas después de la hepatectomía y alcanza su máximo a las 24 - 48 horas. La iniciación de la mitosis se registra 6 a 8 horas más tarde que la síntesis del DNA. Tres días después de la hepatectomía, la masa celular original del órgano se encuentra casi restaurada. Sin embargo, en este momento de la regeneración hepática, la histología del hígado difiere sustancialmente de la normal. Los hepatocitos se encuentran agrupados formando racimos no vascularizados de 12 a 15 células y la cantidad de matriz extracelular se encuentra claramente disminuida como consecuencia de que la proliferación de los hepatocitos se ha verificado sin una simultánea síntesis de esta matriz. A partir de este momento, la intensidad de la proliferación de los hepatocitos decae y los lipocitos migran al interior de los racimos. Es ahora cuando se comienzan a formar nuevos

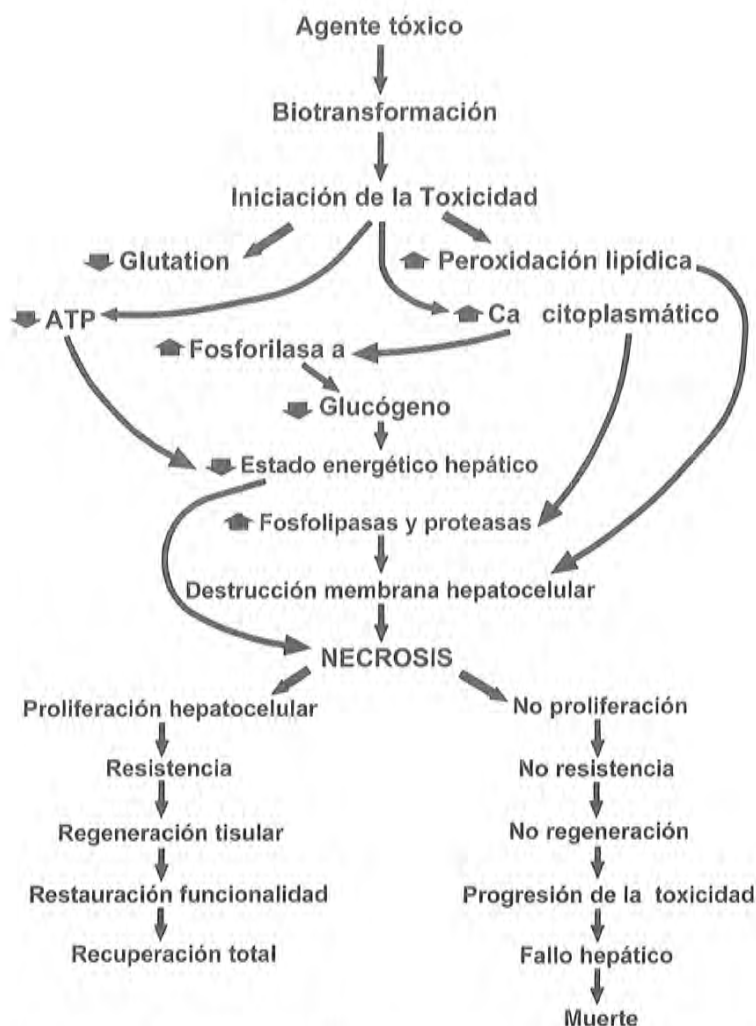


FIGURA 1. Esquema que muestra los diferentes eventos que sufre un agente tóxico que conducen a la muerte celular por necrosis. A partir de aquí, la regeneración celular y tisular conlleva la recuperación total del órgano y la supervivencia del organismo. Un fallo en los mecanismos que desencadenan la proliferación celular puede ser causa de la muerte del organismo (2).

ramales vasculares y la histología hepática normal se restablece a los 8 - 10 días de la operación.

La activación de factores de transcripción preexistentes en forma latente, parece que juega un papel primordial en el establecimiento de la competencia proliferativa en los hepatocitos, es decir en el paso del estado quiescente normal al estado proliferativo (4, 5). Esta transición se verifica por

inducción de varios genes tempranos inmediatos relacionados con el ciclo celular. El factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en la regeneración hepática en base a una fuerte inducción de la unión del NF- κ B al DNA (6). Uno de los inductores más potentes del NF- κ B es el TNF α , citoquina que parece intervenir en la proliferación celular debido a las siguientes observaciones (7-9):

1. los anticuerpos anti-TNF α inhiben la regeneración hepática post-hepatectomía;
2. se ha detectado un incremento rápido del mRNA del TNF α durante la proliferación hepática inducida por mitógenos y
3. tratamientos repetidos con TNF α recombinante inducen la proliferación hepática *in vivo*

Esta notable respuesta del hígado frente a la agresión tóxica necrogénica puede ser considerada como el principal mecanismo de defensa. Mediante la inducción de la proliferación de los hepatocitos remanentes, el hígado está capacitado para recuperar su masa y celularidad inicial. Durante mucho tiempo se ha creído que la deficiencia en la masa hepatocelular era el agente desencadenante de la expansión de las células remanentes, pero en caso de hígado de ratón transgénico con una supresión somática (10), se inicia la regeneración sin que existan cambios en el peso o en el número de células hepáticas, lo que indica que el agente desencadenante tiene que ser algún indicador de la función hepática y que sólo cuando la masa hepática satisface la demanda de funcionalidad es cuando la proliferación celular cesa, en respuesta a la señal que indica que la regeneración está completa. El fenotipo hepático demuestra el notable potencial proliferativo de las células hepáticas, ya que sólo unos pocos hepatocitos podrían efectivamente repoblar el órgano completo.

El modelo de ratones transgénicos puede ser utilizado para el estudio de las señales implícitas en la regeneración hepática y en la naturaleza de la respuesta celular, aunque el estímulo más común para la división, que afecta al parénquima hepático, es la pérdida de las propias células del hígado. La pérdida de las células hepáticas puede deberse a tres causas: infección, intoxicación química o hepatectomía parcial. A pesar de la diferencia entre ellas, la respuesta celular es aparentemente la misma en cualquiera de estos tres casos. Como se indicó anteriormente, el modelo más utilizado para el estudio de la respuesta proliferativa sincrónoma se consigue en ratas por hepatectomía de porciones de hígado que pueden llegar

hasta un 70 % del total (3). La regeneración hepática se logra también mediante la administración de agentes químicos hepatotóxicos que producen, según la dosis administrada, diversos grados de necrosis.

La proliferación del parénquima hepático comienza en las zonas periportales y se desplaza posteriormente hacia las áreas perivenosas. De esta manera, en un plazo de 2 a 3 semanas el segmento hepático remanente, recupera tanto el número de células como el peso originario del hígado. En el curso de esta hiperplasia compensatoria, el 90% de los hepatocitos se divide entre las 24 y las 48 horas después de la hepatectomía (11, 12). Para entender la regulación del crecimiento hepático después de la hepatectomía parcial es fundamental conocer los cambios, que tienen lugar en la función del hepatocito. La regeneración hepática *in vivo* presenta una respuesta bifásica. Durante la primera ronda de división, son los hepatocitos las únicas células hepáticas que se encuentran involucradas en la replicación del DNA (fase S con máximo a las 24 horas) y en la actividad mitótica (fase M con máximo a las 30 horas). La segunda ronda mitótica, que es menos sincrónoma, ocurre 24 horas más tarde y en ella participan todas las células hepáticas, parenquimáticas y no parenquimáticas (4). Durante las transiciones proliferativas se verifica la desdiferenciación celular, proceso que implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo. Este estado desdiferenciado es distinto al correspondiente al desarrollo ontogénico o carcinogénico.

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, el hígado sufre un proceso de necrosis hepatocelular infligida por el mecanismo de bioactivación de la toxina. Inmediatamente después, y por mecanismos aún no completamente esclarecidos, el hígado responde estimulando la proliferación y con ello la regeneración hepatocelular. A dosis débiles del hepatotóxico, la necrosis afecta a pocas células y la regeneración tiende a iniciarse a las 6 horas, desapareciendo a las 24 horas los síntomas de lesión. Es frecuente que reaparezca con posterioridad alguna muestra de lesión remanente y que entre las 36 y las 48 horas tenga lugar una segunda fase de división celular (13). La regeneración hepática va unida a la resistencia a la acción citotóxica de agentes químicos. Por tanto, además de la reposición de las células y de la restauración de la morfología hepatolobular, merced a la resistencia que poseen las nuevas células, el tejido hepático se encuentra capacitado para superar la inminencia de una nueva agresión tóxica en las fases posteriores, evitando, por una parte, la expansión de la lesión y por otra, acelerando el proceso de la recuperación total (14). La aparición del *fenotipo resistente* en los hepatocitos es una respuesta adaptativa del hígado frente a una amplia variedad de

xenobióticos. Esta resistencia es un mecanismo de adaptación clonal que surge por expresión del (gen *mdr1*) para sobrevivir en un ambiente hostil, el cual se encuentra involucrado en la promoción tumoral y en la resistencia a la quimioterapia de muchos cánceres humanos (15).

Otra forma de proliferación hepatocelular, es la debida a productos químicos capaces de producir hiperplasia e hipertrofia, como es el caso del fenobarbital, que normalmente, acompaña a la inducción de la actividad enzimática del citocromo P-450, con un aumento en el tamaño del hígado, y en el número de los hepatocitos. Esto no se asocia con una necrosis detectable microscópicamente, o con alteraciones enzimáticas. La hiperplasia se puede reconocer por un incremento en la mitosis y por cambios en el citoplasma que indican que existe una inducción enzimática.

Se ha descubierto un método utilizado como diagnóstico de rutina que permite detectar células en proliferación y evaluar la regeneración hepática en muestras humanas. Este método utiliza anticuerpos monoclonales frente a un *antígeno nuclear de células proliferantes* (PCNA), factor auxiliar de la DNA polimerasa. La detección inmunohistoquímica de este antígeno no depende de la incorporación de marcadores externos, como la bromodesoxiuridina o la timidina tritiada y se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-PCNA pueden aplicarse con éxito a tejidos fijados con formol e incluidos en parafina (16, 17).

3. CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

La proliferación celular en condiciones normales requiere la acción de factores del crecimiento, los cuales promueven la activación ordenada de proteínas reguladoras que controlan la transición a través de la fase G1 del ciclo celular. Después que las células han superado el punto de restricción al final de G1, las células pueden progresar en el ciclo, incluso en ausencia de los factores del crecimiento (18). Es importante, por tanto, conocer las bases bioquímicas que controlan el paso a través del punto de restricción, cuando se quiere profundizar en los mecanismos del ciclo de división celular. Son muchos los estudios que han atribuido a la proteína retinoblastoma (RB) y al factor de transcripción E2F, el papel de mediadores clave del punto de restricción (19). La fosforilación de RB al final de la fase G1, promueve la liberación de E2F, el cual una vez liberado, puede regular la transcripción de genes necesarios para la progresión en la fase S. La fosforilación de RB la realizan complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina (CDK) (20). En muchos tipos celulares la ciclina D1 es la que se regula

durante la fase G1 por acción de los factores del crecimiento. Esta ciclina parece actuar como un mediador clave intracelular de las señales extracelulares tales como las emitidas por mitógenos, que regulan la proliferación. Los complejos de la ciclina D1 con las quinasas cdk4 y cdk6, una vez activados por la quinasa activadora de la ciclina, son capaces de fosforilar a la proteína RB (21) (Figura 2)

En animal adulto, los hepatocitos se encuentran muy diferenciados y realizan numerosas funciones metabólicas esenciales. En hígado normal los hepatocitos raramente se dividen, aunque retienen una capacidad similar a las de las células progenitoras, que se pone de manifiesto en respuesta a agresiones que reduzcan la masa hepática funcional. Es esta una característica de los hepatocitos que los distingue de otros tipos de células parenquimáticas diferenciadas. El control de la proliferación de los hepatocitos en el hígado es un proceso enormemente complejo y todavía no completamente esclarecido, pero estudios recientes en modelos de hepatectomía, están tratando de ofrecer una panorámica más clara de los acontecimientos que promueven la entrada en el ciclo celular (5, 12). La transición G0 - G1 y la progresión al inicio de G1 parece que se encuentra mediada por cambios en la matriz extracelular y por citoquinas entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleuquina 6 (IL-6). La progresión de los hepatocitos al final de G1 se cree que requiere la acción de factores del crecimiento e implica la activación de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina. Los hepatocitos en cultivo primario proliferan fácilmente en respuesta a mitógenos tales como el factor del creci-

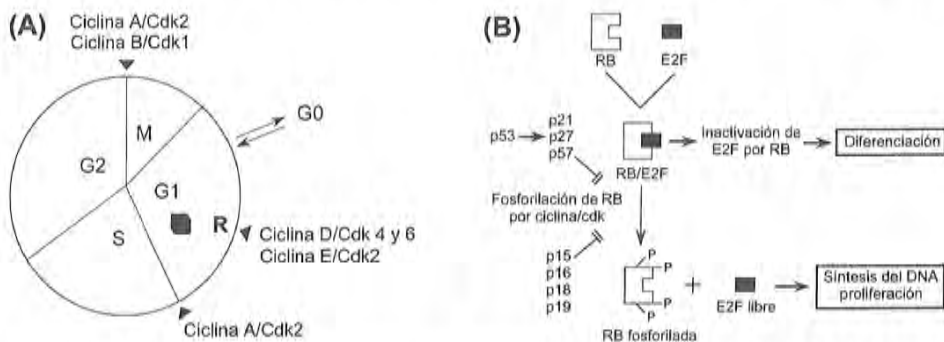


FIGURA 2. Ciclo de División celular. (A) Regulación del ciclo celular por ciclinas y proteínas asociadas. R, punto de restricción; Cdk, quinasas dependientes de ciclinas; G0, fase quiescente; G1, fase que precede a la síntesis del DNA; S, fase de síntesis del DNA; G2, fase que precede a la mitosis; M, fase de mitosis. (B) Papel de los complejos ciclinas/cdk y de los inhibidores de las cdk en la regulación del ciclo. RB proteína retinoblastoma; E2F, factor de transcripción. RB y p53 proteínas supresoras de tumores.

miento epidérmico (EGF). Recientemente se ha demostrado que la ciclina D1 regula la progresión de los hepatocitos en las etapas terminales de G1 en respuesta a mitógenos. También hay que destacar que el control de la proliferación de los hepatocitos por la matriz extracelular puede estar mediada también por la ciclina D1, sugiriéndose que esta proteína es un mediador del que dependen las señales extracelulares que regulan la proliferación de estas células. La inducción de la ciclina D1 puede ser el factor limitante en la proliferación de los hepatocitos. La velocidad de progresión a través de G1 en hepatocitos se encuentra controlada también por la proteína p21. Resultados funcionales proponen que al menos dos componentes que controlan la actividad del complejo ciclina/cdk regulan también la progresión a través de G1: la ciclina D1 promueve la entrada en la fase S, mientras que la p21 retrasa la transición en la fase S (22)

La citocinética, es el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y de poblaciones de células. Los cambios en la cinética de las células de los tejidos, durante la exposición a agentes tóxicos, puede ayudar a conocer su mecanismo de acción y la patogénesis. 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 maternas, y el final de la mitosis de las células hijas.

Para conseguir la multiplicación por división, las células de cualquier tejido abandonan el estado quiescente (G_0) para entrar en el ciclo celular y proceder a través de una serie de pasos consecutivos que culminan en la mitosis. 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. La única fase visible al microscopio, es la mitosis. G_1 es una fase de latencia que precede a la replicación del DNA, y las células en G_1 tienen el mismo contenido en DNA que las en G_0 , pero durante G_1 tiene lugar una serie de cambios dentro de la célula, en la concentración intracelular de iones, en el transporte de proteínas y nutrientes y en la síntesis de enzimas específicos para la síntesis del DNA. Durante la fase S (síntesis del DNA) del ciclo celular, se verifica la replicación del DNA y la síntesis de la mayoría de proteínas e histonas. En un momento dado de una población celular tumoral, 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_0/G_1 hasta dos veces este contenido (4C) de la fase G_2/M . 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, en la que se incluye

la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en mitosis (fase M) y las células hijas vuelven a la fase G_0 (fase quiescente) o a la fase G_1 (23). Durante la fase G_0/G_1 ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis protéica decrece y cesa la síntesis de RNA. En general, la fase S, dura entre 7 y 8 horas, la G_2 , entre 2 y 4 horas y la M menos de 1 hora, mientras que la duración de la fase G_1 es la más variable (Figura 3).

El estudio, en un tejido dado, de la fracción de células que participa en el ciclo celular, es un concepto importante en el análisis de la población celular. Esta fracción se eleva tras la lesión celular, durante la reparación compensatoria, siendo las células en G_0 las que se estimulan para participar en el ciclo celular. La fracción celular en crecimiento decrece cuando finaliza la reparación y la restauración de la función del tejido. La mitosis se

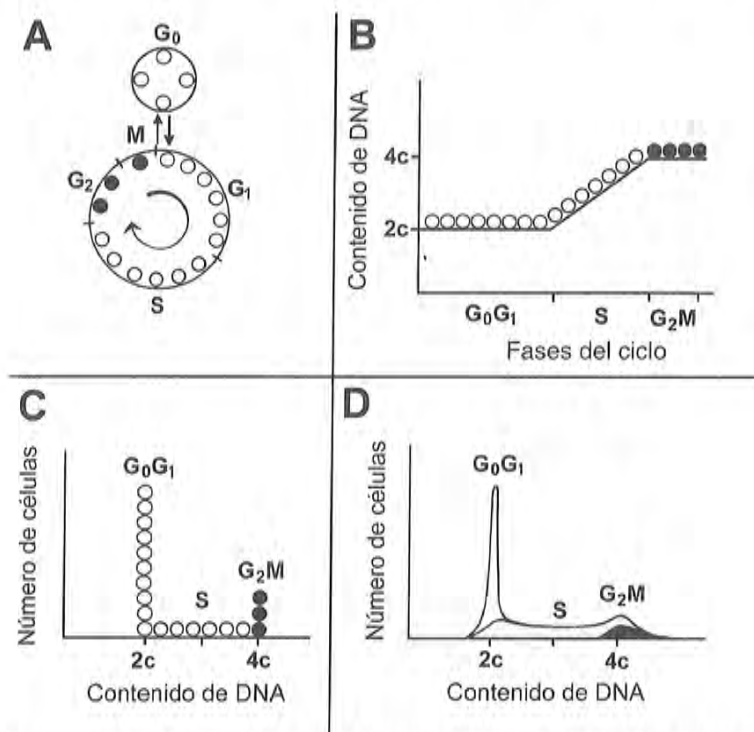


FIGURA 3. Ciclo de división celular. (A) fases del ciclo. (B) Relación entre el contenido de DNA (ordenadas) y la progresión en las fases del ciclo celular (abscisas). (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de las poblaciones ilustradas en (B). Distribución analítica del DNA de una gran población de células.

puede observar microscópicamente y nos indica, como primera aproximación, el ritmo de proliferación. El índice mitótico es la proporción de mitosis en la población celular total, en un tiempo concreto. Este parámetro se ha utilizado por nuestro grupo para la localización intraacinar de la mitosis en relación con la zona necrosada (24, 25)

La citometría de flujo está especialmente indicada para el estudio del ciclo celular, usando líneas celulares o suspensiones de células simples, obtenidas por medios físicos o electrónicos. El ciclo celular puede explorarse a lo largo de sus fases, G_0/G_1 , S y $G_2 + M$, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA. Esto permite clasificar las poblaciones celulares en G_1 , S ó G_2 . Otras tinciones ligadas a ambos, DNA y RNA, como el naranja de acridina, permiten identificar poblaciones en G_0 . La medida del DNA, célula por célula, en el ciclo celular, es importante en los estudios de células cancerígenas porque las células malignas tienen alterado con frecuencia el contenido en DNA o su citocinética. También las células en regeneración post-necrótica presentan notables alteraciones en la ploídia del DNA (24, 26). Para el análisis del DNA se emplean fluorocromos intercalantes o fluorocromos no intercalantes. Los fluorocromos intercalantes, tales como el yoduro de propidio o el bromuro de etidio, forman complejos con la doble hélice de DNA por intercalación entre los pares de bases. Para los complejos formados con el yoduro de propidio, las longitudes de onda de máxima excitación y emisión son 545 y 623 nm, respectivamente.

Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del DNA, el más utilizado es el de Vindelov *et al.*, (27), que utiliza el yoduro de propidio y analiza la distribución del DNA en fracciones de 10.000 a 50.000 células. Este fluorocromo presenta, sobre otros, las propiedades siguientes:

- (a) es muy estable y puede ser excitado por un laser de argón standard;
- (b) produce histogramas con un coeficiente de variación bajo y permite el cálculo de la actividad proliferativa; y
- (c) emite en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultáneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína.

Es posible evaluar los cambios sobre la ploídia originados por diferentes agentes químicos: células con contenido normal de DNA (2C), células con el doble del contenido del DNA normal (4C), y valores intermedios que se asignan a S (2C \rightarrow 4C), o fase S. Mediante la citometría de flujo se ha

podido detectar el efecto clastogénico de algunas sustancias por el incremento de la dispersión del contenido del DNA celular. En células en división, se puede producir una distribución desigual del DNA en las células hijas; esto se puede detectar por un ensanchamiento, en el pico obtenido para la fase G₁ del ciclo celular. También se puede detectar con rapidez si se produce una aneuploidia en la población celular que está expuesta a un agente, supuestamente tóxico.

Es muy importante para la interpretación de estos resultados la utilización de estandars externos como referencia en la determinación del contenido relativo de DNA. Los más comunes son los eritrocitos de pollo o de trucha, cuyos índices son de 0,35 y 0,80, respectivamente. Son fundamentales, sobre todo, en el caso de la existencia de procesos tumorales donde el estadio de aneuploidia es de difícil interpretación (28).

4. CÉLULAS PROGENITORAS EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

En condiciones normales la renovación celular en hígado es muy baja y la mayoría de sus células se encuentran en estado de reposo. Los hepatocitos adultos diferenciados, sin embargo, mantienen la capacidad de repliarse y pueden responder rápidamente a cualquier agresión que conlleve una pérdida moderada de células. De la misma manera que los hepatocitos, las células del conducto biliar mantienen la capacidad de proliferar y responden a la obstrucción biliar y a otras formas de enfermedad del tracto biliar con la proliferación de estas células. Hay casos, sin embargo, en los que desaparece la capacidad regenerativa de los hepatocitos maduros y el hígado necesita recurrir a poblaciones de células precursoras para restaurar su masa y su funcionalidad. Existen dos hipótesis en relación con la intervención de las células precursoras en el proceso de regeneración hepática: la hipótesis del *flujo hepático vectorial* o «*streaming liver*», y la de las *células pluripotentes facultativas*. La primera sugiere que el hígado, al igual que la piel o el intestino, posee una población celular activa precursora que reemplaza continuamente a aquellas células maduras que han perdido su capacidad de división. Los hepatocitos que se generan en la región periportal, migran a lo largo de las trabéculas a velocidad casi constante y mueren, al final de su período de supervivencia, en la región perivenosa. Por tanto, si los hepatocitos periportales son las células que proliferan después de la hepatectomía parcial, el compartimento de células precursoras primigenias o progenitoras ha de ubicarse en esta región del acino. Esta teoría tiene una gran aceptación, pero hay quien rechaza esta renovación vectorial de los hepatocitos en el interior del acino, y proponen

que la proliferación puede realizarse en cualquier punto del parénquima hepático (29-31). Trabajos en nuestro laboratorio en un modelo de hepatotoxicidad inducida por cocaína con y sin fenobarbital, han podido demostrar que la capacidad de regeneración de los hepatocitos periportales es igual que la de los hepatocitos perivenosos (24, 25) (ver capítulo 10 de este volumen). La segunda hipótesis propone la existencia de células pluripotentes «facultativas», a modo de una pequeña población de células durmientes, que se multiplican sólo cuando el hígado sufre una lesión tan grave que aborta la capacidad regenerativa de los hepatocitos maduros. Entonces las células *precursoras pluripotentes hepáticas* se activan dando lugar a la proliferación rápida de las células precursoras inmaduras, que expresan marcadores tanto de las líneas celulares precursoras de los hepatocitos (hepatoblastos), como de las líneas celulares precursoras del epitelio biliar. Estas observaciones han hecho que a estas líneas celulares se las denomine *hepatocitos ductulares* y que se sugiera la existencia de una similitud de éstas con las células ovals debido a que poseen un potencial de diferenciación bidireccional. Posteriormente estas células se diferencian en hepatocitos y en células epiteliales biliares (ver capítulo 9 de este volumen).

Se ha descrito la existencia de células progenitoras del epitelio del conducto biliar en hígado adulto humano (32). Cuando estas células entran en estado proliferativo, lo que ocurre en casos de colestasis, expresan una *molécula de adhesión celular neural*. Esta molécula no se encuentra en células epiteliales adultas y es típica de células epiteliales embrionarias durante el proceso normal de diferenciación. La expresión de esta molécula por células del tracto biliar en proliferación, es un índice de la existencia de células progenitoras en la formación de nuevos canalículos biliares.

Las *células ovals* son células epiteliales que proliferan rápidamente en hígado de rata por efecto de los tóxicos que inducen lesión hepática severa. Son células pequeñas, redondas, con una elevada relación núcleo/citoplasma que surgen en el área periportal del acino hepático expándiéndose con gran rapidez hacia la región perivenosa. Constituyen una población pleiomórfica, procedente de la proliferación de células precursoras multipotentes. Para considerar a las células ovals como células precursoras hepáticas es necesario demostrar que poseen una serie de propiedades tales como: elevada capacidad de replicación, características de hepatoblastos fetales y capacidad de diferenciarse en los dos linajes, el hepatocítico y el biliar. Está bien definido que las células ovals poseen una elevada capacidad de replicación y un ciclo de vida corto. Después de la exposición a un hepatotóxico estas células son, entre todas las células hepáticas ensayadas, las que incorporan los niveles más elevados de timidina tritiada. La proliferación de

las células ovales se encuentra bajo un control estricto. También las células ovales muestran una elevada expresión de oncogenes asociados con el ciclo de división celular como el *c-myc*, *c-fos* y *c-ras*. Por ejemplo, las células ovales expresan altos niveles de la proteína p53, producto de un gen supresor que controla la entrada de las células en el ciclo de división celular. Un argumento más en apoyo de las células ovales como presuntas representantes de células progenitoras hepáticas, es que algunas de ellas se asemejan a hepatoblastos por su elevada expresión de α -fetoproteína y moderada expresión de albúmina. Las células ovales contienen el mRNA de 2,3 kb de la α -fetoproteína, característico de los hepatocitos fetales, que se encuentra ausente en hepatocitos maduros. Por último, ciertas células ovales coexpresan marcadores de superficie considerados específicos de células hepáticas maduras, tanto de las células del tracto biliar como de los hepatocitos adultos (33). Yasui et al., (34) han conseguido la transformación de las células ovales en hepatocitos y han podido comprobar que estas células funcionan como células compensatorias en la lesión hepática severa y se cree que son equivalentes a las células madre progenitoras hepáticas.

La mayor parte de las células ovales desaparecen por apoptosis y no se diferencian. Está demostrado que las células ovales remanentes se diferencian en el *linaje biliar*, pero no está aún del todo claro que puedan diferenciarse en el *linaje hepatocítico*. La primera evidencia de esta diferenciación ha sido la identificación de células intermedias entre las células ovales y las hepatocíticas en ciertos modelos de hepatocarcinogénesis química, estas *células de transición* aparecen como pequeños hepatocitos que expresan α -fetoproteína y albúmina, contienen los mismos isoenzimas fetales que las células ovales y exhiben marcadores de superficie típicos de ambas clases de células.

Se desconoce aún el mecanismo que regula la proliferación y diferenciación de las células precursoras en casos de lesión hepática y la influencia de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento en la señalización inductora de la proliferación de líneas celulares específicas. Parece ser que las células precursoras exhiben una adaptabilidad y/o plasticidad frente a la diferenciación, cuya limitación aún no se ha definido.

Los dos procesos, multiplicación y diferenciación son paralelos pero inversos, de modo que cuanto más diferenciada sea una célula menor es su capacidad proliferativa. En la mayor parte de los epitelios adultos el proceso se puede incluir en tres compartimentos: en el primero se encuentran las *células precursoras* capaces de autoreplicarse; en el segundo las *células*

progenitoras que unen a su capacidad replicativa su tendencia hacia la diferenciación; y en el tercero las *células diferenciadas*. Esta organización permite la renovación permanente de las células maduras que mueren una vez finalizado su ciclo de vida normal. Algunos tejidos adultos, como el muscular y el nervioso, no se ajustan a este modelo porque al carecer de células precursoras, sus células diferenciadas no pueden reemplazarse (Figura 4).

La existencia en hígado de células precursoras es aún un tema debatido que tiene sus detractores. Éstos abogan en contra de esta existencia aludiendo una serie de razones como (a): los hepatocitos tienen una supervivencia larga, (200 a 400 días) y su renovación fisiológica es muy baja (menor del 1%), reteniendo su capacidad replicativa en respuesta a factores que estimulan el crecimiento (b); esta capacidad autoreplicativa de los hepatocitos adultos normales es suficiente para permitir la restauración completa de la masa hepática después de una pérdida por lesión tóxica o por hepatectomía asegurando así la renovación y la restauración de la funcionalidad hepática (4, 35).

Se ha demostrado que la procedencia de las células ovas es extrahepática y que es la médula ósea la fuente potencial de estas células. Las células progenitoras de la médula ósea se desarrollan en linajes hematopoyéticos y mesenquimales, pero hasta la fecha no se conocía que participaran en la producción de hepatocitos, de células biliares y ovas durante la regeneración hepática. Petersen et al., (36) utilizaron ratas machos con trasplante de hígado tratadas con 2-acetilaminofluoreno, agente hepatotóxico

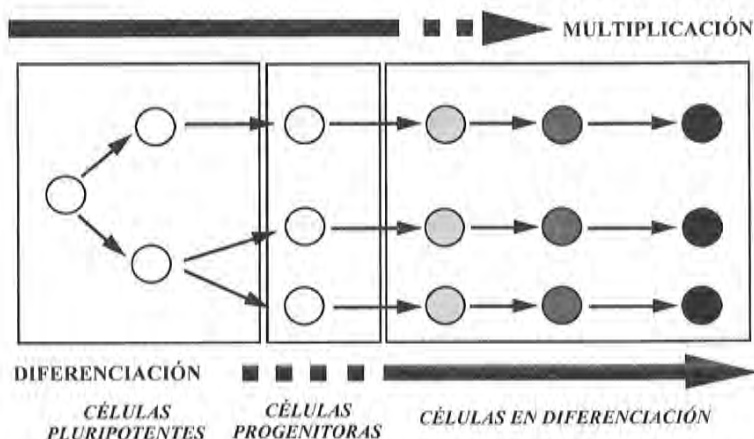


FIGURA 4. Papel de las células pluripotentes en la organogénesis y en la renovación celular (69).

que bloquea la proliferación de los hepatocitos. Estos autores mediante un marcador del cromosoma Y, el enzima dipeptidil peptidasa IV y el antígeno L21-6 pudieron identificar las células hepáticas originadas en la médula ósea. Este importante descubrimiento demuestra que en ciertas condiciones fisiopatológicas una célula asociada a la médula ósea puede actuar como progenitora de los diversos tipos de células hepáticas. Los límites y la repercusión biológica de estas células derivadas de la médula ósea necesitan ser evaluados, pero esto añade una nueva evidencia sobre el notable grado de plasticidad que poseen las células en el organismo adulto.

5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES TEMPRANOS INMEDIATOS

La expresión genética en el hígado regenerante se verifica en diferentes etapas, y comienza con la expresión de un gran número de *genes tempranos inmediatos*. Los hepatocitos tienen que estar «preparados» (primed) antes de que puedan responder a los factores del crecimiento (HGF, TGF α , EGF). Esta preparación requiere de las citoquinas TNF α e IL-6, además de otros agentes que previenen la citotoxicidad. Las especies reactivas de oxígeno y el contenido de glutatión en los hepatocitos puede determinar si el efecto del TNF α sobre los hepatocitos es proliferativo o apoptogénico. Los protooncogenes *c-fos* y *c-jun* han sido los primeros en ser identificados. Se han identificado hasta 70 genes que participan en la inmediata respuesta a la hepatectomía (37). Estos genes incluyen factores de transcripción, tirosina quinazas y fosfatasas y proteínas metabólicas. Se ha observado que al menos cuatro factores de transcripción: NF κ B (Nuclear Factor for the κ chain of B cells), STAT3 (Signal Transduction and Activators of Transcription), AP-1 y C/EBP β juegan importantes papeles en la iniciación de la regeneración hepática. Alguno de estos factores está notablemente inducido por el TNF α (6, 38, 39).

Originalmente identificado en linfocitos B, el NF κ B se encuentra en casi todas las células incluyendo hepatocitos y otras células hepáticas. En hepatocitos existe como heterodímero compuesto por dos subunidades p65 y p50. Las dos se encuentran unidas en el citoplasma, pero el heterodímero es inactivo debido a un inhibidor, I κ B, que se une a p65. Liberado del inhibidor, el heterodímero NF κ B (p65-p50) migra al núcleo donde activa la expresión de genes implicados en la inflamación, la adhesión celular, la respuesta al estrés, la replicación y la apoptosis. Después de la hepatectomía parcial, el NF κ B se activa muy rápidamente (30 minutos). La activación es transitoria y no se detecta después de 4 o 5 horas (6). La activación del

NF κ B implica la fosforilación del inhibidor I κ B, por las quinasas I κ B, en dos residuos de serina críticos (Figura 5A).

El factor NF κ B existe en forma latente en el citosol de células no estimuladas y consiste en un dímero transcripcionalmente activo unido a una proteína inhibidora I κ B. Las subunidades de la familia NF κ B en mamíferos son p50, p65 (RelA), cRel, p52 y RelB, mientras que también existen múltiples formas de I κ B en mamíferos, I κ B α , β , γ (p105) δ (p100) y ϵ , y Bcl3. La vía mediante la cual se activa el NF κ B ha sido tema de intensas investigaciones. La mayor parte de estos trabajos se han centrado en el dímero p50/p65, la forma predominante de NF κ B en muchas células, y su asociación con el I κ B α . Se sabe que el estímulo produce la rápida fosforilación del I κ B en dos residuos de serina el S32 y el S36, lo cual señala a I κ B para la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S (Figura 5B). El dímero, una vez liberado del I κ B se trasloca al núcleo y activa genes mediante su unión con elevada afinidad a los elementos κ B de sus promotores. La fosforilación y degradación del I κ B son acontecimientos estrechamente acoplados, de forma que los agentes que activan al NF κ B estimulan la quinasa del I κ B o alternativamente inactivan una fosfatasa particular.

Desde su descubrimiento, hace más de diez años, el factor de transcripción inducible de eucariotas superiores NF κ B, se ha demostrado que juega un papel importante en la regulación de muchos genes implicados en la respuestas inmunes e inflamatorias. También el NF κ B se ha relacionado en una lista de procesos tales como la reactivación y la replicación de muchos virus, en el desarrollo embrionario, en el control de la proliferación celular y la apoptosis, en el desarrollo neuronal y en la neurodegeneración. No sorprende, por tanto, que este factor se encuentre activado en muchos tipos celulares en respuesta a una amplia variedad de estímulos y condiciones, los cuales incluyen productos víricos y bacterianos, mitógenos de células T y B, citoquinas inflamatorias tales como IL-1 y TNF, situaciones de estrés intracelular tales como sobrecarga proteica del retículo endoplásmico, la luz ultravioleta, los fármacos, el alcohol etc. (Figura 6). Puede considerarse que el NF κ B representa un sistema, a modo de interruptor, que cuando se pone en funcionamiento, opera de manera muy eficiente para regular la expresión genética. Los genes inducidos juegan papeles en las respuestas fisiológicas durante el desarrollo y también en la respuesta a la lesión y la infección (40).

El factor STAT3 se activa también después de la hepatectomía parcial, pero la activación es más lenta y el mecanismo es completamente diferente al del NF κ B. STAT3 se fosforila y se transloca al núcleo donde regula la

expresión de un gran número de genes implicados en la inflamación, la respuesta a la fase aguda y la proliferación (38)

La segunda fase de la expresión genética en la regeneración post hepatectomía parcial se refiere a la respuesta de los *genes tardíos*. La transcripción de estos genes se bloquea por inhibidores de la síntesis proteica, lo que

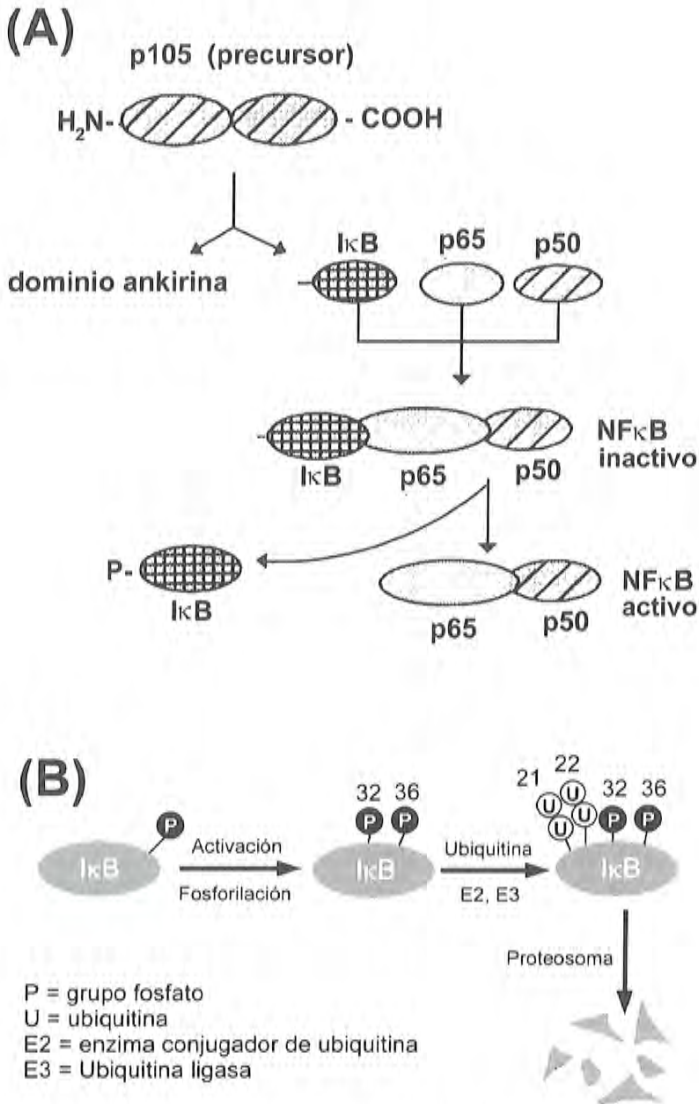


FIGURA 5. Mecanismos de activación del NFκB. (A) Transformación del dímero activo p65-p50, a partir de un precursor y después de eliminar el inhibidor. (B) Degradación del IκB.

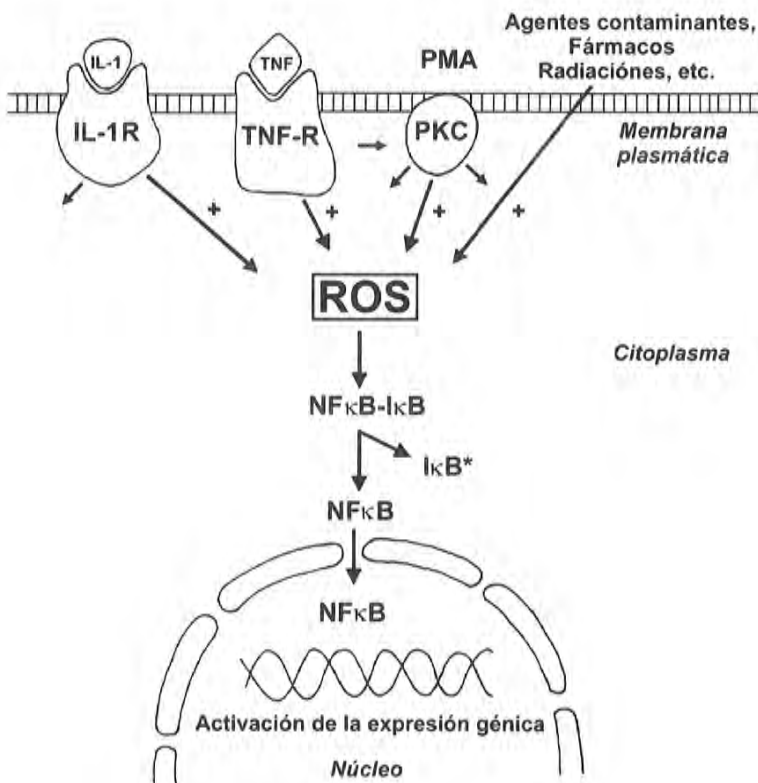


FIGURA 6. Mecanismos de activación del factor de transcripción NFκB. El metabolismo de fármacos influye sobre el NFκB a través de la generación de especies reactivas de oxígeno que actúan como segundos mensajeros.

indica que su actividad es un acontecimiento secundario. Un ejemplo de estos genes es el Bcl-X_L, un gen antiapoptogénico expresado en hígado, cuyo mRNA se eleva después de la hepatectomía parcial en ratón, alcanzando un máximo a las 8 horas de la hepatectomía. No se sabe si la expresión de este gen previene la apoptosis de los hepatocitos en las primeras etapas de la regeneración hepática o si tiene otros papeles. Una posibilidad sería que funcionara como un antioxidante para prevenir la acción agresiva de las especies reactivas de oxígeno generadas por la mitocondria (41)

Los genes del ciclo celular activados durante la regeneración hepática incluyen p53, p21, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. La expresión de la ciclina la D1 establece probablemente el estado en el cual la replicación del DNA se torna independiente de los factores del crecimiento y se vuelve autónoma

6. MECANISMOS REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. FACTORES DEL CRECIMIENTO

Muchos científicos han utilizado la regeneración hepática como uno de los modelos más interesantes para investigar la regulación de la proliferación celular y los mecanismos que gobiernan la entrada de las células en la fase de replicación del DNA. En los últimos años se ha demostrado la existencia de síntesis del DNA en hepatocitos aislados de ratas adultas mantenidas en cultivo de monocapa durante varios días. Es un hecho conocido que una serie de biocatalizadores desempeñan una misión destacada o son esenciales para la replicación del DNA en tales cultivos. Entre estos agentes cabe citar las hormonas, los factores de crecimiento, las citoquinas, así como otras sustancias como el piruvato, el calcio, los aminoácidos y las poliaminas (42). Entre estas últimas, la putrescina, la espermidina y la espermina juegan un papel esencial en el crecimiento celular y en la diferenciación y se encuentran asociadas a la regeneración hepática post-hepatectomía, la isquemia hepática y la lesión hepatotóxica. Las señales proliferativas resultantes se producen por interacciones entre estas moléculas, nutrientes y metabolitos, pero el problema se complica cuando un mismo factor de crecimiento puede actuar positiva o negativamente, caso del factor transformante del crecimiento β (TGF β), el factor de crecimiento hepático (HGF) o el glucagón (43).

En general, todas las hormonas parecen ser moduladoras del crecimiento. Las que más interés han despertado han sido la insulina, el glucagón y la norepinefrina, ya que tanto en hepatocitos *in vivo* como *in vitro* han demostrado que modulan la actividad de otros efectores. Estas hormonas se consideran hoy de gran importancia en la terapéutica y a nivel de los trasplantes.

El *factor de crecimiento epidérmico* (EGF) es uno de los responsables clave de la proliferación celular en hígado durante el desarrollo fetal y después de la hepatectomía parcial o la lesión tóxica. La acción del EGF se encuentra modulada por una serie de hormonas que intervienen modificando las interacciones entre este factor y su receptor. El EGF actúa sinérgicamente con la insulina y el glucagón en el estímulo de la regeneración hepática y se ha comprobado que el número de receptores EGF hepáticos se regula de manera específica según el diferente ritmo en la secreción de la hormona pituitaria (44). En cultivos primarios de hepatocitos de rata, se ha observado que los estrógenos antagonizan la unión del EGF a su receptor inhibiendo por ello el efecto mitogénico del EGF (45). Los glucocorticoides, por otro lado, actúan modulando la fosforilación de la tirosina del receptor

EGF inducida por el propio factor EGF (46). No obstante, se sabe poco acerca del mecanismo mediante el cual el EGF estimula la proliferación celular. El receptor situado en la superficie celular, necesario para la acción del EGF, contiene una porción amino que se une al EGF, un dominio transmembrana y un dominio quinasa. Estos dos dominios son homólogos al producto proteico del oncogen viral *erb B*. Se ha descrito que el EGF disminuye el número de sus receptores sobre la superficie celular durante el periodo prereplicativo alcanzando su mínimo a las 36-48 horas debido a que al unirse el HGF al receptor este se internaliza (35).

El *factor transformante del crecimiento α* (TGF α) y el EGF se unen al mismo receptor y ambos promueven la síntesis del DNA en hepatocitos de rata. A pesar de que el TGF α se une al receptor EGF con una afinidad cuatro veces menor que el EGF, su actividad biológica es más efectiva. Durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial, la síntesis de TGF α aumenta en hepatocitos y alcanza su máximo en el momento de mayor síntesis del DNA (47). La elevación del TGF α durante las primeras 24 horas que siguen a la hepatectomía parcial coincide con una disminución en el número de receptores de EGF debida a su mayor internalización y es paralela a un incremento en el mRNA de este receptor (48). También, durante el desarrollo fetal del hígado en los últimos estadios de la gestación se registra un incremento en la expresión del receptor del EGF (48,49). La elevación en el contenido del TGF α es necesaria para que los hepatocitos progresen desde G₁ a S. La expresión de este factor alcanza su máximo después de la lesión tóxica con tetracloruro de carbono o galactosamina o tras la hepatectomía parcial.

Otro factor con potente capacidad mitogénica para muchas células epiteliales, entre las cuales se incluyen los hepatocitos, es el HGF (*factor de crecimiento de los hepatocitos*), factor que influye en la regeneración hepática en respuesta de la pérdida de hepatocitos (50). El HGF aparece en suero de rata después de la hepatectomía parcial y en suero humano después de una hepatitis fulminante. Este factor se ha manifestado como el mitógeno con actividad más potente en cultivos primarios de hepatocitos y ejerce sus efectos biológicos a través de un único receptor de superficie (11). El HGF fue también denominado *hepatopoyetina*, e identificado por primera vez en suero de ratas parcialmente hepatectomizadas, más tarde se purificó a partir de plaquetas, plasma humano e hígado de rata (51) y su secuencia de aminoácidos se ha deducido por clonaje de su DNA complementario (52). El HGF se sintetiza y segrega en hígado normal por las células Kupffer y las endoteliales. Hasta hace poco, el HGF se consideró que poseía una estrecha especificidad actuando principalmente como mediador humoral de la rege-

neración hepática después de hepatectomía parcial o lesión hepática, sin embargo las investigaciones más recientes han demostrado que el HGF es un polipéptido funcional que actúa de forma paracrina sobre una amplia variedad de tipos celulares (53), ya que se expresa en diversos órganos, se libera por fibroblastos en cultivo (54) y estimula la proliferación de un amplio espectro de células. Estudios de Montesano *et al.*, (55) han revelado una propiedad adicional del HGF, la capacidad de transmitir información para determinar el reordenamiento espacial de las células epiteliales. Es interesante destacar que entre un número de citoquinas bien caracterizado, sólo el HGF induce la tubulogénesis en fibroblastos lo que le atribuye una función morforegulatoria específica. Elevados niveles de HGF aparecen en suero de ratas después de la necrosis inducida por hepatotoxinas tales como el CCl_4 o la D-galactosamina. Como los lipocitos son los responsables de la producción del HGF, como también de la matriz extracelular, no sorprende que el HGF se deposite en dicha matriz.

El *factor de crecimiento de fibroblastos* (FGF) participa también en el desarrollo del hígado fetal (56) y en la regeneración hepática post hepatectomía y post necrótica. A concentraciones 10^{-12} M el FGF estimula la síntesis del DNA en hepatocitos, sin embargo, a concentraciones 10^{-9} M este factor inhibe el crecimiento inducido por el EGF. Después de la hepatectomía parcial la elevación en la expresión genética del FGF hepático es anterior a las del $\text{TGF}\alpha$ y $\text{TGF}\beta$. De esta manera, la proliferación de los hepatocitos que se inicia inmediatamente después de la necrosis hepática y se eleva a medida que surgen, primero el FGF (10^{-12} M) y después el $\text{TGF}\alpha$ y el EGF, puede continuar mientras los niveles de $\text{TGF}\beta$ sean bajos (10^{-12} M). Más tarde, la elevación en las concentraciones del FGF y del $\text{TGF}\beta$ pone límite a la proliferación de los hepatocitos (57).

En la búsqueda de otros factores de crecimiento involucrados en el proceso de la regeneración hepática, se ha encontrado que el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor considerado miembro de la familia del FGF, estimula también la síntesis del DNA en hepatocitos de rata en cultivo primario. La capacidad mitogénica de este factor es superior a la del EGF y el $\text{TGF}\alpha$ y es sólo comparable a la del HGF. El KGF se produce en grandes cantidades en el íleon y parece ser que una vez segregado por esta porción del intestino delgado, llega al hígado vía vena porta y actúa sobre la regeneración hepática como factor endocrino. Otros factores, como el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), las interleuquinas 1 y 6, y el factor de crecimiento derivado del bazo (SDGF) (58), actúan activando o inhibiendo la proliferación de hepatocitos por mecanismos aún no bien determinados.

El factor transformante del crecimiento β , al contrario que el TGF α , es un regulador negativo muy potente de la proliferación de los hepatocitos, tanto en condiciones normales en las que la proliferación celular es muy baja, como en estados de regeneración post-necrótica, preneoplásicos y neoplásicos, antagonizando el crecimiento hepático inducido por el TGF α . La familia de los TGF β se compone de 3 isoformas y la que más se relaciona con los hepatocitos es la TGF β 1, este factor se segrega biológicamente inactivo por lo que se requiere su activación proteolítica. La administración *in vivo* de TGF β 1 a ratas hepatectomizadas inhibe la síntesis del DNA en hígado en regeneración. Durante el proceso regenerativo originado por hepatectomía parcial se eleva notablemente la expresión del TGF β 1 en hígado, pero el punto máximo de expresión es posterior al del TGF α . Por técnicas de inmunoensayo se ha detectado que su expresión comienza en hepatocitos periportales justo antes de comenzar la síntesis del DNA y luego progresa hacia la región pericentral en el momento que estos hepatocitos se encuentran en su máxima fase de síntesis. No existen, sin embargo, muchas evidencias del resto de los factores inhibidores del crecimiento como son la activina, péptido de alta homología con el TGF β , el inhibidor de la proliferación hepática, o los inhibidores del crecimiento derivados de plaquetas α y β (29, 43).

Otras citoquinas se han implicado también en la regeneración hepática: las IL-1 y IL-6 producidas en células no parenquimáticas activadas, en el proceso regenerativo, y concretamente a nivel prereplicativo. El pretratamiento con lipopolisacárido, un activador de la producción de citoquinas, 24 horas antes de la hepatectomía parcial, aumenta la síntesis de DNA. Además las concentraciones séricas de IL-6 se incrementan significativamente tras hepatectomía parcial, incremento que es inhibido por la administración de anticuerpos frente al TNF α , factor que induce la liberación de IL-6 (7). Sin embargo, el papel de la IL-1 es más complejo, ya que la IL-1 α en combinación con la IL-6 incrementa el índice mitótico, mientras que la IL-1 β inhibe la proliferación en hepatocitos en cultivo. La administración a ratas de TNF α estimula la síntesis de DNA unas cuatro veces por encima del control, no obstante, estos valores no son tan elevados si se comparan con las 50 veces que se incrementa esta citoquina tras una hepatectomía parcial. Existe cierta controversia sobre el tipo de células sobre las que produce sus efectos ya que según Feingold *et al.*, (59) sólo actúa sobre macrófagos hepáticos. Hoy en día, mediante la administración de anticuerpos policlonales del TNF α 1 hora antes de la hepatectomía parcial, se ha visto que actúa tanto sobre células no parenquimáticas como sobre los hepatocitos y por ello se considera un modulador positivo de la regeneración hepática.

En conclusión, EGF, TGF α , FGF y HGF funcionan como inductores fisiológicos de la síntesis del DNA en hepatocitos durante la regeneración hepática. Todos ellos actúan a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. El estímulo del crecimiento hepático por el EGF y el TGF α se modula por el TGF β , el cual se induce un poco después que el TGF α , previniendo así una proliferación celular incontrolada (60). El destacado papel que juegan estos factores en la regeneración hepática se ha visto reforzado por un interesante descubrimiento: la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial se encuentra muy retrasada en ratones atímicos mantenidos en esterilidad (libres de gérmenes) y, por tanto, sin contacto con componentes bacterianos, tales como el lipopolisacárido (LPS). Estos ratones fueron asimismo resistentes al LPS, por una deficiencia en tejido linfoide. El retraso en la iniciación de la regeneración hepática puede ser debido a la incapacidad de estos animales para liberar factores de crecimiento en respuestas a toxinas alimentarias o ambientales.

La entrada de las células en el ciclo proliferativo va acompañada por un incremento en la velocidad de síntesis proteica. Experimentos con células en cultivo, como linfocitos o fibroblastos, han demostrado que al menos alguna de las variaciones en la síntesis proteica se deben a alteraciones de compuestos preexistentes del sistema traduccional. Uno de los principales factores implicados en el control de la síntesis proteica es el factor de iniciación eIF-2 (eukaryotic initiation factor-2). Para estudiar el papel de estos factores sobre la síntesis proteica a nivel ribosómico durante la regeneración hepática, se ha establecido un sistema *in vitro* con polisomas de hígado normal, como fuente de mRNA y ribosomas, y con fracción citosólica de hígado en las diferentes etapas de la regeneración después de hepatectomía parcial (61). La actividad de las fracciones citosólica y microsomal, obtenidas después de hepatectomía parcial, estimuló de manera notable la incorporación de aminoácidos por estos polisomas.

Hoy se utilizan diversos métodos indirectos para la determinación de los factores de crecimiento y citoquinas liberados en el proceso necrótico con el fin de facilitar la subsiguiente fase regenerativa. Entre ellos cabe destacar la incubación de sistemas celulares, tales como macrófagos o neutrófilos, con suero de animales obtenidos a distintos tiempos de la lesión hepática, pudiendo así detectar la capacidad de los sueros para estimular la producción de algún metabolito fácilmente detectable, del cual se conozcan los activadores directos, un caso típico es el óxido nítrico. El óxido nítrico es un importante mensajero inter e intracelular que desempeña funciones tan diversas como la vasodilatación, la comunicación neuronal y que participa en los mecanismos de defensa (62). El NO es sintetizado a partir de la L-

arginina, en presencia de coenzimas tales como FAD, FMN, NADPH y BH_4 , por la óxido nítrico sintasa, un enzima del que se han descrito tres isoformas. Las células endoteliales y nerviosas contienen dos isoenzimas diferentes que se expresan constitutivamente y que requieren Ca^{2+} y calmodulina para ser activados, mientras que el isoenzima expresado en macrófagos no necesita estos cofactores pero se induce por citoquinas y factores de crecimiento como el IFN- γ o el TNF- α en macrófagos y neutrófilos (63). La inducción enzimática puede ser retro-regulada por TGF- β y PDGF en células de músculo liso vascular y en macrófagos, donde tres miembros de la familia de los TGF- β , el β_1 , β_2 y β_3 bloquean la habilidad del IFN- γ para inducir la liberación de NO. Se ha comprobado también que la IL-4 puede inducir la NOS mientras que la IL-10 la inhibe (64).

6. MODULACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

El concepto clásico que consideraba a la matriz extracelular como una estructura inerte que servía de soporte para que las células descansasen confortablemente mientras realizaban sus funciones ha sido completamente superado. Hoy se considera que esta matriz extracelular esta «viva». Sus componentes o alguno de los productos de su degradación, son capaces de actuar como señalizadores a través de receptores específicos de la membrana plasmática. Sin embargo, las células pueden también modular sus respuestas a los componentes de la matriz extracelular, regulando la expresión de los receptores a los cuales se unen los componentes de dicha matriz. Las moléculas de la matriz extracelular son polivalentes y poseen múltiples dominios que les permiten interactuar con uno o más componentes de la superficie celular o de la matriz. El entramado así formado, juega un papel fundamental en la organización y función de cada tejido y actúa como un radar sensible que mantiene a las células informadas de lo que ocurre en cada microambiente.

La regeneración hepática es un fenómeno biológico notable. Después de lesiones agudas tales como tratamiento con tetracloruro de carbono, tioacetamida o hepatectomía parcial, el hígado se regenera para restaurar su masa y su función. *In vivo* y en cultivo los mitógenos primarios son el factor de crecimiento epidérmico, el factor transformante del crecimiento alfa y el factor de crecimiento de hepatocitos. Aunque muchos factores del crecimiento y citoquinas se han identificado como participantes importantes en la iniciación de la regeneración hepática, no se ha estudiado directamente el papel de la matriz extracelular en su contribución a la proliferación de los hepatocitos durante los estadíos más tempranos de la regeneración hepática.

La matriz extracelular está compuesta por varias macromoléculas, entre las que se incluyen la fibronectina, el colágeno, la laminina, la vitronectina y los proteoglicanos. La función de la matriz extracelular es actuar como soporte físico para las células epiteliales y endoteliales. También actúa modulando la diferenciación celular, la migración, el crecimiento y la apoptosis. La matriz extracelular del hígado es distinta a la de otros órganos (65). En otros órganos, el intersticio actúa como una barrera de difusión entre el plasma y las células epiteliales y contiene una membrana de base. En el hígado, sin embargo, se encuentra en una región denominada espacio de Disse o espacio perisinusoidal, un espacio pequeño entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales que contiene matriz extracelular, pero que carece de una membrana base verdadera. Se considera que esta disposición puede facilitar el máximo intercambio de nutrientes entre la sangre circulante y los hepatocitos. El espacio perisinusoidal se cree que está compuesto primariamente de haces de colágeno (tipo I, III y IV), fibronectina, laminina, entactina y perlecan. La proteína más abundante en el espacio perisinusoidal es la fibronectina, que existe en forma soluble en el plasma circulante y en forma insoluble en la matriz extracelular. La mayor fuente de la fibronectina circulante del plasma son los hepatocitos. Aunque la mayor forma de fibronectina producida durante la regeneración hepática es la plasmática, los hepatocitos son también capaces de producir fibronectina celular durante la regeneración. Por otro lado, la laminina que consiste en tres cadenas distintas, se detecta normalmente en el espacio perisinusoidal, en los grandes vasos sanguíneos y en conductos biliares. Diversas evidencias sugieren que las subunidades de la laminina se expresan en hígado normal y en regeneración, pero la composición exacta de estas subunidades no está clara.

Los componentes de la matriz extracelular, la fibronectina y la laminina interactúan con las células mediante receptores heterodímeros integrina de la superficie celular y una familia de proteínas transmembrana compuestas de cadenas α y β . El heterodímero integrina $\alpha_5\beta_1$ se une predominantemente a la fibronectina, mientras que el heterodímero integrina $\alpha_v\beta_3$ se une a la vitronectina. Sin embargo, la capacidad de unión de los heterodímeros integrinas a los diversos componentes de la matriz extracelular es redundante, ya que la mayoría de las integrinas son capaces de unirse a los diferentes componentes de la matriz extracelular (66).

Durante la regeneración hepática la síntesis de la matriz extracelular puede jugar un papel importante en el restablecimiento del fenotipo quiescente y diferenciado de los hepatocitos. Se ha observado que la matriz extracelular modula el fenotipo de los hepatocitos, ya que el estado quies-

cente se basa en la interacción célula - matriz extracelular. Aunque la regulación de la expresión de la dicha matriz está aún poco estudiada, la iniciación de su expresión se relaciona con la máxima expresión del mRNA del TGF β , el cual es en sí mismo un fuerte estimulador de la síntesis del colágeno. Son diversos los mecanismos que controlan la síntesis y degradación de la matriz extracelular. La degradación está mediada principalmente por las metaloproteinasas que forman un grupo de enzimas que requieren iones cinc para su actividad.

En el hígado la matriz extracelular se encuentra en la región denominada espacio de Disse o espacio perisinusoidal, un pequeño espacio entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales. Se ha estudiado la degradación de la matriz en hígado después de la hepatectomía parcial y se ha observado que inmediatamente se verifica una rápida reorganización de los componentes de la matriz, que es importante para la proliferación de los hepatocitos en los estadios iniciales de la regeneración hepática. En esta reorganización juega un importante papel el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), generado por los lipocitos y secuestrado en la matriz extracelular (Figura 7). Este factor pasa de su forma inactiva a su forma

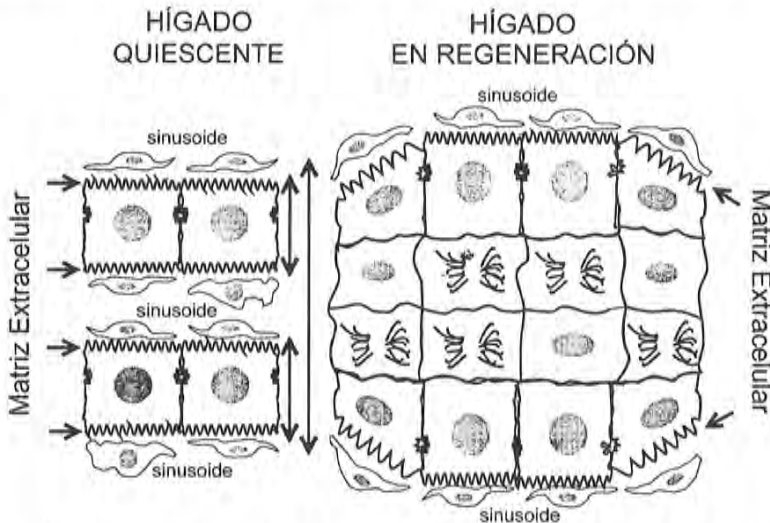


FIGURA 7. Proliferación de los hepatocitos y formación de los sinusoides en hígado en regeneración. En el hígado normal las superficies basolaterales de los hepatocitos están en contacto directo con los componentes de la matriz extracelular en el espacio de Disse que recubre los sinusoides. En el hígado en regeneración se forman grupos de hepatocitos sin intervención de los sinusoides. Las flechas indican la distancia entre espacios de Disse adyacentes. Esta distancia corresponde al diámetro de un hepatocito en hígado normal y al diámetro de varios hepatocitos en hígado en regeneración (65).

activa por acción del activador del plasminógeno tipo urokinasa. La infusión de HGF en hígado de rata normal se ha demostrado que estimula la proliferación sólo en los hepatocitos periportales, sin embargo, cuando el hígado fue pretratado con colagenasa antes de la infusión de HGF, la síntesis del DNA se elevó de manera notable en todas las áreas del lóbulo. Estas evidencias llevan a la conclusión que la degradación de la matriz extracelular combinada con la activación del HGF en los estadíos iniciales de la regeneración hepática puede desencadenar la proliferación de los hepatocitos (66, 67, 68).

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos implicados en el proceso de regeneración hepática. Este avance se ha basado en parte en el desarrollo de modelos de ingeniería genética en ratones en los cuales se han insertado o inactivado genes específicos. Hoy se sabe que los hepatocitos maduros poseen una asombrosa capacidad proliferativa y que tanto la proliferación como la apoptosis pueden ser desencadenadas por un solo agente, el $TNF\alpha$. Sin embargo, quedan todavía muchas preguntas sin respuesta. Por ejemplo: la procedencia y los mecanismos que causan el incremento del TNF que inicia la proliferación, y si está el LPS (lipopolisacárido) implicado en esta inducción. Además ¿por qué los hepatocitos se dividen una o dos veces y la regeneración termina en un determinado momento? Es necesario estudiar las conexiones entre la actividad metabólica hepática y la compleja cascada de activación genética necesaria para la síntesis del DNA. Podría ser que las especies reactivas de oxígeno liberadas por la elevada demanda metabólica de las mitocondrias de los hígados que han perdido un 70 % de sus masas, funcionaran como conductoras de proceso mitogénico mediante la activación del $NF\kappa B$. En este caso la restauración de la masa hepática y la actividad metabólica normal eliminaría las señales necesarias para la proliferación.

La regeneración hepática presenta un gran interés por la posibilidad de su aplicación a la clínica. El transplante de los hepatocitos puede ser de una gran utilidad en el tratamiento de enfermedad metabólica hepática y las perspectivas son hoy mucho más alentadoras. Los hepatocitos en cultivo permanecen viables por largos periodos de tiempo y pueden ser inducidos a proliferar mediante la adición al medio de cultivo de factores del crecimiento. La infusión de factores del crecimiento precedida por la administración intrahepática de TNF podría incrementar notablemente el efecto de otros factores del crecimiento como el HGF, el $TNF\alpha$ o el EGF, especial-

mente en casos de trasplante de hígados pequeños o trozos pequeños de hígado y en casos de lesión masiva aguda inducida por hepatotóxicos.

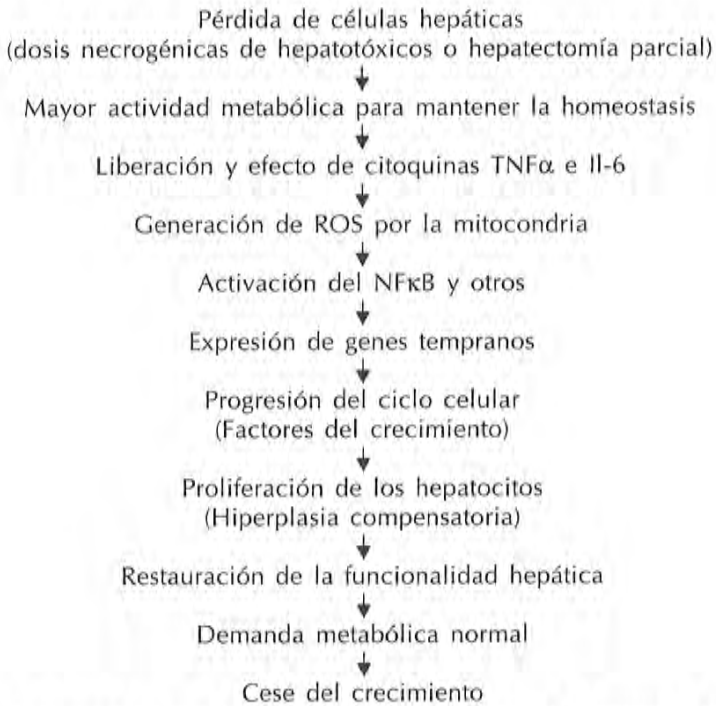


FIGURA 8. Secuencia de acontecimientos que desencadenan la regeneración hepática en relación con las demandas metabólicas y las señales mitogénicas. La hipótesis presentada es que la iniciación y cese de la regeneración se conecta con las demandas metabólicas del hígado, que es posible sea la fuente de las señales de crecimiento/parada del crecimiento (5).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L (1995) Small-for-size liver transplants into larger recipient: a model of liver regeneration. *Hepatology* **19**, 210-216
2. Cascales M (1994) Regeneración hepática postnecrótica y hepatocarcinogénesis. En: *Proliferación Celular y Cáncer*, vol IV pp 347-378 (eds Cascales M y Villanueva JR) Real Academia de Farmacia y Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. Madrid.
3. Higgins GM y Anderson RM (1931) Experimental pathology of the liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* **12**, 186-202.

4. Fausto N y Weber EM (1994) Liver regeneration. En: *The liver. Biology and Pathobiology* (Eds Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA y Shafritz DA) pp 1059-1084, Raven Press, Nueva York.
5. Fausto N (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* **32** suppl 1 19-31
6. Fitzgerald M, Webber E, Donivan J y Fausto N (1995) Rapid DNA binding by nuclear factor κ B in hepatocytes at start of liver regeneration. *Cell Growth Diff* **6**, 417-427
7. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ y Diehl AM (1992) Antibodies to tumor necrosis factor inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* **263**, G579-G585
8. Menegazzi M, Guerriero C, Carcereri de Prati A, Cardinale A, Suzuki H Armato U (1996). TPA and cycloheximide modulate the activation of NF-kappa B and the induction and stability of nitric oxide synthase transcript in primary neonatal rat hepatocytes. *FEBS lett* **379**, 279-285.
9. Shinozuka H, Ohmura T, Katyal SL, Zedda AI, Ledda-Columbano GM y Columbano A (1996) Possible roles of non-parenchymal cells in hepatocyte proliferation induced by lead nitrate and by tumor necrosis factor alpha. *Hepatology* **23**, 1572-1577.
10. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL y Degen JL. (1991) Complete Hepatic Regeneration after Somatic Deletion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell* **66**, 245-256.
11. Michalopoulos GK. (1990) Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J.* **4**, 176-187
12. Michalopoulos GK y DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66
13. Mehendale HM. (1991) Role of hepatocellular regeneration and hepatobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1155-1162.
14. Mangipudy 1995 Mangipudy RS, Chanda S y Mehendale HM. (1995) Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environmental health perspectives*, **103**, 260-267.
15. Abraham EH, Pratt AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arci RJ, Kramer R, Guidotti G y Cantrello HF (1993) The multidrug resistance (*mdr1*) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **90**, 312-316
16. Kamel 1991 Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ y Warnke RA. (1991) Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am J Pathol* **138**, 1471-1477
17. Kayano K, Mitsuru Y, Kubota M, Takenaka K, Mori K, Yamashita A, Kubo Y, Sakaida I, Okita K y Sanuki K (1992) Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. *Liver* **12**, 132-136

18. Mead JE, Braun I, Martin DA y Fausto N (1990) Induction of replicative competente («priming») in normal liver. *Cancer Res* **50**, 7023-7030.
19. Helin K (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factor. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 28-35.
20. Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308**, 697-711
21. Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature (Lond)* **374**, 131-134.
22. Albrecht JH y Hansen LK (1999) Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell Growth & Differ* **10**, 397-404.
23. Vielh P, Magdelénat H, Remvikos Y y Dutrillaux B. (1991). Analysis of DNA content. En: *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Flow Cytometric*. (ed. P. Vielh) pp 21-57, Igaku-Shoin, New York, Tokyo.
24. Gascó P, Fernández-Simón L, Díez-Fernández C, Sancho M, Sanz N y Cascales M (1993) Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de lesión hepatocelular en ratón. *Rev Toxicol* **11**, 105-111
25. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L (1994) Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001
26. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M (1993) Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration-induced by thioacetamide. *Hepatology* **24**, 460-467.
27. Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. (1983) A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327
28. Spyrtatos F. DNA content and cycle analysis by flow cytometry in clinical samples: Application in breast cancer. *Biol. Cell.* **78**, 69-72 (1993).
29. Czaja MJ (1998) Liver regeneration following hepatic injury. En: *Liver growth and repair* (eds Strain AJ y Diehl AM) pp 28-49, Chapman & Hall. Londres,
30. Terada T y Nakanuma Y. (1993) Development of human intrahepatic peribiliary glands. *Lab Invest* **8**, 261-269.
31. Schuler E y Salvi R. (1991) Pattern of hepatocyte renewal in regenerated rat liver. Evidence against streaming mechanism (abstract) *Hepatology* **14**, 102A.
32. Sell S. (1991) Is there a liver stem cell? *Cancer Res* **50**, 3811-3815.
33. Sirica AE y Mathis GA. (1990) Isolation, culture and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* **58**, 44-64.
34. Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T (1997) Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver. *Hepatology* **25**, 329-334
35. Michalopoulos GK. (1992) Hepatocyte growth factor. *Hepatology* **15**, 149-155

36. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greeberger JS by Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170
37. Taub R (1996) Transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* **10**, 413-427
38. Cressman DE, Diamond RH y Taub R (1995) Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* **21**, 1443-1449
39. Diehl AM y Yang SQ (1994) Regenerative changes in C/EBP α C/EBP β expression modulate binding to the C/EBP site in the c-fos promoter. *Hepatology* **19**, 447-456
40. Bowie A y O'Neill LAJ (2000) Oxidative stress and nuclear factor-kappa B activation a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries *Biochem Pharmacol* **59**, 13-23
41. Tzung SP, Fausto N y Hockenbery DM (1997) Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed-early response gene. *Am J Pathol* **150**, 1985-1995
42. Higaki I, Matsui-Yuasa I, Hirohashi K, Kinoshita H y Otani S (1999) The role of polyamines in growth factor induced DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Hepato-Gastroenterol* **46**, 1874-1879
43. Sporn MB y Roberts AB. (1990) TGF β : problems and prospects. *Cell Regul.* **1**, 875-882
44. Jamso JO, Ekberg S, Hoath SB, Beamer WG y Fröhman LA. (1988) Growth hormone enhances hepatic epidermal growth factor receptor concentration in mice. *J. Clin. Invest.* **82**, 1871-1876
45. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Sciascia C, Coetza ML, Pellini R y Todo S (1987) Different response to epidermal growth factor of hepatocytes in culture isolated from male and female rat liver. Inhibitor effect of estrogen on binding and mitogen effect of epidermal growth factor. *Gastroenterology* **93**, 597-605
46. Karasik A y Kahn CR. (1988) Dexamethasone-induced changes in phosphorylation of the insulin and epidermal growth factor receptor and their substrates in intact rat hepatocytes. *Endocrinology* **123**, 2214-2222.
47. Evarts RP, Nakatsukasa H Marsden ER, Hu Z y Thorgeirsson S (1992) Expression of transforming growth factor alfa in regenerating liver and during differentiation. *Mol Carcinog* **5**, 25-31
48. Gruppuso PA, Mead JE y Fausto N (1990) Transforming growth factors receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* **50**, 1464-1469
49. Gruppuso PA (1989) Expression of hepatic transforming growth factor receptor during late gestation in foetal rat. *Endocrinology* **125**, 3037-3043

50. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A y Tashiro K. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440-443
51. Asami O, Ihara I, Shimidzu S, Tomita Y, Ichiara A y Nakamura T (1991) Purification and characterization of hepatocyte growth factor from injured liver of carbon tetrachloride-treated rats. *J Biochem* **109**, 8-13
52. Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N y Nakayama T. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 967-973
53. Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Tanoguchi S y Nakamura T. (1990) Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers as revealed by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* **173**, 42-47.
54. Rubin JS, Chan AML, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW y Aaronson SA. (1991). A broad spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 415
55. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T y Orci L. (1991) Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**, 901-908
56. Presta M, Statuto M, Rusnati M, Dell'Era P y Ragnotti G. (1989) Characterization of Mr 25,000 basic fibroblasts growth factor form in adult, regenerating, and foetal rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1182-1189
57. Kan M, Huang JS, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B y McKeehan WL. (1989) Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor) a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7432-7436
58. Suzuki M, Itoh T, Suzuki T, Koga N, Kato K, Saito T y Mitsui Y. Identification of the hepatocyte mitogen in bovine spleen as heparin-binding growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1192-1200 (1992).
59. Feinglod RK, Barker M, Jones AL Y Grunfeld C (1991) Localization of tumor necrosis factor-stimulated DNA synthesis in the liver. *Hepatology* **13**, 773-779
60. Braun L, Mead JE, Panzuca M, Mikuno R, Bell GI y Fausto N (1988) Transforming growth factor mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 1539-1543
61. Bommer UA, Junghahn I Y Bielka H (1987) The role of cytosolic fraction and of initiation factor IF-2 for changes of the rate of protein synthesis during liver regeneration. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **368**, 445-450
62. Moncada S, Palmer, RM) y Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.

63. Hauschildt S, Luckhoff A, Mulsch A, Kohler J, Bessler W y Busse R (1990) Induction and activity of NO synthase in bone-marrow derived macrophages are independent of Ca²⁺. *Biochem J* **270**, 351-356
64. Cunha FQ, Moncada S y Liew FY (1992) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the induction of NAD by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 1155-1159
65. Martínez-Hernández A y Aumenta PS (1995) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* **9**, 1401-1410
66. Kim T-H, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE y Michalopoulos GK (1997) Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* **26**, 896-904
67. Manns MP (1999) Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* **30**, 1159-1166
68. Rudolph KL, Trautwein C., Kubicka S, Rakemann T, Bahr MJ, Sedlaczek N, Schuppan D y Manns MP (1999) Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* **30**, 1159-1166
69. Scoazec JY (1992) The liver stem cells: myth or reality. En: *Liver Regeneration* (eds Bernuau D y Feldman G.) pp 17-27, John Libbey Eurotext, Paris

HEPATOTOXICIDAD Y HEPATOCARCINOGENESIS

SUMARIO

1. Introducción
2. Mitogénesis y mutagénesis.
3. Hepatocarcinogénesis inducida por xenobióticos.
4. Fases de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión
5. Apoptosis y hepatocarcinogénesis
6. TGF β y hepatocarcinogénesis
7. Células progenitoras y hepatocarcinogénesis.
8. Conclusiones
9. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

Los hepatocitos de hígado adulto normal presentan una actividad proliferativa muy baja, la cual, frente a la exposición de dosis no tóxicas de un carcinógeno, experimenta un incremento apenas detectable con pocas probabilidades de formar tumores. Sin embargo, si la dosis del carcinógeno alcanza niveles hepatotóxicos, origina muerte hepatocelular seguida inmediatamente de una hiperplasia compensatoria, que es la que da lugar a la expansión de las células *iniciadas*. Este mismo efecto se puede lograr con dosis moderadas (no tóxicas) del carcinógeno administradas durante la proliferación hepática regenerativa inducida por hepatectomía parcial o por dosis necrogénicas de otro hepatotóxico como el tetracloruro de carbono. Es un hecho conocido que los hepatocitos son más sensibles a los efectos iniciadores de un carcinógeno cuando se encuentran en el momento de la transición entre la fase G₁ y la fase S, o en los inicios de la fase S del ciclo de división celular. Una vez que el DNA se ha modificado estructuralmente en el proceso de la iniciación, si se replica con rapidez antes de que actúen

los enzimas reparadores, la modificación inducida por el carcinógeno se fija en forma de mutación. Sin embargo, si la proliferación hepatocelular se induce por un mitógeno o un agente promotor como el fenobarbital, no se consigue detectar una replicación mayor del DNA en las células iniciadas, aunque la actividad proliferativa del mitógeno sea similar a la inducida por hepatectomía parcial o la producida por dosis necrogénicas de xenobióticos. Puede ser que en la hiperplasia hepática reversible, inducida por el fenobarbital, las células iniciadas sufran la apoptosis (muerte celular programada) una vez eliminado el mitógeno. Otra explicación alternativa a este fenómeno sería que el modelo de proliferación celular inducido por mitógenos o promotores del crecimiento sea diferente del observado durante el crecimiento regenerativo postnecrótico o post-hepatectomía.

2. MITOGÉNESIS Y MUTAGÉNESIS

La mitogénesis o división celular inducida, juega un papel predominante en la carcinogénesis. Ames y Gold (1) han llegado a la conclusión que las lesiones espontáneas del DNA causadas por oxidantes endógenos son relativamente frecuentes y que más de la mitad de los agentes químicos que nos rodean (naturales y sintéticos) son carcinógenos y un elevado porcentaje de ellos son mutágenos. Se sabe que *la mitogénesis incrementa la mutagénesis*, ya que una célula en división presenta un riesgo mayor de propagar una mutación que una célula quiescente. Los mutágenos son agentes exógenos y endógenos, que causan alteraciones en la molécula del DNA por formación de aductos, que pueden convertirse en mutaciones estables durante la división celular. Las agresiones al DNA de los oxidantes endógenos por célula y día se cifran aproximadamente en 10^4 en humanos y en 10^5 en ratas. Estas alteraciones promutagénicas del DNA pueden repararse eficientemente, pero a veces la reparación no es del todo perfecta o no se realiza a tiempo, pudiéndose derivar de ellas una mutación estable. Las agresiones oxidativas del DNA producidas por especies activas de oxígeno son las causantes de las lesiones que contribuyen en mayor grado a las enfermedades degenerativas. Cualquier agente que actúe induciendo la proliferación celular es indirectamente mutágeno y carcinógeno, por incrementar la probabilidad de convertir en mutaciones las lesiones endógenas del DNA. Los agentes no genotóxicos, como la tioacetamida, son hepatocarcinógenos porque a dosis elevadas ocasionan la muerte celular e inducen la mitogénesis. Los agentes químicos genotóxicos, como el 2-acetilaminofluoreno, son incluso más efectivos que los no genotóxicos, porque no sólo causan mitogénesis a elevadas dosis, como respuesta proliferativa al proceso necrótico, sino que además actúan como mutágenos. A pesar de ésto, se sabe que

el 2-acetilaminofluoreno induce tumores hepáticos a dosis moderadas con una velocidad baja de mitogénesis, lo que demuestra que estas excepciones aparentes tienen una importancia crítica.

3. HEPATOCARCINOGENESIS INDUCIDA POR XENOBIÓTICOS

Es interesante destacar que aproximadamente el 60% de los agentes químicos ensayados por el Programa Nacional de Toxicología en los Estados Unidos, son carcinogénicos y originan tumores hepáticos en ratas y ratones. Algunos de estos carcinógenos son sólo débilmente genotóxicos y muchos funcionan más bien como agentes promotores de tumores. Una serie de agentes terapéuticos pueden presentar riesgo para la especie humana porque actúan como promotores tumorales. Entre ellos se incluyen: los esteroides anticonceptivos, el antiestrógeno tamoxifeno, las benzodiazepinas, la dioxina, los proliferadores de peroxisomas (agentes hipolipidemiantes) y el fenobarbital. Por tanto, para valorar exactamente el riesgo carcinogénico de estos xenobióticos, es necesario determinar los mecanismos moleculares por los cuales estos promotores tumorales elevan el riesgo de formación de tumores.

La hepatocarcinogénesis inducida por xenobióticos se caracteriza por el desarrollo escalonado de lesiones hepáticas morfológicamente diferentes. En las fases iniciales, posteriores a la exposición al carcinógeno, aparecen numerosas proliferaciones clonales de hepatocitos fenotípicamente alterados, denominadas *focos*. Más tarde se desarrolla un número limitado de tumores benignos denominados *nódulos hiperplásicos o neoplásicos*, que posteriormente degeneran en el carcinoma hepatocelular. Esta secuencia de acontecimientos, común a la mayoría de modelos experimentales, es independiente del carcinógeno utilizado o del modo de administración y demuestra la naturaleza multiescalonada de la génesis del cáncer.

La carcinogénesis es el resultado de tres etapas diferentes: *iniciación, promoción y progresión*. Estas tres etapas se han caracterizado en muchos sistemas experimentales de mamíferos, particularmente en el hígado y en la piel. De acuerdo con el concepto de carcinogénesis multiescalonada, en cada etapa del desarrollo surgen clones de células con mayor autonomía y a partir de estas poblaciones seleccionadas de células se desarrolla el neoplasma (2).

En los años cuarenta Friedwald y Rous (3) y Berenblum (4) demostraron que ciertas combinaciones de tratamientos químicos actuaban sinérgica-

mente en la formación de tumores de piel. Estos autores observaron que la aplicación de una pequeña cantidad de un hidrocarburo policíclico carcinogénico, sobre la piel de ratón, originaba unos pocos tumores. Sin embargo, si este tratamiento se unía a la exposición continuada de un extracto de planta no carcinogénico, como el aceite de cróton, el ratón generaba rápidamente un gran número de tumores de piel. En estos estudios pioneros, el tratamiento con el hidrocarburo policíclico, se describió como un acontecimiento iniciador, mientras que el aceite de cróton actuaba como promotor tumoral. Desde entonces, se ha acumulado una serie de evidencias que han llegado a proponer que este modelo de carcinogénesis multiescalonada se puede aplicar a la formación neoplásica en todas las células epiteliales entre las que se incluyen las de la vejiga urinaria, las del pulmón, colon, hígado y mama.

Desde estos primeros estudios carcinogénicos, se han desarrollado muchos modelos experimentales. En todos ellos, es posible identificar las tres distintas etapas antes mencionadas, para el desarrollo del tumor. La iniciación, la primera etapa de la carcinogénesis, implica la formación de células que contienen un cambio genético irreversible, que las capacita para sufrir una expansión clonal con la influencia de un promotor. Esta alteración genética o mutación puede ocurrir espontáneamente o en respuesta a agentes físicos o químicos y puede ser consecuencia de eventos genéticos o epigenéticos (ambientales). La *promoción* es una etapa reversible que implica la expansión clonal selectiva de las células iniciadas en focos de células alteradas. Subgrupos de células de estos focos se desarrollan posteriormente mediante un proceso de transformación neoplásica que conduce al fenotipo maligno. A esta etapa final se ha denominado *progresión* (5). Durante la progresión tumoral van apareciendo alteraciones genéticas adicionales, que implican la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, que al final van a dar lugar a tumores con crecimiento autónomo y capacidad para metastatizar (6, 7).

Los compuestos químicos con actividad iniciadora son muy numerosos y entre ellos cabe destacar la dietilnitrosoamina como el agente más utilizado como iniciador de la hepatocarcinogénesis en especies de murinos, debido a su capacidad para inducir la proliferación hepatocelular postnecrótica. El modelo experimental que se consigue en ratas por exposición a dosis hepatotóxicas de este agente alquilante, es óptimo para investigar las relaciones existentes entre la necrosis, la iniciación y la replicación (8).

Hasta el momento estos modelos de hepatocarcinogénesis química se han utilizado para caracterizar las fases de iniciación y promoción, estu-

diándose en ellos las respuestas biológicas relativas a estas fases. En la actualidad el interés de los investigadores se inclina más bien a profundizar en los mecanismos de la proliferación celular, que se encuentran implicados en la secuencia de acontecimientos que conduce a la hepatocarcinogénesis, tratando de relacionar la proliferación con el riesgo de mutaciones y el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas.

De acuerdo con esto, se han establecido relaciones entre la necrosis hepatocelular, la replicación del DNA y la aparición de hepatocitos glutatión-S-transferasa placentaria positivos (GST-P), mediante la administración de dosis hepatotóxicas de dietilnitrosoamina a ratas, que inducen necrosis perivenosa a las 48 horas, seguida de un proceso regenerativo compensatorio con un máximo a las 96 horas. Las alteraciones posteriores a la administración de una dosis hepatotóxica de este agente, demuestran que la proliferación celular postnecrótica contribuye de manera positiva a elevar el número de *células iniciadas*. La forma de detectar estas células se realiza mediante la evaluación de marcadores neoplásicos como la GST-P. Se ha comprobado que existe una estrecha dependencia entre la frecuencia de células GST-P positivas y la replicación del DNA en el proceso de regeneración hiperplásica (9, 10).

Ya hemos visto que la alteración del DNA y su replicación son requisitos indispensables para la iniciación de los hepatocitos de rata. Los aductos en la cadena del DNA se forman durante los dos primeros días después de la inyección de dietilnitrosoamina. Inmediatamente después se registra una marcada elevación de la replicación del DNA, cuyo objeto es convertir los aductos-DNA en mutaciones en las células hijas. Por tanto, es el desencadenamiento rápido de la proliferación celular, por acción del carcinógeno, lo que produce la expansión de las células iniciadas; o dicho de otro modo, el estímulo regenerativo ocasionado por la administración del carcinógeno en dosis hepatotóxicas es esencial para la fijación de las lesiones genéticas en las células iniciadas.

El efecto iniciador máximo de un hepatocarcinógeno se obtiene cuando su administración coincide con la entrada en la fase S (síntesis de DNA) del crecimiento hepatocelular regenerativo. La respuesta proliferativa de las células del conducto biliar es más tardía y su entrada en la fase S se verifica con 12 horas de retraso respecto a la de los hepatocitos. En este momento se ha observado que el carcinógeno iniciador no ejerce virtualmente ningún efecto.

Para que la carcinogénesis progrese más allá del estado de iniciación es necesario fijar la mutación del DNA en un genoma diploide. Esto se

debe a que sólo en el genoma diploide podrá expresarse dicha mutación (a través de la pérdida del alelo normal o de las funciones represoras), y a que sólo las células diploides pueden presentar la pluripotencialidad necesaria para la expansión clonal de la población iniciada. Existen, por tanto, dos causas fundamentales que conducen al cáncer: los efectos genotóxicos sobre el DNA (xenobióticos, radiaciones, etc.) y el incremento de la proliferación celular (hormonas, mitógenos, etc). De estas dos causas, actualmente se da mayor importancia al incremento de la proliferación celular. La genética molecular ha puesto en evidencia que la división celular es esencial para la inducción de la carcinogénesis y que el riesgo de cáncer se eleva en proporción directa a la proliferación celular. El *incremento en la división celular* implica que la actividad mitótica de una determinada población es superior a la normal. El riesgo de errores genéticos se eleva cuando la división celular es mayor de forma que las alteraciones del DNA se convierten en mutaciones y las recombinaciones mitóticas del DNA provocan cambios aún más profundos que una simple mutación (11).

Por tanto, una secuencia de alteraciones en los mecanismos que regulan la división celular normal, se encuentra implícita en el desarrollo de un tumor maligno. Estas alteraciones se resumen en dos: la activación o expresión alterada de proto-oncogenes, y la pérdida o inactivación de genes supresores. La activación de proto-oncogenes por mutación, translocación o amplificación, requiere división celular. La inactivación de un gen supresor necesita inicialmente de una mutación que inactive un alelo, seguida de una deleción durante la mitosis que origine la homocigotidad. La fijación de la mutación inicial y la pérdida del gen supresor en el alelo original requieren proliferación celular.

La progresión a través del ciclo celular se verifica mediante la acción coordinada de factores de crecimiento y oncogenes. Los factores de crecimiento promueven que las células en G_0 se incorporen al ciclo celular. La respuesta mitogénica se verifica en dos pasos: en el primero, la célula quiescente G_0 avanza hacia G_1 por efecto de factores de «competencia» y en el segundo, la célula verifica la transición $G_1 \rightarrow S$, bajo la influencia de factores de «progresión» (11).

De todo lo anteriormente expuesto queda claro que una de las características básicas del cáncer es la proliferación celular incontrolada. Es interesante destacar, que la patogénesis de un tumor debe referirse a los mecanismos reguladores del crecimiento normal del tejido originario de dicho tumor, ya que cada tipo tisular posee un programa proliferativo

específico de su diferenciación funcional. Se ha demostrado que la mayor parte de los focos hepáticos, nódulos hiperplásicos y hepatocarcinomas son diploides, lo que hace suponer que la población de hepatocitos diploides es más susceptible a la iniciación. Una vez iniciadas, las células son incapaces de sufrir la poliploidización debido a la rápida replicación de su DNA. Esto se debe a que después del tratamiento con una serie de carcinógenos químicos, en los estadios iniciales (preneoplásicos), aparezca una significativa expansión de la población diploide de los hepatocitos. Esta expansión diploide aumenta el riesgo de la progresión carcinogénica de dos formas: elevando la expresión de mutaciones oncogénicas (las cuales se expresan con menos probabilidad en un genoma poliploide, donde los alelos normales dominantes y los genes represores se encuentran en exceso); y aumentando el número de células progenitoras potencialmente tumorales. Tomando como cierto el hecho de que la poliploidización es un fenómeno irreversible, las células poliploides no pueden generar células diploides. Por tanto, los nódulos diploides preneoplásicos postnecróticos deben surgir a partir de células diploides progenitoras. La mera existencia de una fracción hepatocelular diploide, por pequeña que sea, en el interior de un tumor hepatocelular clonal, debe excluir su origen a partir de células poliploides. La presencia de células diploides en todos los tumores hepatocelulares examinados refuerza la hipótesis del origen de tales tumores (12, 13).

4. FASES DE LA CARCINOGENESIS: INICIACIÓN, PROMOCIÓN Y PROGRESIÓN

La *iniciación* se caracteriza por la naturaleza irreversible de la lesión genética originada por el carcinógeno. Para el estudio de la hepatocarcinogénesis, la producción de una población de células iniciadas puede conseguirse mediante una serie de técnicas y tratamientos. La exposición del hígado a un carcinógeno no es suficiente por sí misma para producir células iniciadas. La mayoría de los protocolos requieren también de proliferación celular incrementada para «fijar» las alteraciones inducidas por el carcinógeno en el genoma celular. Como en el hepatocito adulto la capacidad proliferativa es baja, para que la iniciación sea eficiente después de la administración de una sola dosis de un genotóxico químico, como la dietilnitrosoamina, se requiere que se someta a los animales previamente a una hepatectomía parcial para inducir la proliferación (14), o administrar la dosis del carcinógeno en animales muy jóvenes en los que el hígado se encuentra todavía proliferando. Alternativamente, puede administrarse una dosis subletal necrogénica del carcinógeno que conlleve a necrosis hepática

y a la proliferación celular regenerativa compensatoria (9). Sin embargo, se ha demostrado que la administración de una gran dosis de dietilnitrosamina produce cambios cariotípicos y aneuploidia frente a los cambios producidos por dosis pequeñas del mismo tóxico administradas a animales justo después del nacimiento. Más recientemente, se ha observado que la iniciación puede ser un proceso reversible, ya que las células iniciadas, en determinadas condiciones, como la restricción calórica, se eliminan del hígado por apoptosis (15). La eliminación de las células iniciadas del hígado por apoptosis no quiere decir que se revierta la lesión al DNA inducida por el carcinógeno en el proceso de iniciación

El estudio de los hepatocitos iniciados ha sido difícil por la incapacidad de detectarlos en una fase temprana del desarrollo. Se ha sugerido como marcador el isoenzima placentario de la glutatión-S-transferasa (GST-P) para estudiar los hepatocitos iniciados en las etapas iniciales de su desarrollo, ya que el número de hepatocitos GST-P positivos presentes en el hígado se relaciona con la dosis de dietilnitrosamina administrada. Aunque el parámetro GST-P puede ser útil para el estudio de la fase inicial de la carcinogénesis, no todas las células iniciadas son GST-P positivas (12).

La segunda etapa de la carcinogénesis, *la promoción*, fue demostrada por Peraino et al., (16), quienes administraron un carcinógeno, el 2-acetilaminofluoreno a ratas durante 2 semanas y después las sometieron a una dieta que contenía fenobarbital. Los animales expuestos al carcinógeno y al fenobarbital desarrollaron muchos más tumores que las ratas expuestas solo al carcinógeno. Además, muy pocos animales tratados solo con el fenobarbital, desarrollaron tumores hepáticos. Con estos experimentos se definieron tres características importantes de la promoción tumoral del hígado:

- (a) La fase de promoción de la carcinogénesis hepática es reversible. La eliminación del tratamiento con un promotor conlleva a un decremento en el número y tamaño de los focos, mientras que su readministración causa su rápida reaparición.
- (b) Para observar un efecto de promoción tumoral, los animales han de ser expuestos al agente promotor por largos períodos. La exposición a fenobarbital y a ácido orótico durante unos 3 meses es necesario para la máxima promoción tumoral.
- (c) Las curvas dosis-respuesta de un promotor muestran un umbral aparente por debajo del cual los efectos no son detectables (17).

Antes de desarrollarse tumores realmente visibles, el hígado de ratas tratadas con carcinógenos contienen áreas focales de hepatocitos iniciados proliferantes que pueden identificarse por tinción histoquímica. Estos focos hepáticos son de origen clonal (18) y se cree que se desarrollan en respuesta directa al tratamiento con un agente promotor y representan la expansión clonal de las células iniciadas. Los focos hepáticos crecen progresivamente y su velocidad de síntesis del DNA es mucho mayor que la del tejido que los rodea. A partir de aquí, algunos de estos nódulos llegan a crecer de manera autónoma, independiente del agente promotor, y son los que van a dar lugar a la transformación y la malignidad (Figura 1).

Al contabilizar los hepatocitos iniciados hay que destacar que, aunque puedan detectarse 1 millón de células GST-P positivas en el hígado de ratas tratadas con dietilnitrosamina, solo mil desarrollarán focos después de la promoción con fenobarbital, y de estas mil, solo una pequeña porción dará lugar al carcinoma hepatocelular. Está claro que, incluso bajo la influencia de este potente promotor, no todas las células iniciadas pueden expandirse clonalmente en focos. Esto ha hecho pensar que los diversos promotores promueven diferentes subpoblaciones de células iniciadas cuyas estructuras genotípicas proporcionan una ventaja selectiva de crecimiento (19). En realidad, los análisis de los perfiles fenotípicos e histológicos de los focos hepáticos promovidos con fenobarbital o con tamoxifeno, han mostrado que la mayoría de focos inducidos por fenobarbital eran GST-P positivos.

La *progresión* es la etapa menos estudiada y menos conocida de la carcinogénesis. El concepto de progresión proviene de la observación que sólo una pequeña subpoblación de los focos expandidos clonalmente, persisten y se desarrollan en un verdadero neoplasma. En la progresión, los focos persistentes pueden sufrir una serie de cambios irreversibles que con-



FIGURA 1. Etapas de la carcinogénesis hepática: Iniciación, promoción y progresión. Los hepatocitos preneoplásicos (círculos blancos) y los hepatocitos neoplásicos (círculos negros) están rodeados por hepatocitos normales los cuales proliferan en número (hiperplasia) y tamaño (hipertrofia) por efecto del fenobarbital (2)

ducen al carcinoma hepatocelular. Las características más reconocidas de la progresión son la inestabilidad genómica, la aneuploidia y la metástasis.

Estudios a nivel molecular han detectado también cambios en la expresión de proto-oncogenes y de genes supresores de tumores en una variedad de tumores (20). La expresión celular de los proto-oncogenes *c-Ha-ras* y *c-myc* no están incrementados en los focos pero sí lo están en algunos hepatocarcinomas. Además las alteraciones en la expresión de *c-myc* y *src* se han demostrado en hepatocarcinoma inducidos por exposición de los animales a 3'-metil-4-dimetilaminobenceno o al protocolo de Solt y Farber (21)

5. APOPTOSIS Y HEPATOCARCINOGENÉISIS

La apoptosis juega un papel en cada una de las etapas, reconocidas experimentalmente, de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión. La irreversibilidad de la iniciación es un concepto importante del proceso multiescalonado de la carcinogénesis, que se encuentra apoyado por numerosos datos experimentales. Sin embargo, si las células iniciadas ocasionalmente se mueren, esto indica que un cierto porcentaje de estas células iniciadas o de clones celulares iniciados puede extinguirse. La probabilidad depende de la proporción de las tasas de proliferación y muerte celulares en el clon. La apoptosis en hepatocitos normales tiene lugar a tasas extremadamente bajas, que se elevan en casos de restricción calórica de la dieta y se ha demostrado que lesiones espontáneas preneoplásicas y neoplásicas en hígado, como también los hepatocitos iniciados, disminuyen cuando a los animales se les administra una dieta restringida en calorías. En modelos experimentales de hepatocarcinogénesis se ha realizado una predicción matemática, que ha demostrado que la mayoría de las células iniciadas desaparecen por apoptosis (22, 23). Esta proporción se elevó sometiendo a los animales iniciados a una disminución a un 60% en el contenido calórico de la dieta (restricción calórica) durante tres meses, lo cual dió como resultado un declinar en la síntesis del DNA, una tendencia hacia la apoptosis y una pérdida del 20% de las células hepáticas. El posterior tratamiento con el promotor nafenopina, indujo muchos menos tumores en estos animales, que en los animales alimentados *ad libitum* (14).

Por tanto, se puede concluir que la hepatocarcinogénesis espontánea o la inducida experimentalmente con un agente iniciador se regula negativamente por apoptosis. Sin embargo, hay que destacar que la restricción dietética suprime la expresión de Fas (receptor de muerte), indicando que la vía FasL/Fas no debe jugar un papel importante en la apoptosis inducida por

restricción calórica. Períodos cortos de ayuno agudo, que conducen a una reversión completa del crecimiento clonal de los hepatocitos iniciados, como resultado de la apoptosis de las células en clones iniciados, no causan apoptosis de las células progenitoras de los clones (24).

Sin embargo, no hay que olvidar que, dependiendo del factor de crecimiento extracelular presente, las células pueden permanecer en G0, pasar de G0 a G1 o sufrir la apoptosis (Figura 2). La entrada en el ciclo celular y el paso a través del punto de restricción (R) depende también de señales extracelulares. Defectos en el R conducen a inestabilidad genómica, una característica de las células cancerosas.

La expansión clonal de los hepatocitos iniciados se verifica durante la etapa de la promoción. Esta expansión se origina por un incremento selectivo de la proliferación celular y por una disminución selectiva de la apoptosis de los hepatocitos preneoplásicos. Se ha demostrado experimentalmente que diversos agentes promotores, que son efectivos en la hepatocarcinogénesis, inhiben selectivamente la apoptosis. Estos agentes incluyen el tetracloro dibenzo-p-dioxina, el fenobarbital y el acetato de ciproterona. La eliminación de un agente promotor durante la hepatocarcinogénesis de la rata causa un enorme incremento en la apoptosis de los hepatocitos y de los focos preneoplásicos.

Los promotores tumorales, por tanto, no solo elevan el tamaño de los focos al elevar la proliferación, sino que reducen la tasa de muerte celular (25, 26). La apoptosis de los hepatocitos después de haber suprimido la administración del agente promotor, acetato de ciproterona o nafenopina, se localiza en la región periportal e implica a aquellos hepatocitos no incluidos en la inducida hiperplasia (26). El TNF α (Factor de necrosis tumoral α) puede simular el efecto de la nafenopina sobre la apoptosis de los hepatocitos y sobre la síntesis del DNA, tanto *in vivo* como *in vitro* (28). Estos efectos de los agentes promotores sobre las células preneoplásicas no son únicos del hígado, sino que se han observado también en carcinogénesis de vejiga urinaria, colon y en células mieloides normales y leucémicas.

Durante la etapa de la progresión en la hepatocarcinogénesis, la tasa de la apoptosis parece elevarse con la proliferación celular incrementada, a pesar que la expresión de Bcl-2 aparece en una minoría de carcinomas hepatocelulares humanos y en hepatomas de ratón inducidos por agentes químicos. En recientes experimentos de nuestro grupo hemos podido observar que El TGF β , es un inductor reconocido de la apoptosis en cultivos de hepatocitos de rata (29), pero este mismo factor produce efectos variables o

nulos sobre una variedad de líneas celulares de hepatoma derivadas de ratas y de humanos

Las evidencias experimentales anteriormente mencionadas demuestran que la muerte celular por apoptosis juega un importante papel en las tres etapas de la hepatocarcinogénesis (25). Sin embargo, se argumenta también, que los mecanismos principales implicados en la apoptosis en hepatocitos normales están mediados a través de vías ligando-receptor, particularmente aquellas que implican al $TNF\alpha$ y al $TGF\beta$. Las evidencias sugieren que al menos un miembro de la vía del $TNF\alpha$ está suprimido durante la elevación de la apoptosis de hepatocitos iniciados por restricción dietética (30). Se ha descrito también, la acumulación del $TGF\beta$ en hepatocitos individuales preapoptóticos, pero no en hepatocitos específicamente iniciados. Como se ha demostrado que el $TNF\alpha$ simula el efecto supresor de la apoptosis por



FIGURA 2. Factores del crecimiento que controlan la homeostasis del tejido hepático. Los hepatocitos *in vivo* están afectados por estimuladores e inhibidores del crecimiento. Cuando los efectos de estos dos tipos opuestos de factores del crecimiento se equilibran entre ellos los hepatocitos permanecen en el estado quiescente G_0 . Por el contrario, una alteración en las señales de los factores del crecimiento puede estimular a los hepatocitos a entrar en el ciclo celular incrementándose su número, o inducir a los hepatocitos a sufrir la apoptosis. Una vez en el ciclo celular el $TGF\beta$ juega una misión importante regulando la velocidad a la cual los hepatocitos atraviesan el punto de restricción (R) y entran en la fase S. Cdk, ciclinas dependientes de quinasas; HGF, factor del crecimiento de hepatocitos; IGF2, factores del crecimiento insulínico; $TGF\alpha$, factor transformante del crecimiento α ; $TGF\beta$, factor transformante del crecimiento β .

un agente promotor, esto hace suponer que esta vía no instiga la apoptosis durante las etapas de iniciación y promoción; más bien puede servir para elevar o incluso mediar parcialmente los efectos de los agentes promotores, inhibidores de la apoptosis, en hepatocitos. Por el contrario, los agentes promotores pueden prevenir los efectos autocrinos del TGF β que ocurren en hepatocitos (31). Por otro lado, el mecanismo implicado en la elevación de la apoptosis observados en carcinomas hepatocelulares es confuso. En las fases iniciales de la progresión, las células neoplásicas exhiben todavía efectos reguladores de agentes promotores. De esta manera, los efectos detectados pueden ser una magnificación de los llevados a cabo por un incremento de la replicación celular, inherente a las células durante la progresión. Así como la progresión progresa con su evolución de anormalidades genéticas, se restringen las señales de los ligandos inductores de la apoptosis, probablemente por una carencia en la expresión de sus receptores. Es probable que en estas situaciones la elevada tasa de apoptosis se relacione más con las perturbaciones en el ciclo celular y en los factores de transcripción; simplemente porque las anormalidades en el genoma y la expresión alterada de los componentes del ciclo celular y de enlace al DNA (26) son numerosas y típicas de esta etapa. En cualquier caso, un mayor conocimiento de los mecanismos de la regulación, inducción e inhibición de la apoptosis en hígado normal, hiperplásico, preneoplásico y neoplásico ha de hacer avanzar nuestro conocimiento en el campo de la hepatología.

6. TGF β Y HEPATOCARCINOGENÉISIS

Los promotores tumorales incrementan el número y el tamaño de los tumores. Los tumores en desarrollo están rodeados por hepatocitos normales, por tanto, para comprender a nivel tisular el mecanismo mediante el cual los promotores inducen la formación tumoral, es importante apreciar los efectos inductores de la proliferación, no sólo sobre las células iniciadas, sino también sobre aquellas normales que las rodean. En el hígado, donde operan los mecanismos homeostáticos, el efecto del crecimiento diferencial, que los agentes promotores tienen sobre los hepatocitos normales *versus* los iniciados, es lo que va a proporcionar la presión selectiva que va a dar lugar a la formación del tumor.

Cuando los animales se exponen al fenobarbital, el hígado incrementa su tamaño y su celularidad. Parte de este incremento en la masa hepática se debe a hipertrofia celular; sin embargo, el fenobarbital también causa un grado significativo de hiperplasia, principalmente en la región perivenosa del acino hepático. Esta respuesta proliferativa, la cual puede ser, en parte, resultado de

una mayor concentración plasmática del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) (32), llega a su máximo a los 3 días del comienzo del tratamiento crónico con fenobarbital, y retorna a los niveles normales 1 o 2 semanas más tarde. Así, el efecto a corto plazo del fenobarbital es un incremento transitorio de la proliferación de los hepatocitos. Se requiere un período de unos tres meses de administración continuada de fenobarbital, para promover al máximo la formación tumoral hepática. Es necesario, por tanto, determinar los efectos que la administración de fenobarbital, a corto y largo plazo, ejercen sobre la proliferación de los hepatocitos normales e iniciados para poder caracterizar los mecanismos de la promoción tumoral en hígado. Resultados de Jirtle et al., (33) han demostrado que la capacidad proliferativa de los hepatocitos resulta significativamente reducida por exposición crónica al fenobarbital. Otros promotores tumorales como el ácido orótico (34) y el etinil estradiol (35), muestran también efectos mitoinhibidores cuando se administran a largo plazo. Así que, aunque el fenobarbital eleve inicialmente la proliferación de los hepatocitos por encima de lo normal, la exposición crónica a este fármaco, requerida para la promoción tumoral, disminuye dramáticamente el potencial de crecimiento de los hepatocitos normales en relación al de las células iniciadas. Esta reducida capacidad de los hepatocitos tratados con fenobarbital para proliferar en respuesta a estímulos mitogénicos, se relaciona con una significativa reducción en el número de receptores del factor del crecimiento epidérmico (EGF), una pérdida en la capacidad de la proteína quinasa C a ser translocada a la membrana y a un incremento en el receptor M6P/IGF2 (manosa-6-fosfato/factor de crecimiento insulínico 2) y en la expresión del TGF β 1 en los hepatocitos normales, pero no en iniciados (36, 37). Estos últimos resultados resaltan la importancia del TGF β en la oncogénesis de los tumores hepáticos. (Figura 3).

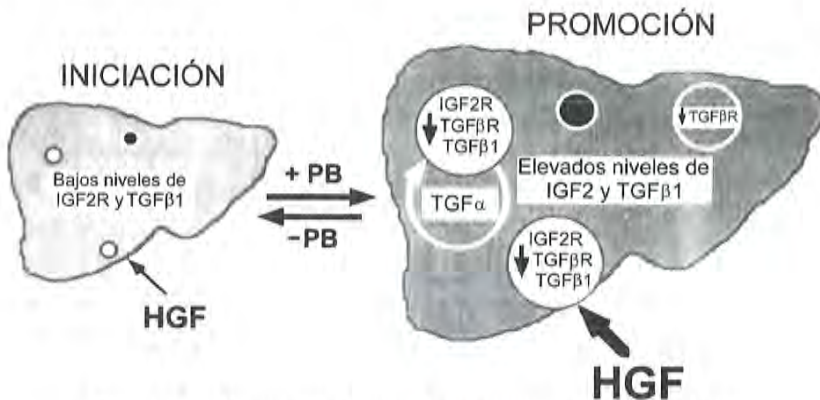


FIGURA 3. Promoción tumoral en respuesta a fenobarbital

El TGF β no se segrega en forma activa sino como complejo latente, que no puede unirse a sus receptores (I, III y III), a menos que sea activado por proteólisis. El complejo latente TGF β contiene residuos de manosa-6-fosfato, por lo que puede unirse al receptor M6P/IGF2R. La unión del complejo latente TGF β a este receptor facilita la activación en la que interviene el enzima proteolítico plasmina cuando se encuentra en presencia de la transglutaminasa. Por tanto la regulación de la síntesis y la activación del TGF β son eventos importantes implicados en el control de los efectos biológicos del TGF β en los tejidos y el receptor M6P/IGF2R juega un papel central en la activación de estos procesos (Figura 4). Aunque la unión del complejo latente TGF β al M6P/IGF2R conlleva su internalización y posterior degradación en los lisosomas, la activación extracelular del TGF β , resulta enormemente incrementada

Se ha postulado que el gen *M6P/IGF2R* puede funcionar como un gen supresor de tumores. De acuerdo con este postulado Jirtle et al., (36) han encontrado que la expresión de *M6P/IGF2R* y del TGF β es muy baja en tumores de hígado de rata inducidos por fenobarbital (37).

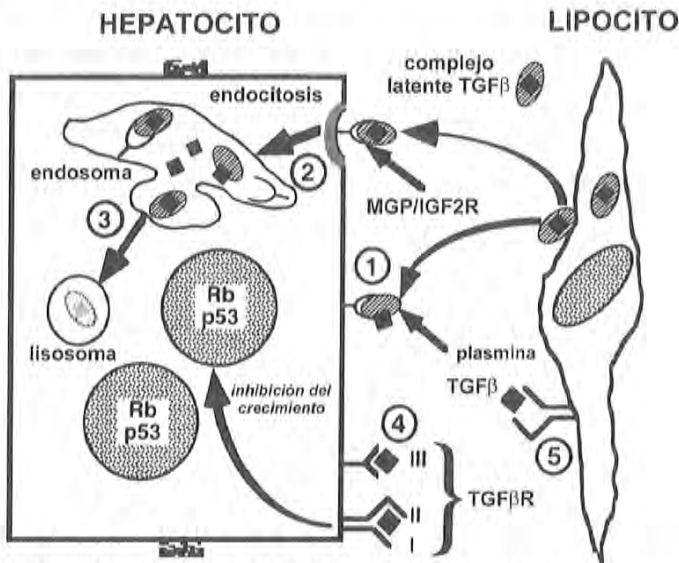


FIGURA 4. Modelo de activación del TGF β en tumores hepáticos expuestos a fenobarbital. El complejo latente TGF β está producido por los lipocitos, y se une al receptor M6P/IGF2 sobre la superficie de los hepatocitos (1) donde se activa por la acción proteolítica de la plasmina. Alternativamente, el complejo latente TGF β se internaliza en el compartimento preendosómico (2), y el TGF β se degrada en los lisosomas (3). Una vez activo, el TGF β se une a sus receptores (TGF β R) tipos I, II y III (4) e inhibe la proliferación de los hepatocitos, mientras que estimula a los lipocitos a producir más complejo latente TGF β (5).

7. CÉLULAS PROGENITORAS Y HEPATOCARCINOGENESIS

La capacidad de autoconservación es un rasgo común y fundamental de todas las células pluripotentes (38). En este contexto, el hígado adulto, que posee una gran capacidad para mantener el número de sus células parenquimáticas a lo largo de toda la vida del organismo, ha de ser considerado como un sistema celular pluripotente en el que el hepatocito es la célula progenitora (39).

La existencia de *células madre pluripotentes* en hígado es un tema muy discutido por los hepatólogos, y fue postulada por primera vez por Wilson y Leduc en 1958 (40). La demostración de su existencia supone un gran logro que ha de repercutir en la evaluación correcta de los múltiples aspectos relacionados con la regeneración hepatocelular postnecrótica y con las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis. Terada y Nakamura (41) han estudiado la morfología, funciones, inervación, suministro sanguíneo y cambios patológicos en poblaciones progenitoras de las células de los conductos biliares en casos de enfermedad hepática y han observado que las glándulas peribiliares intrahepáticas surgen a partir de hepatocitos periportales inmaduros en el hilio hepático.

El desarrollo embrionario del hígado se inicia a las 3 ó 4 semanas de gestación derivado del mesodermo. En el interior del mesénquima del *septum* transversal se diferencia y crece una masa de células inmaduras. En el interior de esta masa de células progenitoras inmaduras y en rápido desarrollo, van apareciendo canalículos biliares y sinusoides. Estas células pueden diferenciarse, unas en el linaje hepatocítico (hepatoblastos), mientras que otras, las que se encuentran en contacto directo con el mesénquima que rodea al terminal porta, pueden transformarse en células de la placa ductular que se diferencian en el linaje biliar epitelial (Figura 5). Las células progenitoras se definen como células inmaduras de morfología no descrita, con capacidad proliferativa ilimitada, clonogenicidad y pluripotencia. Son indiferenciadas o parcialmente diferenciadas y tienen la capacidad de proliferar y desarrollarse a través de diversas líneas celulares. Las células maduras de un tejido adulto derivan de la multiplicación y diferenciación de una sola célula primigenia. Este proceso es fundamental durante la embriogénesis y la organogénesis en los que cada paso en la diferenciación está representado por poblaciones puras. El mismo proceso persiste en el organismo adulto para asegurar, por un lado, la *renovación* continua de las células maduras que han finalizado su periodo de vida, y por otro, la *restauración* de un órgano que ha sufrido una lesión (39).

La génesis de los tumores hepáticos se verifica a través de múltiples mecanismos moleculares que dependen de la naturaleza del carcinógeno y de las lesiones inducidas por dicho carcinógeno. Como ya se mencionó en el capítulo 8 de este volumen, el sistema hepático debe ser considerado compuesto por dos sistemas de células progenitoras: el unipotencial hepatocítico y el multipotencial ductular (Figura 5). Por tanto, parece razonable esperar que ambos sistemas han de proporcionar células progenitoras para los procesos neoplásicos. No hay duda que el propio hepatocito es frecuentemente el progenitor de los tumores hepáticos (42). La intervención del sistema ductular en la génesis de los tumores hepáticos es aún tema de debate. Se ha propuesto que la célula que da origen al cáncer hepático es la célula progenitora hepática o su progenia, la célula ductular de transición (43, 44). Alternativamente, Farber (42) ha propuesto que los hepatocitos originales, maduros y poco comunes, que aparecen después de la iniciación con carcinógenos genotóxicos en las zonas 1, 2 y 3 del hígado adulto, son el origen celular de los focos de hepatocitos alterados y los nódulos derivados de estos focos. El tema central para mejor comprender la implicación de las células no parenquimáticas epiteliales (ductulares), en el proceso hepatocarcinogénico es la caracterización de los mecanismos que regulan la proliferación de estas células después de la agresión carcinogénica y los factores que gobiernan el compromiso del linaje celular en este proceso.

Una importante contribución a la intervención de las células no parenquimáticas del hígado a la hepatocarcinogénesis fue proporcionada por Farber

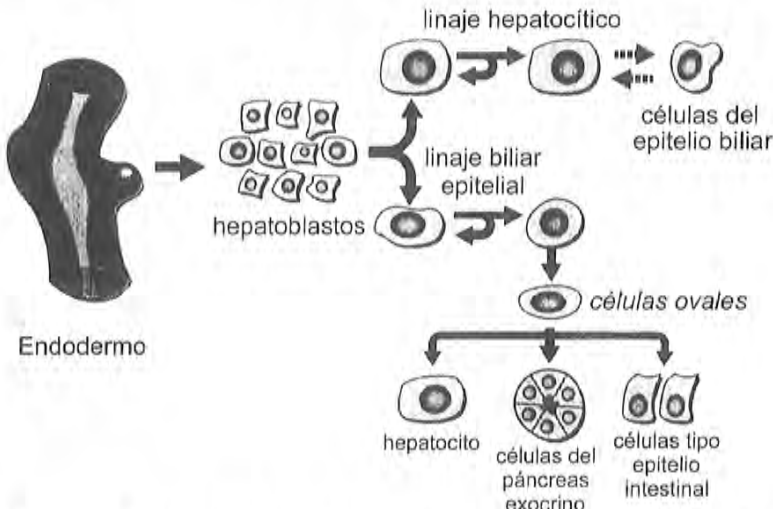


FIGURA 5. Interrelación entre las células ovasales y linajes biliar y hepatocítico (39).

en 1956 (45), quien realizó una detallada descripción muy documentada de los cambios histológicos iniciales durante la hepatocarcinogénesis causada por tres agentes químicos hepatocarcinógenos. Los carcinógenos utilizados por Farber fueron la etionina, el 2-acetilaminofluoreno y el 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (Me-DAB). Estos compuestos, a pesar de ser estructuralmente muy diferentes, causan alteraciones histológicas muy similares. Las características comunes de estos tres carcinógenos son las siguientes:

- (a) proliferación de las células ovasales las cuales comprometen la mayor parte del lóbulo hepático, comenzando en las áreas portales;
- (b) cambios degenerativos e hipertróficos en los hepatocitos adyacentes a las células ovasales proliferativas; y
- (c) hiperplasia regenerativa nodular de las células hepáticas.

Sin embargo, se encontraron importantes diferencias en el curso del tiempo en la aparición y destino de las células ovasales inducidas por estos carcinógenos. Mientras que, en el caso de la etionina y el 2-acetilaminofluoreno, la aparición de las células ovasales fue a los 7 y 14 días, respectivamente, en el caso del Me-DAB la aparición de células ovasales fue posterior (21 días). Hay que destacar que el destino de las células ovasales en el modelo tratado con Me-DAB fue diferente al de los otros dos carcinógenos. En las fases iniciales las células ovasales inducidas por el Me-DAB fueron morfológicamente similares a aquellas generadas por los otros dos carcinógenos. Sin embargo, en etapas más tardías fueron numerosas las áreas de transición aparente entre las células ovasales y los hepatocitos en el caso de animales tratados con Me-DAB y ausentes en aquellos animales que recibieron etionina y 2-acetilaminofluoreno (45).

Estas observaciones llevan a importantes consideraciones: La primera, y la más importante, es que muchos compuestos químicos capaces de producir tumores hepáticos en ratas y ratones, inducen una secuencia similar de cambios histológicos en los cuales la hiperplasia de células ovasales es prominente. La segunda considera que si la transición desde las células ovasales a los hepatocitos puede observarse morfológicamente, después del tratamiento con Me-DAB, entonces está en principio establecido que las células ovasales (o al menos una subpoblación de células ovasales) tienen la capacidad de diferenciarse en hepatocitos. El hecho de que la administración de etionina o 2-acetilaminofluoreno no proporcionen la misma secuencia morfológica que se observa en el caso de la administración de Me-DAB, en donde las células ovasales emergen imperceptiblemente y están en continuidad con

los nódulos regenerativos, sugiere que los compuestos capaces de inducir la proliferación de las células ovasales afecta enormemente la tasa y la intensidad de la diferenciación de las células ovasales en hepatocitos. El que una gran población de células ovasales se divida durante las etapas iniciales de la hepatocarcinogénesis química y que estas células puedan diferenciarse en hepatocitos hace pensar que al menos un porcentaje de los carcinomas hepatocelulares derivan de progenitores de las células ovasales (45).

El origen de las células iniciadas por acción de un agente químico, está siendo objeto de frecuentes controversias. Debido a la similitud a *grosso modo* entre la morfología de los hepatocitos normales y las células de los nódulos o focos alterados, se considera que las células iniciadas tienen un origen hepatocelular. Después de la iniciación, las células pasan por una secuencia de etapas de desdiferenciación. Poco tiempo después de la administración de un carcinógeno se detectan hepatocitos que poseen el isoenzima GST-P, índice de iniciación y desdiferenciación.

En modelos experimentales de hepatotoxicidad severa los estadios preneoplásicos más tempranos se caracterizan por la proliferación de células ovasales. En tales circunstancias, estas células proliferan rápidamente para adquirir, después de estadios intermedios o de transición, propiedades morfológicas y bioquímicas de hepatocitos. Las células ovasales comparten características fenotípicas con las de hepatomas, como elevada expresión de la α -fetoproteína, γ -glutamyl transferasa y varios isoenzimas fetales. Por ello, muchos autores atribuyen a las células ovasales el origen de los tumores hepatocelulares. Braum et al., (46) han demostrado que unas líneas celulares ovasales transfectadas *in vitro* por un oncogen *ras* activado, son capaces de formar tumores al ser transplantadas en ratones nudos.

Durante las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis inducida por 2-acetilaminofluoreno y hepatectomía parcial, se ha puesto en evidencia la proliferación de células ovasales y su posterior diferenciación en hepatocitos. Estas células pueden ser las responsables de la formación de nódulos reversibles formados en diversas condiciones de hepatotoxicidad. La naturaleza basófila y el pequeño tamaño de los hepatocitos recién formados se corresponde con el incremento en la población de hepatocitos diploides y de menor tamaño que aparece durante la proliferación celular postnecrótica inducida por tioacetamida (47). En hígado sometido a un tratamiento tóxico no severo es difícil identificar células ovasales. Por ejemplo, en modelos de hepatocarcinogénesis inducidos por dosis con muy baja toxicidad, las células ovasales proliferan de forma no detectable lo que hace poco probable que sean las precursoras de lesiones preneoplásicas.

Las células ovales aisladas de hígado de rata después del tratamiento con un carcinógeno, pueden ser forzadas *in vitro* a diferenciarse en células con propiedades hepatocíticas tales como la capacidad de sintetizar albúmina. En experimentos *in vivo* se ha demostrado que en ciertos modelos de hepatocarcinogénesis las células ovales pueden transformarse en células con un fenotipo hepatocítico. Sin embargo, las fases intermedias de la diferenciación han sido sólo caracterizadas parcialmente. Los productos de la diferenciación de las células ovales no son hepatocitos normales maduros, sino que se corresponden con hepatocitos basófilos, población específica de nódulos hiperplásicos inducidos por carcinógenos, que se observan en las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis química. Estos hepatocitos basófilos tienen una vida muy corta, una capacidad replicativa elevada, coexpresan la α fetoproteína y la albúmina y se consideran precursores intermedios de células malignas (47).

8. CONCLUSIONES

El profundizar en el estudio de los procesos que intervienen en el desarrollo del hígado y de su propia renovación y diferenciación ha de ser muy provechoso en el diseño de nuevas terapias para resolver enfermedades hepáticas de pronóstico grave. El aislamiento de las células precursoras de los dos tipos celulares primarios del hígado adulto, hepatocitos y células del epitelio biliar, puede representar un factor de enorme interés en el campo de la patología hepática. Actualmente, cualquier enfermedad hepática irreversible, como la cirrosis y el hepatocarcinoma, puede resolverse únicamente mediante el trasplante del órgano. Disponer en el futuro de poblaciones de células precursoras hepáticas, puede proporcionar el medio óptimo para restaurar un hígado lesionado de forma severa e irreversible. Las células progenitoras hepáticas pueden presentar también un potencial interesante para la terapia génica: por ejemplo, ante una alteración específica en la síntesis de proteínas plasmáticas, debida a un fallo genético del hígado, la repoblación de este órgano con poblaciones de células primigenias poseedoras de un nuevo gen puede resolver esta deficiencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ames BN y Gold LS (1990). Too many rodent carcinogens: Mitogenesis increases mutagenesis. *Science* **249**, 970-971.
2. Mills JJ Y Jirtle RL (1995) Mechanism of liver tumor promotion. En: *Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms* (ed Jirtle RL) pp 199-226. Academic Press, Nueva York, Toronto

3. Friedwald WF y Rous P (1944) The initiating and promoting elements in tumor promotion. *J Exp Med* **80**, 101-125
4. Berenblum I y Shubik P (1947) The role of croton oil application, associated with a single painting of a carcinogen in tumor induction in the mouse skin. *Br J cancer* **1**, 379-383
5. Pitot HC, Dragan Y, Sargent L y Xu Y-H (1991) Biochemical markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* **93**, 181-189 (1993)
6. Pitot HC y Dragan YP (1994) The multistage nature of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Drug metab Rev* **26**, 209-220
7. Vogelstein B y Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **4**, 138-141
8. Cascales M y Cascales C (1990). Hepatocarcinogénesis experimental. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias* (eds. M. Cascales y J. Rodés) pp 147-169. CSIC. Madrid
9. Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I y Sato K (1985). Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 3964-3968.
10. Moore MA, Nakagawa K, Satou K, Ishikawa T y Sato K (1987). Single GST-P positive liver cells - putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis* **8**, 483-489.
11. Cascales M (1994) Regeneración hepática post-necrítica y hepatocarcinogénesis. En: *Proliferación celular y cáncer* (eds Cascales M y Villanueva JR) pp 347-378. Real Acad Farm y Fund Cien Asoc Esp Cancer, Madrid
12. Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM y Seglen PO (1989). Diploid nature of hepatocellular tumors developing from transplanted preneoplastic liver cells. *Br J Cancer* **59**, 198-203.
13. Goldsworthy TL, Hanigan MH y Shinozuka H (1986) Models of hepatocarcinogenesis in the rat - contrasts and comparisons. *Crit Rev Toxicol* **17**, 61-89.
14. Farber E (1991) Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell cancer. *Dig Dis Sci* **36**, 973-978
15. Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttkey-Nedecky B, Wagmer A, Lauer B y Schulte-Hermann R (1994) Food reduction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9995-9999
16. Peraino C, Fry RJM y Staffeldt EF (1971) Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* **31**, 1506-1512
17. Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA y Poland A (1980) Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosoamine. *Cancer Res* **40**, 3616-3620

18. Tsuji S, Ogawa K, Takasaka H, Sonoda T y Mori M (1988) Clonal origin of gamma-glutamyl transpeptidase positive lesions induced by initiation-promotion in ornithine carbamyltransferase mosaic mice. *Jpn J Cancer Res* **79**, 148-151.
19. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Rao PM, Rajalakshmi S y Sarma DSR (1982) Initiation of experimental liver carcinogenesis by chemicals: Are the carcinogenic altered hepatocytes stimulated to grow into foci by different selection procedures identical? En. *Chemical carcinogenesis* (ed Nicolini C) pp 167-178, Plenum Press, Nueva York.
20. Goyette MC, Cho K, Fasching CL, Levy DB, Kinzler KW, Paraskeva C, Vogelstein B y Stanbridge EJ (1992) Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol* **12**, 1387-1395
21. Solt D y Farber E (1976). New principle for the analysis of chemical carcinogens. *Nature* **263**, 701-703.
22. Moolgavkar SH (1995) Quantitative analysis of enzyme altered foci. *Toxicol Appl Pharmacol* **111**, 469-484
23. Luebeck EG, Grasl-Kraupp B, Timmermann-Trosiener I, Bursch W, Schultehermann R y Manjeshwar S, Laconi E, Rao PM, Rajalakshmi S y Sarma DSR (1993) Influence of orotic acid on multistage hepatocarcinogenesis in the rat: Resistance of hepatocytes from nodules to the mitoinhibitory effects of orotic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**, 25-29
24. Hikita H, Vaughan J y Pitot HC (1997) The effect of two periods of short term fasting during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rats: the role of apoptosis and cell proliferation. *Carcinogenesis* **18**, 159-166
25. Schulte-Hermann R, Bursch W, Löw-Baselli A, Wagner A y Grasl-Kraupp B (1997) Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. *Cell Biol Toxicol* **13**, 339-348
26. Pitot HC (1998) Hepatocyte death in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **28**, 1-5
27. Roberts RA, Soames AR, Gill JH, James NH y Wheeldon EB (1995) Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis* **16**, 1693-1698.
28. Rolfe M, James HN y Roberts RA (1997) Tumor necrosis factor α (TNF α) suppresses apoptosis and induces DNA synthesis in rodent hepatocytes: a mediator for the hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators? *Carcinogenesis* **18**, 2277-2280
29. Díez-Fernández C, Sanz N, Alvarez AM Wolf A y Cascales M (1998) The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate, on the re-

- lationship between reactive oxygen species, antioxidant enzyme expression and apoptosis. *Carcinogenesis* **19**, 1715-1722
30. Higami Y, Shimokawa I, Tomita M, Okimoto T, Koji T, Kobayasho N e Ikeda T (1997) Aging accelerates but life-long dietary restriction suppresses apoptosis-related Fas expression on hepatocytes. *Am J Pathol* **151**, 659-663.
 31. Gressner AM, Lahme B, Mannherz H-G y Polzar B (1997) TGF- β mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol* **26**, 1079-1092
 32. Lindroos P, Tsai WH, Zarnegar R y Michalopoulos GK (1992) Plasma levels of HGF in rats treated with tumor promoters. *Carcinogenesis* **13**, 139-141
 33. Jirtle RL y Meyer SA (1991) Liver tumor promotion: Effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor- β 1 during liver regeneration. *Dig Dis Sci* **36**, 659-668
 34. Manjeshwar S, Laconi E, Rao PM, Rajalakshmi S y Sarma DSR (1993) Influence of orotic acid on multistage hepatocarcinogenesis in the rat: resistance of hepatocytes from nodules to the mitoinhibitory effects of orotic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**, 25-29
 35. Yager JD, Zurlo J, Sewall CH, Lucier GW y He H (1994) Growth stimulation followed by growth inhibition in livers of female rats treated with ethinyl estradiol. *Carcinogenesis* **15**, 2117-2124
 36. Jirtle RL, Hankins GR, Reisenbichler H y Boyer IJ (1994) Regulation of manose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors and transforming growth factor beta during liver tumor promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis* **15**, 1473-1478
 37. Brockenbrough JS, Meyer SA, Li C, Jirtle RL (1991) A reversible and phorbol ester-specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated rats *Cancer Res* **51**, 130-136
 38. Lajtha LG (1979). Stem Cell concepts. *Differentiation* **14**, 23-34.
 39. Thorgeirsson SS (1995) Stem cells and hepatocarcinogenesis. En: *Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanisms* (ed Jirtle RL) pp 99-112. Academic Press, Nueva York, Toronto.
 40. Wilson JW y Leduc EH (1958) Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* **76**, 441-449
 41. Terada T y Nakanuma Y (1993). Development of human intrahepatic peribiliary glands. *Lab Invest* **68**, 261-269.
 42. Farber E (1992) On cells of origin of liver cell cancer. En: *The role of cell types in hepatocarcinogenesis* (ed Sirica AE) pp 1-28. CRC Press, Boca Ratón, Florida
 43. Sell S (1990). Is there a liver stem cell? *Cancer Res* **50**, 3811-3815

44. Sell S y Pierce GB (1994) Biology of disease. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinoma and epithelial cancers. *Lab Invest* **70**, 6-22
45. Farber E (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene and 3-methyl-4-dimethyl-aminobenzene. *Cancer Res* **16**, 142-155.
46. Braum L, Goyette M, Yawsen P, Thomson NL y Fausto N (1987). Growth in culture and tumorigenicity after transfection with *ras* oncogene of liver epithelial cells from carcinogen-treated rats. *Cancer Res* **47**, 4116-4122.
47. Cascales M, Martín-Sanz P y Cascales C (1990) Liver functionality and enzymes related to peroxidation in experimental hyperplastic noduligenesis.(1990) En (Dargel R, Dummler W eds) 3er Hepatologische Symp Friedrich-Schiller Univ. Jena, Alemania. pp 185-196.

MODULACIÓN DE LA HEPATOTOXICIDAD POR INTERACCIÓN DE XENOBIÓTICOS

SUMARIO

1. Introducción
2. Etanol e hígado
 - 2.1. Intoxicación aguda del etanol y biotransformación de xenobióticos
 - 2.2. Toxicidad de xenobióticos por efecto del alcoholismo crónico.
3. Fenobarbital e hígado. Cambios en la expresión genética inducidos por fenobarbital
 - 3.1. Efecto del fenobarbital sobre la hepatotoxicidad de la cocaína
 - 3.2. Potenciación de la hepatotoxicidad de la tioacetamida por efecto del fenobarbital
4. Efecto protector de la aminoguanidina sobre la hepatotoxicidad de la tioacetamida
5. Mecanismo de acción del fenobarbital
6. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas de la toxicología, relativo a la salud pública, es el riesgo de intoxicaciones inesperadas debidas a interacciones de xenobióticos ambientales, ocupacionales o terapéuticos en dosis inofensivas en el aspecto individual. El interés mayor se concentra en los compuestos no tóxicos por sí mismos, pero cuya toxicidad se desenmascara cuando ingresan juntos en el organismo. La administración continuada de una serie de sustancias puede actuar *acelerando* el metabolismo de fármacos, *acortando* el tiempo de acción de medicamentos o *incrementando* la actividad de los sistemas biotransformadores microsómicos del hígado. Los agentes mejor conocidos son aquellos que inducen las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, como el etanol o el fenobarbital, cuya

administración repetitiva acelera la biotransformación de muchos medicamentos. Como el hígado es el órgano que se encarga preferentemente de la biotransformación y el metabolismo de un gran número de sustancias, cualquier alteración en su funcionamiento influye en su capacidad degradativa de fármacos y toxinas.

La exposición a agentes químicos, terapéuticos, ocupacionales o ambientales, se limita raramente a una sola sustancia. Incluso en situaciones estrictamente controladas, el organismo vivo se encuentra expuesto diariamente a una amplia variedad de agentes tales como fármacos o medicamentos y aquellos incluidos en alimentos, bebidas, productos de higiene etc. Esta toxicidad potencial derivada de la exposición a múltiples agentes químicos se ha ampliado en las últimas décadas con los problemas ambientales que generan los innumerables productos derivados del desarrollo industrial.

Aunque los organismos vivos se encuentran sometidos a la acción de numerosas sustancias tóxicas, la mayor parte de las investigaciones se han ocupado de los efectos tóxicos de un sólo compuesto. Desde la perspectiva de la valoración del riesgo a la exposición de dos o más medicamentos, la utilidad de la información derivada del estudio de agentes aislados resulta muy limitada. Por tanto, la investigación toxicológica de mezclas de fármacos es fundamental para conseguir una valoración real, la cual ha de ampliarse a la de productos derivados de la contaminación ambiental u ocupacional. Esto es importante frente a la política global de los problemas, no sólo a nivel farmacológico y clínico, sino también a nivel medioambiental, donde puede ser inmenso el impacto social y económico de una metodología inadecuada de esta valoración del riesgo.

Como la toxicidad producida por un fármaco o xenobiótico en el organismo está mediada por la interacción entre la sustancia o sus metabolitos y las moléculas o estructuras celulares, es necesario definir lo que significa dicha «interacción». Interacción significa que el efecto de la exposición a dos o más xenobióticos no es lo que se espera de sus curvas individuales de dosis/respuesta. En otras palabras, se entiende como interacción aquella desviación de la respuesta de la mezcla de la suma de los efectos individuales, en el caso de dosis-respuesta lineales, o el producto de los efectos individuales, en el caso de dosis-respuesta no lineales (1). Por tanto el problema para definir las interacciones es doble:

- (1) definir lo que se espera de la combinación, y
- (2) determinar si los efectos son lineales o no lineales.

El metabolismo de fármacos en hígado se encuentra sometido a una amplia serie de variables entre las que se encuentran factores genéticos y ambientales. El efecto de la enfermedad es un caso específico debido a que la enfermedad se adquiere dependiendo de factores del huésped. Por tanto los factores genéticos, ambientales y específicos del huésped van a determinar la expresión fenotípica de genotipo individual y van a conducir a la variabilidad en el metabolismo de fármacos. El hígado al ser el órgano principal encargado del metabolismo de xenobióticos, las enfermedades hepáticas y su grado de severidad han de ejercer una gran influencia en la eliminación de dichas drogas.

Es un hecho demostrado en toxicología, que el hígado es el órgano responsable de la mayor parte de la destoxicación de los fármacos, sin embargo, de la selección y especialización de cada región del acino hepático para llevar a cabo esta misión puede depender la gravedad reversible o irreversible de un proceso tóxico. En la actualidad es este un tema que ocupa la atención de muchos investigadores implicados en el campo farmacológico y toxicológico. La función hepática compartimentada se manifiesta por diferencias fenotípicas entre las células, las cuales dependen en gran parte de su ubicación en el interior del acino (2). Esta función compartimentada da lugar a la heterogeneidad hepatocítica que se manifiesta mayoritariamente en los enzimas dependientes del citocromo P-450. La zonación en la capacidad de activación y destoxicación de los fármacos es un factor importante en la etiología de la lesión específica acinar ocasionada por muchas hepatotoxinas. De los conocimientos adquiridos hasta el momento se supone que la mayor parte de los genes hepáticos se expresan de manera diferente en los hepatocitos según sea su localización anterior (periportal) o posterior (perivenosa) en el acino.

El mecanismo molecular mediante el cual los agentes químicos alteran el fenotipo celular incrementando o inhibiendo la transcripción de genes específicos, constituye un problema apasionante de regulación genética. Numerosos genes que codifican enzimas implicados en el metabolismo de fármacos se activan transcripcionalmente por sus propios sustratos, por otros fármacos o por contaminantes ambientales y carcinógenos químicos. La respuesta inductora se ha clasificado sobre la base de la clase química del compuesto inductor y de los genes afectados. Entre los agentes inductores se encuentran hidrocarburos policíclicos aromáticos, proliferadores de peroxisomas, glucocorticoides y antiglicocorticoides, etanol, fenobarbital y numerosos fármacos.

La mayor parte de los medicamentos poseen algún grado de liposolubilidad necesaria para facilitar su absorción gastrointestinal. Una vez absorbi-

dos circulan por la sangre unidos a proteínas plasmáticas y son secuestrados por el tejido según su grado de lipofilia. Como los fármacos liposolubles no pueden ser excretados por vía urinaria, para facilitar su eliminación, a través del riñón, se requiere que sean previamente transformados en productos hidrosolubles.

2. ETANOL E HÍGADO

El etanol es uno de los hepatotóxicos más consumidos por el hombre y por ello el que origina mayor número de enfermedades hepáticas debido a su abuso. El alcoholismo, agudo o crónico, trae consigo una serie de problemas, debidos a que el metabolismo hepático del etanol compite con el de los xenobióticos. Una de las causas de la hepatotoxicidad del etanol es la alteración del estado de oxido-reducción celular producida por el exceso de equivalentes reductores que, en forma de NADH, se generan en su oxidación a acetaldehído y acetato. La oxidación del etanol está catalizada por la alcohol deshidrogenasa (K_m 0,2 - 2 mM) y las aldehído deshidrogenasas. El incremento del cociente NADH/NAD⁺ altera notablemente el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas y purinas. El exceso de NADH produce elevación del α -glicerofosfato el cual, unido a una mayor síntesis de los ácidos grasos (3), favorece la acumulación de triacil-glicéridos. La actividad del ciclo cítrico se inhibe por efecto del etanol y con ello disminuye la β -oxidación de los ácidos grasos, lo que dá lugar a la acumulación en hígado de la grasa de la dieta (4 - 7)

El etanol se oxida también en los microsomas por el sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450E1 (K_m 10 - 15 mM), isoforma inducible por el etanol, que contribuye a su metabolismo y tolerancia. La inducción del citocromo P-450E1 eleva la velocidad de formación de especies químicas reactivas a partir de numerosos xenobióticos, lo cual explica la mayor susceptibilidad de los alcohólicos a los solventes industriales, anestésicos, medicamentos de uso común, analgésicos, antibióticos y carcinógenos químicos. El etanol disminuye la concentración hepática de vitamina A por acelerar su degradación microsómica a través de una vía dependiente del NAD⁺ que se induce por el etanol, la cual transforma el retinol en retinal (2, 8) (Figura 1)

La isoforma del citocromo P-450 que se induce por efecto del etanol es la CYP2E1, la cual se eleva de 5 a 10 veces por activación transcripcional del gen *CYP2E1* o por estabilización de su mRNA. A dosis bajas de etanol la inducción se verifica a nivel post-traducciona, mientras que a dosis ele-

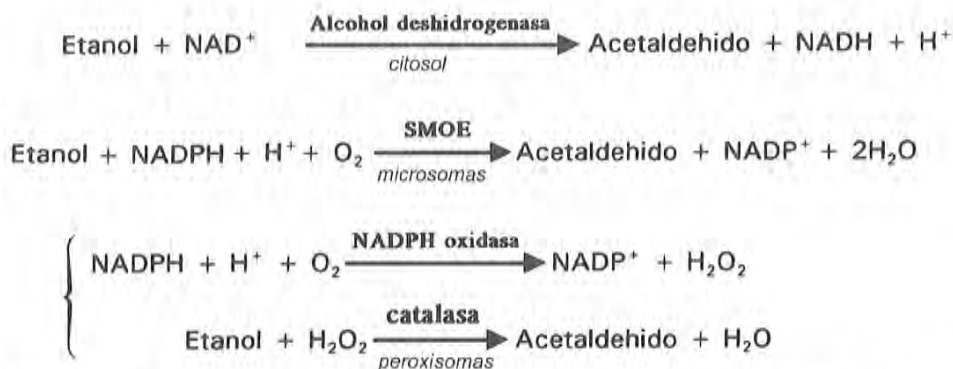


FIGURA 1. Metabolismo del etanol en hepatocitos. La alcohol deshidrogenasa (ADH) en la fracción soluble; el sistema microsómico de oxidación del etanol (SMOE) en el retículo endoplásmico; y la catalasa en los peroxisomas.

vadas la inducción se verifica en la transcripción. El sistema microsómico de oxidación del etanol dependiente de las isoformas CYP 2E1 y E2, entra en competencia con otros sistemas microsómicos por la utilización del citocromo P-450, el NADPH y el O_2 . Esto explica la cantidad de interacciones del etanol con los fármacos y agentes terapéuticos. En el caso de intoxicación aguda porque impide la correcta biotransformación y aumenta la letalidad de la dosis, y en caso de intoxicación crónica, porque al inducir el sistema biotransformador microsómico puede ocasionar secuelas clínicas importantes.

2.1. Intoxicación aguda del etanol y biotransformación de xenobióticos

En casos de intoxicación etílica aguda, las interacciones del etanol y otros xenobióticos son de una importancia extrema, ya que pueden registrarse *inhibiciones en el metabolismo de fármacos*. El mecanismo implicado parece ser la competencia entre el etanol y el fármaco por una vía de destoxificación parcialmente compartida. La administración simultánea de etanol y medicamentos retrasa el metabolismo de estos últimos, *prolongando e incrementando* sus efectos (2, 8). Por tanto, el etanol en la fase aguda, aumenta la vida media de sustancias como el fenobarbital, el meprobamato y las benzodiazepinas. La biotransformación de estas últimas por N-desmetilación o hidroxilación es la que se altera por efecto del etanol, lo que no ocurre cuando estos fármacos se eliminan como conjugados. Las fenotiazinas se metabolizan también por vías microsómicas y la administración aguda de etanol en conjunción con ellas, da lugar a una inhibición competitiva del metabolismo hepático de estos fármacos con un aclaramiento retardado

y una elevación de su acción sedante. Uno de los efectos colaterales de estos medicamentos, la hipotensión, puede agravarse por efecto del etanol. Los antidepresivos tricíclicos, como la amineptina, pueden producir convulsiones y en casos de intoxicación etílica aguda, deben administrarse con cautela. La interacción del etanol con barbituratos representa un peligro particular, ya que la vida media de éstos se duplica con la consiguiente disminución de su dosis letal. El etanol interacciona también con los narcóticos de manera que la acción competidora del etanol sobre el sistema microsómico, produce una acumulación de la morfina que puede conllevar riesgo de muerte. El efecto cerebral de la metadona se potencia notablemente, por la acción bloqueadora del etanol sobre el sistema microsómico hepático.

La intoxicación aguda de etanol afecta también al metabolismo de otros fármacos como el anticoagulante warfarina, originando riesgos de hemorragia. La intoxicación crónica, sin embargo, al acelerar la degradación microsómica de este fármaco, produce una disminución de sus efectos anticoagulantes. El xileno es un solvente orgánico que ingresa en el organismo por inhalación en individuos cuyo trabajo se relacione con pinturas, tintas de impresión y pesticidas. La excreción de xileno es lenta, debido a su elevada liposolubilidad y posibilidad de almacenamiento en los tejidos ricos en lípidos. La ingestión aguda de alcohol etílico, eleva la concentración en sangre de este solvente porque retrasa su aclaramiento (2).

2.2. Toxicidad de xenobioticos por efecto del alcoholismo crónico

La velocidad de aclaramiento de fármacos, como el meprobamato y el pentobarbital, se eleva notablemente en los alcohólicos. De igual manera ocurre con la antipirina, tolbutamida, warfarina, propanolol, diazepam y rifampicina. En individuos alcohólicos la vida media de cualquiera de estos fármacos es un 50% más corta, con lo cual disminuye en la misma proporción su efecto terapéutico.

La mayor actividad de los enzimas hepáticos microsómicos inducidos por el consumo prolongado de alcohol etílico, origina una aceleración en la biotransformación de los xenobióticos. Esta aceleración actúa, por un lado, disminuyendo el efecto terapéutico de los medicamentos, y por otro, generando a mayor ritmo especies químicas reactivas las cuales, en la mayoría de los casos, son más tóxicas que el agente precursor. Por tanto, la inducción del sistema microsómico de oxidación del etanol, en casos de alcoholismo crónico, disminuye la acción farmacológica de numerosos fár-

macos, a la vez que aumenta su toxicidad, porque se convierten con mayor rapidez en especies químicas hepatotóxicas, que muchas veces unen a su toxicidad un potencial carcinogénico. Por tanto, la significación fisiológica de este sistema microsómico en general, y la del citocromo P-450E1 en particular, es consecuencia, no sólo de la oxidación del etanol, sino también de la capacidad de la isoforma P-450E1 para acelerar la conversión de fármacos y xenobióticos en metabolitos tóxicos. El tetracloruro de carbono (CCl_4), conocido agente hepatotóxico que ejerce su toxicidad a través de su conversión en el radical libre $\cdot\text{CCl}_3$, eleva su toxicidad cuando se administra a animales pretratados con etanol, originando una lesión necrótica de mayor gravedad en la región perivenosa del acino hepático, que es donde se encuentra la mayor proporción de citocromo P-450E1 (9). La hepatotoxicidad de otros compuestos, como el bromobenceno y el halotano, también se eleva en casos de alcoholismo crónico. Entre los medicamentos de uso común, son muchos los que aumentan su toxicidad por efecto de la ingestión crónica de etanol. Es conocida la hepatotoxicidad de dosis terapéuticas de isoniazida en los alcohólicos, debida a una aceleración en la producción del derivado acetilado del fármaco. El mismo mecanismo de hepatotoxicidad afecta al acetaminofeno cuando se administra a los alcohólicos en dosis terapéuticas. El pretratamiento con etanol aumenta los efectos necrogénicos de la cocaína por acelerar la producción de sus derivados hepatotóxicos, N-hidroxinorcocaina y norcocaína nitróxido (10). El etanol afecta también el metabolismo de esteroides endógenos y exógenos. Entre estos efectos hay que destacar la disminución de la concentración de testosterona en sangre de los alcohólicos, debida a la degradación acelerada de esta hormona y su conversión en estrógenos (8) (Figura 2).

3. FENOBARBITAL E HÍGADO. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA INDUCIDOS POR FENOBARBITAL

La inducción enzimática por fármacos, conocida desde hace más de 50 años, produce profundos efectos sobre las respuestas farmacológicas. El fenobarbital es una de las sustancias que posee la propiedad de inducir la expresión de los sistemas microsómicos hepáticos biotransformadores de fármacos y esteroides. Esta capacidad inductora puede tener gran impacto en el metabolismo e interacción de medicamentos, en la farmacocinética, en la toxicidad y carcinogenicidad de agentes químicos y en la potencia y disposición de hormonas circulantes (11). Por ejemplo, el fenobarbital cuando se administra de manera crónica a ratas, reduce gradualmente su efecto hipnótico porque eleva su propio metabolismo y eliminación, un fenómeno conocido como «tolerancia progresiva».

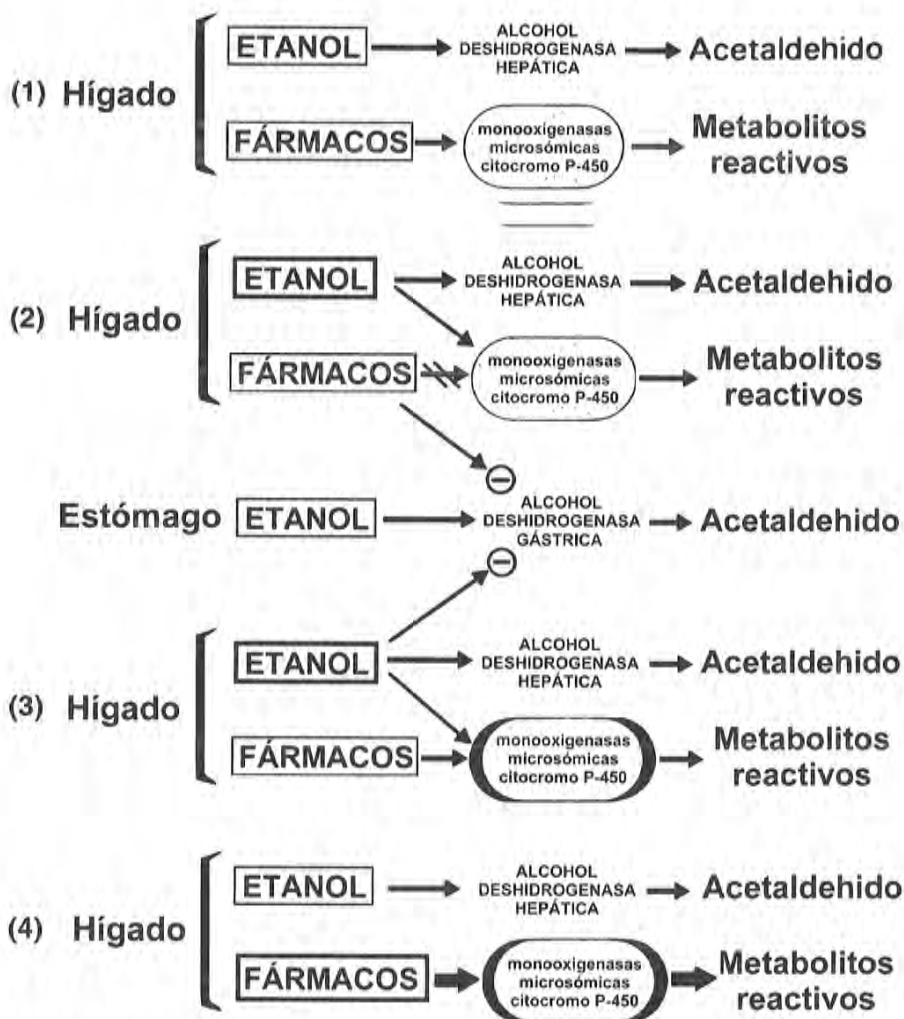


FIGURA 2. Interacciones del etanol con fármacos. (1) Metabolismo del etanol por la ADH y de los fármacos por el sistema microsómico. (2) Contribución del sistema microsómico al metabolismo del etanol cuando se incrementa su concentración en sangre, e inhibición del metabolismo microsómico de fármacos en presencia de etanol al competir, etanol y fármacos, por un sistema de detoxificación común. (3) Inducción del sistema microsómico tras el consumo crónico de etanol. (4) Metabolismo acelerado de fármacos debido a la inducción microsómica por intoxicación etílica crónica.

El fenobarbital es el fármaco considerado como prototipo de numerosos agentes inductores de enzimas que elevan la actividad de las monooxigenasas de función mixta hepática y de la glucuronil transferasa. El fenobarbital actúa también produciendo alteraciones en la excreción biliar de ciertos aniones y en este efecto pueden estar implicados diversos mecanismos

Uno de los sistemas metabolizadores de drogas y esteroides más importantes, que responde al fenobarbital es el sistema microsómico dependiente del citocromo P-450. Las isoformas que responden al fenobarbital son las CYP2B1 y la CYP2B2. La expresión en hígado de enzimas P-450 individuales se regula por factores endógenos (hormonal gonadales y de la pituitaria) y por factores exógenos (medicamentos y otros).

Hasta la fecha se han estudiado ampliamente los mecanismos moleculares implicados en la inducción selectiva de CYP por el 3-metilcolantreno y por hidrocarburos policíclicos aromáticos relacionados, mientras que los mecanismos mediante los cuales el fenobarbital eleva la expresión de las isoformas CYPB1 y CYPB2 se encuentra poco esclarecida. Los efectos del fenobarbital incluyen además la proliferación del retículo endoplásmico liso, la estimulación del incremento de peso hepático y la promoción tumoral. El fenobarbital induce la expresión de estas dos isoformas en hígado mucho más que en tejidos extrahepáticos.

La inducción de las isoformas CYP2B1 y CYP2B2 por el fenobarbital se debe a la síntesis proteica resultante de un incremento en los niveles del mRNA. La inducción de estas isoformas no implica al mecanismo de estabilización del mRNA que se asocia a la inducción del CYP1A2 por el 3-metilcolantreno. El incremento debido al fenobarbital se debe a una elevación en la transcripción de los genes *CYP2B*. Esta activación es rápida y se detecta a los 30 - 60 minutos y puede alcanzar de 20 a 50 veces el valor basal (12).

También se ha observado que el fenobarbital es capaz de inducir la expresión de otra isoforma de la superfamilia genética CYP, la CYP2A5 producto del gen *Cyp2A5* (13). Se ha demostrado que la actividad cumarín 7 hidroxilasa, catalizada por la monooxigenasa dependiente del CYP2A5, se indujo 33 veces en cultivo de hepatocitos de ratón por efecto del fenobarbital y que dicho efecto inductor fue modulado por el AMP cíclico. El que la cicloheximida origine una elevación en la actividad basal y una superinducción, en conjunción con el fenobarbital, implica la intervención de una proteína represora, tanto en la actividad basal como en la inducida por fenobarbital. La eliminación de la actividad cumarín 7 hidroxilasa por actinomicina D supone que la transcripción *de novo* es necesaria para la inducción de esta actividad por el fenobarbital. La inhibición de la proteína quinasa C y de otras tirosina kinasas no produjo alteraciones. Sin embargo, el tratamiento con dibutilil cAMP, forskolina (activador específico de la adenilato ciclase) o isobutil-1-metil xantina (inhibidor de la fosfodiesterasa), elevaron la actividad basal y la inducida por fenobarbital y los niveles del

mRNA correspondiente. Es probable que la inducción del CYP2A5 por el cAMP sea mediada por mecanismos que involucren a una o varias proteínas, ya que una serie de factores nucleares se unen a secuencias del DNA en las regiones promotoras de genes inducibles por el cAMP. El CER (consenso del elemento responsable) del cAMP está constituido por una secuencia palindrómica TGACGTCA. El examen de 1900 pares de bases en la región 5' anterior al gen *Cyp2a-5*, revela una perfecta secuencia CRE. Puede ser que la inducción de este gen por el fenobarbital y el cAMP esté mediada por mecanismos que impliquen la unión de una o varias proteínas de enlace al CRE y que esa unión active la transcripción del gen *Cyp2a-5*.

El fenobarbital, además de ser el prototipo de numerosos agentes inductores de enzimas que elevan la actividad de la oxidasa de función mixta hepática y de la UDP-glucuronil transferasa, actúa también desequilibrando la excreción biliar de ciertos aniones y en este efecto pueden estar implicados diversos mecanismos. Parece ser que el fenobarbital estimula el mecanismo de transporte de aniones orgánicos vía sinusoidal lo cual hace disminuir el eflujo canalicular.

El pretretamiento con fenobarbital eleva la toxicidad de ciertos fármacos como la cocaína (14, 15, 16) que son transformados por el sistema microsómico monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 y de la NADPH citocromo P-450 reductasa y además, en el caso de la cocaína, el fenobarbital origina un cambio intracinar de la lesión de la zona perivenosa a la periportal. Se ha observado que el fenobarbital eleva la actividad de la GSSG reductasa en hepatocitos (17). Se cree que el fenobarbital aumenta la capacidad del hepatocito para sintetizar GSH vía un mecanismo hormético no descrito hasta la fecha, capacidad que sólo se reserva frente a una situación de estrés oxidativo de suficiente magnitud. La importancia de la elevación en la síntesis del GSH y de la actividad glutation reductasa por el fenobarbital en el mantenimiento del «pool» del GSH radica en que es una forma de mitigar las consecuencias del estrés oxidativo.

Las monooxigenasas microsómicas dependientes de flavina (FAD monooxigenasas) se encuentran implicadas en la bioactivación de una serie de xenobióticos, especialmente aquellos que van a sufrir una oxidación S- o N-. A pesar de que se ha descrito que los fármacos específicos de las FAD monooxigenasas no parecen ser los principales determinantes de las interacciones droga-proteína (18), la tioacetamida se metaboliza por la FAD monooxigenasa. Aunque algunos autores consideran que la FAD monooxigenasa no se induce por el fenobarbital (18), en experimentos de nuestro grupo ha podido detectarse un incremento significativo, inducido por el fenobar-

bital, en la actividad de este sistema en hígado de rata (19). Este incremento ha potenciado la severidad de la lesión hepatocelular inducida por tioacetamida (19). Por tanto, el efecto inductor del fenobarbital sobre las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450, se extiende también a la FAD monooxigenasa.

La exposición crónica al fenobarbital causa adenomas hepatocelulares, inhibe la comunicación intercelular, estimula la proliferación e inhibe la apoptosis de los hepatocitos en focos neoplásicos (20). La actividad promotora tumoral del fenobarbital, así como la de otros barbituratos, se ha relacionado con su capacidad para inducir el sistema microsómico monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 (21). Un mecanismo mediante el cual el fenobarbital puede ejercer su actividad promotora tumoral es aumentando la generación de especies activas de oxígeno formadas como subproductos en las reacciones catalizadas por las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, a través de la lipoperoxidación y de lesiones oxidativas en el DNA. Se ha demostrado que el fenobarbital activa el factor de transcripción NF- κ B y la activación se verifica por la capacidad del fenobarbital de inducir el sistema citocromo P-450 y con ello incrementar la generación de peróxido de hidrógeno y radical superóxido, los cuales, al ocasionar un estado intracelular más oxidado, son los causantes de la activación de este factor nuclear (22).

3.1. Efecto del fenobarbital sobre la hepatotoxicidad de la cocaína

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo recientemente investigaciones sobre el efecto modulador del fenobarbital sobre la hepatotoxicidad de la cocaína en ratones. La cocaína es un alcaloide natural que induce selectivamente la muerte celular del hepatocito, a través de especies reactivas que son las verdaderas responsables de su hepatotoxicidad. Los xenobióticos, en general, lesionan preferentemente la región perivenosa del acino hepático, debido a que en esta región existe un desequilibrio entre la velocidad de producción de metabolitos reactivos por el sistema microsómico dependiente del P-450 y la capacidad de detoxificación. El modelo experimental se seleccionó en base a la lesión *perivenosa* que produce la cocaína cuando se administra a ratones Swiss machos (60 mg/Kg) y a la lesión *periportal* que produce la misma dosis de esta droga cuando se administra a ratones tratados previamente con fenobarbital durante cinco días consecutivos (1 g/L en el agua de bebida). La secuencia de acontecimientos que se verifica en el interior del hepatocito por efecto de una gran parte de los agentes tóxicos es la siguiente:

Tóxico → Metabolito reactivo → Necrosis → Proliferación hepatocelular
 → Regeneración tisular → Restauración de la funcionalidad

En el caso de la cocaína esta secuencia se produce por la formación de metabolitos reactivos productos del metabolismo oxidativo de esta droga

Cocaína → Norcocaína → N-hidroxinorcocaína ↔ Norcocaína nitróxido· (Figura 3).

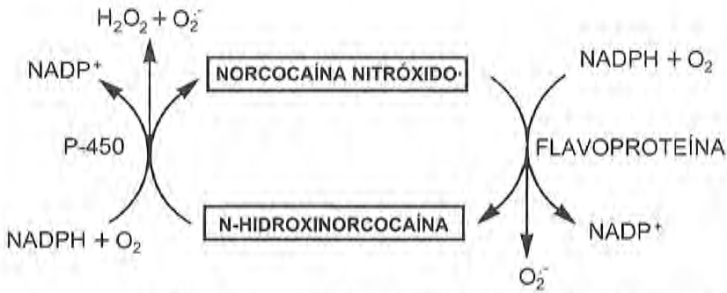


FIGURA 3. Ciclo redox entre los metabolitos de la cocaína. Se produce un ciclo redox fútil entre la norcocaína nitróxido y la N-hidroxinorcocaína, en el que se generan el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Para hacer un seguimiento de estos acontecimientos, se dispusieron dos grupos de ratones machos de la raza Swiss. Ambos grupos recibieron sendas dosis de cocaína, pero uno de ellos fue tratado con fenobarbital durante los cinco días anteriores a la administración de cocaína. El objetivo de este tratamiento fue inducir el sistema microsómico CYP y con ello incrementar la toxicidad de la cocaína en estos animales al inducir en ellos el sistema hepático biotransformador de la cocaína (Figura 4).

La administración de cocaína a ratones en estas condiciones dió lugar a lesión hepática, afectando severamente las células localizadas en la región perivenosa (cocaína) o en la región periportal (fenobarbital + cocaína). Esta diferente localización de la lesión hepática ha permitido comparar las consecuencias de la inducción de la muerte celular en dos regiones del acino hepático. El cambio en la localización de la necrosis de perivenosa a periportal indica que el fenobarbital induce preferentemente el sistema CYP en el área periportal. El incremento en la actividad sérica de la ICDH, parámetro marcador de la necrosis, fue más temprano y más pronunciado en el caso de la necrosis periportal. El punto máximo de necrosis se registró, en

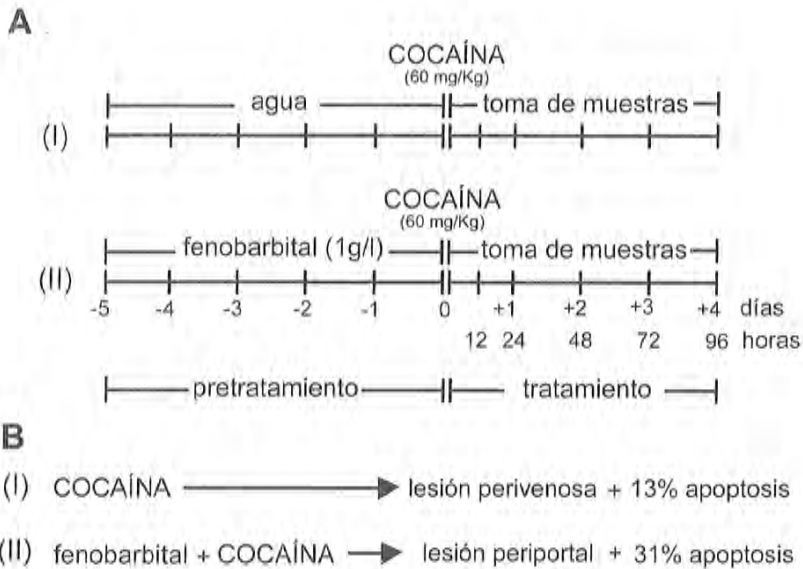


FIGURA 4. Esquema que muestra el protocolo experimental para el estudio de la hepatotoxicidad de la cocaína en ratones: (A) Modelo del tratamiento al que fueron sometidos los ratones Swiss. La cocaína se administró por vía intraperitoneal (60 mg/Kg). El fenobarbital se administró en el agua de bebida (1g/L). (B) Diferencias en la ubicación de la lesión necrótica y en la intensidad de la apoptosis (14)

ambos casos, a las 24 horas de la administración de cocaína. La alteración en la ubicación de la lesión hepática producida por un agente hepatotóxico, según el tratamiento, es un hecho poco frecuente. Se desconoce el mecanismo mediante el cual el fenobarbital actúa sensibilizando a los hepatocitos de la región portal a los efectos tóxicos de la cocaína (Figura 5).

En nuestros experimentos se observó también que la actividad del citocromo P-450 disminuía después de la administración de la cocaína. Esta disminución fue similar en ambas condiciones experimentales y se sospecha que pudo ser debida al estímulo de la actividad hemo oxigenasa, el paso limitante en la vía de degradación del grupo hemo, y al incremento en la peroxidación lipídica (23). Por otra parte, la oxidación de la cocaína está catalizada por monooxigenasas dependientes del NADPH ubicadas en el retículo endoplásmico liso, que predominan en el área perivenosa y se inducen preferentemente en esta región por efecto de barbituratos como el fenobarbital. Los enzimas generadores y consumidores del NADPH predominan también en la región perivenosa. Por tanto, no encontramos explicación al hecho de que el pretratamiento con fenobarbital incremente la sensibilidad de los hepatocitos de la región periportal a la cocaína. Es probable que sean los cambios en las

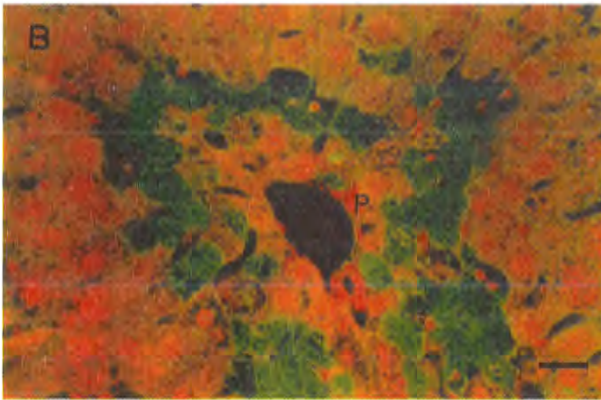
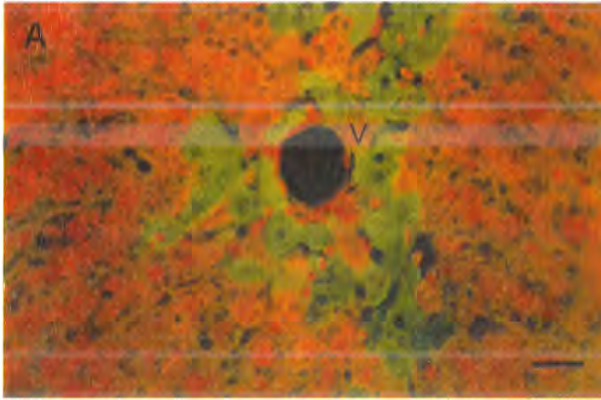


FIGURA 5. *Morfología de cortes de hígado de ratón intoxicado con cocaína x 200 (A) necrosis perivenosa inducida por cocaína. (B) necrosis periportal inducida por cocaína en ratones pretratados con fenobarbital (23).*

concentraciones relativas del NADPH y el GSH los que medien el efecto del fenobarbital y se encuentren involucrados en la localización de la lesión. El tratamiento con fenobarbital no elevó los niveles séricos de actividad ICDH ni afectó la morfología hepática, pero otros parámetros de funcionalidad hepática, como el ATP, el malondialdehído y el NADPH se alteraron notablemente. Los niveles más bajos de GSH que aparecen en hígado pretratado con fenobarbital, por efecto de la cocaína, en comparación con el hígado sin pretratamiento, pueden ser una consecuencia de la destrucción selectiva de las células periportales, que contienen una concentración intracelular de GSH dos veces superior a la de las perivenosas. La demostración de la compartimentación nuclear del glutatión en hepatocitos, descrita por Bellomo (24), refuerza el interés del GSH, pues el gradiente de concentración entre el núcleo y el citoplasma (aproximadamente 3), se colapsa con agentes que deplecionan el ATP. El GSH es esencial, por tanto, por su papel protector del DNA y otras estructuras frente a la agresión tóxica y su compartimentación intracelular depende de la concentración de ATP.

La actividad mitótica, calculada como *Índice Mitótico*, es un medio para determinar el estado proliferativo del tejido. En preparaciones histológicas de rutina de hígado de ratón, el índice mitótico se calculó en las regiones mediozonal, perivenosa y periportal, después de la administración de cocaína a ratones. Debido a la heterogeneidad del acino hepático, la localización de la actividad mitótica estuvo relacionada con el área acinar donde se desarrolló la necrosis. La proliferación celular que sigue a la necrosis perivenosa inducida sólo por cocaína, se localizó de mayor a menor en las áreas *mediozonal > perivenosa > periportal*, mientras que en la necrosis periportal inducida por cocaína en el grupo tratado previamente con fenobarbital, las células proliferativas se localizaron en las áreas *mediozonal > periportal > perivenosa*. De acuerdo con los valores obtenidos en el cálculo del índice mitótico, el máximo de proliferación hepatocelular sucedió, en ambos grupos, a las 48 horas de la administración de cocaína.

La proliferación hepática post-necrótica inducida por xenobióticos representa un mecanismo de defensa celular frente al ataque tóxico. Estudios de nuestro grupo (25) han mostrado cambios en la ploidía y distribución del DNA en la regeneración postnecrótica inducida experimentalmente. Por citometría de flujo se han observado cambios en el ciclo celular durante el proceso de lesión hepática inducido por cocaína. En núcleos de hepatocitos aislados, teñidos con yoduro de propidio, se establecieron comparaciones entre los tratados con cocaína, los controles y los obtenidos de fetos a término. A las 12 horas de la administración de cocaína se observó la aparición de una población hipodiploide en ambos grupos. El pico hipodiploide del grupo con cocaína fue de un 13% y se ha considerado como una población espontánea de células apoptóticas promovida por los metabolitos de la cocaína. Sin embargo, el pico hipodiploide que aparece, también a las 12 horas, en hígado de animales pretratados con fenobarbital, de un 31% puede ser debido, en parte, a la reducción apoptótica del exceso celular en hígado hipertrófico inducido por el fenobarbital. Durante el período de 0 a 4 días después de la administración de cocaína a ambos grupos de ratones se observaron alteraciones, tales como una disminución en la población diploide unida a incrementos en las poliploides (4N y 8N). Esta poliploidización de los hepatocitos a los 4 días de la administración de cocaína, fue más acusada en el grupo tratado con fenobarbital (14).

Considerando el proceso multiescalonado de la muerte celular (perivenosa o periportal) y la proliferación hepatocelular inducida por la cocaína, y sobre la base de los resultados obtenidos se resume lo siguiente:

- (a) caracterización de una población hipodiploide, típica de apoptosis, que aparece a las 12 horas de la administración de cocaína en animales con y sin tratamiento previo con fenobarbital;
- (b) la actividad proliferativa compensatoria alcanzó su máximo a las 48 horas con células en mitosis localizadas en la vecindad de la región acinar que sufrió la necrosis;
- (c) alteraciones en la heterogeneidad de la distribución del DNA genómico (más dramáticas en el grupo pretratado con fenobarbital), en relación con incrementos de poblaciones poliploides (4N y 8N) y disminuciones en la población diploide (2N).

A los cuatro días (96 horas) de la administración de la cocaína, el hígado no había recobrado aún su patrón normal de ploidia mostrando, en ambos grupos, una prominente abundancia de hepatocitos poliploides. La importancia biológica de esta distribución no está clara, pero puede especularse que estas poblaciones representan una clase de hepatocitos hiperfuncionales requerida para enfrentarse al intenso estrés post-necrótico inducido por la el agente hepatotóxico, en nuestro caso la cocaína. Finalmente, estos resultados confirman y amplían estudios previos que muestran la validez del modelo murino para el estudio de la hepatotoxicidad, que pueden ayudar a mejorar el uso de protocolos analíticos y quizás servir de aproximación a terapéuticas paliativas en el tratamiento de la drogadicción.

3.2. Potenciación de la hepatotoxicidad de la tioacetamida por efecto del fenobarbital

Muchos de los compuestos, o sus metabolitos, que pueden causar lesión letal a los hepatocitos, son agentes que poseen una elevada reactividad química. Estas especies electrofílicas tienen capacidad de unirse covalentemente a las macromoléculas celulares, existiendo una estrecha correlación entre la cantidad de estas uniones covalentes y la necrosis celular (26). La hipótesis de que la lesión y muerte celular son consecuencia directa de la interacción de especies electrofílicas reactivas con lugares celulares críticos, ha sido la base de la mayoría de los avances en el estudio de los mecanismos de la muerte celular inducida por agentes tóxicos.

La tioacetamida, al igual que muchos otros agentes hepatotóxicos, se metaboliza rápidamente en microsomas de hígado de rata dando lugar a la tioacetamida S-óxido, que se considera el compuesto electrofílico capaz de

formar aductos N-ε-acetil lisina con las proteínas y ejercer así sus efectos necrogénicos (27), cirrogénicos (28, 29) y carcinogénicos. El sistema monooxigenasa microsómico, dependiente de flavina, el N,N-dimetil anilina N-oxidante (EC 1.14.13.8), es el sistema enzimático responsable del metabolismo de la tioacetamida que la transforma a tioacetamida-S-óxido (30). Se han utilizado modelos experimentales de disfunciones hepáticas, inducidas por administración de tioacetamida a ratas, para estudiar parámetros bioquímicos relacionados con la funcionalidad hepática (31), así como reacciones bioquímicas involucradas en la biotransformación de esta sustancia hepatotóxica.

La administración intraperitoneal a ratas de 2 meses de edad de una dosis de 6,6 mmoles/Kg de tioacetamida produjo necrosis hepatocelular masiva que presentó su máximo a las 24 horas de la administración del hepatotóxico y el subsiguiente proceso regenerativo. Morfológicamente a las 24 horas aparecen hemorragias e infiltrados inflamatorios con leucocitos polimorfonucleares. Esta lesión hepatocelular masiva, que afecta al 50% del tejido, se caracteriza por cariólisis, picnosis y cariorexisis. A las 48 horas de la intoxicación se observa que la necrosis pericentral se mantiene aunque ya en fase de resolución; el infiltrado inflamatorio es de tipo mixto, leucocitos polimorfonucleares típicos de inflamación aguda y linfocitos y monocitos característicos de inflamación crónica; también se manifiesta una dilatación de los sinusoides perivasculares y reacciones fibrosas asociadas a las venas centrales. A las 72 horas son pocas las zonas que se encuentran todavía afectadas por la acción del hepatotóxico, aunque persisten las células del infiltrado crónico, fibroblastos y algunos hepatocitos necrosados a nivel periférico; los hepatocitos mediozonales presentan un cierto grado de tumefacción y abundantes mitosis.

El porcentaje de células hepáticas en fase S (síntesis), se eleva de manera notable a partir de las 24 horas de la administración del hepatotóxico, y esta elevación alcanza su punto máximo entre las 36 y 48 horas con cotas tan elevadas como 21 y 19 veces, respectivamente, los valores control. Esta elevación se inicia en el punto más elevado de la necrosis y coincide con la casi desaparición de la fracción tetraploide. Considerando que el descenso de la fracción G2 + M precede en horas al de máxima síntesis del DNA se deduce que una parte de la fracción tetraploide desaparece debido, por un lado, a un mayor índice mitótico y por otro, a que la necrosis afecte mayoritariamente a las células que se encuentren en G2 + M. La figura 6 muestra dos cortes de hígado de rata a las 48 horas de la intoxicación con tioacetamida donde se muestran diversas células en mitosis en el proceso de regeneración hepática.

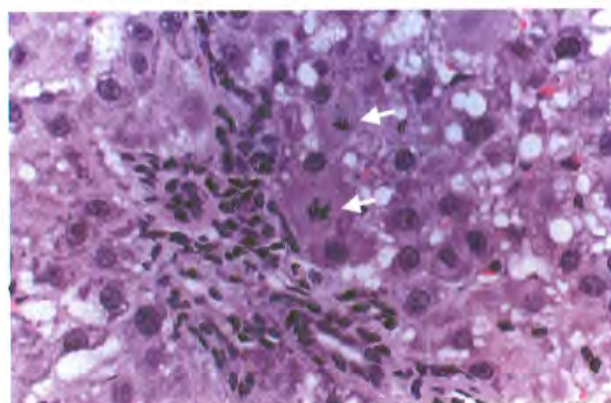
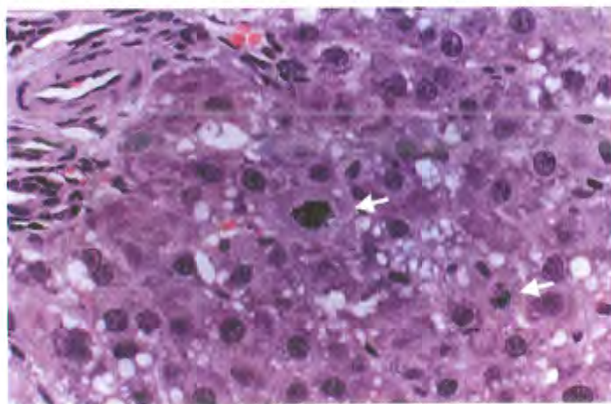


FIGURA 6. Cortes de hígado de rata que muestran células en mitosis en el proceso de regeneración post-necrótica inducida por una dosis subletal de tioacetamida ($\times 333$) (51).

La autofluorescencia emitida por la mayor parte de las células de mamíferos, paralela al estado redox de la célula y por consiguiente a su estado metabólico, parece que se debe a la presencia de nucleótidos de flavina y piridina que producen emisión de fluorescencia cuando se excitan con luz azul-verde y ultravioleta, respectivamente (33). El hígado de ratas por efecto del tratamiento con tioacetamida sufrió un proceso necrótico hepatocelular perivenoso seguido de una respuesta proliferativa. Para que se verifique esta respuesta, las poblaciones remanentes de hepatocitos maduros altamente diferenciados, presentaron una fluorescencia elevada, índice de menor energía. Estos hepatocitos tienen que pasar por un proceso de desdiferenciación en el que adquieren propiedades características de los hepatocitos fetales, fluorescencia más baja que se corresponde con un nivel energético más elevado. De estos análisis se deduce que los hepatocitos aislados de hígado en regeneración post necrótica inducida por tioacetamida, muestran características muy diversas en tamaño, complejidad y fluorescencia. Una serie de poblaciones presenta propiedades

de hepatocitos adultos, otra de hepatocitos fetales y otra de hepatocitos con características intermedias (25).

En nuestros experimentos con triacetamida la atención se concentró en el papel de la formación de aductos entre las especies reactivas y el glutatión, con el consiguiente descenso en los niveles del GSH intracelular, pero más tarde se ha reconocido que la oxidación del GSH a GSSG supone también un mecanismo importante comprometido en la defensa frente a la agresión tóxica (35). Los enzimas marcadores de la lesión hepática, la γ -glutamyl transferasa plasmática y la glutatión S-transferasa, alcanzan los valores más elevados en los momentos de máxima necrosis hepatocelular, hecho que es una de las causas de la disminución transitoria del glutatión. A partir de aquí, la concentración de glutatión intrahepática se recupera hasta alcanzar los niveles iniciales. El malondialdehído, producto de la degradación de los lipoperóxidos, muestra unos incrementos muy notables que se inician de manera abrupta a las 6 horas después de la intoxicación y se mantienen especialmente elevados en el período que fluctúa entre las 24 y 48 horas, para más tarde descender. Glutatión y malondialdehído muestran perfiles inversos, pero el descenso del glutatión es anterior al incremento del malondialdehído, lo que concuerda con el hecho de que una disminución de glutatión moderada no tiene que ir acompañada de una elevación del malondialdehído y que la elevación en la concentración de este último ocurre sólo en la fase terminal de la necrosis (32).

El glucógeno hepático desciende bruscamente a las 6 horas de la administración de tioacetamida, mostrando a las 48 horas niveles inferiores al 10% del control. La glucosa plasmática, sin embargo, no experimenta variaciones. En el hepatocito de los mamíferos, la degradación del glucógeno se controla hormonalmente a través de la formación del inositol trifosfato, que promueve la liberación del calcio de los reservorios en el interior de la célula (36), incrementando el calcio citoplasmático desde 0,1-0,2 μ M hasta 0,5-1,0 μ M. El calcio activa la glucógeno fosforilasa quinasa y estimula la degradación del glucógeno, mientras que la proteína quinasa C inhibe la glucógeno sintetasa (37). También el incremento en los niveles de cAMP encontrados por Rosa *et al.*, (38) en hígado en regeneración, junto con la actividad de la proteína quinasa dependiente del cAMP, pueden contribuir a la degradación del glucógeno. La glucoquinasa (glucosa 100 mM) desciende a las 6 horas, mientras que las hexoquinasa (glucosa 0,5 mM y fructosa 33 mM) se elevan progresivamente hasta alcanzar a las 36 y 48 horas actividades significativamente elevadas. Los niveles intracelulares del calcio basal en poblaciones de hepatocitos obtenidos después de la administración de tioacetamida, muestran un incremento paulatino que alcanza su valor

más elevado a las 24 horas de la intoxicación, siendo mínimo (10%), en este momento, el calcio localizado en retículo endoplásmico. Esto se debe, entre otras causas, a la inhibición de la ATPasa microsomal que a las 24 horas sólo alcanza valores del 35%. Estos niveles de calcio producen un estímulo de la actividad de la glucogeno fosforilasa, que llega a alcanzar un máximo a las 24 horas de la intoxicación (291%) (39).

Los enzimas generadores de NADPH enzima málico y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sufren un fuerte descenso en sus actividades enzimáticas a las 12-24 horas del tratamiento para aumentar posteriormente durante el proceso de regeneración; no obstante, si bien el primero tiende a la normalidad, la G6PDH alcanza valores del 230% a las 48 horas. Estos resultados vienen apoyados por las expresiones respectivas de sus mRNAs ya que el transcrito del enzima málico sólo alcanza a las 96 horas del tratamiento, la mitad del valor control, mientras que la G6PDH alcanza valores del 247% a las 48 horas. La causa de estas diferencias en las expresiones y actividades se debe al hecho de que en el caso del enzima málico las variaciones se deben tan sólo al proceso de destrucción de los hepatocitos perivenosos, localización mayoritaria de estos enzimas, y a la posterior regeneración de los mismos; mientras que en el caso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, los niveles superan los controles normales al existir una relación directa entre este enzima y la síntesis del DNA por ser el que suministra la ribosa-5-fosfato necesaria para la misma (40, 41, 42).

Los experimentos de nuestro grupo, anteriormente mencionados, ponen de manifiesto la capacidad necrogénica de una sola dosis subletal de tioacetamida, y sus consecuencias sobre diferentes rutas del metabolismo del hepático. La necrogenicidad de la tioacetamida es una consecuencia de su biotransformación por el sistema microsómico FAD monooxigenasa, a los derivados radicales libres sulfóxido y sulfona.

Por ello, recientemente en nuestro laboratorio se ha estudiado la capacidad del fenobarbital administrado previamente (durante 5 días en el agua de bebida) a una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg) en ratas (19).

Anteriormente, se ha mencionado que el pretratamiento con fenobarbital eleva la hepatotoxicidad de la cocaína por inducir el fenobarbital la transcripción de la isoforma CYP involucrada en la oxidación de esta droga. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que demuestre algún efecto inducible del fenobarbital sobre la actividad del sistema FAD monooxigenasa implicada en la activación microsómica de la tioacetamida. Algunos autores habían sugerido que los niveles de expresión de la FAD mono-

oxigenasa no se afectaban aparentemente por inducción (43). Este sistema se encuentra involucrado en la en la oxidación microsómica de una serie de derivados nucleofílicos (ver capítulo 5 de este volumen).

En estas condiciones experimentales pudimos demostrar la potenciación de la hepatotoxicidad de la tioacetamida a nivel morfológico y por incrementos significativos de las aminotransferasas plasmáticas, gamma glutamil transferasa y los niveles de bilirubina total. La intensidad de la potenciación por fenobarbital de la lesión hepática inducida por tioacetamida fue similar en los dos grupos (2 y 12 meses de edad). La actividad de la FAD monooxigenasa, el enzima responsable de la biotransformación de la tioacetamida se elevó significativamente (dos veces) por efecto del fenobarbital y sufrió una posterior elevación por efecto de la tioacetamida. Estas elevaciones precedieron el máximo de la necrosis. El fenobarbital indujo la actividad de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 (más seis veces) y esta actividad decreció abruptamente con la eliminación del fenobarbital y la administración de la tioacetamida, mostrando a las 48 horas de la administración de la tioacetamida, valores similares a los controles. La potenciación, por el fenobarbital, de la necrogenicidad de la tioacetamida fue paralela a la inducción de la FAD monooxigenasa, tanto por el fenobarbital, como por la misma tioacetamida. La intensidad de la lesión fue significativamente mayor en ratas de 12 meses, pero el efecto del fenobarbital fue similar en ambos grupos (Figura 7)

4. EFECTO PROTECTOR DE LA AMINOGUANIDINA SOBRE LA HEPATOTOXICIDAD DE LA TIOACETAMIDA

Sobre el mismo modelo de intoxicación experimental inducida en ratas por exposición a una dosis subletal de tioacetamida, se ensayó el pretratamiento con aminoguanidina sobre los acontecimientos multiescalonados implicados en la lesión y regeneración hepatocelulares (44). El derivado nucleofílico aminoguanidina se sabe que disminuye el desarrollo de complicaciones en modelos experimentales de diabetes y se ha propuesto como un agente protector en humanos (45 - 47). Además, la aminoguanidina ha recibido mucha atención como inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) debido al reconocimiento de su selectividad hacia la NOS inducible, su baja toxicidad y su potencial utilidad clínica. Los resultados obtenidos en nuestro grupo han demostrado que el pretratamiento con una sola dosis de aminoguanidina disminuye significativamente los efectos necrogénicos de la tioacetamida. Los marcadores de necrosis hepatocelular, actividad aspartato aminotransferasa sérica, niveles de glutatión y malondialdehído resultaron

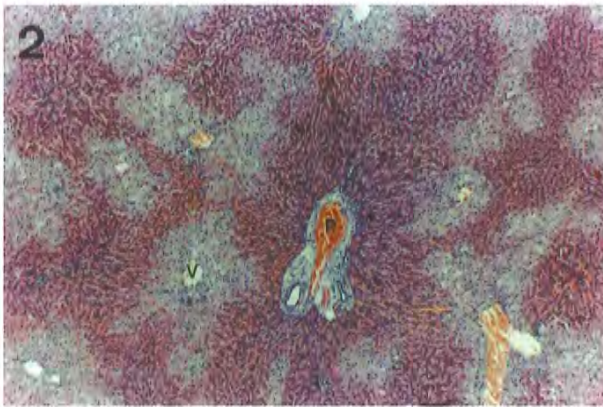
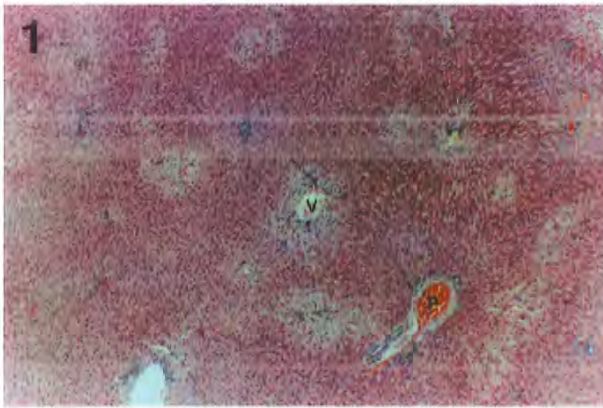


FIGURA 7. Potenciación de la hepatotoxicidad de la tioacetamida por pretratamiento con fenobarbital (A) Corte de hígado de rata mostrando la necrosis perivenosa inducida por tioacetamida (500 mg/Kg). (B) Corte de hígado de rata mostrando la necrosis perivenosa de más intensidad inducida por tioacetamida (500 mg/Kg) en ratas pretratadas con fenobarbital ($\times 66$) (51).

menos alterados cuando se compararon con sus valores basales. Este efecto beneficioso del tratamiento previo con aminoguanidina no puede atribuirse a la acción de este compuesto sobre la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) hepática, ya que en previos trabajos hemos demostrado que la actividad iNOS y los niveles del correspondiente mRNA se detectan sólo en los hepatocitos post-necróticos proliferantes (48). Sin embargo, también hemos encontrado que el NO se produce por isoformas NOS constitutivas presentes en las células de Kupffer y que las guanidinas pueden actuar bloqueando la acción del peroxinitrito producido por actividad iNOS residual o por el NO producido por isoformas constitutivas de NOS (49).

5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FENOBARBITAL

La modulación de la hepatotoxicidad por interacción entre dos o más fármacos se caracteriza por un aumento o disminución de la capacidad

hepatotóxica. Para el farmacólogo supone un tema de extraordinario interés observar como responde el hígado a la agresión de cualquier agente hepatotóxico una vez que ha sido pretratado con un inductor del sistema microsómico, como es el fenobarbital.

Los carcinógenos no genotóxicos mitogénicos, como el fenobarbital y el clofibrato, inducen tumores en roedores sin ocasionar interacciones directas con el DNA. Estos agentes son capaces de inducir proliferación celular hiperplásica en ausencia de necrosis y de inhibir la muerte celular por apoptosis. Las alteraciones genéticas parece que están inducidas por estrés oxidativo y por errores espontáneos en la replicación y reparación del DNA durante la división celular. Todas estas actividades pueden contribuir a la acción de estos compuestos.

Evidencias experimentales han comprobado que el cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples alteraciones que ocurren en un número limitado de genes: oncogenes y genes supresores de tumores. No sorprende, por tanto, que aquellos agentes químicos que inducen mutaciones genéticas o aberraciones cromosómicas mediante directas interacciones con el DNA exhiban normalmente actividad carcinogénica. Lo que es menos obvio es que ciertos agentes, como el fenobarbital, que no poseen propiedades genotóxicas, sean capaces de producir alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer.

Se han emitido numerosas hipótesis acerca del mecanismo de acción de estos carcinógenos no genotóxicos. Entre ellas se considera que los puntos de control del ciclo celular pueden jugar un importante papel (50). Estos puntos de control funcionan para mantener la integridad genómica. Actúan con sistemas supervisores capaces de reconocer las alteraciones o situaciones genéticas que pueden conllevar daño genético. Son también capaces de inducir señales que permitan a la célula responder apropiadamente a la lesión del DNA. Si estos puntos de control se pierden o no son operativos, los sistemas reparadores del DNA no podrán eliminar las lesiones potencialmente mutagénicas o clastogénicas antes de que sean fijadas como mutaciones durante la replicación del DNA y la mitosis. La pérdida de la respuesta a estos puntos de control, por tanto, puede conducir a inestabilidad genómica, la cual juega un papel crítico en la transformación neoplásica.

Son diversos los genes que se encuentran implicados en la respuesta al daño del DNA. La vía más estudiada, la de la proteína p53 dependiente de G1 en respuesta al daño del DNA, parece que implica a 3 genes: *ATM* (mutado en la ataxia telangiectasia), *el p53* y *el p21*. El gen o los genes *ATM*

actúan en secuencias del DNA anteriores a la del *p53* y se piensa que están involucrados en la inducción de la expresión de la proteína *p53*, la cual se verifica inmediatamente después de la lesión genética. La proteína *p53*, a su vez, activa la transcripción de una variedad de genes incluyendo el anteriormente mencionado *p21*. La función de *p21* es la de unir el mecanismo de respuesta a la lesión al DNA con la maquinaria del ciclo celular. Así que, se asocia con los complejos ciclina-CDK en G1 inhibiendo su actividad kinasa. Esto conlleva la acumulación de la proteína RB hipofosforilada, lo cual previene la activación del factor de transcripción E2F necesario para la progresión hacia la fase S. Gonzales *et al.*, (48) han realizado ensayos en cultivos de hepatocitos de ratón B6C3F1 que reaccionan a la lesión del DNA por parada en G1 y G2. En estos hepatocitos se induce la expresión de la proteína *p53* después de 5 horas de exposición a bleomicina. En hepatocitos de ratón C57BL que carecían de genes *p53*, no se produjo la parada en G1 en respuesta a la bleomicina y continuaron el tránsito a la fase S de manera similar que los hepatocitos no tratados. Esto revela que la respuesta al punto de control en G1 es dependiente de *p53*, y consiste en moléculas señalizadoras que han sido ya identificadas como participantes en las respuestas de control en sistemas humanos.

Estos autores han encontrado que el fenobarbital fue capaz de retrasar y atenuar la respuesta al punto de control G1 en hepatocitos diploides sin afectar la capacidad de las células a la parada en G2. Los hepatocitos tratados con fenobarbital contenían niveles basales más bajos de proteína *p53* sin exhibir cambios en los niveles de mensaje *p53*. También el fenobarbital fue capaz de retrasar y atenuar la inducción de la *p53* en respuesta a la lesión del DNA. Estas observaciones sugieren que la capacidad del fenobarbital de alterar las respuestas al punto de control G1 está mediada, en parte, a través de *p53* y proporcionan un nuevo mecanismo epigenético por el cual los agentes químicos no genotóxicos mitogénicos pueden ejercer su efecto carcinogénico

6. BIBLIOGRAFÍA

1. El-Masri HA, Reardon KF, Yang RSH (1997) Integrated approaches for the analysis of toxicologic interactions of chemical mixtures. *Critical Rev Toxicol* **27**, 175-197.
2. Jungermann K. (1992) Zonal liver cell heterogeneity. *Enzyme* **46**, 5-7.
3. Lieber CS. (1991) Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepatol* **12**, 394-401
4. Cascales C, Benito M, Cascales M, Santos-Ruiz A. (1983) The effect of chronic ethanol administration on lipogenesis in liver and adipose tissue in the rat. *British J Nutr* **50**, 549-553.

5. Cascales M. (1987) Metabolismo del etanol y aspectos energéticos. En: *Aspectos básicos y clínicos del alcoholismo*. pp 19-30. V Reunión Científica del FISS, Instituto Nnal de la Salud, Madrid.
6. Cascales C y Cascales M. (1990) Metabolismo del etanol y lesiones hepáticas inducidas. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias* (eds Cascales M y Rodés J) **vol 13**, pp 107-127.. CSIC, Madrid
7. Cascales M, Robles-Chillida EM, Cascales C y Santos-Ruiz MA (1997) Intoxicación etílica y estrés oxidativo. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés oxidativo* (ed: Cascales M) pp 267-285, Real academia de Farmacia y Fundación José Casares Gil. Madrid
8. Lieber CS. (2000) Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments *J Hepatol* **32**, 113-128
9. Hasumura Y, Teschke R y Lieber CS (1974) Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology* **66**, 415-422.
10. Hedaya MA, y Pan WJ (1996) Cocaine and alcohol interactions in naive and alcohol-pretreated rats. *Drug Metabolism Disp* **24**, 807-812.
11. Waxman DJ y Azaroff L (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* **281**, 577-592
12. Brown SE, Guzelian CP, Schuetz E, Quattrochi LC, Kleinman HK y Guzelian PS (1995) Critical role of extracellular matriz on induction by phenobarbital of cytochrome P450 2B1 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Lab Invest* **73**, 818-827
13. Salonpää P, Pelkonen O, Kojo A, Pasanen M, negiski M y Raunio H (1994) Cytochrome P4502A5 expression and inducibility by phenobarbital is modulated in mouse primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 631-637.
14. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz, N y Boscá L (1994) Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed cell death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001
15. Gascó-Alberich P. (1993) Hepatotoxicidad inducida por cocaína en ratón. Alteraciones funcionales, bioquímicas y morfológicas durante la necrosis y regeneración hepáticas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Dirigida por M. Cascales.
16. Gascó P, Fernández-Simón L, Martín-Sanz P, Díez-Fernández C, Sancho M, Sanz N y Cascales M. (1994) Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de lesión hepatocelular en ratón. *Rev Toxicol* **11**, 105-111.
17. Utley WS y Mehendale HM (1991) Evidence for stimulated glutathione synthesis by phenobarbital pre-treatment during an oxidative challenge in isolated hepatocytes. *J Biochem Toxicol* **6**, 101-113.

18. Boelsterli UA (1993) Specific targets of covalent drug-protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* **25**, 395-451
19. Zaragoza A, Andrés D, Sarrión D y Cascales M (2000) Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact* **124**, 87-101.
20. Whysner J, Ross PM y Williams GM (1996) Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation and tumor promotion. *Pharmacol Ther* **71**, 153-191.
21. Shulte-Hermann R (1985) Tumor promotion in the liver. *Arch Toxicol* **57**, 147-158
22. Li Y, Leung LK, Spear BT y Glaubert HP (1996) Activation of hepatic NF- κ B by phenobarbital in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 982-989
23. Cascales M, Zaragoza A, Díez-Fernández C y Fernández-Simón L (1994) Metabolismo oxidativo de la cocaína. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (ed. Cascales M) pp 281-309. Fund J Casares Gil y Real Acad Farm. Madrid
24. Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P y Orrenius S. (1992) Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4412-4416.
25. Cascales M, Martín-Sanz P, Alvarez A, Sanchez-Pérez M, Díez-Fernández y Boscá L. (1992) Isoenzymes of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis: responses to growth factors. *Hepatology* **16**, 232-240.
26. Gillette JR. (1974) A perspective on the role of chemically reactive metabolites of foreign compounds in toxicity. II. Alterations in the kinetics of covalent binding. *Biochem. Pharmacol* **23**, 2785-2797.
27. Dyrof MC y Neal RA (1981) Studies on the mechanism of metabolism of thioacetamide-S oxide in rat liver microsomes. *Cancer Res* **41**, 3430-3445
28. Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M (1995) Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* **16**, 1585-1593.
29. Sanz N, Díez-Fernández C, Valverde AM, Lorenzo M, Benito M y Cascales M (1996) Malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression increases in rat liver cirrhogenesis. *Br J Cancer* **75**, 487-492.
30. Chieli E y Mavaldi G (1984) Role of FAD-containing monooxygenase in liver toxicity of thioacetamide-S-oxide. *Toxicology* **31**, 45-52
31. Cascales M (1987) Hepatopatías Experimentales. Estudio del metabolismo. En: *Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones hepáticas* (eds Cascales M y Ferrándiz F) pp 9-26, CSIC. Madrid

32. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, y Cascales M. (1993) Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* **18**, 912-918, 1993.
33. Thorell B (1983) Flow cytometric monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels. *Cytometry* **4**, 61-65
34. Shapiro HM (1989) Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity. *Arch Pathol Lab Med* **113**, 591-597.
35. Vos RME y Bladeren PJP (1990) Glutathione-S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interactions* **75**, 241-265.
36. Berridge MJ e Irvine RF (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321
37. Bourne HR y De Franco AL (1989) Signal transduction and intracellular messengers. En: *Oncogenes and the molecular origins of cancer* (ed Weinberg RA) pp 97-124. Cold Spring Harbor, Lab Press Nueva York
38. Rosa JL, Ventura F, Carreras J y Bartrons R (1990) Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase during liver regeneration. *Biochem J* **270**, 645-649.
39. Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M (1996) Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications of the activity of Ca²⁺ dependent enzymes. *J Hepatol* **24**, 460-467
40. Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M. (1996) Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol*, **51**, 1159-1163.
41. Díez-Fernández C, Sanz N, Boscá L, Hortelano S y Cascales M (1997) Involvement of nitric oxide synthesis in hepatic perturbations induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* **121**, 820-826
42. Sanz N, Díez-Fernández C, Valverde AM, Lorenzo M, Benito B y Cascales M (1997) Malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression increases in rat liver cirrhogenesis. *Br J Cancer* **75**, 487-492.
43. González FJ (1997) Overview of experimental approaches for study of drug metabolism and drug-drug interactions. *Adv Pharmacol* **43**, 255-277
44. Díez-Fernández C, Sanz N, Alvarez AM, Zaragoza A y Cascales M (1998) Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* **125**, 102-108
45. Hames H, Martin S, Federlin K, Geisen K y Brownlee M (1991) Aminoguanidine inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11555-11558

46. Ou P y Wolf SP (1993) Aminoguanidine, a drug proposed for prophylaxis in diabetes, inhibits catalase and generates hydrogen peroxide *in vitro*. *Biochem Pharmacol* **46**, 1139-1144.
47. Schleicher E, Wagner E y Nerlich G (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetic and aging. *J Clin Invest* **99**, 457-468
48. Díez-Fernández C, Sanz N, Boscá L, Hortelano S, Boscá L y Cascales M (1997) Involvement of nitric oxide synthesis in hepatic perturbations induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* **121**, 820-826
49. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Suthan GJ, Salman AL y Radi R (1997) Mercaptoethylguanina and guanina inhibitors of nitric oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* **272**, 9030-9036
50. Gonzales AJ, Christensen JG, Preston J, Goldsworthy TL, Tlsty TD y Fox TR (1998) Attenuation of G1 checkpoint function by the genotoxic carcinogen phenobarbital. *Carcinogenesis* **19**, 1173-1183
51. Sarrión Pelous D (1997) Alteraciones en los parámetros de lesión hepática y regeneración inducidos por administración de tioacetamida a ratas pretratadas con fenobarbital. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Dirigida por M Cascales.