

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**Estudio bioquímico y estructural del modelo experimental de
regeneración hepática postnecrótica inducida por
tioacetamida**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María del Carmen Díez Fernández

Directora

María Cascales Angosto

Madrid

ISBN: 978-84-8466-838-1

© María del Carmen Díez Fernández, 1992

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

**ESTUDIO BIOQUIMICO Y ESTRUCTURAL DEL MODELO
EXPERIMENTAL DE REGENERACION HEPATICA
POSTNECROTICA INDUCIDA POR TIOACETAMIDA**

MEMORIA DE TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
M^a DEL CARMEN DIEZ FERNANDEZ

Madrid, Julio 1992

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación **BIOQUIMICA FARMACOLOGICA** del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, durante los cursos académicos 1989-90, 1990-91 y 1991-92, y dirigido por la Dra. **MARIA CASCALES ANGOSTO**, Investigadora Científica del CSIC.

A mi familia,
con inmenso cariño

AGRADECIMIENTOS

No encuentro palabras para expresar mi gratitud a la Directora de esta Tesis, la Dra. María Cascales Angosto que, desde el principio, me brindó su constante apoyo y amistad. Estaré siempre en deuda con ella por haberme iniciado en los caminos de la investigación y por haber llevado su preocupación por mí más allá de lo que correspondía a sus funciones académicas.

Desde estas páginas me gustaría expresar la inmensa suerte que he tenido al poder trabajar con el Dr. Lisardo Boscá y la Dra. Paloma Martín-Sanz que atendieron siempre mis dudas con paciencia y comprensión. Vaya para ellos mi especial agradecimiento y mi más profunda admiración.

Quisiera dar las gracias al Dr. Ruiz Amil por la amable acogida que me brindó en este Departamento y por tanto la oportunidad de llevar adelante este proyecto.

Reciban mi reconocimiento mis compañeras y amigas: Dra. Ana María Genaro, María Junco, Marta Casado, Sonsoles Hortelano, Marta de Paula y Alicia de don Pablos, por facilitarme el trabajo diario y honrarme con su amistad. Hago extensiva mi gratitud a Pilar Gascó y Lourdes Fernández Simón, por su contribución en este trabajo.

Quiero agradecer muy especialmente a Dolores Velasco el haber sido, una vez más la compañera incansable de tantas horas de trabajo.

Querría asimismo expresar mi gratitud a Martín Monteserín, Manolo Escobosa y Ángel García, por la colaboración prestada.

Agradezco a Ana Díez y Antonio Mantilla su colaboración en la realización de todos los dibujos e ilustraciones de esta Tesis.

Por último, a todas las personas con las que he compartido este tiempo, muchísimas gracias.

ABREVIATURAS

cAMP = AMP cíclico.
ATP = Adenosin 5'-trifosfato.
BSA = Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumine).
CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
DMEM = Dulbecco's modified Eagle medium.
DMSO = Dimetil sulfóxido.
DTNB = Acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico.
DTT = Ditiotreitól.
EDTA = Acido etilen-diamino-tetracético.
EGF = Factor de crecimiento epidérmico.
EGTA = Acido etilen-glicol-bis (β -amino etil eter
N,N'tetracético).
Fru(2,6)P₂ = Fructosa 2,6-bisfosfato.
GSH = Glutation reducido.
GSSG = Glutation oxidado.
HEPES = Acido N-2-hidroxietil piperazín-N'-2-etanosulfónico.
HGF = Factor de crecimiento de hepatocitos.
NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADP⁺ = Nicotinamida adenina dinucleótido fosforilado.
PBS = Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline).
Pi = Fosfato inorgánico (PO₄³⁻).
PIPES = Acido 1,4-piperazín-dietil-sulfónico.
PKA = Proteína quinasa A.
PKC = Proteína quinasa C.
PMA = Forbol 12-miristato-13-acetato.
PPi = Pirofosfato inorgánico (P₂O₇⁴⁻).
SDS = Docecil sulfato sódico.
TAM = Tioacetamida.
TBA = Acido tiobarbitúrico.
TCA = Acido tricloroacético.
TNB = Acido 5-tio 2-nitrobenzoico.

ENZIMAS

GGT = Gamma-glutamil transferasa (gamma-glutamil-péptido: aminoácido gamma-glutamil transferasa, EC 2.3.2.2.).

GK = Glucoquinasa (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.2.).

GOT = Glutamato oxalacetato transaminasa, EC 2.6.1.1.

GPa = Glucógeno fosforilasa a (alfa-1,4-glucan. ortofosfato glucosil transferasa, EC 2.4.1.1.).

GPT = Glutamato piruvato transaminasa, EC 2.6.1.2.

GST = Glutation S-transferasa, EC 2.5.1.18.

ICD = Isocitrato deshidrogenasa, EC 1.1.1.42.

HK = Hexoquinasa (ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.).

LDH = Lactato deshidrogenasa (L-lactato: NAD⁺ oxidorreductasa, EC 1.1.1.27.).

PFK-1 = 6-fosfofructo 1-quinasa (ATP: D-fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa, EC 2.7.1.11.).

PFK-2 = 6-fosfofructo 2-quinasa (ATP: D-fructosa 6-fosfato 2-fosfotransferasa, EC 2.7.1.105.).

PK = Piruvato quinasa (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40.).

INDICE

	Página
1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Regeneración hepática	4
1.2.- Circulación hepática	4
1.3.- Proliferación hepática post-necrótica	7
1.4.- Respuesta mitótica de los hepatocitos	9
1.5.- Reguladores de la proliferación celular	12
1.5.1.- Hormonas	13
1.5.2.- Poliaminas	16
1.5.3.- Factores de crecimiento humorales	17
1.6.- Regeneración y función hepática	26
1.7.- Muerte celular. Apoptosis versus necrosis	28
1.8.- Papel del calcio en la hepatotoxicidad producida por agentes químicos	31
1.8.1.- Medida de la concentración del calcio intrace- lular	34
1.8.2.- Efectos tóxicos del calcio	35
1.9.- Hepatotoxicidad de la tioacetamida	37
1.10.- Mecanismos reguladores del metabolismo hepático de carbohidratos	41
1.10.1.- Regulación hormonal de la vía glucolítica	43
1.10.2.- Regulación del metabolismo del glucógeno	47
1.11.- Citometría de flujo	50
1.11.1.- Estructura de un citómetro de flujo	50
1.11.2.- Aplicaciones de la citometría de flujo	53
1.12.- Ciclo de división celular	53
1.12.1.- Análisis del DNA por citometría de flujo	56
1.13.- Objetivos del trabajo	57
2.- MATERIAL Y METODOS	60
2.1.- Aparatos	60
2.2.- Productos	61
2.3.- Animales	61
2.4.- Tratamiento con tioacetamida	62
2.5.- Obtención de suero y plasma sanguíneo	62
2.6.- Obtención y fijación de muestras para la prepa- ción de cortes de tejido	63
2.7.- Aislamiento de hepatocitos	64

	Página
2.7.1.- Obtención de hepatocitos adultos	64
2.7.2.- Obtención de hepatocitos fetales	65
2.7.3.- Condiciones de cultivo de hepatocitos	66
2.7.4.- Preparación de suspensiones de hepatocitos para estudios citométricos	67
2.8.- Obtención de fibroblastos de embrión de pollo	67
2.8.1.- Condiciones de cultivo de fibroblastos	68
2.9.- Adición de suero de rata y determinación de la in- corporación de timidina tritiada en cultivos de fibroblastos	68
2.10.- Preparación de extractos hepáticos y fracciones subcelulares	69
2.11.- Determinación de actividades enzimáticas	70
2.11.1.- 6-fosfofructo 2-quinasa	70
2.11.2.- Lactato deshidrogenasa	71
2.11.3.- Glucógeno fosforilasa a	71
2.11.4.- 6-fosfofructo 1-quinasa	72
2.11.5.- Piruvato quinasa	73
2.11.6.- Hexoquinasas	74
2.11.7.- Glutation S-transferasa	75
2.11.8.- Gamma-glutamil transferasa	76
2.11.9.- Glutamato oxalacetato transaminasa	76
2.11.10.- Glutamato piruvato transaminasa	77
2.12.- Determinación de la concentración de metabolitos.	78
2.12.1.- Fructosa 2,6-bisfosfato	78
2.12.2.- Glucógeno	80
2.12.3.- Glucosa	80
2.12.4.- Lactato	81
2.12.5.- Malondialdehido	81
2.12.6.- Glutation total	82
2.13.- Determinación de proteínas	82
2.14.- Análisis del contenido de DNA en hepatocitos por citometría de flujo	82
2.15.- Determinación de calcio intracelular	84
3.- RESULTADOS	85
3.1.- Morfología hepática en cortes de hígado de rata ..	85
3.2.- Citometría de flujo	94

	Página
3.2.1.- Propiedades físicas en poblaciones de hepatocitos evaluadas por citometría de flujo	94
3.2.2.- Análisis del contenido de DNA en hepatocitos aislados por citometria de flujo	100
3.3.- Parámetros determinantes de necrosis hepática	106
3.3.1.- Alteraciones en los niveles séricos de la asparaminotransferasa	106
3.3.2.- Alteraciones en los niveles séricos de la alanina aminotransferasa	108
3.3.3.- Alteraciones en los niveles séricos de NADP-isocitrato deshidrogenasa	110
3.4.- Parámetros determinantes de lesión hepática inducida por hepatotóxicos	112
3.4.1.- Alteraciones en la actividad sérica de la gamma-glutamyl transferasa	113
3.4.2.- Actividad de la glutation S-transferasas en la fracción soluble de hígado de rata	115
3.4.3.- Niveles en hígado de glutation y malondialdehido..	117
3.4.4.- Concentración intracelular del calcio	120
3.5.- Efecto mitogénico del suero de ratas tratadas con tioacetamida sobre cultivos de fibroblastos	122
3.6.- Acción del glucagón sobre enzimas relacionados con el metabolismo de carbohidratos	126
3.6.1.- Efecto del glucagón <i>in vivo</i> sobre las actividades relacionadas con la degradación de carbohidratos..	126
3.6.2.- Efecto del glucagón sobre la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos aislados ..	128
3.7.- Fructosa 2,6-bisfosfato y actividad PFK-2 en cultivos primarios de hepatocitos. Efecto del PMA, bombesina e insulina	130
3.8.- Efecto de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del cAMP sobre la actividad de la PFK-2	141
3.9.- Efecto del sn-glicerol 3-fosfato sobre la actividad de la PFK-2	143
3.10.- Actividades hexoquinasas y glucoquinasa en la fracción soluble de hígado de rata	145

	Página
3.11.- Glucógeno hepático y glucosa plasmática	147
4.- DISCUSION	149
4.1.- Necrosis hepatocelular y lesión hepática inducida por tioacetamida	149
4.2.- Análisis por citometría de flujo	152
4.3.- Efecto mitogénico del suero de ratas después de la administración de tioacetamida	156
4.4.- Calcio y proliferación	157
4.5.- Efecto de hormonas y mitógenos sobre la PFK-2	158
5.- CONCLUSIONES	164
6.- BIBLIOGRAFIA	166

1.- INTRODUCCION

La destrucción selectiva de células hepáticas en la necrosis producida por una dosis subletal del hepatotóxico tioacetamida a ratas (6,6 mmoles/Kg) y el proceso regenerativo que tiene lugar inmediatamente después, ha permitido estudiar en este modelo experimental las fases de muerte celular y regeneración. La iniciación de la serie de reacciones celulares que conducen a la necrosis hepática inducida por xenobióticos se debe principalmente a las especies químicas reactivas derivadas de la biotransformación de agentes químicos (Hunter y col, 1977; Dyroff y Neal, 1983). La necrosis hepatocelular producida por la tioacetamida se asocia con una serie de alteraciones debidas a la formación de metabolitos reactivos derivados de la tioacetamida y de la tioacetamida S-óxido (Chieli y Mavaldi, 1984). La formación masiva de estas especies químicas reactivas trae consigo, entre otras, las siguientes alteraciones: el estrés oxidativo, la oxidación y depleción del glutation (Vos y Bladeren 1991), la oxidación de los tioles proteicos (Nicotera y col, 1985), la peroxidación lipídica, la elevación del calcio intracelular (Landon y col, 1986; Orrenius y col, 1987 y 1988) y la necrosis.

La respuesta regenerativa que se desencadena inmediatamente después del proceso necrótico, está siendo objeto de investigaciones para esclarecer los mecanismos que regulan *in vivo* la regeneración hepática y los cambios en el perfil de isoenzimas específicos del metabolismo de carbohidratos (Obaseki y col, 1983).

Para establecer un diagnóstico de la lesión hepática inducida por la administración de tioacetamida se han determinado una serie de actividades enzimáticas en suero (aminotransferasas GOT y GPT e isocitrato deshidrogenasa), que proporcionan índices relativos a la necrosis hepatocelular (Cascales y col 1990a), los cuales, unidos al estudio histopatológico en cortes de hígado

nos han permitido establecer un cuadro de necrosis perivenosa masiva. Los enzimas relacionados con la utilización del glutathion se consideran también indicativos de desequilibrio hepático en modelos de hepatotoxicidad (Cascales y col, 1991). Las actividades enzimáticas de la gamma-glutamyl transferasa sérica y la glutathion S-transferasa hepática se elevaron notablemente a la vez que se observó una brusca disminución en la concentración hepatocelular de glutathion. Estas alteraciones unidas al incremento en la concentración de malondialdehído y a las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular, son índices de lesión hepática (Mehendale, 1991), en la que se encuentra involucrada la peroxidación lipídica y la destrucción de las membranas celulares. Todas estas determinaciones nos han llevado a proponer que el punto máximo de necrosis hepatocelular, originado por una dosis de tioacetamida a ratas, se detecta a las 24 horas de la administración del tóxico y que el periodo de regeneración fluctúa entre las 36 y las 72 horas.

Por citometría de flujo se han determinado, en suspensiones de hepatocitos de rata tratadas con tioacetamida, propiedades físicas tales como tamaño relativo y emisión de fluorescencia a 530 nm, porque estos parámetros pueden ser también utilizados como criterio del grado de lesión hepática producido por xenobióticos (Thorell 1981 y 1983; Dallas y Evans, 1990). El contenido del DNA genómico es de gran utilidad para determinar en hepatocitos en regeneración, la proporción de células comprometidas en el proceso reproductivo a través del ciclo celular (Vidlov y col, 1983; Vielh y col, 1991). Por ello, en hepatocitos aislados durante las fases de necrosis y regeneración se ha evaluado la ploidia así como su distribución en cada fase del ciclo de división celular: G1, S y G2 + M. La comparación de estos resultados con poblaciones de hepatocitos adultos normales y fetales nos ha proporcionado pruebas del grado de desdiferenciación alcanzado durante el proceso regenerativo. Otra de las

características de los procesos post-necróticos es la aparición de factores de crecimiento séricos desencadenantes del proceso regenerativo (Michalopoulos y col, 1982; Andus y col, 1991). La capacidad mitogénica del suero de ratas tratadas con tioacetamida se ha evaluado, por incorporación de timidina tritiada, sobre cultivos secundarios de fibroblastos aislados de embrión de pollo, comprobándose, que la capacidad activadora de la mitosis en estos cultivos alcanzó su máximo cuando se adicionó al medio suero obtenido a las 12 horas de la intoxicación.

Trabajos recientes de nuestro grupo (Cascales y col, 1992b; Díez-Fernández y col, 1992) han podido demostrar que la respuesta de los hepatocitos fetales a la acción estimuladora del forbol 12-miristato 13-acetato (éster de forbol, PMA) es opuesta a la de los adultos, como también lo es la respuesta de los hepatocitos fetales frente a la acción inhibidora del glucagón (Hue y Rider 1987). Esta diferente respuesta a un promotor tumoral, como el PMA, puede estar relacionada con los mecanismos de señalización celular, movilización del calcio y proliferación celular en hígado en regeneración como modelo de tejido en proliferación isocrona (Tsukamoto y Kojo, 1987). La diferente respuesta al glucagón de los enzimas glucolíticos dependientes de la proteína quinasa A en hepatocitos en regeneración post necrótica (Cascales y col, 1992a), prueba la existencia de isoenzimas que exhiben un comportamiento similar al del enzima fetal (Rosa y col, 1990).

1.1.- Regeneración hepática

Una de las características de los organismos vivos es su capacidad para superar las lesiones producidas por agentes físicos o químicos y para ello han generado una serie de mecanismos de defensa que, a grandes rasgos, pueden clasificarse en dos categorías: la primera, comprende todos aquellos procesos de los que se vale la célula para prevenir la lesión después del ataque nocivo, la segunda engloba los mecanismos de respuesta para superar la lesión una vez producida, mediante la renovación y cicatrización del tejido. El estudio de los procesos que participan en la prevención de la lesión celular o tisular, ha ocupado la atención de los investigadores durante mucho tiempo y ha sido sólo hace poco cuando, aquellos sistemas encargados de la regeneración celular y la restauración tisular han empezado a interesar de manera especial.

1.2.- Circulación hepática

El estudio y conocimiento de la circulación hepática es absolutamente indispensable para interpretar cualquier investigación que tenga como base el hígado o sus células. Puntos importantes que conviene tener en cuenta se refieren a: la significación fisiológica del doble suministro sanguíneo (vena porta y arteria hepática), la regulación del flujo portal, y la desorganización circulatoria en procesos de lesión hepática.

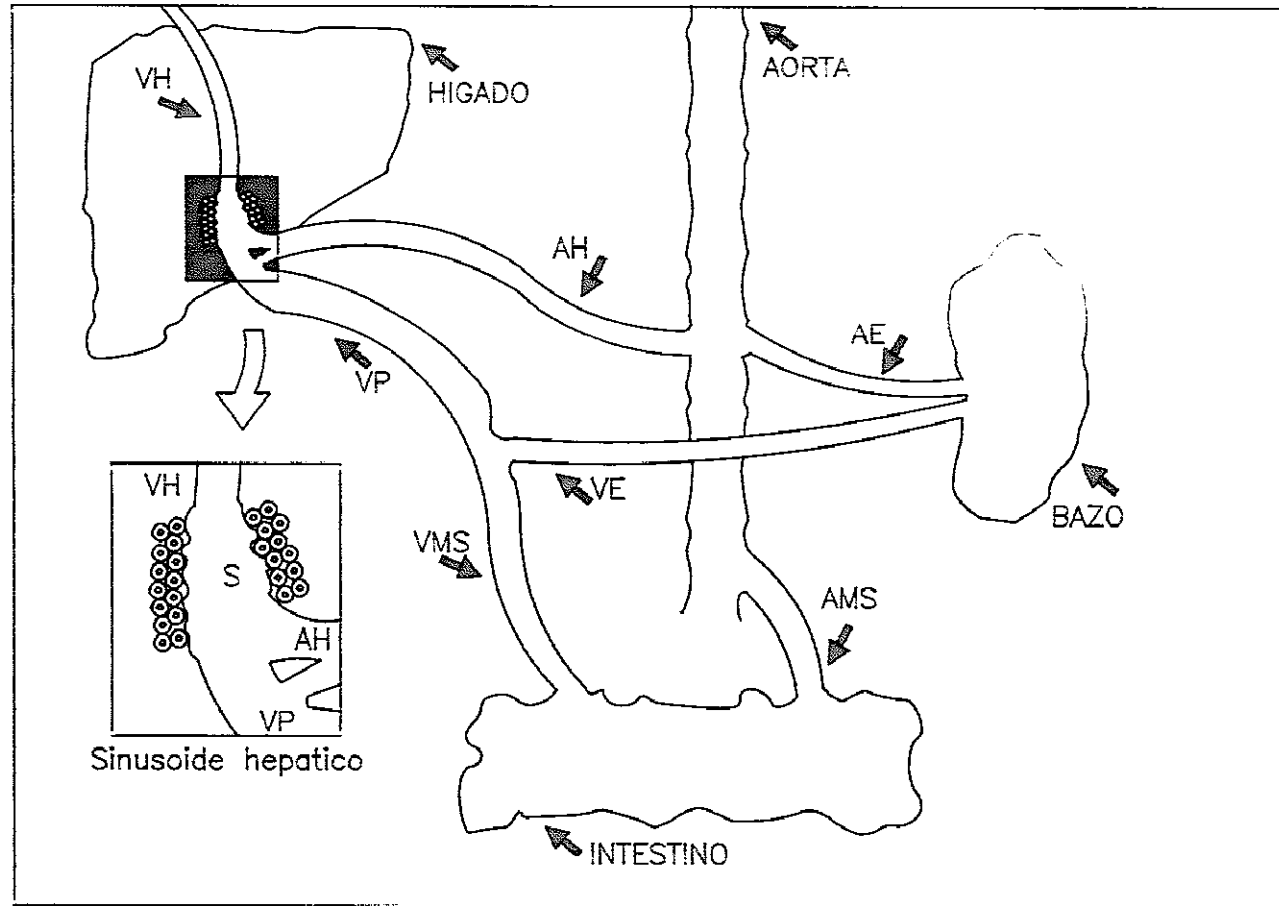
La configuración anatómica hepática separa el hígado en dos lóbulos iguales y subdivide cada lóbulo en dos segmentos. La sangre llega al hígado por dos vías independientes: una arterial con elevada presión, a través de la arteria hepática (AH) y otra venosa con menor presión, a través de la vena porta (VP). El eflujo de la sangre se verifica a través de una vena común, la vena hepática (VH). La arteria hepática (AH) asciende directa-

mente del eje celiaco y se divide en dos ramales gástrico y gastroduodenal siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal ya como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo (VMS) y del bazo (VE). 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 se encuentran en el sinusoides (S) y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior (Esquema 1).

La arquitectura hepática se encuentra organizada en modelos lobulillares o acinares y la sangre aferente arterial (AH) y venosa (VP) viajan separadamente dentro del tejido conjuntivo interlobular o interacinar antes de mezclarse completamente en la región perivenosa. Las arteriolas terminales se vacían tanto en el interior de los capilares venosos, como en el interior de los sinusoides (S) hepáticos. Observaciones directas 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 (Esquema 1).

El sinusoides hepático (S) es un capilar recubierto por un endotelio que posee poros o fenestras a través de los cuales circula el plasma sanguíneo. Las células de Kupffer o fagocitos especializados se distribuyen entre las células endoteliales. En algunas especies, las paredes de las venas hepáticas poseen esfínteres musculares potentes, pero en humanos las paredes de estos canales vasculares son muy finas (Witte y Witte, 1974). Una porción del flujo hepático arterial pasa a través de una fina red capilar que encierra conductos biliares antes de mezclarse con la sangre venosa portal.

Esquema 1



Esquema de la circulacion hepatoesplenica

S:sinusoide; AE:arteria esplenica; AH:arteria hepatica; AMS:arteria mesenterica superior; VE:vena esplenica; VH:vena hepatica; VMS:vena mesenterica superior

1.3.- Proliferación hepática post-necrótica

El hepatocito de los mamíferos es una célula que posee una amplia capacidad funcional y a pesar de su elevado grado de especialización, conserva la capacidad de proliferar en determinadas circunstancias. El estímulo más común para la división, que afecta al parénquima hepático, es la pérdida de las propias células del hígado; esta pérdida puede deberse a tres causas: infección, intoxicación química o hepatectomía parcial. La respuesta celular es aparentemente la misma en cualquiera de estos tres casos. El modelo de regeneración hepática más utilizado para el estudio de la respuesta proliferativa sincrónoma se consigue en ratas por hepatectomía de porciones de hígado que pueden superar hasta un 70 % del total. La regeneración hepática puede lograrse también mediante la administración de agentes químicos hepatotóxicos que producen, según la dosis administrada, diversos grados de necrosis.

En condiciones normales el hepatocito se encuentra en la fase G0/G1 del ciclo de división celular, lo cual no impide que el hígado sea uno de los tejidos del organismo transcripcionalmente más activo. La baja incorporación de precursores metabólicos en la molécula de DNA, se debe a que un porcentaje muy bajo (< 1 %) de los hepatocitos se encuentran en la fase S. En condiciones normales, el DNA mitocondrial muestra también, un mínimo recambio metabólico (Cascales y Martín-Sanz, 1990b; Mehendale, 1991).

El hígado, mediante hepatectomía parcial, se convierte en un modelo experimental de proliferación celular. La síntesis del DNA se inicia unas 18 horas después de la amputación quirúrgica y alcanza su máximo entre las 24 y las 48 horas. Ensayos con precursores metabólicos radioactivos han mostrado que los máximos de incorporación se alcanzan primero en los hepatocitos y después en las células epiteliales y en las de Kupffer. 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 (Bucher y col, 1978).

Para comprender la regulación del crecimiento hepático después de la hepatectomía parcial es fundamental conocer los cambios que tienen lugar en la función del hepatocito. Durante las transiciones proliferativas se verifica la desdiferenciación celular, proceso que implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo. Sin embargo, este estado desdiferenciado es distinto al correspondiente al desarrollo ontogénico o carcinogénico. Como ejemplo pueden citarse los isoenzimas de la aldolasa y la piruvato quinasa en hepatocitos fetales, en hepatocitos regenerantes y en hepatocitos procedentes de ratas tratadas con 2 acetilamino-fluoreno (Dybing y col, 1979). Este estudio revela que los hepatocitos comienzan a producir isoenzimas fetales antes de dividirse y que los hepatocitos normales y los de hígado adulto tratado con carcinógenos, presentan la misma capacidad de proliferar en cultivos primarios. Los isoenzimas de la piruvato quinasa proporcionan una prueba más clara de la desdiferenciación que los de la aldolasa, y con ellos se demuestran las diferencias de los procesos reguladores de la expresión enzimática durante la ontogénesis, regeneración y hepatocarcinogénesis (Guguen-Guillouzo y col, 1988).

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, el hígado sufre necrosis hepatocelular infligida por el mecanismo de bioactivación de la toxina. 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 sólo a pocas células y la regeneración tiende a iniciarse aproximadamente 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 (Mehendale, 1991).

El extraordinario fenómeno de la regeneración hepática va unido a otro fenómeno no menos notable. Las células recién divididas son *resistentes* 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 propiedad de resistencia que poseen las nuevas células, el tejido hepático se encuentra capacitado para superar la inminencia de una 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 (Díez-Fernández y col, 1992).

1.4.- Respuesta mitótica de los hepatocitos

El conocimiento de los cambios en la función del hepatocito, que tienen lugar después de una hepatectomía parcial, es fundamental para comprender la regulación del crecimiento visceral. Durante las transiciones proliferativas, tiene lugar un proceso tal como la *desdiferenciación* o *retrodiferenciación*, que implica una regresión transitoria de las células adultas hacia un estado más primitivo y se considera un paso obligado en la regeneración hepática. La *desdiferenciación* se sabe que tiene lugar durante la ontogénesis, la regeneración y la carcinogénesis.

Trabajos de Huerta-Bahena y col (1983) pueden servir para explicar experimentalmente la regresión o *desdiferenciación* que tiene lugar en la regeneración hepatocelular. En hígado fetal de rata se sabe que la acción de las catecolaminas se regula

principalmente por receptores β -adrenérgicos, mientras que en hepatocitos de animal adulto son los receptores α -adrenérgicos los que median la acción metabólica de la adrenalina. Estos autores han investigado sobre el papel de los receptores α y β adrenérgicos después de la hepatectomía parcial. Se ha demostrado que el efecto estimulador de la adrenalina sobre la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis, dirigido por receptores α -adrenérgicos al cabo de tres días, pasó a ser mediado por receptores β -adrenérgicos y al séptimo día retornó al estado normal primitivo. El bloqueante β -adrenérgico, el d-1 propanolol, previno en gran proporción la regeneración de las células hepáticas de rata, impidiendo la entrada de dichas células en la fase mitótica de su primer ciclo celular sin afectar la replicación del DNA. Este compuesto fue más efectivo cuando se administró 1-2 horas después de la hepatectomía parcial. El propanolol inhibió el incremento pre-replicativo del AMP cíclico y no inhibió la mitosis. La expresión de enzimas fetales y antígenos fetales, tales como la fetoproteína durante la regeneración hepática y la hepatocarcinogénesis se ha demostrado que es el resultado de la retrodiferenciación de los hepatocitos maduros. El grupo de Fausto ha examinado el grado de homología entre poblaciones de RNA en hígado de rata durante el desarrollo, la regeneración y la neoplasia y ha observado que la expresión enzimática es diferente en estos tres casos de proliferación celular (Petropoulos y col, 1985).

En lo que respecta al efecto de la sobrecarga metabólica, originada por la hepatectomía, sobre la iniciación de la síntesis de DNA (Ngala-Kenda y col, 1984), se han estudiado los cambios en la carga energética del ATP ($CE = ATP + 0,5 ADP/ATP + ADP AMP$) como expresión de la sobrecarga metabólica y de la fosforilación oxidativa. Los niveles de ATP disminuyeron significativamente, mientras que la fosforilación oxidativa mitocondrial se incrementó a las 24 horas. La infusión de glucosa previno la caída del

ATP, retrasó la iniciación de la síntesis del DNA y modificó el mecanismo de respuesta. Parece ser que la sobrecarga metabólica es la que se encuentra involucrada en la iniciación de la regeneración hepática.

Se ha descrito un método (Gaub e Iversen, 1984) que permite a las ratas sobrevivir a la hepatectomía del 90 por 100, sobre la base de los experimentos anteriormente indicados. La mortalidad del 100 por 100 se redujo a un 14 por 100, permitiendo a las ratas un libre acceso a un fluido de bebida con glucosa. En estas ratas, la síntesis del DNA y el índice mitótico reveló una respuesta proliferativa desmesurada, con un poderoso estímulo regenerador.

Existen dos cuestiones aún sin resolver que permitirán el esclarecimiento de los cambios en la expresión genética durante el proceso de regeneración: diferencias en cantidad y calidad del mRNA, e interrelaciones entre el modelo de expresión genética y desarrollo hepático. Las respuestas a estas preguntas han de estar basadas en la cantidad de DNA que se transcribe, en la abundancia y complejidad del mRNA y en los datos comparativos de homología de los mRNAs para la albúmina, α -fetoproteína y fibrinógeno en hígado en desarrollo normal y en regeneración (Fausto, 1984).

El hígado normal contiene la mayoría de las especies del RNA que se encuentran en la regeneración, antes y después de la iniciación de la síntesis del DNA. Las variaciones en mRNA hepático, contenido en las poblaciones de RNA, son suficientes para permitir la transición de los hepatocitos de un estado de reposo a otro de división. Finalmente, el análisis de la expresión de genes específicos sugiere que existe poca similitud entre los modelos de expresión genética entre un hígado en regeneración y otro en desarrollo. Un grupo de investigadores (Friedman y col,

1984), al examinar la concentración de diversos RNAs durante la regeneración hepática han encontrado que la mayor parte no experimenta apenas variaciones, tanto en su concentración como en su grado de transcripción. Por el contrario, la concentración de los mRNAs de la actina y de la tubulina se incrementó unas diez veces sin que aumentara su transcripción. Tampoco hay mayor velocidad de síntesis de RNA necesario para hacer pre-rRNA y mRNA para proteínas ribosómicas. La principal conclusión de estos estudios ha sido el hallazgo de que muchos de los constituyentes necesarios para el incremento o utilización de la masa celular, pueden ser suplementados por una mayor conservación del RNA transcrito.

1.5.- Reguladores de la proliferación celular

Muchos investigadores han utilizado la regeneración hepática como uno de los modelos más interesantes para investigar los mecanismos reguladores de la proliferación celular y los 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 replicativa 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 (Bucher, 1982) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como otras sustancias como el piruvato, el calcio y aminoácidos, además de otros factores de crecimiento no definidos aún completamente (Jirtie y Michalopoulos, 1982; Enat y col, 1984). Existen pruebas evidentes que atribuyen un papel importante al EGF en la proliferación de los hepatocitos de rata *in vivo* (Nakamura y col, 1984a) e *in vitro* (Enat y col, 1984). Otras investigaciones confirman que el EGF se une a receptores específicos y estimula la síntesis del DNA en hepatocitos en cultivo de rata adulta (Michalopoulos y col, 1984). Otro grupo

de sustancias, las poliaminas, se han considerado desde hace tiempo implicadas en los procesos de proliferación celular, debido a que la ornitina descarboxilasa, enzima responsable de su síntesis, aparece enormemente incrementada en tejidos en proliferación.

1.5.1.- Hormonas

Se ha descrito que una serie de hormonas actúan como reguladores de la regeneración hepática: insulina, glucagón, hormona paratiroidea, calcitonina, yodotironina, glucocorticoides, etc. (Starzl y col, 1977). El hígado de los mamíferos tiene capacidad de regeneración en respuesta a numerosos estímulos y se sabe que después de la hepatectomía parcial la síntesis del DNA se incrementa bruscamente a las pocas horas seguida de la mitosis, que alcanza un máximo entre las 24 y 48 horas. De esta manera a las 48 horas el hígado remanente ha duplicado su tamaño y a los 7 días ha recuperado su peso normal. En este momento, el crecimiento cesa tan bruscamente como empezó. Los mecanismos responsables de la iniciación, promoción e inhibición del crecimiento no están aún del todo claros.

Se ha sugerido, que la síntesis del DNA en hígado en regeneración se encuentra regulada, en primer lugar, por las catecolaminas que, segregadas por los nervios esplénicos, funcionan a través de los receptores α_1 hepáticos (Nakata y col, 1986). Por otro lado, las observaciones de Nishizuka (1984), ponen de manifiesto que la proteína quinasa C, activada por el éster de forbol, PMA (forbol 12 miristato 13-acetato) interfiere con la transducción de señales de los receptores α_1 (García-Sainz y Hernández-Sotomayor, 1987). Tsukamoto y Kojo (1987) han observado que el PMA previene el proceso de regeneración hepática que tiene lugar después de la hepatectomía parcial. Esta acción negativa puede explicarse sobre la base de que la proteína quinasa C, activada

por el PMA, fosforila y desensibiliza a los receptores α_1 , los cuales regulan primariamente la síntesis del DNA en la regeneración hepática (Rosler y Schoner, 1990). Es un hecho bien establecido que la estimulación de estos receptores por un agonista α_1 , da lugar a un incremento en el turnover de los inositoles con la consiguiente formación de inositol trifosfato (agente movilizador del calcio) y diacilglicerol (activador fisiológico de la proteína quinasa C). Así, la proteína quinasa C puede jugar un papel fundamental como mensajero negativo a modo de control inmediato, frente a una respuesta excesiva, a través del receptor α_1 . Estos resultados, los primeros que se han realizado en animal completo, están en total desacuerdo con los experimentos *in vitro* de otro grupo de investigadores (Boynton y Whitfield, 1980), quienes demostraron no hace mucho, que el PMA actúa como un promotor tumoral típico que induce la síntesis del DNA en células hepáticas. Esta aparente contradicción entre el diferente comportamiento de las células hepáticas nativas o cultivadas, frente a un mismo promotor tumoral, necesita de posteriores investigaciones, ya que al contrastar estos resultados con los obtenidos con el fenobarbital, también clasificado como promotor tumoral, no se ha observado actuación negativa sobre la regeneración hepática. El PMA parece que actúa sobre las células en las fases G1 y/o S, ya que los agonistas α_1 regulan la síntesis del DNA 12 horas después de la hepatectomía parcial, que es cuando los hepatocitos entran en la fase G1 y S y se encuentran a la espera de la señal del nervio esplénico para continuar el proceso. En este momento es cuando el efecto negativo del PMA se pone de manifiesto. Aunque estos resultados indican que la inhibición de la regeneración hepática por PMA se establece de una manera un tanto ambigua si la proteína quinasa C ejerce su efecto a través de la desensibilización sólo de los receptores α_1 , se sabe que este enzima desensibiliza también otros receptores hormonales movilizadores de calcio como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), vasopresina y angiotensina II, cuyas contribu-

ciones en la regeneración hepática no están aún bien establecidas (Lynch y col, 1985).

Tomando como punto de referencia el incremento en el contenido de DNA en hígado en regeneración como un reflejo de la cantidad total de células hepáticas y el incremento en la velocidad de eliminación de la antipirina como una consecuencia del incremento en la masa funcional hepática, Petersen y col (1987) han estudiado la regeneración hepática en función del tiempo en ratas hepatectomizadas después de la supresión de la respuesta humoral al glucagón por pretratamiento durante 14 días con 20 μ g de cinc-glucagón. En estas condiciones se ha visto que existe un adelanto cronológico y más pronunciado en las dos variables ensayadas (contenido de DNA y velocidad de eliminación de la antipirina), en las ratas pretratadas con cinc-glucagón. Esto indica que esta hormona actúa produciendo una aceleración en la regeneración hepática.

También se han estudiado las relaciones del estrógeno y su receptor frente a la regeneración y crecimiento del hígado de rata, encontrando un descenso notable en la concentración del receptor de estrógeno y en el número de células que lo contienen. La caída comienza a las 3 horas de la hepatectomía parcial y continúa hasta las 72 horas. Paralelamente se registra un mayor número de células que exhiben receptor de estrógeno en sus núcleos. La administración de 17 β -estradiol, en el momento de la extirpación hepática, eleva la translocación del receptor de estrógeno hacia el núcleo y acelera la velocidad de síntesis del DNA. Todo parece indicar que el estrógeno y su receptor se encuentran involucrados en la promoción de la regeneración hepática (Fisher, 1984).

1.5.2.- Poliaminas

Las poliaminas han interesado a los investigadores en el campo de la regeneración hepática, a partir del hallazgo de una gran concentración de putrescina en tejidos con rápido crecimiento como el hígado de rata después de la hepatectomía parcial (Tabor y Tabor, 1976 y 1984).

Se sabe que durante las primeras horas después de la hepatectomía parcial, el incremento en putrescina es paralelo a la actividad de la diamina oxidasa (Sessa y col, 1981), enzima que cataliza la oxidación de putrescina a gamma-aminobutiraldehído. Dando por sentado que la diaminooxidación parece que es el paso limitante en el metabolismo oxidativo de la putrescina, se ha investigado su síntesis y degradación tratando de esclarecer el mecanismo responsable de esta elevada actividad enzimática en hígado en regeneración (Sessa y col, 1982). Con inhibidores de la síntesis proteica se ha demostrado que el incremento se debe a una mayor capacidad de síntesis de la proteína enzimática y no a un cambio en la vida media del enzima.

Se ha estudiado también (Rupniak y col, 1982) los efectos *in vivo* de un análogo de las poliaminas, el 1,3 diaminopropanol (DAP), sobre la regeneración hepática. El DAP es un análogo estructural de la putrescina y se cree que bloquea la formación de poliaminas por supresión de la actividad de la ornitina descarboxilasa, enzima limitante de la síntesis. La infusión de DAP en ratas parcialmente hepatectomizadas, previno los consiguientes fenómenos de síntesis de espermidina y DNA en hígado en regeneración. La reducción de la biosíntesis del DNA reflejó un bloqueo en la entrada de los hepatocitos en la fase S.

Se ha demostrado que un número de agentes, que frenan la biosíntesis de poliaminas, producen la inhibición del crecimiento

celular en cultivos. Estos agentes son casi todos los inhibidores de la ornitina descarboxilasa, el único enzima que forma putrescina en las células de mamíferos. La comparación de los inhibidores irreversibles de la ornitina descarboxilasa con los inhibidores competitivos, ha dado importancia a los primeros. El único compuesto que interfiere con la producción de poliaminas es el metilglioxal, el cual es un inhibidor muy potente e irreversible de la S-adenosil metionina descarboxilasa, cuyo producto actúa como fuente de grupos propilamina necesarios para convertir la putrescina en espermidina y espermina (Pegg y col, 1981).

También la ornitina descarboxilasa ha generado un gran interés desde que se descubrió su implicación en el crecimiento celular. Este enzima, dependiente del piridoxal fosfato, controla el paso limitante de la biosíntesis de poliaminas. Se ha establecido una relación estrecha entre la actividad de la ornitina descarboxilasa y la velocidad de crecimiento en un gran número de sistemas. El incremento en su actividad enzimática, que se registra en células transformadas, es consecuencia de una mayor síntesis de novo de la proteína enzimática (Weiss y col, 1981).

1.5.3.- Factores de crecimiento humorales.

Una vez establecido que frente a la pérdida de células hepáticas por hepatectomía parcial o por lesión química o infecciosa, el hígado posee una capacidad inmensa para regenerarse, es obvio preguntarse acerca de los mecanismos que controlan este proceso. La regeneración hepática se regula mediante la acción de hormonas y factores de crecimiento (Andus y col, 1991). El factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF) es uno de los responsables clave de la proliferación celular en hígado durante el desarrollo fetal y después de la hepatectomía parcial o lesión tóxica (Slack, 1989; Luetke y Michalopoulos, 1985).

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 (Skov Olsen y col, 1988). 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 (Jamso, 1988). La liberación al plasma de la hormona pituitaria de manera intermitente en ratones macho, es más efectiva en el estímulo de la expresión del receptor EGF que la liberación continua de esta hormona en el caso de las hembras (Kashimata y col, 1988; Ekberg y col, 1989). 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 (Francavilla y col, 1987). Los glucocorticoides, por otro lado, actúan modulando la fosforilación de la tirosina del receptor EGF inducida por el propio factor EGF (Karasik y col, 1988).

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 (Brenner y col, 1989). 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 (Gruppuso y col, 1990). 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 (Gruppuso, 1989).

El TGF 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 (Wollemberg y col, 1987; Carr y col, 1986; Strain y col, 1987), antagonizando el crecimiento hepático inducido por el TGF α (Mead y Fausto, 1989). La administración *in vivo* de TGF β a ratas hepatectomizadas inhibe la síntesis del DNA en hígado en regeneración (Russel y col, 1988). Durante el proceso regenerativo originado por hepatectomía parcial se eleva notablemente la expresión del TGF β en hígado, pero el punto máximo de expresión del TGF β es posterior al del TGF α (Braun y col, 1988).

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) participa también en el desarrollo del hígado fetal (Presta y col, 1989) y en la regeneración hepática post hepatectomía y post necrótica (Kan y col, 1989). 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 TGF α y TGF β (Presta y col, 1989). De esta manera, la proliferación de los hepatocitos que se inicia inmediatamente después de la necrosis hepática, puede continuar mientras los niveles de TGF β sean bajos (10^{-12} M). Más tarde, la elevación en las concentraciones del FGF y del TGF β pone límite a la proliferación de los hepatocitos.

Otro factor específico del crecimiento de hepatocitos, desencadenante de la regeneración hepática en respuesta de la pérdida de hepatocitos es el HGF (hepatocyte growth factor) (Miyazawa y col, 1989; Nakamura y col, 1986, 1987 y 1989). 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 (Feingold y col, 1988). El HGF también denominado *hepatopoyetina* fue identificado en suero de ratas parcialmente hepatectomizadas (Nakamura y col, 1984; Michalopoulos y col, 1984). Más tarde se purificó a partir de plaquetas (Nakamura y col 1986), plasma humano (Gohda y col, 1988) e hígado de rata (Asami y col, 1991) y su secuencia de aminoácidos se ha deducido por clonaje de su DNA complementario (Nakamura, 1989; Miyazawa, 1989). Hasta hace poco, el HGF se consideró que poseía una estrecha especificidad actuando principalmente como mediador humoral de la regeneración hepática después de hepatectomía parcial o lesión hepática (Gohda y col, 1988). 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, ya que se expresa en diversos órganos, se libera por fibroblastos en cultivo (Rubin, 1991) y estimula la proliferación de un amplio espectro de células. Estudios de Montesano y col (1991) 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 por Montesano y col (1991), sólo el HGF indujo la tubulogénesis en fibroblastos lo que le atribuye una función morforegulatoria específica. Se ha demostrado la existencia de elevados niveles de HGF en suero de ratas después de la necrosis inducida por hepatotoxinas tales como el CCl₄ o la D-galactosamina (Andus y col, 1991).

Otros factores, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), actúan activando o inhibiendo la proliferación de los hepatocitos, por mecanismos aún no bien determinados (Nakamura y col, 1988; Kuma y col, 1990).

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 (Braun y col, 1988). 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 (Cornell y col, 1990). El retraso en la iniciación de la regeneración hepática puede ser debido a la incapacidad de estos animales para liberar factores de crecimiento en respuesta a toxinas alimentarias o ambientales.

El cultivo primario de hepatocitos de animal adulto está convirtiéndose, cada vez con más frecuencia, en un bioensayo para la detección de factores de crecimiento hepáticos. Nakamura y col (1983a y b), han enfocado su atención hacia la influencia de la densidad celular sobre el crecimiento de hepatocitos de rata adulta en cultivo primario y han sido capaces de demostrar, con bastante claridad, que las células hepáticas tendían a crecer mejor a bajas densidades, lo que hizo pensar en que la interacción celular desempeñaba una misión destacada en la regeneración.

Trabajos de Nakamura y col (1983a y b) ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo modulador de la síntesis del DNA en hepatocitos de rata incubados con insulina y EGF. Este factor ubicado en la membrana plasmática celular era el responsable de la dependencia que existía entre la síntesis del DNA y la densidad celular. Este factor modulador se ha descrito como una

proteína de 670 kDa lábil al calor. El papel de esta proteína *in vivo* es aún incierto y es necesario demostrar si su efecto modulador se verifica en las etapas iniciales del ciclo celular, ya que los hepatocitos normales se encuentran, prácticamente en su totalidad, en fase G₀. Yamada y col (1987) han estudiado el papel de este modulador en relación con la regeneración hepática, en hepatocitos aislados 24 horas después de la hepatectomía parcial. Se ha observado que la adición a estos cultivos de membranas plasmáticas, tanto de hígado normal como de hígado en regeneración, daba lugar a una inhibición de la síntesis del DNA. El hecho de que este modulador no obstaculice la unión del EGF con los hepatocitos cultivados, ha hecho pensar que la inhibición de la proliferación de los hepatocitos en la fase G₁ del ciclo celular por este modulador, puede estar controlada también por otros factores en el proceso de la regeneración.

Los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario mostraron una síntesis inducida del DNA cuando se adicionó al medio suero sanguíneo procedente de ratas 48 horas después de haber sufrido la hepatectomía parcial. Estos fenómenos se han atribuido a una disminución de los inhibidores del crecimiento preexistentes en suero, lo cual permite actuar a los de carácter estimulador de forma opuesta, favoreciendo el crecimiento celular. La adición de hormonas a estos sistemas, ha puesto de manifiesto que la sustancia estimuladora del crecimiento no coincide con el EGF, ni con el factor derivado de las plaquetas (PDGF), ni con la tiroxina, glucagón o hidrocortisona (Michalopoulos y col, 1982).

También se ha investigado sobre un factor producido en hígado en regeneración, que estimula la incorporación de timidina marcada en el DNA. Esta sustancia es específica del órgano e *in vivo* también de la especie (La Brecque, 1982 y La Brecque y col, 1984). Se ha demostrado que es termostable y precipita, aunque no se inactiva, por etanol. Otros autores (Starzl y col, 1977)

están de acuerdo con los resultados anteriores y sugieren, la existencia de un factor sérico que estimula a los hepatocitos quiescentes a entrar en el ciclo celular. Sin embargo, estos autores, no pudieron identificar este factor debido a las complejas interacciones *in vivo*.

Los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario retienen muchas de las funciones hepáticas y responden a diversas hormonas igual que *in vivo*. Además estos hepatocitos pueden proliferar en cultivo cuando la densidad celular es baja y cuando se añade al cultivo EGF e insulina. En 1976 Richman y col, describieron por vez primera, que la insulina y el EGF eran potentes activadores de la síntesis del DNA en cultivos primarios de hepatocitos de rata madura y desde entonces son muchas las investigaciones que han confirmado estos resultados. Sin embargo, no existe ninguna descripción *in vivo*, de que estos factores experimenten un incremento en suero después de la hepatectomía parcial, y por el contrario, existen pruebas de la rápida disminución de los niveles de insulina en sangre portal y periférica después de la hepatectomía parcial. Por otro lado, la concentración de EGF normal es del orden de 1 ng/ml, lo cual supone sólo una décima parte de la dosis efectiva para la síntesis del DNA en hepatocitos cultivados.

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*. El número de receptores del EGF se encuentra a menudo incrementado en líneas celulares malignas derivadas de cánceres humanos. La cantidad de mRNA que codifica el receptor EGF se encuentra frecuentemente elevada en tumores y en líneas celulares derivadas de tumores. Por otra parte, si

se incrementa el número de receptores celulares EGF en células NIH/STS utilizando un retrovirus portador del gen del receptor EGF se llega a un fenotipo transformado que depende de la presencia del EGF. Se ha descrito que el EGF disminuye (down regulation) el número de sus receptores sobre la superficie celular e incrementa la expresión del mRNA de su receptor. Como el EGF juega un papel importante en la proliferación celular es probable que la regulación del receptor EGF en un sistema de elevada capacidad proliferativa como el hígado en regeneración, sea muy importante. No ha sido aún demostrado directamente que el EGF juegue un papel primordial en la regeneración hepática *in vivo*, pero existen pruebas experimentales que así lo apoyan. Para determinar si existen cambios durante la regeneración hepática, en la cantidad de mRNA del receptor del EGF, Johnson y col (1988) han aislado los mRNAs en diferentes momentos después de la hepatectomía parcial y los han analizado mediante hibridación con dos sondas diferentes de cDNA de gen humano. Estas sondas, pE7 y pE62 se hibridaron con especies de RNA de 10 y 6 kbases. En las primeras 12 horas después de la hepatectomía, se observó que ambas especies disminuían mientras que en las muestras tomadas a las 24 y 72 horas se incrementaban muy significativamente sobre los controles. Estos resultados hacen pensar que existe un mecanismo regulador transcripcional y/o post-transcripcional, en el hígado en regeneración con respecto a la expresión genética de los receptores del EGF.

La entrada de las células en el ciclo proliferativo se acompaña de un incremento en la velocidad de síntesis proteica. Los mecanismos moleculares responsables de este incremento se encuentran en estudio. Experimentos *in vitro* 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 translacional. Uno de los principales factores implicados en el

control de la velocidad de 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 diferentes estadios de regeneración después de hepatectomía parcial (Bommer y col, 1987). Para detectar cambios en la actividad de factores solubles durante la regeneración hepática, independientes de los cambios en el mRNA y ribosomas, han usado un sistema con polisomas de hígado normal que no mostraba actividad endógena de incorporación de aminoácidos. La actividad de las fracciones citosólica y microsomal obtenidas después de hepatectomía parcial estimuló de manera notable la incorporación de aminoácidos por estos polisomas.

En cultivos primarios de hepatocitos de ratas adultas a diversos tiempos (4, 8 y 10 horas) después de hepatectomía parcial del 70 por 100 del hígado, se sintetizan cantidades de DNA, comparadas con las de rata normal. Sin embargo, a las 24 horas, la biosíntesis del DNA en hepatocitos aislados, es tres veces superior a la considerada normal. La adición de insulina al medio ejerce un efecto mínimo sobre la síntesis del DNA en todos los hepatocitos ensayados. La incorporación del factor de crecimiento epidérmico, sólo o en combinación con insulina, produce un incremento notorio en la síntesis del DNA en hepatocitos en regeneración, que se pone de manifiesto a las 4 horas de la hepatectomía, y alcanza su máximo a las 24 horas de la operación (Francavilla y col, 1986).

Estos resultados muestran claramente que los hepatocitos sintetizan DNA inmediatamente después de la hepatectomía parcial. La activación de la síntesis del DNA por el EGF puede resultar muy útil para el conocimiento de este mecanismo celular. De la

misma manera que ocurre en los fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico puede que ejerza también su actividad mitogénica en hepatocitos. Los hepatocitos en cultivo, aislados a tiempos diferentes después de la hepatectomía parcial, representan un sistema óptimo para estudiar las interrelaciones del factor de crecimiento epidérmico con la actividad mitogénica y con el estado de los receptores. Estos mismos autores han determinado la unión del factor de crecimiento epidérmico a los hepatocitos, y han comprobado que los resultados conseguidos en hepatocitos aislados de ratas, a las 4 horas después de la hepatectomía, son los mismos que para los hepatocitos normales, pero son casi insignificantes en los hepatocitos aislados 12 y 24 horas después de la operación. Se ha demostrado en muchos ejemplos, que cuando la proliferación celular está estimulada, la unión del EGF disminuye (Brown y col, 1984; Rozengurt y col, 1981; Shoyab y Todaro, 1980; Wharton y col, 1982).

1.6.- Regeneración y función hepática

El hígado, ya hemos visto, es un órgano notable, que responde a una agresión tóxica que causa necrosis hepatocelular, mediante la inducción de la proliferación de los hepatocitos remanentes; y después de un período de tiempo, no superior a las dos semanas, es capaz de recuperar su masa y celularidad inicial (Fausto, 1990; Michalopoulos, 1990). Experimentos con timidina tritiada han puesto de manifiesto un elevado porcentaje de núcleos marcados con tritio en hígado en regeneración en comparación con hígado control. También en hígado en regeneración, se ha observado una mayor proporción de núcleos hepáticos con un contenido tetraploide u octaploide de DNA ya que, los hepatocitos con núcleos poliploides son prueba de un estado de proliferación rápida típico de regeneración hepática. El desarrollo de la masa total hepática después de un proceso necrótico o de amputación quirúrgica es una prueba de la enorme capacidad regenerativa de

las células hepáticas. Sin embargo, aún no se ha resuelto una cuestión importante concerniente a la identidad de las células progenitoras implicadas en el proceso regenerador. Se ha descrito que una clase de células hepáticas progenitoras existentes en los conductos biliares terminales o intermedios, puede proliferar en respuesta a un recambio normal hepatocelular o a cualquier forma de lesión hepática (Sell, 1991). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que son los hepatocitos maduros los que son capaces de llevar a cabo la regeneración y que, tanto durante el desarrollo del hígado normal, como durante la regeneración hepática, los nuevos hepatocitos surgen de los hepatocitos preexistentes (Fausto, 1990; Michalopoulos, 1990). Por tanto, existe un *pool* de células maduras con potencial regenerativo que hace que las células progenitoras sean innecesarias en el proceso regenerativo. Durante mucho tiempo se ha creído que la deficiencia en la masa hepatocelular era el agente que desencadenaba la expansión de las células remanentes, pero en caso de hígados de ratones transgénicos con una supresión somática (Sandgren y col, 1991), 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.

1.7.- Muerte celular. Apoptosis versus necrosis

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que la muerte celular surge como consecuencia de procesos patológicos (Trump y Mergner, 1974), ahora se sabe que la muerte de algunas células supone un fenómeno fisiológico necesario para el desarrollo normal y la renovación celular (Saunders, 1966). El estudio de la morfología de las células que mueren, ha revelado dos modelos diferentes de muerte celular, denominados necrosis y apoptosis (Wyllie, 1981).

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 preneocrótica, 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 (McConkey y Orrenius, 1991).

Al contrario que las células necróticas, las células apoptóticas pierden el contacto con las células adyacentes y sufren condensación y fragmentación. 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 (Boobis y col, 1989).

Las 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 (Orrenius y Bellomo, 1986). Los efectos citotóxicos inducidos por ese incremento originan alteraciones en el citoesqueleto que se asocian con la aparición de prominencias en la membrana plasmática (Jewell y col, 1982), la activación de las fosfolipasas dependientes de calcio que lesionan la membrana (Chien y col, 1977) y la activación de proteasas neutras, también dependientes del calcio (Nicotera y col, 1986). En núcleos de hepatocitos de rata se ha demostrado la existencia de endonucleasas que necesitan calcio a nivel milimolar para ser estimuladas (Jones y col, 1989). McConkey y col, (1989) han encontrado que una elevación sostenida del calcio citosólico (desde 50-100 nM a 300-700 nM) precede a la fragmentación del DNA característica de la muerte de timocitos inmaduros inducida por glucocorticoides (Wyllie y col, 1980). El tratamiento previo de los timocitos con quelantes del calcio, tales como el quin-2-AM, o la incubación de estas células en medio sin calcio, evitó la elevación del calcio, la fragmentación del DNA y la muerte celular. La rotura de la cromatina se bloquea también con inhibidores de la calmodulina, sugiriéndose que la calmodulina interviene en la apoptosis de los timocitos (Nicotera y col, 1986). En estudios con diversos agentes tóxicos se pone de manifiesto que procesos análogos a éstos, en los que interviene la elevación sostenida del calcio citosólico asociada con una activación de la fragmentación del DNA, pueden presentar un enorme interés a nivel toxicológico (Orrenius y Bellomo, 1986).

Numerosos agentes químicos, así como otros estímulos tóxicos, pueden lesionar las células y originar en ellas una secuencia compleja de reacciones que culminen 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 que se inicie un proceso activo que lleve a la apoptosis.

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 las limitaciones de los sistemas experimentales disponibles y 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 aquellas 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 (Mesland y col, 1981). 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 (Lemasters y col, 1987).

A pesar de los esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigadores, no están aún definidos los mecanismos mediante los cuales los tóxicos matan las células. Se sabe que muchos compuestos muestran su toxicidad a través de metabolitos reactivos, bien directamente o como resultado de la generación

de especies activas de oxígeno. Cada vez son más evidentes las pruebas que llevan a considerar que la perturbación de la homeostasis del calcio se asocia a la toxicidad de muchos compuestos. Sin embargo, no se sabe con certeza, cuales 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.

1.7.- Papel del calcio en la hepatotoxicidad producida por agentes químicos

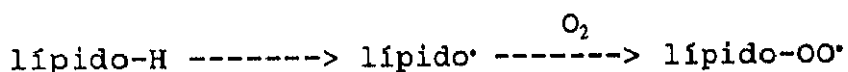
Los trabajos realizados en los últimos años, en particular por el grupo de Orrenius (1987, 1988), hacen suponer que un aumento prolongado de calcio ionizado en el citoplasma, es uno de los elementos que intervienen en la sucesión de reacciones que sobrevienen entre la introducción de la toxina y la muerte del hepatocito. El estado actual de los conocimientos permite proponer el siguiente esquema: a) formación de especies químicas reactivas, b) depleción del glutathion y modificación de los tioles proteicos y c) aumento del calcio citosólico.

a) La hepatotoxicidad de los agentes químicos se debe, en general, a la formación de especies químicas reactivas, capaces de reaccionar con los constituyentes celulares hepáticos (Pessayre, 1987). Estas especies reactivas, pueden ser metabolitos electrofílicos y/o radicales libres. Estos últimos pueden actuar directamente o a través de la formación de un radical superóxido u otras especies reactivas de oxígeno.

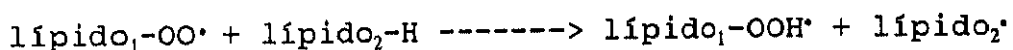
b) Por mecanismos diferentes, los metabolitos electrofílicos y los radicales libres producen una depleción del glutathion

hepatocelular y una alteración de los grupos tioles de las proteínas. Los metabolitos reactivos electrofílicos reaccionan con el grupo tiol, nucleófilo, del glutatión y también con los grupos -SH₂ de las proteínas con lo cual desaparece el GSH y se origina una arilación o alquilación de las proteínas celulares. En las reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas, el átomo de azufre del GSH proporciona los electrones para el ataque del sustrato electrofílico. El conjugado así formado se hidroliza eliminando el residuo glutámico por acción de la gamma-glutamil transferasa y el residuo glicocólico por acción de la hidrolasa específica y se excreta como mercapturato, el derivado acetilado del conjugado de cisteína (Anderson y col, 1980).

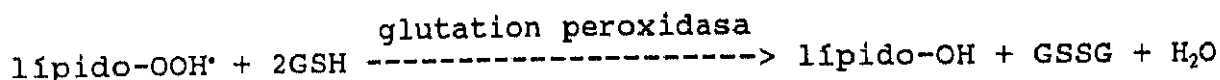
Por otro lado, los radicales libres actúan atrapando un átomo de H⁺ de un lípido insaturado dando lugar a un radical lipídico, que fija oxígeno y forma un radical lipo peróxido.



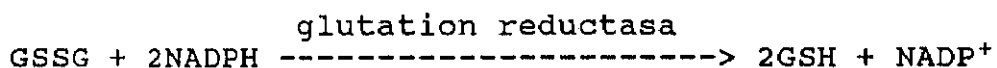
El lípido peróxido reacciona con un segundo lípido insaturado y origina un lipo hidroperóxido y un segundo radical lipídico, responsable de la propagación del proceso de peroxidación:



La glutatión peroxidasa transforma el hidroperóxido lipídico en alcohol (lípido-OH) con la oxidación concomitante del GS en GSSG:



El GSSG formado se reduce mediante la acción de la glutatión reductasa y se regenera el GSH:



La actividad de la glutatión reductasa consume NADPH, coenzima suministrado por las deshidrogenasas, dependientes del NADP⁺, del ciclo de los pentosa fosfatos, principalmente la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Cuando el hepatocito se encuentra sometido a un estrés oxidativo importante, se produce GSSG a una mayor 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. El aumento del cociente GSSH/GSH va acompañado de una oxidación de los grupos -SH₂ de las proteínas (Orrenius y col, 1987).

c) Las condiciones citadas anteriormente confluyen para desembocar en un aumento del calcio intracelular. La membrana plasmática, alterada por peroxidación lipídica o fijación covalente, deja entrar calcio en grandes cantidades (Lauterburg, 1987). La disminución de NAD(P)H, observada en ciertas situaciones de estrés oxidativo, aminora la capacidad mitocondrial para acumular calcio (Bellomo y col, 1982). La oxidación de los tioles proteicos disminuye la actividad de las ATPasas dependientes del calcio del retículo endoplásmico y de la membrana (Nicotera y col, 1990), 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 citoplasmático del hepatocito (McConkey y col, 1989b).

Para determinar si el aumento del calcio intracelular se encuentra implicado en la citotoxicidad, numerosos autores han compa-

rado la toxicidad de diversos agentes químicos sobre hepatocitos incubados en presencia y en ausencia de calcio. Los resultados han sido absolutamente contradictorios. Trabajos de Reed (Pascoe y Reed, 1989) han demostrado que la ausencia de calcio y de vitamina E en cultivos de hepatocitos, puede por sí misma ser hepatotóxica. Por un mecanismo todavía mal conocido, tales incubaciones entrañan una sobrecarga oxidativa con peroxidación lipídica, oxidación y disminución del GSH, agotamiento de la vitamina E del hepatocito, oxidación de los tioles proteicos, alteraciones mitocondriales y mortalidad celular (Farris y col, 1985; Thomas y Reed, 1988a y 1988b). Por tanto, una incubación sin calcio y sin vitamina E podría prevenir el aumento prolongado de calcio intracelular, pero por otro lado introduciría un efecto tóxico propio. Este doble efecto explica los resultados confusos de las experiencias que comparan la toxicidad de moléculas extrañas en presencia o en ausencia de calcio.

1.8.1.- Medida de la concentración de calcio intracelular

La metodología reciente permite evaluar las variaciones del calcio intracelular inducidas por hormonas en hepatocitos individualizados. Por medio de la microscopía de fluorescencia puede detectarse el calcio en células cargadas con indicadores fluorescentes (fura2, indol) o bioluminiscentes (acuorina) (Rooney y col, 1989; Tsien, 1988). La acuorina es una fotoproteína que se extrae de la medusa *Aequora* y una vez inyectada en la célula emite una luz cuya intensidad depende del calcio. Otro método consiste en medir las variaciones del calcio intracelular a partir del potasio sensible al calcio en hepatocitos individualizados (Capiod y col, 1987). Con esta técnicas se ha observado que las hormonas o los neurotransmisores originan oscilaciones en la señal del calcio. Debido a la asincronía inevitable de las respuestas celulares, estas oscilaciones han podido observarse sólo en células individuales y no en suspensiones celulares

(Jacob, 1990). Se han detectado también oscilaciones del calcio intracelular en hígado perfundido (Graft y col, 1987). Además, parece que la frecuencia, no la amplitud, de las oscilaciones depende de la concentración de las hormonas estimulantes (Woods y col, 1987). Estas observaciones han llevado a sugerir que las señales repetitivas podrían ser un modo general de codificar la información de las respuestas hormonales. Se han propuesto diferentes modelos para explicar la génesis de estas respuestas especialmente en el hígado. Por un lado, se atribuye a los períodos de síntesis y degradación del IP_3 , la liberación y reacumulación secuencial del calcio por el retículo endoplásmico (Meyer y Stryer, 1988), y por otro se ha propuesto la existencia de secuencias periódicas de activación/desensibilización del canal-receptor del IP_3 (Pietri y col, 1990). Una tercera teoría imagina liberaciones repetidas de calcio desde los diferentes reservorios mediante un mecanismo denominado "liberación de calcio inducida por calcio" (Rooney y cols, 1989). Si los reservorios se sitúan en lugares diferentes de la célula, este último modelo puede explicar las oleadas de calcio y su redistribución no homogénea en la célula (Berridge e Irvine, 1989).

1.8.2.- Efectos tóxicos del calcio

En muchos modelos de estrés oxidativo se ha observado que existe una estrecha correlación entre el grado de elevación del calcio intracelular y la citotoxicidad, como una posible relación de causa efecto. Esta idea encuentra apoyo en el efecto protector de diversas sustancias bloqueantes de los canales de calcio (nifedipina, verapamil, clorpromazina, etc.), frente a la acción de diversos hepatotóxicos conocidos (cloroformo, dimetilnitrosoamina, paracetamol, tetracloruro de carbono y tioacetamida *in vivo*) (Landon y col, 1986). *In vitro* se ha podido demostrar, que una elevación prolongada del calcio intracelular permite

conseguir aumentos prolongados de calcio de manera específica. Esto se ha conseguido mediante la adición de maitotoxina (Kutty y col, 1989), sustancia que se comporta como un agonista de los canales de calcio y hace entrar el calcio extracelular en el hepatocito o también añadiendo un ionóforo del calcio, el A23187 (Costa y col, 1987) que hace entrar el calcio extracelular en el hepatocito y amplía, por otro lado, el calcio acumulado en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. Se puede igualmente aumentar el calcio intracelular inhibiendo la extrusión del calcio del hepatocito. Esto último puede lograrse adicionando ATO al medio de incubación (Nagelkerke y col, 1989) o también añadiendo cistamina que forma disulfuros mixtos con los tioles proteicos inhibiendo así la actividad de las translocasas dependientes del calcio de la membrana plasmática (Nicotera y col, 1989). Estos tratamientos acarrearán un aumento prolongado del calcio intracelular y una posterior formación de vejigas citoplasmáticas, aumento de enzimas proteolíticos intracelulares y la muerte celular.

El aumento prolongado de calcio intracelular activa las proteasas citosólicas que dependen del calcio. Estas proteasas digieren las proteínas celulares, especialmente aquellas que aseguran el enganche de los microfilamentos sobre las proteínas de la membrana plasmática (Orrenius y col, 1988). La desorganización de esta red microfilamentaria bajo la membrana, permite la formación de protuberancias o vejigas cuya ruptura acarreará la muerte celular.

Es importante destacar que la formación de estas vejigas puede originarse por mecanismos independientes de la concentración de calcio intracelular. El monómero de la actina posee muchos grupos -SH. En el caso de una sobrecarga oxidativa numerosas moléculas de actina se unirán por puentes disulfuro formando voluminosos agregados macromoleculares no funcionales (Mirabelli y col,

1988). La hipótesis es que se produce una alteración de la red microfilamentaria que dará lugar a las vejigas citoplasmáticas (Thor y col, 1988). En el caso de sobrecarga oxidativa es probable que también tenga lugar la formación de disulfuros mixtos, actina-glutation. Se ha demostrado que estos disulfuros mixtos no impiden la polimerización normal de la actina monomérica (actina G) en microfilamentos (actina F), pero las fibrillas formadas presentan una estabilidad mecánica muy débil (Stournara y col, 1990). De esta manera, la oxidación de los grupos tiol proteicos puede alterar el sistema microfilamentario por dos mecanismos: uno directo, que oxida los grupos tiol de la molécula de actina, y otro indirecto, a través de la elevación del calcio intracelular, activación de las proteasas y alteración secundaria de la red microfilamentaria.

1.9.- Hepatotoxicidad de la tioacetamida

Muchos de los compuestos, o sus metabolitos, que pueden causar lesión letal a los hepatocitos, son compuestos con una elevada reactividad química. Estas especies electrofílicas tienen capacidad de unirse covalentemente a las macromoléculas celulares. Existe una estrecha correlación entre la cantidad de estas uniones covalentes y la necrosis celular (Gillette, 1974). 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 mayor parte de las sustancias que son tóxicas mediante su biotransformación en intermediarios reactivos, afectan la concentración celular del glutatión. Inicialmente, la atención de los investigadores se concentró en el papel de la formación de aductos entre la especie reactiva y el glutatión, con el

consiguiente agotamiento del GSH celular, pero se reconoce ahora que la oxidación del GSH a GSSG supone también un mecanismo importante comprometido en la defensa (Vos y Bladeren, 1990).

La tioacetamida se metaboliza rápidamente en hígado de rata dando lugar a la tioacetamida S-óxido que se considera el compuesto electrofílico capaz de formar aductos N-ε-acetil lisina y ejercer así sus efectos necrogénicos (Dyroff y Neal, 1983).

La tioacetamida, al igual que muchos otros agentes hepatotóxicos, se metaboliza en el retículo endoplásmico dando lugar a metabolitos reactivos que interaccionan con componentes de la célula e inician una cadena de reacciones que conducen a una lesión hepática que se manifiesta por diversos grados de necrosis centrilobular (Dyroff y Neal, 1983). La necrosis hepática inducida por tioacetamida se asocia con un incremento en el contenido hepático de calcio (Landon y col, 1986; Anghileri y col, 1986). El sistema mono-oxigenasa 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 S-óxido en microsomas de hígado de rata y de la formación de aductos N-ε-acetil lisina con proteínas microsómicas (Dyroff y Neal, 1983; Chieli y Mavalidi, 1984).

Se han utilizado modelos experimentales de disfunciones hepáticas, inducidas por administración de tioacetamida a ratas, para estudiar parámetros bioquímicos relacionados con la funcionalidad hepática (Martín-Sanz y col, 1987b; Cascales y col, 1990a), así como reacciones bioquímicas involucradas en la biotransformación de esta sustancia hepatotóxica (Chieli y Mavalidi, 1984).

El modelo utilizado por nuestro grupo en estudios de intoxicación crónica se obtuvo en ratas por administración intraperitoneal diaria de tioacetamida en dosis de 50-100 mg/Kg durante ocho

semanas. Este tratamiento continuado dió lugar a hígados con un elevado grado de desarrollo nodular y con una colestasis hepatobiliar crónica. Al final de las 8 semanas los numerosos nódulos en la superficie hepática revelaron un grado severo de cirrosis portal con nódulos hiperplásicos (Cerdán, 1978). Estos nódulos son proliferaciones focales de hepatocitos alterados que pueden observarse en la mayor parte de los modelos de tumores hepáticos inducidos por sustancias químicas (Solt y Farber, 1976). Recientemente, estos nódulos han sido definidos histológicamente como "nódulos atípicos adenomatosos hiperplásicos" y se supone que representan un primer estadio del carcinoma hepatocelular (Nakanuma y col, 1990).

El desequilibrio metabólico en hígado es una de las consecuencias del metabolismo de agentes hepatotóxicos, y así en caso de intoxicación crónica con tioacetamida, se han descrito alteraciones significativas en los enzimas del ciclo de la urea, como también en los sistemas enzimáticos relacionados con el ácido glutámico, que ocasionan un incremento en las concentraciones de amonio, tanto en el interior del hepatocito como en plasma sanguíneo (Cascales y col, 1979 y 1982). También los enzimas generadores de NADPH de la vía de los pentosa fosfatos se encuentran notablemente afectados en hígado de rata tratada crónicamente con tioacetamida (Cerdán y col, 1981).

De acuerdo con estas sugerencias se iniciaron con posterioridad investigaciones en relación con la lipogénesis *de novo* en hígado por efecto de la administración aguda y crónica de tioacetamida (Martín-Sanz y col, 1989b), así como otras relacionadas con los mecanismos de peroxidación (Cascales y col, 1990a y 1991). Las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, disminuían progresivamente a lo largo de las ocho semanas de administración de tioacetamida. Sin embargo, las actividades de otros enzimas lipogénicos, dependientes del NADP, como el

enzima málico y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, (Cerdán y col, 1981) experimentaron incrementos muy notables. Estos incrementos pueden relacionarse con un mayor requerimiento del NADPH necesario para la destoxificación y no para la lipogénesis.

En el curso de investigaciones concernientes a alteraciones en el metabolismo de los lípidos en tumores hepáticos inducidos por administración continuada de tioacetamida, nuestro grupo ha realizado estudios sobre la translocación de la fosfatidato fosfohidrolasa (EC 3.1.3.4.) y su modulación por una serie de sustancias (Cascales y col, 1989). La fosfatidato fosfohidrolasa es un enzima que se encuentra en la encrucijada de la biosíntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos y su actividad depende de su translocación desde el citosol, donde es inactivo, a las membranas del retículo endoplásmico, donde es activo.

Entre las sustancias moduladoras de la translocación/actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa se encuentran algunas, como la espermina y el PMA, que están involucradas en el mecanismo de proliferación celular y en la promoción tumoral y otras, como la clorpromazina, que al actuar como antagonistas del calcio disminuyen la acumulación de este elemento y la necrosis centrilobular asociadas con la administración de TAM (Landon y col, 1986). La ornitina descarboxilasa se eleva considerablemente en hígado de ratas en caso de intoxicación aguda o crónica con tioacetamida (Cascales y col, 1986). La relación entre la actividad de esta enzima y la capacidad moduladora de la espermina, hace suponer que la actividad enzimática de la fosfatidato fosfohidrolasa se encuentra relacionada estrechamente con mecanismos de proliferación celular.

A partir de aquí, nuestras investigaciones se encaminaron a estudiar los mecanismos de dextoxificación hepática relacionados con la peroxidación (Cascales y col, 1991), concentrándose en

sistemas enzimáticos involucrados en el ciclo redox de peroxidación del glutatión : glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y otros como la catalasa y la superóxido dismutasa, los cuales unidos a los generadores de NADPH y a los relacionados con el sistema monooxigenasa del citocromo P-450, podían dar cuenta de las vías utilizadas por este hepatotóxico en su degradación microsómica. La intoxicación crónica con tioacetamida produjo un desequilibrio entre las actividades de los enzimas acoplados al glutatión. La actividad de la glutatión reductasa incrementó progresivamente con la intoxicación, mientras que la glutatión peroxidasa mostró un comportamiento totalmente opuesto. Las alteraciones en la actividad de la glutatión peroxidasa de la fracción soluble fueron paralelas a las de la actividad catalasa. Estos resultados, junto con las actividades disminuidas de los enzimas relacionados con el sistema monooxigenasa citocromo P-450 (NADPH citocromo P-450 reductasa y NADH citocromo b₅ reductasa) sugieren que las células hepáticas no están protegidas frente al estrés oxidativo producido por la administración crónica de tioacetamida.

1.10.- Mecanismos reguladores del metabolismo hepático de carbohidratos

La regulación hormonal de procesos metabólicos, tales como la gluconeogénesis, glucólisis y metabolismo del glucógeno, ha sido un área activa de investigación durante mucho tiempo. Esta regulación se puede dividir en efectos a corto y a largo plazo. Los efectos a corto plazo, que ocurren en segundos o minutos, comprenden las alteraciones en la actividad de enzimas realizadas por cambios en efectores alostéricos y/o en el estado de fosforilación de enzimas mientras que, los efectos a largo plazo engloban las variaciones en la expresión de los genes, un proceso que normalmente tarda horas o días.

La regulación hormonal del metabolismo hepático tiene lugar por dos mecanismos generales. El primer mecanismo incluye aquellas hormonas (glucagón, agonistas β -adrenérgicos) que interaccionan con un receptor de la membrana plasmática que se asocia con la activación de la adenilato ciclasa, dando como resultado una elevación de los niveles de cAMP intracelular. Esto conduce a la activación de proteína quinasas dependientes de cAMP que catalizan la fosforilación de sustratos proteicos, dando lugar a una respuesta fisiológica que estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis.

El segundo mecanismo incluye aquellas hormonas que actúan a través de variaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} generadas por dos mensajeros intracelulares: el inositol 1,4,5-trifosfato y 1,2-diacilglicerol. El cambio en los niveles de Ca^{2+} intracelular, en combinación con calmodulina y/u otros efectores, activa las proteínas quinasas dependientes del Ca^{2+} . En la gluconeogénesis y la glucólisis, tanto la fosforilación dependiente del cAMP (PKA) como la que depende del Ca^{2+} (PKC) producen cambios similares en el flujo de estas vías. La acción de la insulina, por otro lado, es contraria a la de las hormonas que aumentan los niveles de cAMP, probablemente por su capacidad de activar la cAMP fosfodiesterasa y disminuir con ello la concentración de cAMP. Se conoce poco acerca del efecto en la fosfodiesterasa, al igual que tampoco se sabe del mecanismo mediante el cual la acción de la insulina es opuesta a la de las hormonas que actúan vía cambios en los niveles de Ca^{2+} . Los efectos de la insulina pueden, por tanto, representar un mecanismo adicional en la regulación de los procesos metabólicos en el hígado.

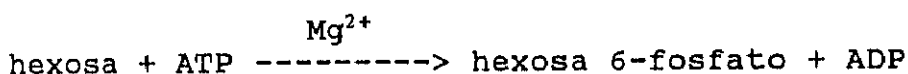
En el hígado, el control a corto plazo de la glucólisis y la gluconeogénesis posee una serie de mecanismos reguladores interesantes. El hecho de que enzimas específicos para la gluconeogénesis, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa 1,6-bisfosfa-

tasa y glucosa 6-fosfatasa, actuen de manera inversa a los enzimas glucolíticos, piruvato quinasa, 6-fosfofructo 1-quinasa y glucoquinasa, respectivamente, incorpora la posibilidad de ciclos entre los sustratos y productos de los enzimas. La operación simultanea de reacciones opuestas hace posible un sistema de control sensible en el cual, tanto la proporción como la dirección del flujo pueden regularse por pequeños cambios en la concentración de efectores de uno o más de los enzimas involucrados en el ciclo y/o por modificación covalente de estas enzimas.

1.10.1.- Regulación hormonal de la vía glucolítica

Nuestro interés en el metabolismo de carbohidratos se ha centrado en las siguientes enzimas glucolíticas: hexoquinasas, 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa, 6-fosfofructo 1-quinasa/fructosa 1,6-bisfosfatasa y piruvato quinasa.

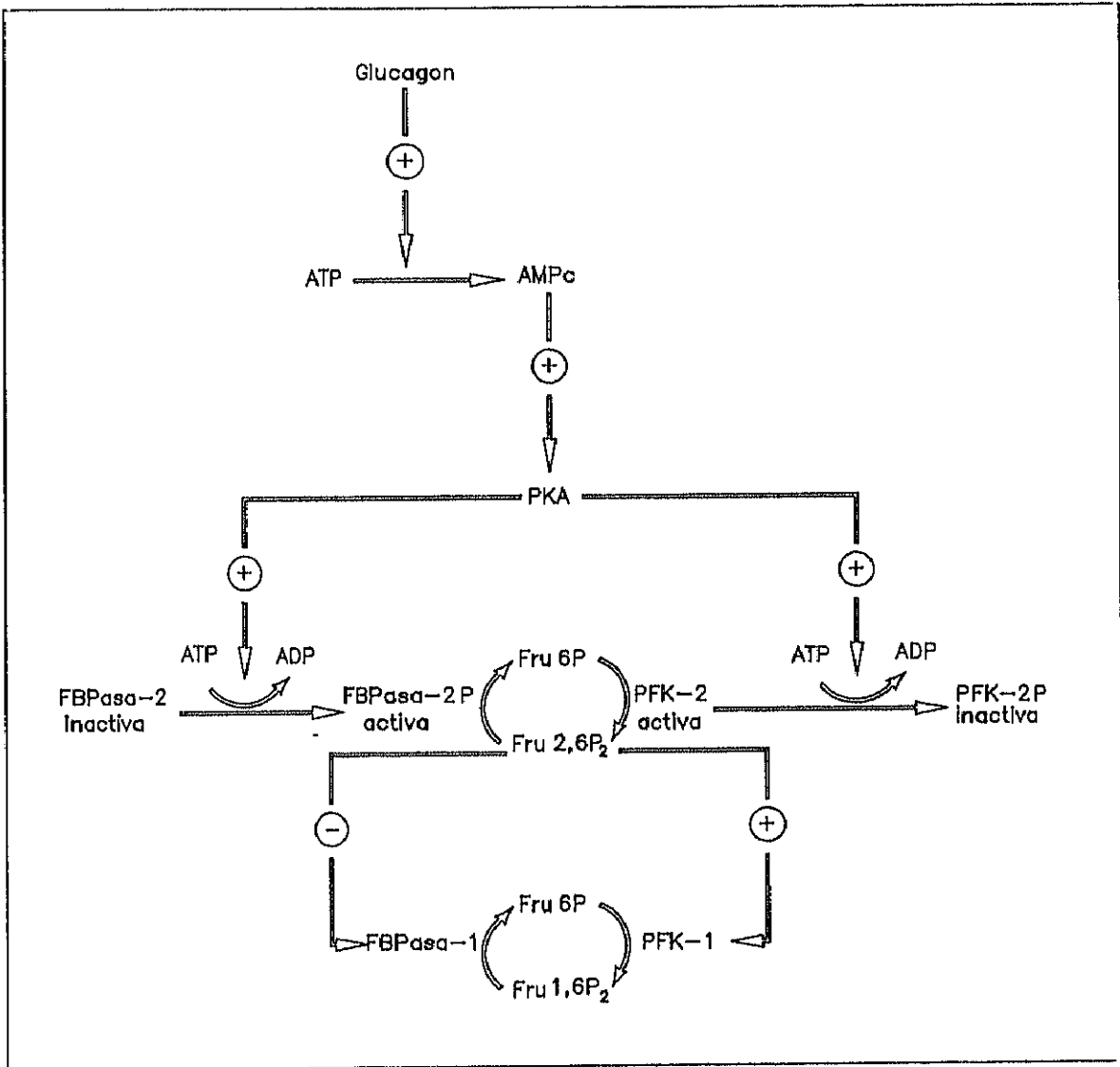
Todas las células que pueden metabolizar la glucosa contienen alguna forma de la hexoquinasa, formada por dos subunidades idénticas, que catalizan la reacción:



La mayoría de las hexoquinasas no son específicas, siendo capaces de catalizar la formación de ésteres fosfato en posición 6 en manosa, fructosa y galactosa. Los tejidos animales contienen una familia de hexoquinasas, fácilmente distinguible en la mayoría de los casos por sus K_m para la glucosa. Una característica importante de la hexoquinasa es su inhibición por el producto hexosa 6-fosfato. Un segundo enzima que cataliza esta reacción es la glucoquinasa, este enzima no es inhibido por la glucosa 6-fosfato y tiene una K_m para la glucosa superior. La glucoquinasa es el enzima que predomina en el hígado adulto.

La actividad de la glucoquinasa no se altera por modificación covalente; así, los cambios en su actividad se deben totalmente a la cantidad de la proteína. Cuando la insulina es baja, la actividad de la glucoquinasa está disminuida al igual que los niveles de mRNA. El glucagón (o el cAMP, su mensajero intracelular) inhibe la transcripción del gen de la glucoquinasa. El estudio del mecanismo de acción del glucagón en la gluconeogénesis hepática ha permitido el descubrimiento de la fructosa 2,6-bisfosfato (Van Schaftingen y col, 1980a). Este metabolito es un potente estimulador de la 6-fosfofructo 1-quinasa (PFK-1) (Van Schaftingen y col, 1980b) y un inhibidor de la fructosa 1,6-difosfatasa (FBPasa-1).

La unión del glucagón a la membrana celular estimula a la adenilato ciclasa, la cual cataliza la síntesis de cAMP a partir de ATP. El incremento del nivel de cAMP intracelular activa la proteína quinasa A, que es inactiva en ausencia de cAMP. Dicha proteína fosforila dos enzimas: la PFK-2 y la FBPasa-2. La PFK-2 fosforilada es inactiva, mientras que es activa la FBPasa-2 fosforilada (Esquema 2).



Esquema 2

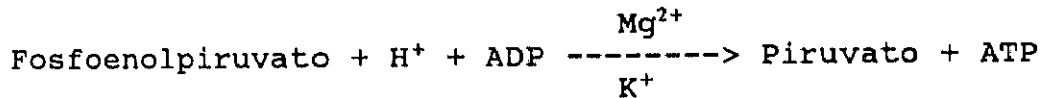
La presencia de fructosa 2,6-bisfosfato en el medio activa a otro enzima la PFK-1, que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato e inhibe la FBPassa-1 que cataliza la reacción en sentido contrario.

Después de la hepatectomía parcial, en los hepatocitos remanentes tiene lugar una serie de cambios hormonales, metabólicos y energéticos que son los que han de condicionar la respuesta mitótica regenerativa. Durante la fase de proliferación celular rápida, la homeostasis de la glucosa tiende a mantenerse mediante una gluconeogénesis incrementada, unida a una glucólisis disminuida (Leffert y col, 1979; Katz, 1979). Los cambios hormonales traen consigo elevaciones en el glucagón, en la corticosterona (Leffer y col, 1979) y en las catecolaminas (Cruise y col, 1987). Recientemente, Rosa y col (1990) han demostrado que tanto el glucógeno como la fructosa 2,6-bisfosfato disminuyen rápidamente después de la hepatectomía parcial y que ambos niveles se normalizan a los 7 días. La forma "activa" (no fosforilada) de la PFK-2 experimenta variaciones paralelas a las de la Fru(2,6)P₂, mientras que la actividad "total" de la PFK-2 disminuye sólo después de 24 horas.

Se ha descrito recientemente que los hepatocitos fetales contienen una forma de 6-fosfofructo 2-quinasa (PFK-2) que no muestra respuesta alguna a la inactivación, dependiente del glucagón, típica de los hepatocitos adultos (Hue y Rider, 1987). Además, en cultivos primarios de hepatocitos fetales a término (feto de 22 días) se ha observado que la inhibición inducida por glucagón necesita al menos 45 minutos para alcanzar la mitad de su efecto máximo, lo que hace pensar que la forma adulta de este enzima se induce rápidamente después del nacimiento (Martín-Sanz y col, 1987a y 1989a). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Petersen y col (1987) quienes han sugerido que uno de los estímulos de la regeneración hepática son los elevados niveles

de glucagón, similares a los encontrados en hígado fetal.

La piruvato quinasa cataliza la última reacción de la glucólisis en la cual el fosfoenolpiruvato transfiere su fosfato al ADP.



La piruvato quinasa hepática es activada por fructosa 1,6-bisfosfato e inhibida por alanina y ATP. La fosforilación de la piruvato quinasa puede ser catalizada por proteína quinasa dependiente de cAMP o por proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina; esta fosforilación da lugar a una inhibición de la actividad, caracterizada por una disminución de la afinidad por el fosfoenolpiruvato (Pilkis y Claus, 1991).

1.10.2.-Regulación del metabolismo del glucógeno

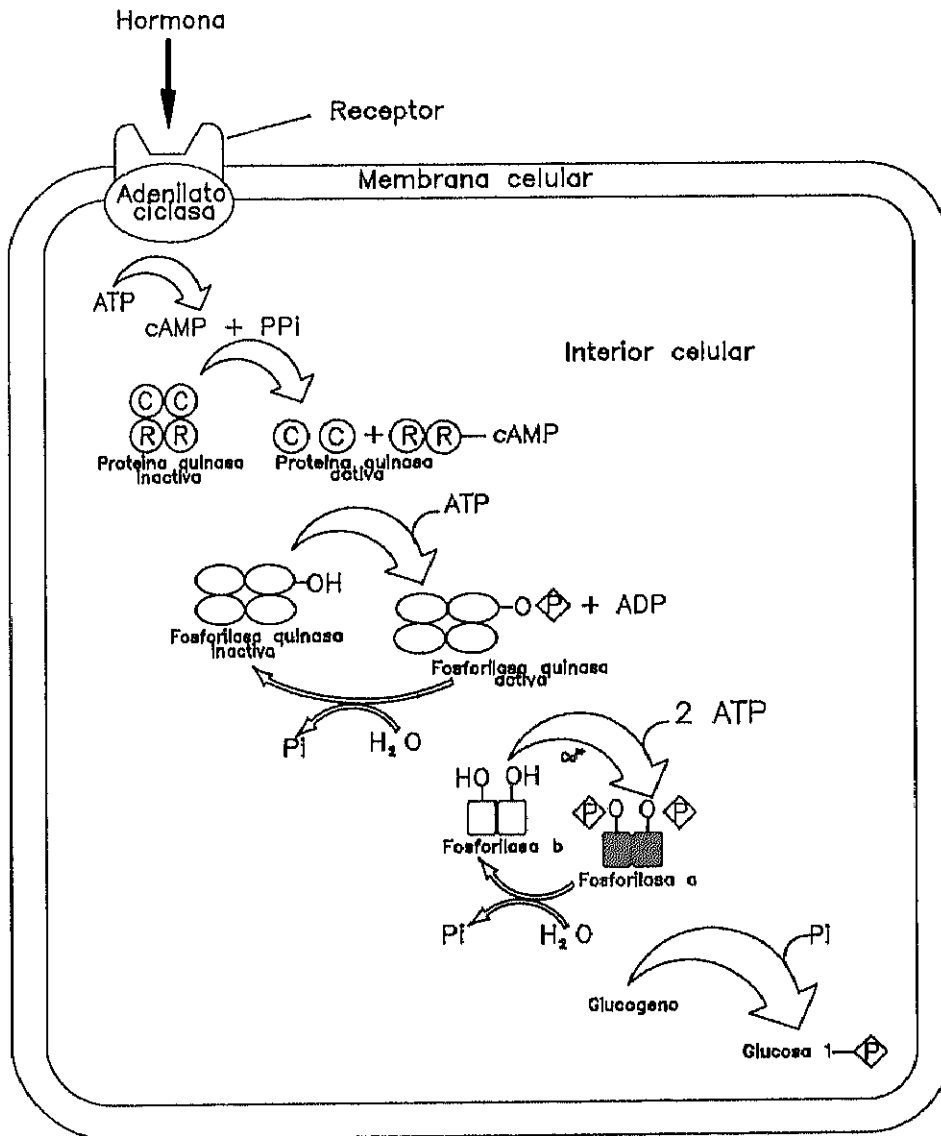
Tanto la epinefrina como el glucagón tienen el efecto de inhibir la síntesis del glucógeno al mismo tiempo que promueven la glucogenolisis; ambos efectos son mediados por el cAMP.

En la glucogenolisis, la movilización del glucógeno involucra un enzima: la glucógeno fosforilasa; este enzima existe en dos formas interconvertibles: la fosforilasa a y la fosforilasa b. Un residuo de serina en la posición 14 de cada cadena polipeptídica está fosforilado en la forma activa, la fosforilasa a, mientras que residuos de serina no modificados están presentes en la forma menos activa, la fosforilasa b.

La movilización del glucógeno hepático se estimula enormemente por efecto del glucagón, hormona que al unirse a la membrana, estimula la adenilato ciclasa que cataliza la síntesis del cAMP; el cAMP activa la proteína quinasa. Esta enzima cataliza la

fosforilación de fosforilasa b a fosforilasa a, dando lugar a la descomposición del glucógeno.

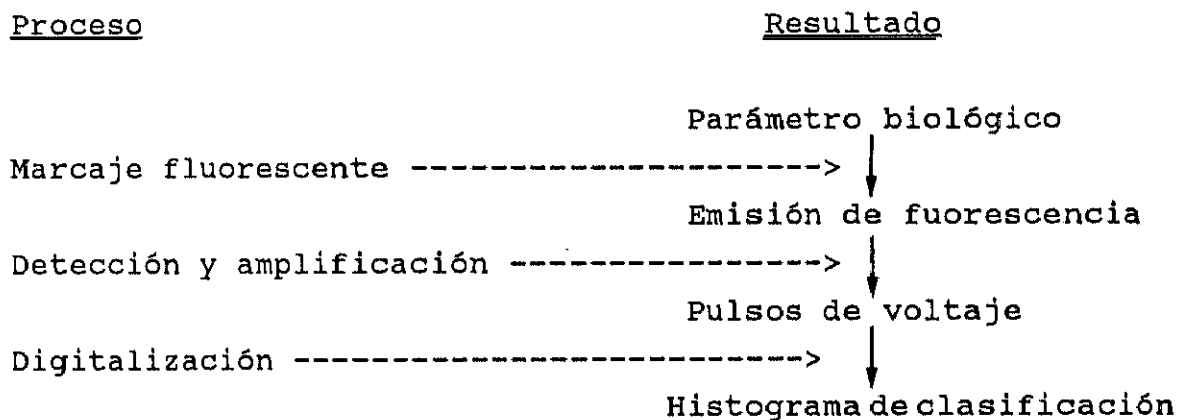
Una de las subunidades de la fosforilasa b quinasa es una proteína llamada calmodulina o proteína modulada por calcio. En el caso de la fosforilasa b quinasa, la unión del Ca^{2+} a la calmodulina es esencial para la actividad catalítica del enzima. Así, la cascada del glucógeno es dependiente tanto de la concentración intracelular de calcio como de los niveles de cAMP (Esquema 3).



Esquema 3

1.11.- Citometría de flujo

La citometría de flujo constituye una metodología de desarrollo relativamente reciente, principio de los 70, que cada día revela mayor capacidad en cuanto a sus posibilidades de aplicación. El fundamento de un proceso de citometría de flujo es análogo al de medida de fluorescencia de células marcadas con anticuerpos conjugados con fluorocromo. El proceso básico de medición por citometría de flujo, para un parámetro biológico cuantificado por emisión de fluorescencia, se recoge en el esquema siguiente:



1.11.1.- Estructura de un citómetro de flujo

Un equipo de citometría de flujo se puede dividir en los siguientes componentes:

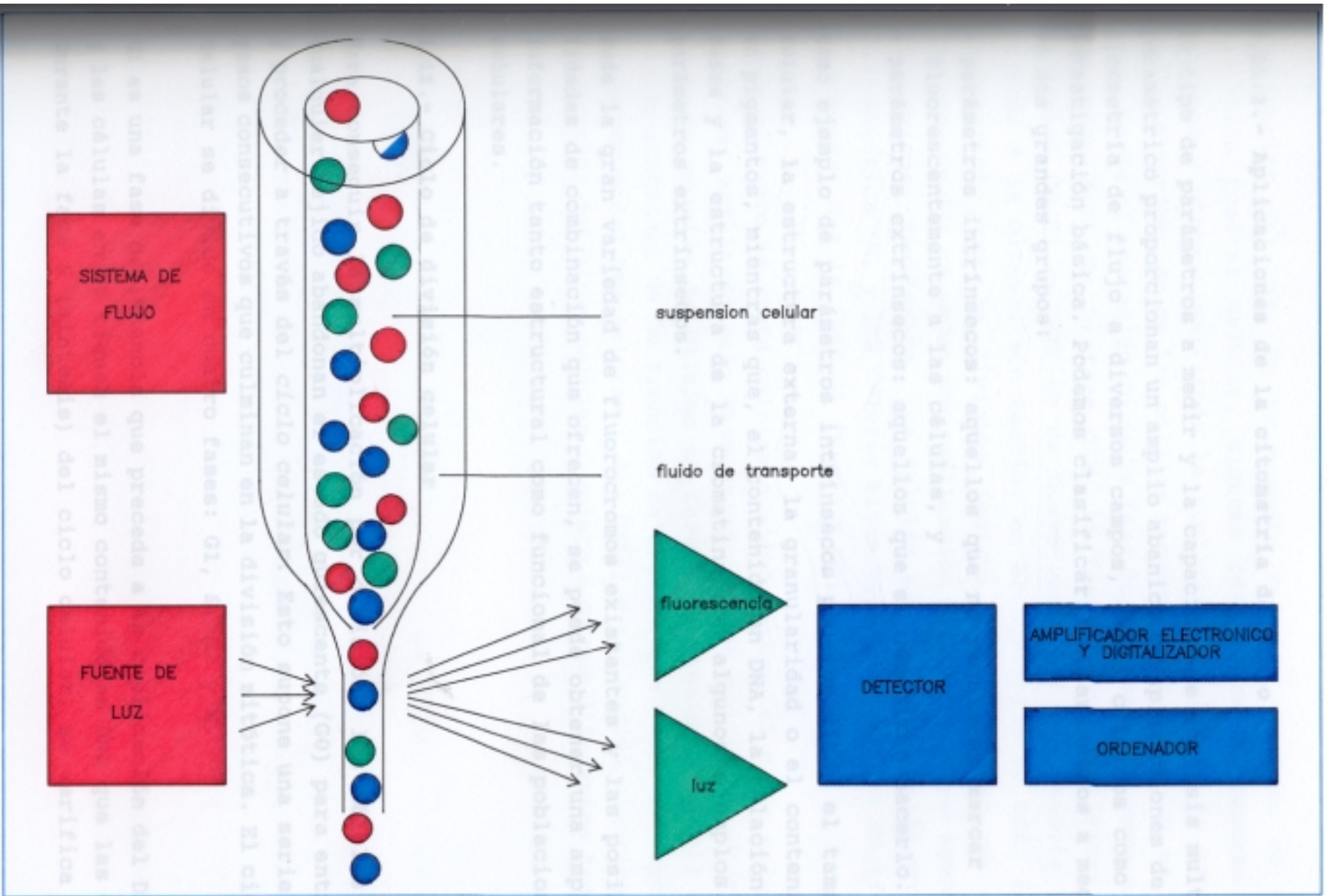
1. Un sistema de emisión de luz para producir la excitación de los fluorocromos utilizados como marcadores. Esto se logra con lámparas de mercurio o xenón o con el laser. Este último produce un rayo de luz coherente, plano polarizado, intenso y monocromático. El tipo de laser condiciona el tipo de fluorocromos utilizables, siendo el más usual el argón iónico.
2. Un módulo de análisis donde se recogerá tanto la luz

dispersada por las células como la fluorescencia emitida por los fluorocromos. Cada rango de longitudes de onda correspondiente a cada uno de los tipos de emisión es convenientemente dirigida a los detectores apropiados, células fotovoltaicas y fotomultiplicadores, mediante filtros. Los elementos centrales del módulo de análisis son: la cámara de flujo y el bloque óptico.

La cámara de flujo: en ella tiene lugar la irradiación de las células. Estas son arrastradas mediante un líquido de transporte que las hace circular en régimen laminar y de forma secuencial a través del haz del laser, reduciendo el diámetro de la corriente de 50 a 100 μm , orden de magnitud del tamaño de las partículas para ser analizadas. Al pasar una célula por el punto focal del haz, se producen los fenómenos de dispersión frontal y ortogonal de la luz, así como la excitación y emisión de fluorescencia correspondiente a los fluorocromos que lleva dicha célula.

El bloque óptico: cada uno de los tipos de emisión es recogido por un emisor de luz; uno colocado frontalmente que mide la dispersión frontal y otros tres situados ortogonalmente respecto al flujo de células y a la dirección de iluminación del haz que miden la dispersión ortogonal y dos tipos de fluorescencia. La capacidad de medir simultáneamente dos fluorescencias en cada célula individualmente, pone de manifiesto las importantes características de la citometría de flujo: el análisis multiparamétrico.

3. Un módulo de amplificación electrónica y digitalización de la señal obtenida en los detectores. Esto conduce a la obtención de los histogramas y a su representación gráfica en un terminal de ordenador (Esquema 4).



Estructura del citometro de flujo

Esquema 4

1.11.2.- Aplicaciones de la citometría de flujo

El tipo de parámetros a medir y la capacidad de análisis multi-paramétrico proporcionan un amplio abanico de aplicaciones de la citometría de flujo a diversos campos, tanto clínicos como de investigación básica. Podemos clasificar los parámetros a medir en dos grandes grupos:

- parámetros intrínsecos: aquellos que no requieren marcar fluorescentemente a las células, y
- parámetros extrínsecos: aquellos que si necesitan hacerlo.

Como ejemplo de parámetros intrínsecos podemos citar el tamaño celular, la estructura externa, la granularidad o el contenido en pigmentos, mientras que, el contenido en DNA, la relación de bases y la estructura de la cromatina son algunos ejemplos de parámetros extrínsecos.

Dada la gran variedad de fluorocromos existentes y las posibilidades de combinación que ofrecen, se puede obtener una amplia información tanto estructural como funcional de las poblaciones celulares.

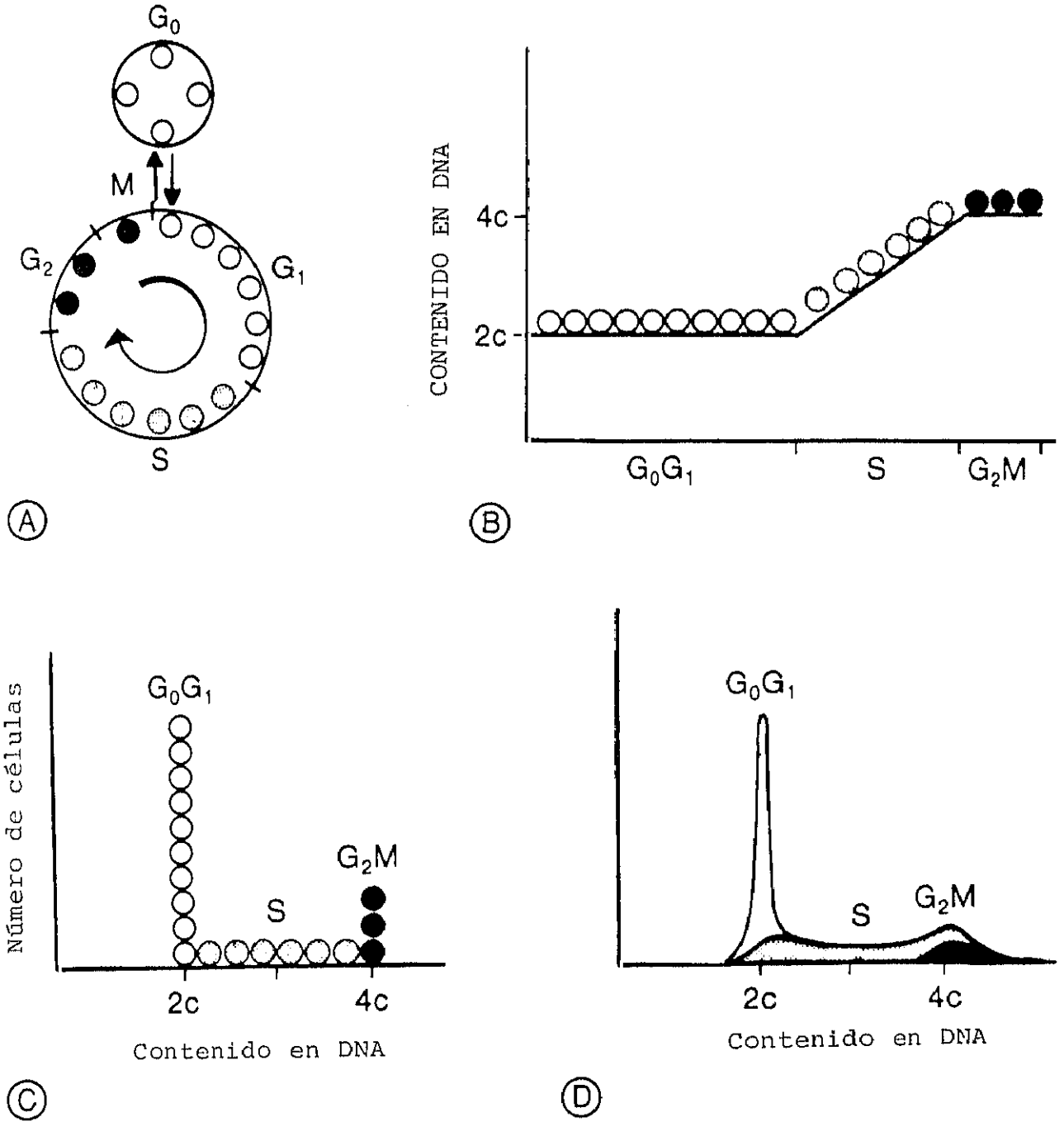
1.12.- Ciclo de división celular

Para conseguir la multiplicación por división, las células de cualquier tejido abandonan el estado quiescente (G0) para entrar y proceder a través del *ciclo celular*. Esto supone una serie de pasos consecutivos que culminan en la división mitótica. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M.

G1 es una fase de latencia que precede a la replicación del DNA, y las células en G1 tienen el mismo contenido en DNA que las G0. Durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, se verifica la

duplicación del DNA. En un momento dado de muestreo de una población tumoral celular, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2c de la fase G₀/G₁ hasta dos veces este contenido (4c) de la fase G₂M. La fase G₂ con dos veces el contenido G₀/G₁ de DNA es de nuevo una fase de latencia que precede a la mitosis sin cambios en el contenido de DNA. Esta preparación para la división incluye la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en división en la fase mitótica (M) y las células hijas vuelven a la fase G₀ (fase quiescente) o a la fase G₁ (Vielh y col, 1991).

Desde el punto de vista clínico o toxicológico, el ciclo celular puede ser analizado bajo tres aspectos: por medida estadística de la proporción de células en fase S (contenido en DNA); por medida funcional de la fracción de células que puede incorporar precursores del DNA (síntesis del DNA); y por medida cinética de la duración del ciclo celular completo o de sus diferentes fases.



Esquema 5.- (A) Fases del ciclo celular. (B) Relación entre el contenido de DNA y la progresión de las fases del ciclo celular. (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de la población ilustrada en B. (D) Distribución analítica del DNA en una población de células.

1.12.1.- Análisis del DNA por citometría de flujo

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 (Crissman y col, 1979), en el presente trabajo se ha utilizado la técnica de Vindelov y col (1983), que utiliza el yoduro de propidio. Este fluorocromo presenta, sobre otros, las propiedades siguientes:

- 1.- Es muy estable y puede ser excitado por un laser de argón standard.
- 2.- Produce histogramas con un coeficiente de variación bajo y permite el cálculo de la actividad proliferativa.
- 3.- Emite en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultaneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína.

1.13.- Objetivos del trabajo

En hepatocitos aislados de rata después de la administración de una dosis de 6,6 mmoles/Kg de tioacetamida se ha estudiado el proceso de regeneración hepática inducida por xenobióticos. La proliferación de los hepatocitos surge inmediatamente después de la iniciación de la necrosis y alcanza su máximo a las 48 horas de la administración del hepatotóxico (Cascales y col, 1992a). Como se han descrito recientemente cambios en la expresión de algunas enzimas glucolíticas en hepatomas (Loiseau y col, 1988) y durante la regeneración post hepatectomía (Rosa y col, 1990), uno de los objetivos de esta Memoria Doctoral ha sido determinar el comportamiento de los hepatocitos post necróticos aislados de ratas a las 48 horas de la administración del hepatotóxico tioacetamida, frente a sustancias hormonales (glucagón e insulina) y agentes mitogénicos (PMA y bombesina).

Trabajos recientes (Martín-Sanz y col, 1987a y 1989a) han demostrado que los hepatocitos fetales contienen una forma de PFK-2 que no responde a la inactivación dependiente del glucagón, típica de los hepatocitos adultos (Hue y Rider, 1987). Los hepatocitos fetales necesitaron al menos 45 minutos para que el efecto inhibitor del glucagón sobre la PFK-2 alcanzara la mitad de su efecto máximo, lo que indica que la forma adulta de esta enzima se induce rápidamente después del nacimiento. Petersen y col (1987), han sugerido que uno de los estímulos de la regeneración hepática son los elevados niveles de glucagón similares a los encontrados en hígado fetal.

La unión del glucagón a su receptor estimula la actividad de la adenilato ciclasa, enzima ligado a la membrana, que forma AMP cíclico (cAMP), metabolito que activa la proteína quinasa dependiente del cAMP. Esta proteína quinasa es el enzima que

fosforila el sistema de la fosfofructoquinasa 2 (PFK-2) desactivándolo en el sentido de formación de fructosa 2,6-bisfosfato (Fru(2,6)P₂). La Fru(2,6)P₂, el regulador más importante de la glucólisis y la gluconeogénesis hasta ahora conocido (Hue y col, 1987), es un activador alostérico de la fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) y cualquier elevación en la concentración intracelular de este metabolito tiene la propiedad de activar la glucólisis e inhibir la gluconeogénesis. Por otra parte, los hepatocitos fetales contienen una forma de PFK-2 incapaz de mostrar respuesta alguna frente a la inactivación, dependiente del glucagón, que exhiben los hepatocitos adultos (Martín-Sanz y col, 1987). También se ha descrito que la PFK-2 de hígado en regeneración exhibe un comportamiento cinético similar al encontrado en el enzima fetal (Rosa y col, 1990).

Para diagnosticar el modelo experimental de necrosis y regeneración hepática inducidas por tioacetamida, se han realizado las pruebas siguientes:

- morfología de cortes de hígado.
- enzimas en suero marcadores de necrosis (GOT, GPT e ICDH).
- enzimas en suero (GGT) y en hígado (GST) marcadores de lesión hepática.
- concentraciones intracelulares de glutation, malondialdehído y calcio, como marcadores de peroxidación lipídica y alteración de las membranas.
- determinación de propiedades físicas de las diferentes poblaciones de hepatocitos.
- cuantificación del DNA genómico en poblaciones de hepatocitos y su distribución entre las fases del ciclo de división celular.
- efecto mitogénico del suero de ratas tratadas con tioacetamida sobre cultivos secundarios de fibroblastos, por incorporación de timidina tritiada.

- modulación de la actividad (hormonas y mitógenos) de la PFK-2 en cultivos primarios de hepatocitos de rata obtenidos a las 48 horas de la administración del hepatotóxico.
- efecto *in vivo* del glucagón sobre actividades de enzimas glucolíticas clave como las hexoquinasas, la PFK-1 y la piruvato quinasa.

Al abordar este trabajo, además de diagnosticar el modelo experimental de necrosis y regeneración inducidas por el hepatotóxico, nos propusimos demostrar la similitud en el comportamiento tanto a nivel enzimático como citométrico, entre los hepatocitos fetales y los hepatocitos en regeneración post necrótica y establecer con ello un modelo donde evaluar la acción tóxica de sustancias de interés farmacológico.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- Aparatos

- Autoclave Autester-G.
- Balanza de precisión y granatario Sartorius, modelos 1203 MP y 1207 MP-2, respectivamente.
- Baño termostaticado Heto-Denmark.
- Baño termostaticado con agitación Unitronic 320 OR.
- Baño termostaticado hasta 100 °C Precistern S-140.
- Bomba de perfusión Miniplus-2 de Gilson.
- Bomba de filtración en vacío Milipore.
- Cámara de conteo de células Neubauer.
- Campanas de flujo laminar Telstar S.A.
- Centrífuga Heraeus Eppendorf Biofuge 13.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Minifuge T.
- Centrífuga refrigerada Kontron, modelo Centrikon H-401.
- Citómetro de flujo FACStar plus (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un láser de argón de 3 W (Coherent, Palo Alto Ca) y un ordenador Hewlet Packard C-30 (Sunnyvale, Ca).
- Contador de centelleo LKB Wallac. 1209 Rackbeta.
- Cronómetros Smiths.
- Espectrofotómetro UV-V Kontron, modelo Uvikon 810.
- Fluorímetro Perkin Elmer, modelo LS-50.
- Homogeneizador Ultraturrax Typ 18-10.
- Homogeneizador Tri-R Instruments con motor Braun-Melsungen, provisto de pistilo de teflón.
- Incubador de células Heraeus.
- Jaulas de plástico de la casa comercial Panlab.
- Lector de placas SLT Labinstruments 340 ATC. Austria, con impresora Citizem 120D.
- Material quirúrgico: jeringas, pinzas rectas y curvas, tijeras de diversos tamaños, cánula de plástico (Braunula 1-G16, Braun Melsungen AG, RFA), hilo de sutura.

- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5414.
- Microscopio óptico Wild-Herbrugg.
- Microscopio de platina invertida Nikon/TMS.
- Microtomo de deslizamiento de la casa comercial Reichert.
- pHmetro Radiometer Copenhagen, modelo 52.
- Pulmón oxigenador de vidrio Afora, modelo U-80622.
- Tubos y placas de incubación estériles de Costar.
- Ultracentrífuga Kontron, modelo Centrícon T 2080.

2.2.- Productos

- El pienso comercial fue suministrado por Sander, S.A.
- Los ácidos y las sales minerales utilizados fueron de las casas comerciales Merck, Panreac y BDH.
- Los sustratos, coenzimas y enzimas fueron suministrados por las casas comerciales Sigma y Boehringer.
- Heparina sódica de la casa Leo.
- Solución fisiológica de Ibys.
- Colagenasa de Boehringer.
- Medio MEM de Gibco.
- Suero fetal de ternero, Seromed, Biochrom KG.
- Insulina y glucagón de la casa Novo.
- Bombesina de Sigma Chem Co.
- PMA de Sigma Chem Co.
- Cyclotest Becton Dickinson.
- Timidina tritiada de Amersham.

2.3.- Animales

Se utilizaron ratas macho de tres meses de edad (180 - 220 g) de la raza Wistar con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua, que se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura.

La gestación en ratas hembra de tres meses de la raza Wistar (180-200 g), para la obtención de hígados fetales, se controló después del apareamiento por los procedimientos convencionales. A los 22 días de gestación se sacrificaron las ratas por dislocación cervical y se obtuvo el hígado de los fetos a término.

Para la obtención de los fibroblastos, se partió de huevos embrionados de pollo incubados durante 10 días, suministrados por la Granja Avícola Grau.

2.4. Tratamiento con tioacetamida

Grupos de ratas se inyectaron por vía intraperitoneal con una dosis subletal de tioacetamida (6,6 mmoles/kilo), preparada extemporaneamente disuelta en ClNa 0,9 %. Otro grupo, utilizado como control, recibió por vía intraperitoneal, dosis de 0,5 ml de ClNa 0,9 %. Los tratamientos se realizaron a primera hora de la mañana y cada experimento se repitió cuatro veces.

A determinados tiempos después de la administración del hepatotóxico, las ratas se sacrificaron por distintos procedimientos según el parametro a evaluar. En unos casos se obtuvo la sangre y posteriormente el hígado, y en otros, las ratas se utilizaron para la obtención de hepatocitos por perfusión con colagenasa.

2.5.- Obtención de suero y plasma sanguíneo

Las ratas se anestesiaron con nembutal (pentobarbital sódico) a concentraciones de 50 mg/ml (0.5 ml de esta solución por rata) y se heparinizaron por vía femoral (25 mg/rata). Pasados unos minutos se abrió el abdomen del animal y se obtuvo la sangre por punción en el corazón, unos 5 ml por rata. La sangre se centrifugó a 3000 x g y se separó el plasma para la determinación de actividades enzimáticas marcadoras de necrosis, y para la valora-

ción de la glucosa plasmática.

Los sueros fueron obtenidos tanto de ratas control como de ratas inyectadas con una dosis subletal de tioacetamida. A diferentes horas de la administración del tóxico, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo la sangre que se mantuvo a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó en Eppendorf a 4 °C durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró con el fin de obtener los sueros estériles.

2.6.- Obtención y fijación de muestras para la preparación de cortes de tejido

Posterior a la extracción de sangre se obtuvieron muestras de hígado que se utilizaron para su observación morfológica. Las ratas se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmol/Kg de peso). Las muestras de hígado se fijaron en formol al 10 %, posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y xilol y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 7 micras que fueron teñidos con una mezcla de hematoxilina-eosina según el siguiente método:

- Desparafinación e hidratación.
- Tinción con hematoxilina al 10% durante 7 minutos.
- Lavado dos veces en H₂O destilada.
- Tinción con eosina al 4 % durante 45 segundos.
- Lavado dos veces en H₂O destilada.
- Deshidratación y montaje.

Reactivos:

Hematoxilina de Carazzi (H₂O destilada 800 ml; glicerina 200 ml; sulfato alumínico potásico 50 gramos; yodato potásico 0,20 gramos)

y hematoxilina 1 gramo).

Eosina pura (eosina 1 gramo y H₂O destilada 100 ml).

Eosina 4 % (eosina pura 40 ml y H₂O destilada 960 ml).

2.7.- Aislamiento de hepatocitos

A distintos tiempos después de la inyección intraperitoneal se aislaron los hepatocitos adultos, tanto de las ratas tratadas con tioacetamida como de las ratas control. El aislamiento se llevó a cabo por el método clásico de perfusión hepática con colagenasa (Hue y col, 1978). Los hepatocitos fetales se obtuvieron mediante una técnica de disgregación hepática en medio con colagenasa (Martín-Sanz y col, 1987a).

2.7.1.- Obtención de hepatocitos adultos

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión *in situ* del hígado de rata adulta con medio Hepes con colagenasa, de acuerdo con el método de Krebs y col (1974) modificado por Hue y col (1975 y 1978). Este método permite obtener hepatocitos con un elevado grado de viabilidad.

Las ratas se anestesiaron con Nembutal (pentobarbital sódico) disuelto en solución salina (ClNa al 0,9 %), por vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/Kg. La heparinización se realizó por vía femoral (0,5 ml de heparina Leo al 1 %). Posteriormente se procedió a la apertura de la región abdominal y se introdujo en la vena porta una cánula de plástico (Braunula 1-G 16, Braun Melsungen AG, RFA), que se fijó por medio de dos ligaduras con hilo de sutura. La cánula se conectó al catéter que hizo fluir el medio a través del hígado. Para facilitar el drenaje se produjo una abertura en la vena cava inferior e inmediatamente se abrió la cavidad torácica y se realizó un orificio en el atrio derecho del

corazón por el cual se introdujo otro catéter de plástico y se cerró la abertura de la vena cava inferior. Se desecharon los primeros 200 ml del medio de perfusión con el objeto de eliminar la sangre y lavar el hígado, y a los 100 ml restantes, se le adicionaron 65 mg de colagenasa (0,15 U/mg Boehringer) y Cl_2Ca 5 mM, cerrándose en este momento el circuito para iniciar la recirculación. Tras 15 minutos de perfusión con el medio con colagenasa, se procedió a la disección y disgregación del hígado. La suspensión así obtenida se filtró a través de gasa para eliminar los trozos no digeridos, y se centrifugó a baja velocidad (a 50 x g, 2 minutos). El sedimento de células se resuspendió y centrifugó para eliminar los restos de membranas. Esta última operación se realizó dos veces. La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (0,2 % en suero salino). El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90 %.

2.7.2.- Obtención de hepatocitos fetales

Porciones de 3 g de hígados de fetos a término (22 días de gestación) se trocearon hasta conseguir una papilla homogénea que se dispuso en un matraz erlenmeyer, previamente lavado con BSA al 1 %, con 15 ml de medio Krebs-Henseleit y 75 μl de EGTA 100 mM y se incubó durante 30 minutos en baño a 37 °C con agitación y gaseo con O_2/CO_2 (95 %/5 %). Posteriormente se centrifugó la mezcla (2 minutos a 50 x g) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Al sedimento así obtenido se le añadieron 15 ml de medio Krebs-Henseleit con 0,5 mg/ml de colagenasa y Cl_2Ca 2,55 mM y la mezcla se mantuvo en incubación durante una hora en baño a 37 °C con agitación y gaseo. A continuación la mezcla se filtró y se centrifugó (a 35 x g, 4 minutos) y una vez eliminado el sobrenadante por aspiración, se resuspendió el sedimento en 10 ml

de medio Krebs-Henseilet. La suspensión se filtró sucesivamente por mallas de nylon de diferente poro (200, 100 y 60 μm) centrifugando cada vez, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento con 10 ml del mismo medio.

2.7.3.- Condiciones de cultivo de hepatocitos

Los hepatocitos aislados de ratas tratadas con tioacetamida y ratas controles se dispusieron en cantidades de 1×10^6 en placas de cultivo de 1,5 cm de diámetro previamente recubiertas de colágeno (Martín-Sanz y col, 1989a), las cuales contenían 1 ml de Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) con 2 % (p/v) de suero fetal de ternero (FCS). Las placas se incubaron a 37 °C durante dos horas en aire con CO₂ al 5 % para facilitar la inserción de las células. Inmediatamente después, el medio junto con las células no insertas, se eliminó por aspiración, se lavaron las placas con 1 ml de medio DMEM y se añadió finalmente 1 ml del mismo medio adicionado de albúmina de suero bovino, exenta de ácidos grasos, al 2 % (p/v), y los hepatocitos en cultivo se mantuvieron en incubación durante 2 y 4 horas. La adición de hormonas y mitógenos se realizó de tal manera que el volumen total del medio no se viera afectado en más de un 2 %. El éster de forbol (PMA = forbol 12-miristato 13-acetato) se preparó en dimetil sulfóxido (DMSO) (1 mg/ml). Las hormonas y mitógenos (insulina, glucagón y bombesina) se disolvieron en agua destilada en las concentraciones apropiadas y se filtraron en condiciones estériles (tamaño del poro 0,22 μm). A los tiempos indicados, se eliminó el medio mediante aspiración y la capa celular se utilizó para la determinación de actividades enzimáticas y metabolitos. Para determinar la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, las células se extrajeron con 0,4 ml de NaOH 50 mM y la suspensión resultante se mantuvo durante 10 minutos en un baño a 80 °C. Para la evaluación de las actividades enzimáticas, las células se lavaron con el medio original (sin suero ni albúmina) y mediante

raspado con una espátula, se extrajeron en 1 ml de la mezcla de FNa 100 mM, EDTA 1mM, ditioneitol 1 mM y fosfato potásico 20 mM a pH 7,4.

2.7.4.- Preparación de suspensiones de hepatocitos para estudios citométricos

Los hepatocitos se aislaron de ratas adultas tratadas con tioacetamida y controles por el método de perfusión hepática con colagenasa, según se explicó en el apartado 2.7.1. de Métodos. Los hepatocitos fetales se aislaron de fetos a término por el método de Martín-Sanz y col (1989a), que se explicó en el apartado 2.7.2 de Métodos. Las diferentes muestras control, tioacetamida 24, 48 y 72 horas y fetales se suspendieron en paraformaldehído al 0,3 %.

2.8.- Obtención de fibroblastos de embrión de pollo

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de huevos embrionados de pollo siguiendo el método de Hunter (1979). Una vez incubados los huevos durante dos semanas se dispusieron en una campana de flujo laminar, previa esterilización de la cáscara con alcohol al 70%, para evitar posibles contaminaciones. Con unas pinzas estériles se golpeó la cáscara de la parte superior hasta romperla y abrir un hueco. Con otras pinzas se separó la membrana embrionaria y se extrajo el embrión depositándolo en una placa estéril. Una vez eliminada la cabeza, el resto del embrión se transfirió a un tubo estéril donde se homogenizó manualmente con una espátula hasta la obtención de una papilla homogénea. Llegado a este punto, se adicionó tripsina (0,05 %) y PBS previamente calentados a 37 °C y la suspensión así obtenida se agitó con una pipeta con el fin de separar las células de la matriz celular. Cuando la mezcla estuvo homogénea, se transfirió el sobrenadante a un tubo en hielo conteniendo suero fetal de ternero (FCS), evitando así la

posterior digestión de las células en suspensión. Al tejido restante se volvió a añadir PBS y se repitió el procedimiento 3 ó 4 veces más. La suspensión celular así obtenida se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en medio Dulbecco's modificado (DMM) con 10 % de FCS.

2.8.1.- Condiciones de cultivo de fibroblastos

Para favorecer la inserción de las células, los fibroblastos obtenidos se dispusieron en placas de cultivo de 1,5 cm de diámetro y se mantuvieron a 37 °C en un incubador en atmósfera de aire con CO₂ al 5 %. Después de varios días, se aspiró el medio y se adicionó PBS procediéndose al lavado de las placas. Posteriormente, se adicionó tripsina y se dejó actuar durante 3 ó 4 minutos. Al cabo de este tiempo, se adicionó de nuevo PBS. Cuando la monocapa presentó un aspecto granular, señal de que las células se han despegado, se recogió el medio en un tubo estéril que se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en DMM con 10 % de FCS y se sembró en placas de 96 pocillos a razón de 50.000 células por pocillo.

2.9.- Adición de suero de rata y determinación de la incorporación de timidina tritiada en cultivos de fibroblastos

Después de 2 ó 3 días, en los cultivos secundarios se aspiró el medio y se añadió medio fresco adicionado de FCS al 0,2 % (foetal calf serum) . Después de 2 horas de incubación se añadieron los sueros estériles procedentes de ratas tratadas con tioacetamida al 0, 2, 5 y 10 % y se incubaron durante 24 horas. Pasado este tiempo, se eliminó el medio por aspiración añadiendo medio fresco adicionado de FCS al 0,2 % y 0,1 µCi de ³H Timidina por pocillo. Al cabo de 24 horas se aspiró el medio y se lavaron todas las placas con PBS y se procedió a la adición de los reactivos necesarios para recoger las células; para ello se añadió NaOH

10 mM y SDS 0,1 %, lavándose la capa celular dos veces con agua. Todo ello se transfirió a tubos donde se añadió 1-2 ml de ácido tricloroacético al 10 %. Después de 15 minutos a 4 °C, se filtraron. Se secaron los filtros y se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas para evitar fenómenos de quimioluminiscencia. Pasado este tiempo se midió la radiactividad en un contador de centelleo.

2.10.- Preparación de extractos hepáticos y fracciones subcelulares

Muestras de 200 mg de hígado control y tratado con tioacetamida, se homogenizaron en ultraturrax con 9 volúmenes de NaOH 50 mM y el homogenado se calentó en baño a 80 °C durante 10 minutos. El extracto obtenido después de centrifugar en Eppendorf se utilizó para la determinación de las concentraciones de fructosa 2,6-bis fosfato y de lactato.

Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron en ultraturrax durante 3 minutos con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Una vez decantado el sobrenadante se volvió a extraer el sedimento con otros 5 ml de TCA al 5 % y ultraturrax durante otros 3 minutos.

Después de centrifugar (15 minutos a 3000 x g) se reunieron los sobrenadantes y en ellos se determinaron las concentraciones de glucógeno y glucosa.

Muestras de 2 g de hígado se homogenizaron en frío, en vaso con pistilo de teflón, con 8 ml de EDTA 0,5 mM, FNa 50 mM, DTT 1 mM y Tris 20 mM pH 7,6 y posteriormente el homogenado se centrifugó a 105.000 x g durante 45 minutos. En el sobrenadante obtenido (fracción soluble) se evaluaron las actividades de la piruvato quinasa (PK), fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) y glucógeno fosforilasa a (GPa).

Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron en frío, en vaso de pistilo de teflón con 4 ml de PO_4KH_2 1 M de pH 6,5. Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos, en el sobrenadante obtenido se evaluó la actividad de la glutation S-transferasa.

Muestras de 1 g de hígado se homogeneizaron con 8 ml de sulfosalicílico al 5 %. Después de centrifugar a 10000 x g durante 20 minutos, se utilizaron los sobrenadantes para la medida espectrofotométrica a 412 nm del glutation total.

2.11.- Determinación de actividades enzimáticas

Las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en las fracciones soluble del extracto hepático, en condiciones óptimas de pH y temperatura, a saturación de sustrato y cofactores. La reacción fue previamente termostatzada a 25 °C, y en todos los casos se siguió una cinética de orden 0, al menos durante 2 min.

Las actividades enzimáticas se determinaron directamente por reacciones acopladas a la oxidación-reducción del par NAD^+/NADH , siguiendo el cambio de densidad óptica a 340 nm, y empleando en los cálculos un coeficiente de extinción para el $\text{NADH} = 4,6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (extinción de 1 μmol de NADH en 1,35 ml de solución).

2.11.1.- 6-fosfofructo 2-quinasa (PFK-2)

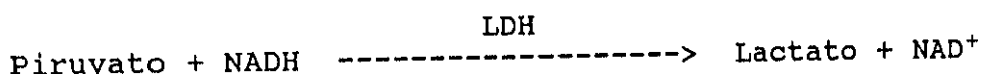
La actividad de la PFK-2 se determinó de acuerdo con el siguiente protocolo : los extractos celulares se fraccionaron después de precipitar con polietilen glicol al 15 % (Martín-Sanz y col, 1989a). Los precipitados se resuspendieron en el medio de extracción ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 20 mM, EDTA 1 mM, ClK 100 mM, DTT 1 mM y FNa 50 mM) y la actividad de la PFK-2 se evaluó a pH 6,6, en presencia de ATP-Mg 5 mM y fructosa 6-fosfato 1 mM, y a pH 8,5 en presencia de ATP-Mg 5 mM y fructosa 6-fosfato 5 mM. La fructosa 6-fosfato

estuvo en proporción 1:3 con la glucosa 6-fosfato para prevenir cambios en su concentración. Después de añadir NaOH 50 mM y de calentar 15 minutos a 80 °C, se midió la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato por el método de Van Schaftingen (1984).

Las medidas a los dos pH se realizaron para determinar la actividad PFK-2 total y la actividad PFK-2 activa, correspondiente a la forma no fosforilada. Basándose en las características cinéticas del enzima, a pH 8,5 las dos formas tienen la misma actividad, mientras que, a pH 6,6 la forma fosforilada es prácticamente inactiva en las condiciones del ensayo.

2.11.2.- Lactato deshidrogenasa (LDH)

La medida de la actividad LDH se llevó a cabo en fracción soluble de hígado de rata, siguiendo el método descrito por Vasault (1987), determinando espectrofotométricamente la disminución de absorbancia a 340 nm por desaparición de NADH según la reacción:



La concentración de los reactivos en la cubeta fué la siguiente: Tris-ClH pH 7,6 50 mM, piruvato 4 mM y NADH 0,2 mM.

2.11.3.- Glucógeno fosforilasa a (GPa)

La actividad de la glucógeno fosforilasa a se determinó por el método de Stalmans y Hers (1975) de acuerdo con el siguiente protocolo: a 100 µl de la fracción soluble hepática se le añadieron 100 µl de la mezcla formada por: glucosa 1-fosfato 50 mM, FNa 100 mM, glucógeno 1 %, cafeína 0,5 mM y Pipes 10 mM pH 6,1. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadieron 0,5 ml de ácido tricloracético al 10 % para detener la reacción. La mezcla se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos

y en el sobrenadante obtenido se determinó colorimetricamente la cantidad de fosfato formado según el método descrito por Fiske y Subbarow (1929), con molibdato amónico al 2,5 % en H_2SO_4 (cromógeno oxidado) y ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (agente reductor) realizando la lectura de absorbancia a 660 nm.

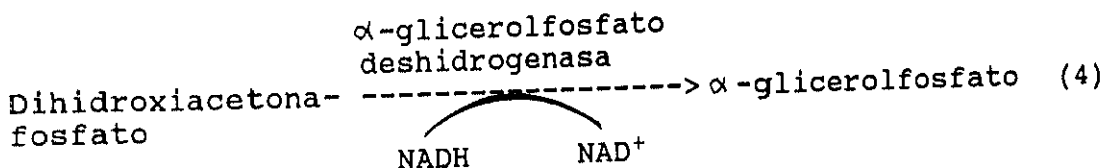
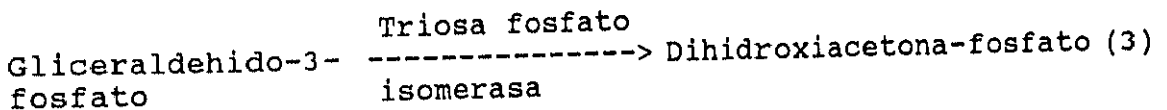
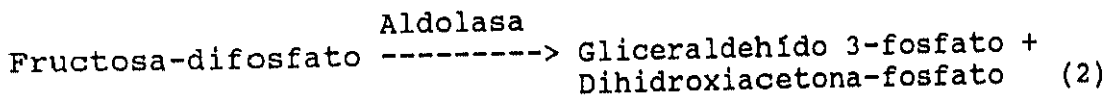
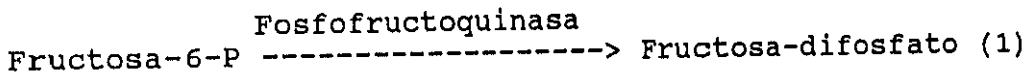
2.11.4.- 6-fosfofructo 1-quinasa (PFK-1)

La actividad de la PFK-1 se determinó en fracción soluble hepática de acuerdo con el método de Bergmeyer (1984), determinando la disminución de absorbancia a 340 nm por desaparición del NADH, en presencia de fructosa 6-fosfato.

La reacción catalizada es:



Fundamento:



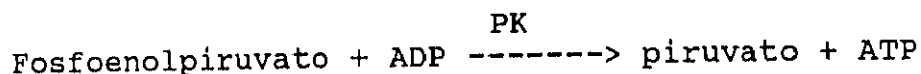
La reacción problema (1), se acopla sucesivamente con la (2) y la (3), cuya misión es proporcionar el sustrato para la reacción indicadora (4). La oxidación de NADH en la reacción (4) se puede medir espectrofotométricamente por la disminución de densidad óptica a 340 nm. La reacción (1) es prácticamente irreversible, por lo que la reacción total está ampliamente desplazada hacia la derecha, de manera que la oxidación de NADH es reflejo cuantitativo de la actividad fosfofructoquinasa. Como por cada mol de fructosa-6-fosfato transformada se originan dos equivalentes de NAD hay que dividir por dos la diferencia en la densidad óptica obtenida.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tampón Tris-ClH pH 7,6 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP/MgCl₂ 0,29 mM, NADH 0,21 mM, FGP 1,85 mM, aldolasa 7,4 µg, TIM/GDH 7,4 µg.

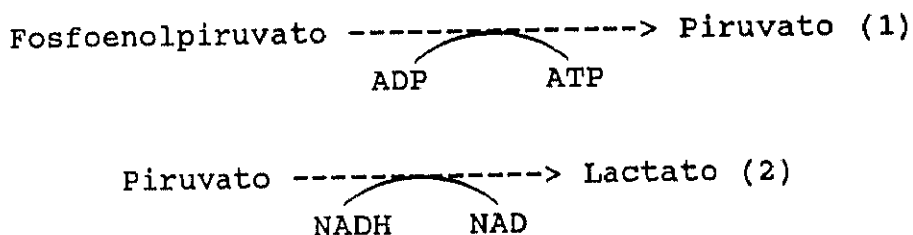
2.11.5.- Piruvato quinasa (PK)

La actividad de la PK fue evaluada en la fracción soluble hepática siguiendo el método de Fujii y Miwa (1987) determinando la disminución de absorbancia a 340 nm por desaparición del NADH.

La reacción que cataliza es:



Fundamento:



Consiste en acoplar la reacción problema (1) con una reacción indicadora (2). La reacción (1) es irreversible, mientras que en la (2), aunque reversible, su equilibrio está fuertemente desplazado hacia la formación de lactato. Por tanto, la velocidad de oxidación de NADH es prácticamente igual a la de reacción (1). La reacción se sigue espectrofotométricamente por evaluación de la disminución en la densidad óptica a 340 nm.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tampón Tris ClH pH 7,4 50 mM; MgCl₂ 54 mM pH 7,4; NADH 0,21 mM; ADP 0,9 mM pH 7; PEP 1,25 mM pH 7; KCl 70 mM, LDH 7,4 µg.

2.11.6.- Hexoquinasas (HK)

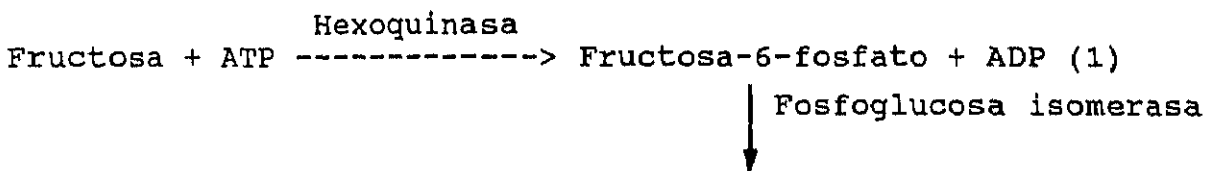
El perfil de las hexoquinasas fue determinado en fracción soluble de acuerdo con el método de Bergmeyer (1984), en el que la formación de hexosa-fosfato se acopla a la reacción catalizadora por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NADP.

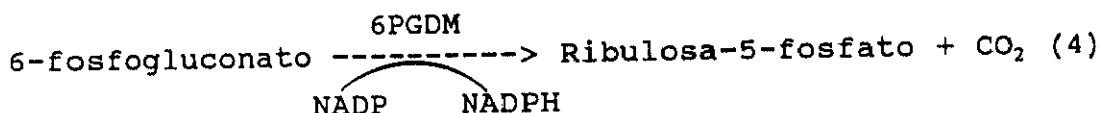
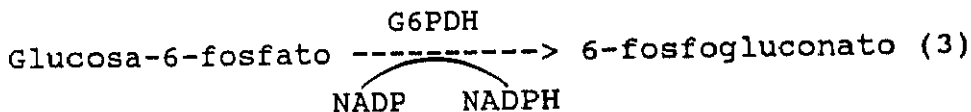
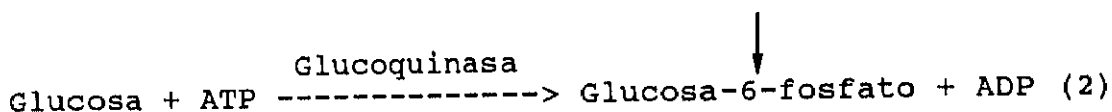
La reacción catalizada es:



Fundamento:

Consiste en acoplar la fosforilación de la hexosa (fructosa o glucosa) (1 y 2) con dos deshidrogenasas dependientes del NADP⁺, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (3) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (4).





La formación de NADPH se evalúa espectrofotométricamente por el incremento de la absorción a 340 nm. Cada molécula de hexosa-fosfato se corresponde con dos equivalentes de NADPH, por lo cual las variaciones en densidad óptica obtenidas han de dividirse por dos a la hora de realizar los cálculos.

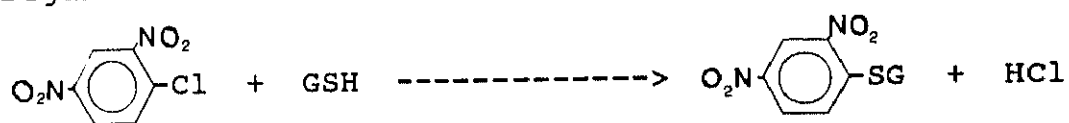
La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta resultó ser: Tris-ClH pH 7,6 40 mM, Cl₂Mg 7,4 mM, ATP/Mg 7,4 mM, NADP 0,33 mM, G6PDH 7,4 µg y 6PGDH 7,4 µg. A concentraciones de glucosa 100 mM se determinó la actividad de la glucoquinasa. Las otras hexoquinazas se determinaron con fructosa 33 mM y glucosa 0,5 mM.

Cuando la actividad hexoquinasa se determinó con fructosa 33 mM como sustrato, la fructosa 6-fosfato que se forma en la reacción (1) se convierte rápidamente en glucosa 6-fosfato por efecto de la actividad fosfogluconosa isomerasa presente en grandes concentraciones en homogenados hepáticos.

2.11.7.- Glutation S-transferasa (GST)

La actividad de las GST se determinó según el método de Habig y col (1974), midiendo la variación de absorbancia a 340 nm con

glutation reducido 0,1 mM y 1-cloro 2,4-dinitrobenceno 0,1 mM, según la reacción:

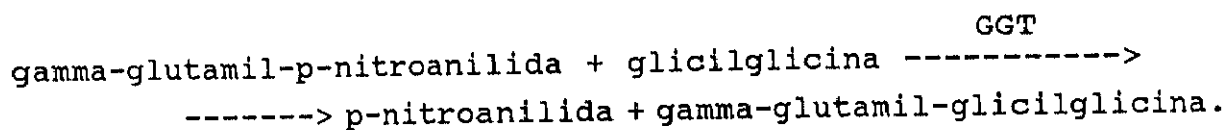


La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: 1-Cloro 2,4-dinitrobenceno 0,5 mM; Glutation 0,5 mM; fosfato potásico pH 6,5 0,5 M.

2.11.8.- Actividad gamma-glutamil transferasa (GGT)

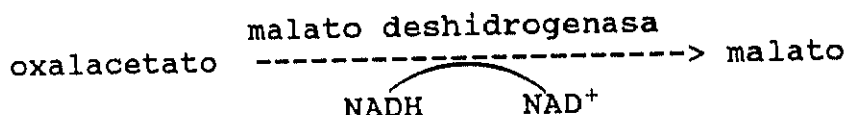
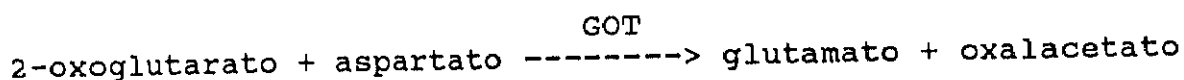
En sueros de ratas control y ratas tratadas con tioacetamida se midió la variación de absorbancia a 405 nm utilizando Tris 125mM pH 8,5, glicilglicina 75 mM y gamma-glutamil-p-nitroanilida 5 mM, según el método de Wahlefeld y Bergmeyer (1987).

La gamma-glutamil transferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamilo de la gamma-glutamil-p-nitroanilida a un dipéptido aceptor, la glicilglicina. La velocidad de formación de p-nitroanilida determinada a 405 nm, es proporcional a la concentración catalítica de gamma-glutamil transferasa en la muestra ensayada.



2.11.9.- Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT)

La actividad de este enzima se determinó espectrofotométricamente en suero midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en la reacción acoplada de reducción del oxalacetato a malato, catalizada por la malato deshidrogenasa (Rej y Horder, 1984), según el siguiente proceso:

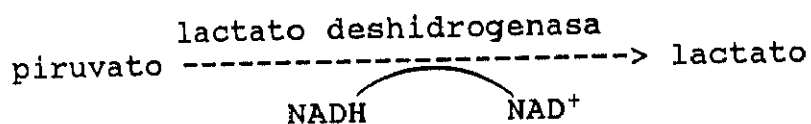
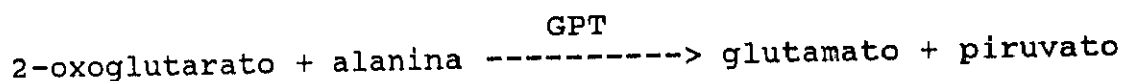


La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente:

Tampón fosfato pH 7,6 0,8 mM; NADH 0,2 mM; 2-oxoglutarato pH 7 15mM; aspartato 0,8 mM y malato deshidrogenasa 20µg.

2.11.10.- Glutamato piruvato transaminasa. (GPT)

La actividad de la GPT se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en la reacción acoplada de reducción de piruvato a lactato catalizada por la lactato deshidrogenasa (Horder y Rej, 1984) según el esquema siguiente:



La concentración de los diferentes reactivos en la cubeta es la siguiente: Tampón fosfato pH 7,4 80 mM, 2-oxoglutarato 15 mM, alanina 80 mM, NADH 0,2 mM y lactato deshidrogenasa 10 µg.

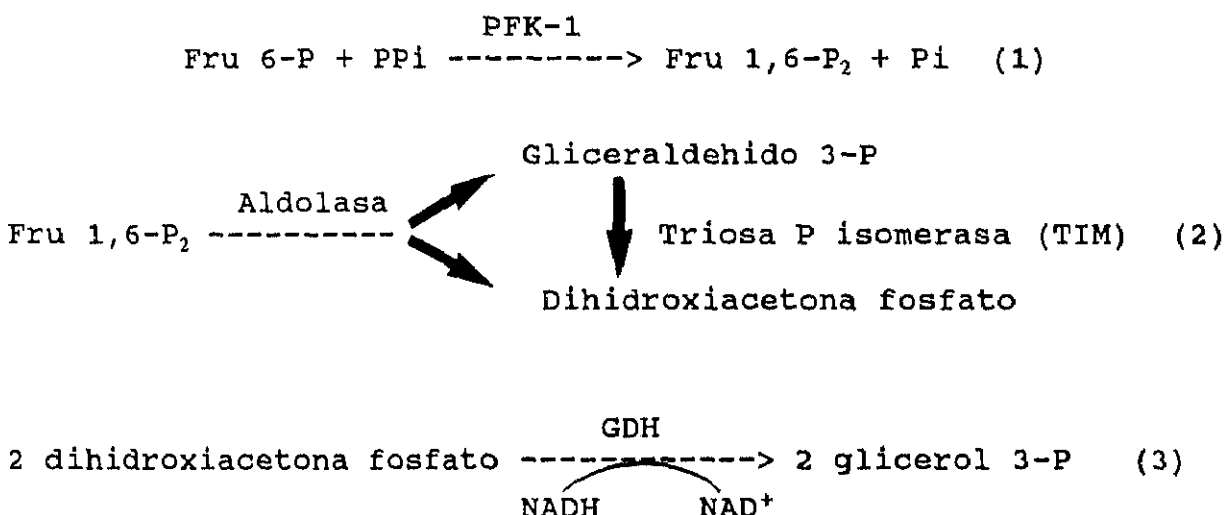
2.12.- Determinación de la concentración de metabolitos

La determinación de la concentración de metabolitos se llevó a cabo según las técnicas que a continuación se describen para cada uno de ellos.

2.12.1.- Fructosa 2,6-bisfosfato

La Fru 2,6-P₂ se determinó en hepatocitos aislados y en extractos hepáticos de ratas control y tratadas con tioacetamida por el método de Van Schaftingen (1984), mediante una determinación espectrofométrica a 340 nm basada en el poder estimulador de la fructosa 2,6-bisfosfato sobre la actividad de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) parcialmente purificada a partir de patata.

El fundamento de la reacción es el siguiente:



La purificación de la PFK-1 se llevó a cabo de la siguiente forma: 1000 g de patatas peladas se homogenizaron en turmix con 2 litros de tampón preparado con: Hepes 20 mM, acetato potásico 20 mM y ditioeritritol (DTT) 2 mM a pH 8,2, a 4 °C. La mezcla se

filtró a través de gasa y al filtrado resultante se añadió pirofosfato sódico 2 mM y Cl_2Mg 2 mM ajustando el pH a 8,2, a 4 °C. Posteriormente se calentó en baño a 70 °C y cuando la solución alcanzó los 59 °C se mantuvo a esta temperatura durante 15 minutos. Una vez enfriada la mezcla a 4 °C, se ajustó a pH 7 con ácido acético.

A continuación se añadió a la mezcla poco a poco polietilenglicol 6000 sólido al 6 % y se mantuvo en agitación durante 15 minutos.

La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos. Al sobrenadante se añadió polietilenglicol 6000 sólido para obtener una concentración final del 15 %. Se mantuvo en agitación durante 15 minutos y se dejó a temperatura ambiente 10 minutos. Se centrifugó a 4000 x g durante otros 10 minutos y se recogió el precipitado en 100 ml de Tris 20 mM, ClK 20 mM y DTT 2 mM a pH 8,2.

Para la determinación de la fructosa 2,6-bisfosfato se prepararon los reactivos siguientes:

a) Tris 200 mM, acetato magnésico 50 mM y DTT 50 mM, ajustándose el pH a 8,2 con acético.

b) La mezcla de 2 ml de aldolasa con 1 ml de TIM/GDH se centrifugó durante 5 minutos en Eppendorf, eliminándose el sobrenadante y reservándose en hielo.

c) 334 mg de fructosa 6-fosfato se disolvieron en 8 ml de agua; se añadió perclórico 6 % final y la mezcla se mantuvo 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó CO_3K_2 hasta pH 7 y los tubos se enfriaron en baño de hielo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

d) NADH 2 mg/ml.

Finalmente, se mezclaron las cuatro soluciones y se llevaron a 100 ml con H₂O destilada.

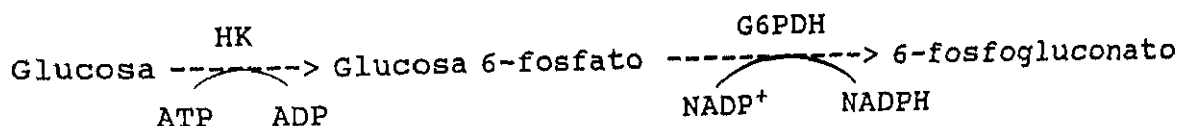
2.12.2.- Glucógeno

La concentración de glucógeno en extractos hepáticos se determinó por el método de Carrol y col (1956), de acuerdo con el siguiente protocolo:

Muestras de 1 g de hígado se homogenizan con 5 ml de ácido tricloracético al 5 %, durante 3 minutos. Se centrifugan a 4000 rpm durante 15 minutos, se extrae el sobrenadante decantando y el resto se vuelve a homogenizar con 5 ml de ácido tricloracético al 5 % durante otros 3 minutos y se vuelve a centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos extrayendo de nuevo el sobrenadante. A 1 ml de este extracto hepático se adicionaron 5 ml de etanol al 95 % y la mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas. Después de centrifugar (15 minutos a 2000 x g), de eliminar el sobrenadante y de lavar con agua el precipitado, se añadió a éste 2 ml de reactivo antrona. La muestra se calentó durante 15 minutos en baño hirviendo y se midieron las absorbancias a 620 nm frente a un patrón de glucosa.

2.12.3.- Glucosa

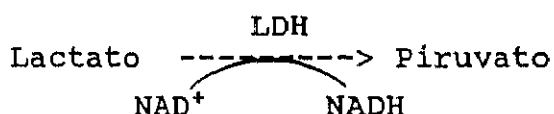
La glucosa se determinó espectrofotométricamente por el incremento de la D.O. a 340 nm mediante las reacciones acopladas de la hexoquinasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en presencia de ATP y NADP⁺ por el método de Kunst y col (1984).



La concentración final de los reactivos en la cubeta fué la siguiente: glicilglicina 62,5 mM/MgCl₂ 25 mM pH 7,6; NADP 0,2 mg; ATP/Mg²⁺ 10 mM; glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 10 µl y hexoquinasa 10 µl.

2.12.4.- Lactato

El lactato se determinó por el método de Noll (1984) en presencia de lactato deshidrogenasa y NAD⁺ a pH 9,2, midiendo el incremento en la densidad óptica a 340 nm, según la reacción:



El equilibrio de la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa está muy desplazado hacia la formación de lactato. Por tanto, la técnica utilizada tiene que desplazar el equilibrio hacia el sentido contrario empleando un medio alcalino para atrapar los protones y, un exceso de concentración de NAD⁺ e hidrazina que va retirando el piruvato en forma de hidrazona a medida que se forma. La concentración final de los reactivos fue: Tris 50 mM, pH 9,1, Hidrazina 0,2 M, SO₄Mg 20 mM, EDTA 2 mM y NAD 1,7 mM.

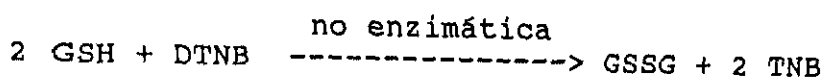
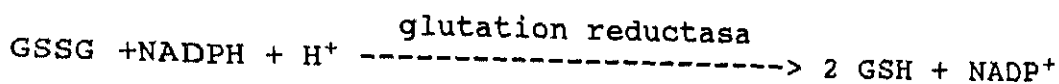
2.12.5.- Malondialdehído

El malondialdehído se determinó por el método de Niehaus y col (1969). Muestras de 1 g de hígado se homogenizaron con 3 ml de ácido tricloracético al 0,1 %. Después de centrifugar a 15.000xg durante 10 minutos, 0,5 ml del sobrenadante se incubaron con 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % en ácido tricloracético al 20 % a 90 °C en baño de agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se paró la reacción poniendo los tubos en baño de hielo. Tras centrifugar a 10.000 x g 5 minutos, se midió

en el sobrenadante la densidad óptica a 532 nm.

2.12.6.- Glutation total

El glutatión total (GSH y GSSG) se determinó siguiendo el método de Griffith y Tate (1980), según las reacciones:



La velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de glutatión. La formación de 5 tío-2-nitrobenzoato (TNB) se determina espectrofotométricamente a 412 nm.

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente:

NADPH 0,21 mM/tampón fosfato 87,5 mM/EDTA 0,45 mM, DTNB 0,6 mM y glutatión reductasa standard 5 µl. GSH 0,1 mM para realizar la curva de calibración.

2.13.- Determinación de proteínas

Las proteínas solubles se evaluaron por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como patrón y reactivo de Coomasie. Los cambios de absorción a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

2.14.- Análisis del contenido de DNA en hepatocitos por citometría de flujo

Las células se analizaron utilizando un test suministrado por

Becton Dickinson basado en el método de Vindelov y col (1983). Los hepatocitos una vez aislados se lavaron dos veces con una solución tampón (85,50 g de sacarosa y 11,76 g de citrato trisódico (40 mM) se disolvieron en 800 ml de agua destilada; se añadieron 50 ml de dimetil sulfóxido y la mezcla se llevó a un volumen de 1000 ml con agua destilada ajustando el pH a 7,6). El precipitado se resuspendió en 250 μ l de esta misma solución y las muestras se congelaron hasta el momento del análisis.

A 100 μ l de las muestras descongeladas en baño a 37 $^{\circ}$ C se les añadió 0,9 ml de una solución A: (15 mg de tripsina se disolvieron en 500 ml de una solución stock preparada de la siguiente manera: 2 g de citrato trisódico (3,4 mM), 2 ml de Nonidet P₄₀ (0,1 %, v/v), tetrahidrocloruro de espermina (1,5 mM) y 121 mg de Tris (hidroximetil)aminometano (0,5 mM), se disolvieron en 2000 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7,6). Los tubos se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 0,75 ml de una solución B: (250 mg de inhibidor de tripsina y 50 mg de Ribonucleasa A, se disolvieron en 500 ml de la solución stock A y se ajustó el pH a 7,6). Los tubos se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 0,75 ml de una solución C: (208 mg de yoduro de propidio y 580 mg de tetrahidrocloruro de espermina, se disolvieron en 500 ml de la solución stock A y se ajustó el pH a 7,6). La solución se protegió de la luz durante toda la determinación.

Los tubos protegidos de la luz con papel de aluminio se agitaron por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los tubos se mantuvieron en baño de hielo hasta el análisis por citometría de flujo.

2.15.- Determinación de calcio intracelular

Para determinar la concentración intracelular de calcio, los hepatocitos se marcaron con Fura-2AM, derivado acetoxi-metilado del Fura-2 y lo suficientemente lipofílico para atravesar la membrana plasmática. En el interior celular, las esterasas citosólicas son capaces de romper el enlace y liberar Fura-2, de esta forma queda confinado en el citosol y puede actuar como sonda fluorescente para la medida de los niveles de calcio tras ser activado con una longitud de onda adecuada (Cobbold y col, 1987).

Procedimiento:

Después de obtenidos los hepatocitos en un medio Hepes 20 mM a pH 7,4, se resuspendieron en PBS (Phosphate buffer saline) con BSA (Bovine serum albumin) a la concentración de 5mg/ml. Después de centrifugar, el precipitado se marcó con Fura-2AM a una concentración final de 5 μ M incubándolo junto con plurónico 0,5 mM final, durante 35 minutos en baño a 37 °C con agitación y gaseo con O₂/CO₂ (95 %/5 %). Tras la incubación, se tomaron alícuotas de la suspensión de hepatocitos que se lavaron dos veces en PBS centrifugando a 100 x g y se resuspendieron en 10 ml de PBS y de aquí se tomaron alícuotas de 2 ml que se depositaron para su lectura en la cubeta del espectrofluorímetro siendo la longitud de onda máxima de excitación 340 nm y la longitud de onda máxima de emisión 510 nm.

En estas condiciones se determinó la fluorescencia máxima en cada ensayo, tras la adición de 20 μ l de SDS (sodium dodecyl sulphate) al 10 %, detergente utilizado para romper las células y liberar el Fura-2 contenido en ellas. La fluorescencia mínima se obtuvo tras añadir 20 μ l de EGTA 0,5 M/TRIS 3M.

3.- RESULTADOS

El tratamiento con tioacetamida en las condiciones de intoxicación aguda, con una dosis subletal de este agente, no tuvo efecto significativo sobre el parámetro obtenido en la relación peso hígado/peso cuerpo, cuyos valores fueron $3,9 \pm 0,2$ y $4,3 \pm 0,3$ mg hígado/g cuerpo, para las ratas control y las tratadas con tioacetamida, respectivamente.

3.1.- Morfología en cortes de hígado de rata

Con el objeto de comprobar el efecto necrogénico y la subsiguiente regeneración, se ha realizado un estudio morfológico de cortes hepáticos de rata a las 24, 48 y 72 horas después de la administración intraperitoneal de tioacetamida (6,6 mmol/Kg).

Los fragmentos de hígado recién obtenidos se fijaron en formol al 10 % y se procesaron de forma convencional para microscopía óptica (deshidratación a concentraciones crecientes de alcohol y xilol e inclusión en parafina). Posteriormente se realizaron cortes de 7 micras de grosor con un microtomo de deslizamiento de la firma comercial Reichert, que se tiñeron con hematoxilina-eosina, según se explica detalladamente en el apartado 2.6 de Métodos.

En la figura 1 se muestra una panorámica del hígado a las 24 horas de la administración del hepatotóxico, donde se puede observar claramente una necrosis en la zona central del lobulillo hepático (también llamada perivenosa o zona 3 del acino hepático) (VC) que se asocia con zonas de hemorragia e infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares. La zona necrosada se extiende sobre un 50 % de la superficie del corte (x 160). La figura 2, detalle de la figura 1, muestra a mayor aumento (x 800) el espacio venoso (vena central) (VC) donde aparece con mayor claridad la zona de necrosis (►) y la infiltración de leucocitos.

La figura 3 (x 800) es también un detalle de la figura 1, donde se observa un espacio porta, con la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y el canalículo biliar (CB), que aparece sin síntomas de necrosis. En la figura 4 se observa la vena central (VC) a mayor aumento (x 1600), donde la lesión hepatocelular masiva se caracteriza por cariólisis, picnosis (►) y cariorrexis nuclear (→).

En la figura 5 se muestra una visión general de un corte de hígado a las 48 horas de la administración del hepatotóxico; puede observarse que se mantiene la necrosis central aunque en fase de resolución (x 160).

La figura 6 es un detalle a mayor aumento (x 800) de la figura 5, donde se muestra el espacio perivenoso (vena central) (VC). La necrosis muestra signos de remisión si se compara con la de los cortes obtenidos a las 24 horas en las figuras 1 y 2. El infiltrado inflamatorio que acompaña a la lesión necrótica es de tipo mixto (leucocitos polimorfonucleares típicos de la inflamación aguda, linfocitos y monocitos característicos de la inflamación crónica). En esta figura aparece también una manifiesta dilatación de los sinusoides perivenulares (S).

La figura 7 (x 800), corresponde al espacio porta de un corte obtenido a las 48 horas de la intoxicación y la figura 8 (x 400), muestra venas centrales (VC), donde existen reacciones fibrosas asociadas.

La figura 9 y las que vienen a continuación corresponden a cortes de hígado obtenidos a las 72 horas de la administración de tioacetamida. En esta figura 9 observamos en una panorámica (x 160) como la necrosis perivenosa se encuentra ya en fase de resolución. En las venas centrales (VC) que se muestran en la figura 10 (x 800), se observa que, a pesar de la clara remisión

del proceso necrótico, estas zonas se encuentran todavía afectadas por acción del hepatotóxico. Se ven algunos hepatocitos necrosados localizados a nivel periférico con persistencia de células de infiltrado crónico y fibroblastos.

La figura 11 presenta un espacio porta (x 800) en el que se pone de manifiesto que esta zona mantiene una morfología normal. En la figura 12 (x 1600), detalle de la figura 11, pueden observarse los hepatocitos mediozonales con cierto grado de tumefacción y abundantes mitosis (M). Se muestran también los sinusoides (S) y las células de Kupffer (K).

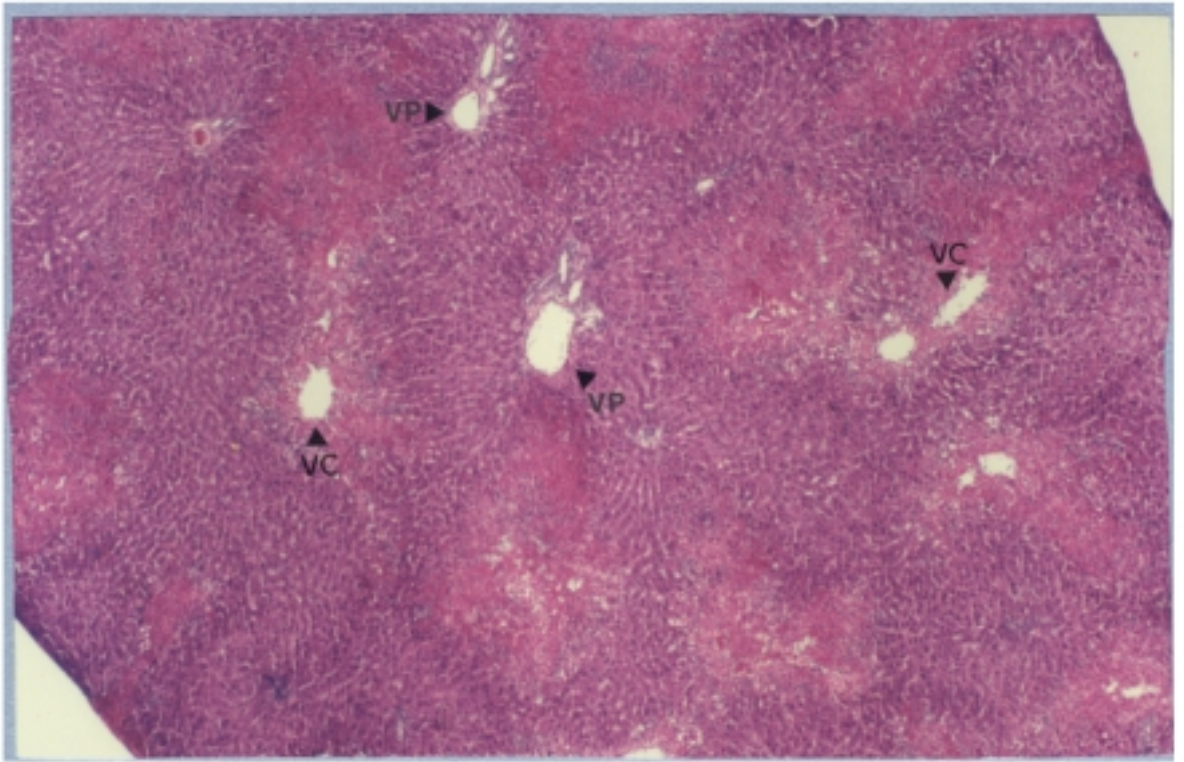


Fig.1 (x160)

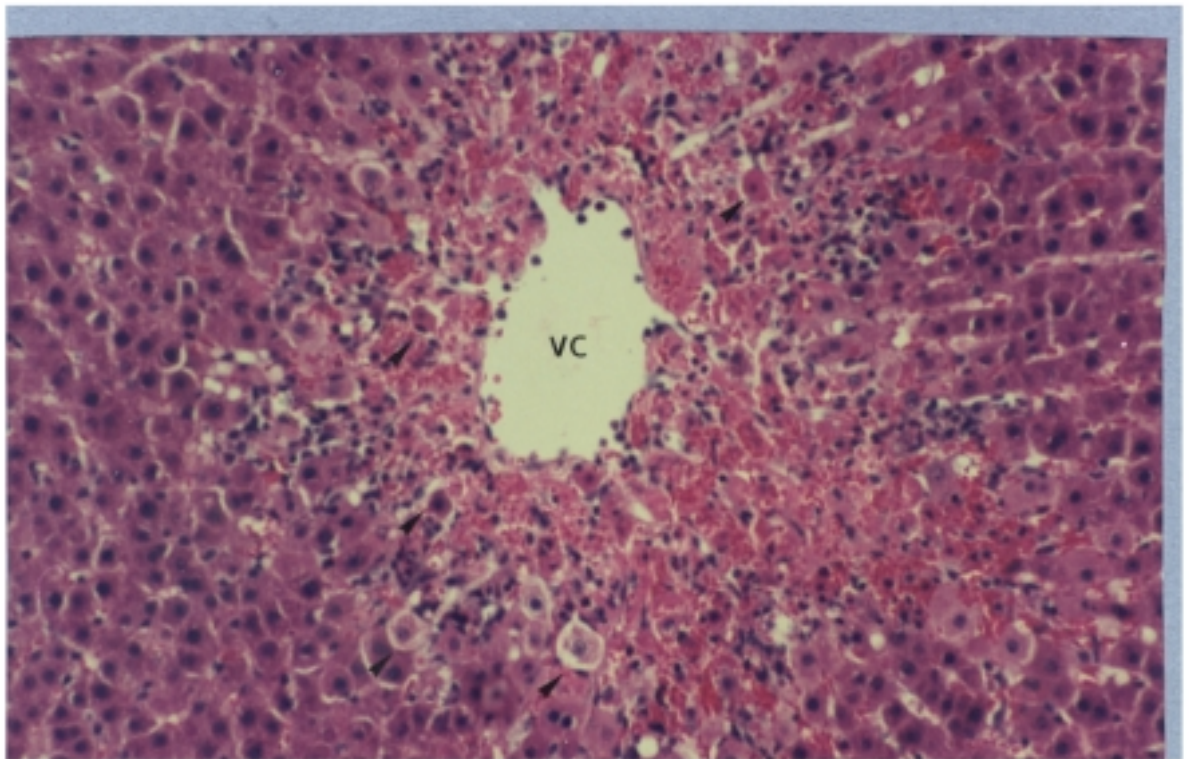


Fig. 2 (x 800)

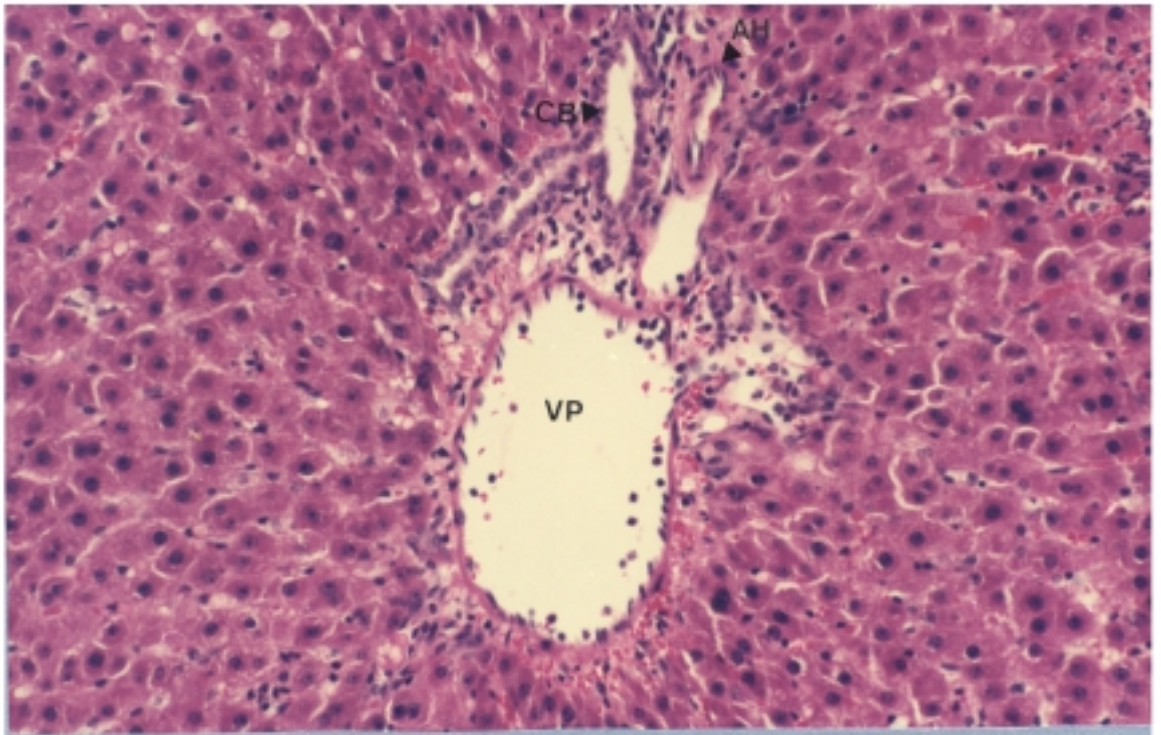


Fig.3 (x 800)

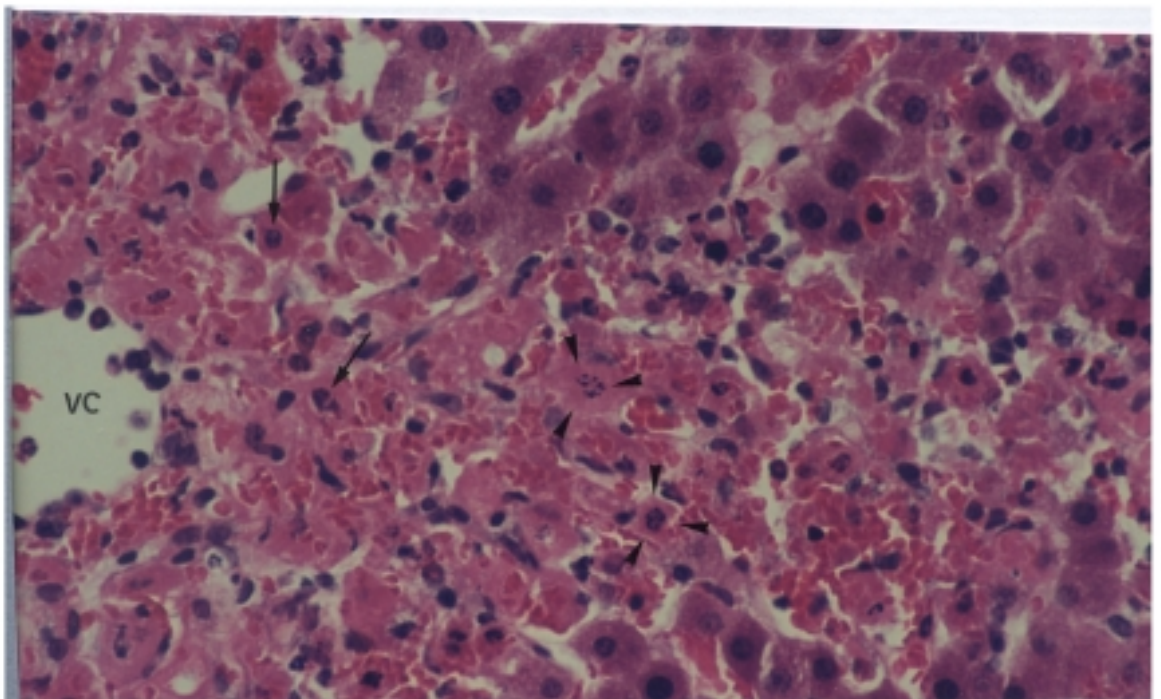


Fig.4 (x 1600)

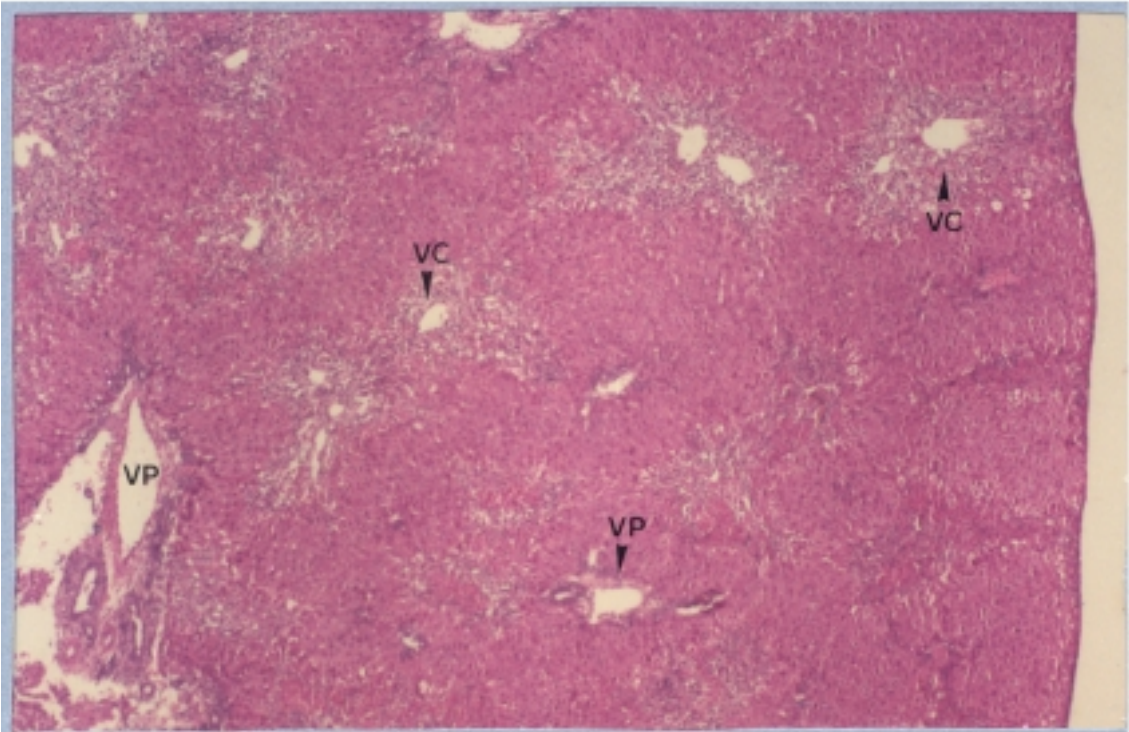


Fig. 5 (x 160)

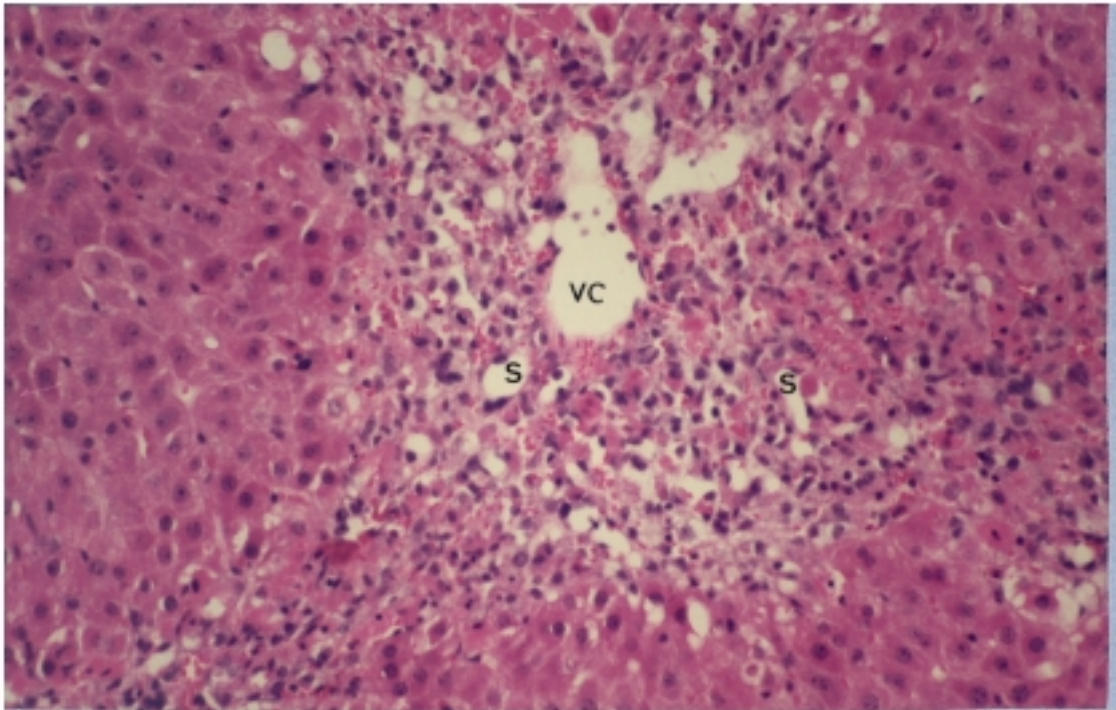


Fig. 6 (x 800)

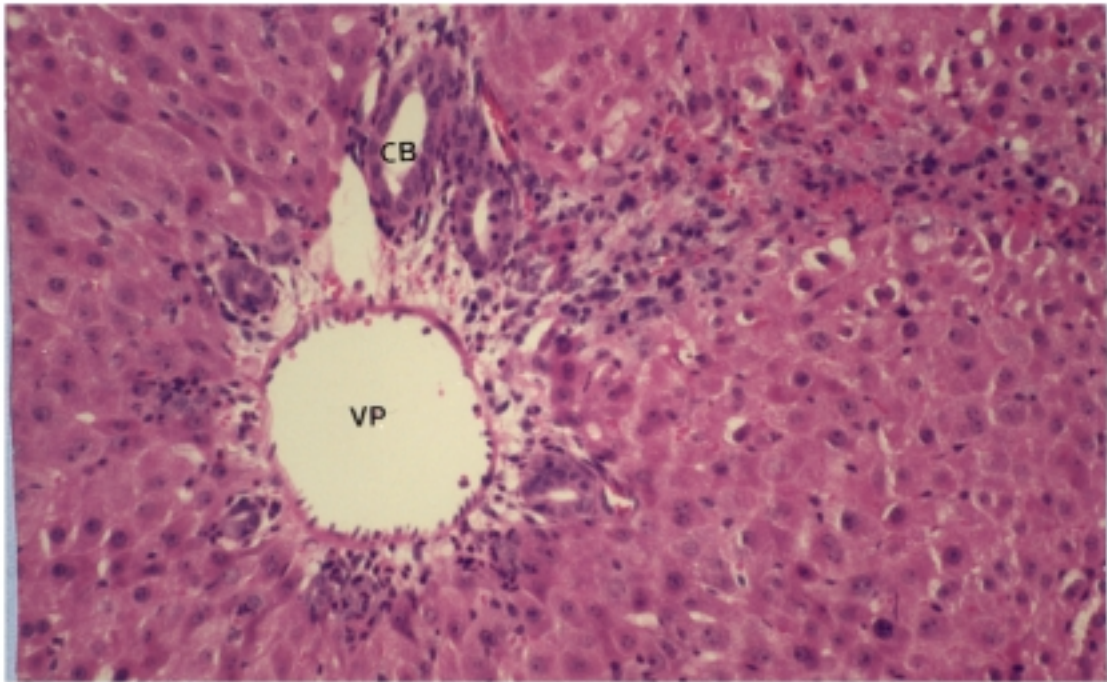


Fig. 7 (x 800)

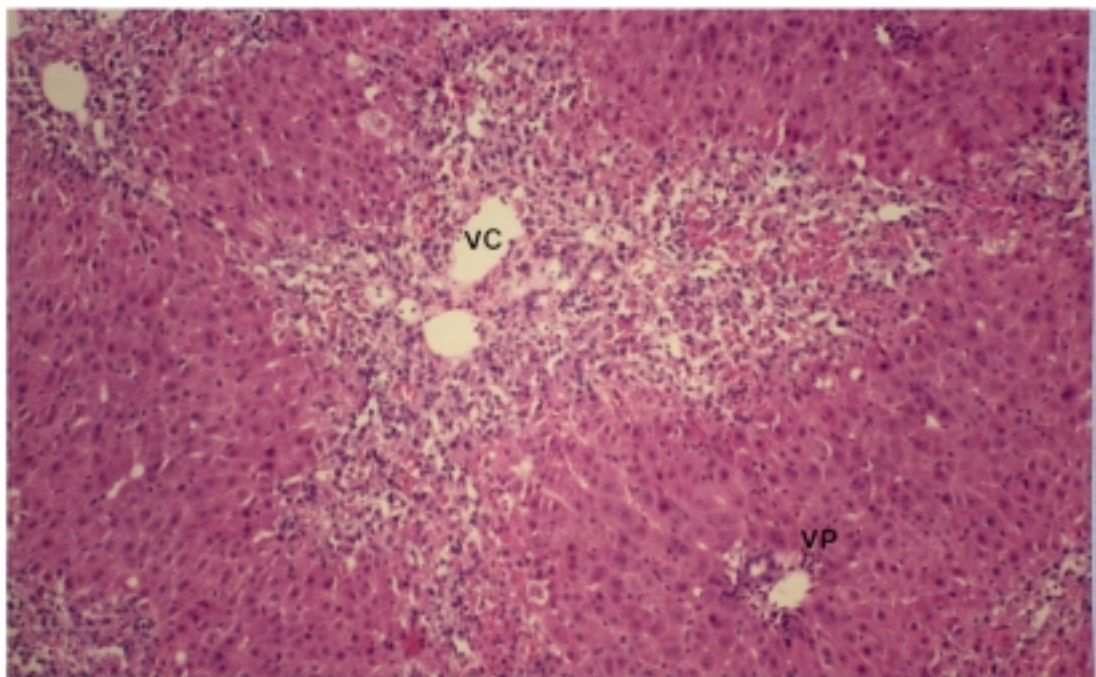


Fig. 8 (x 400)

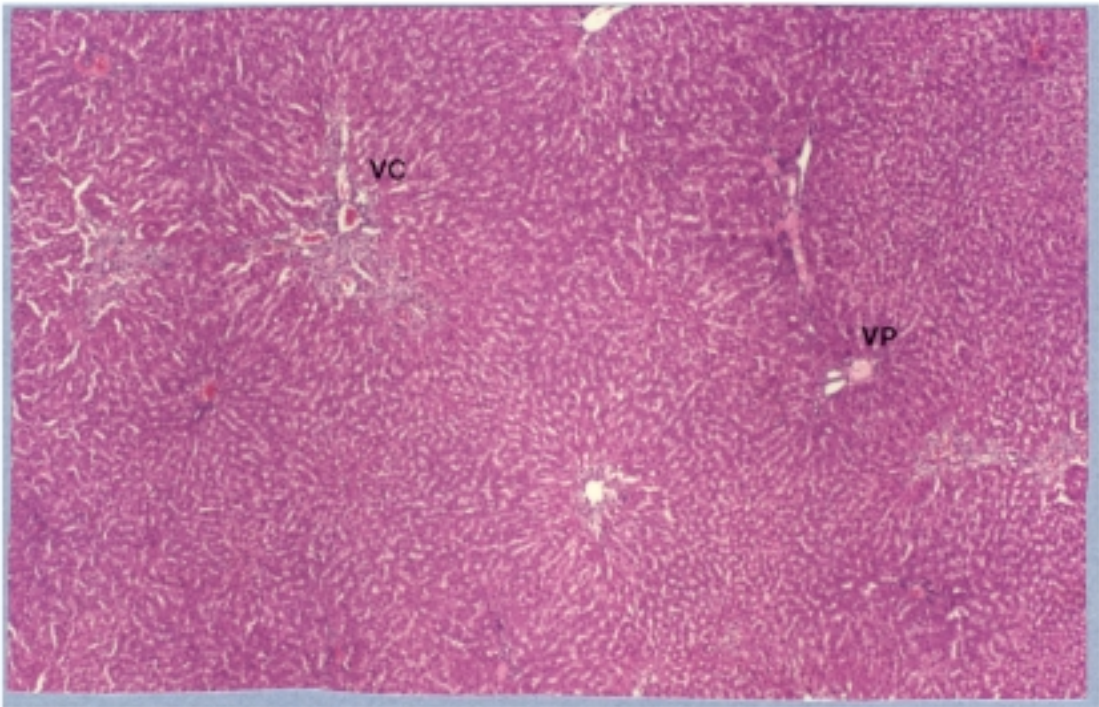


Fig.9 (x160)

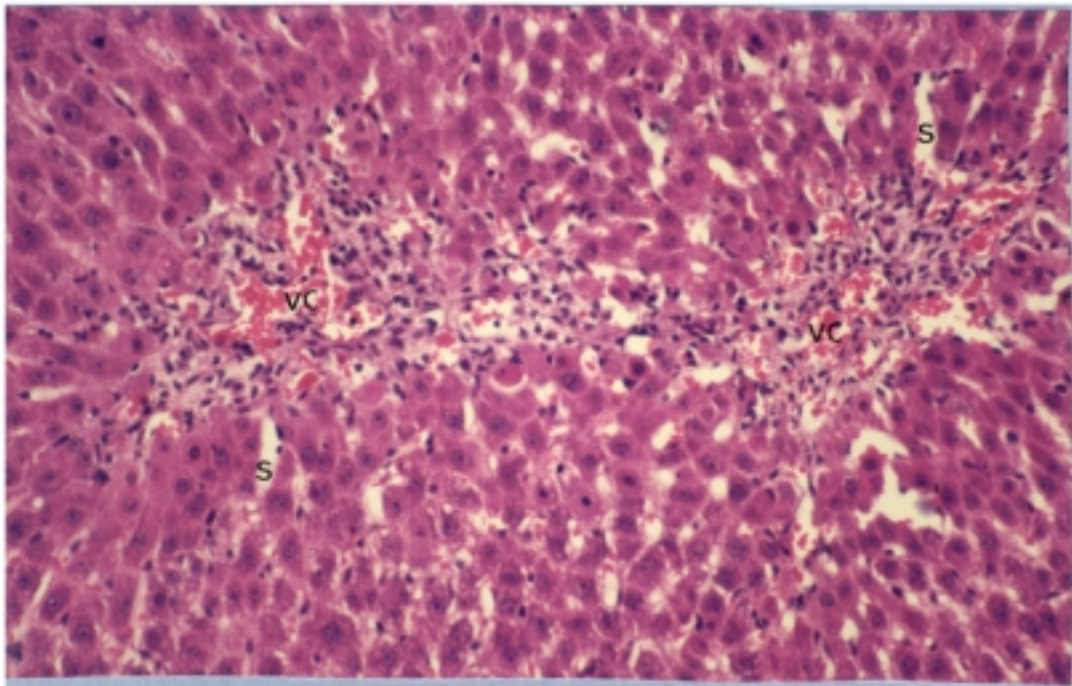


Fig. 10 (x800)

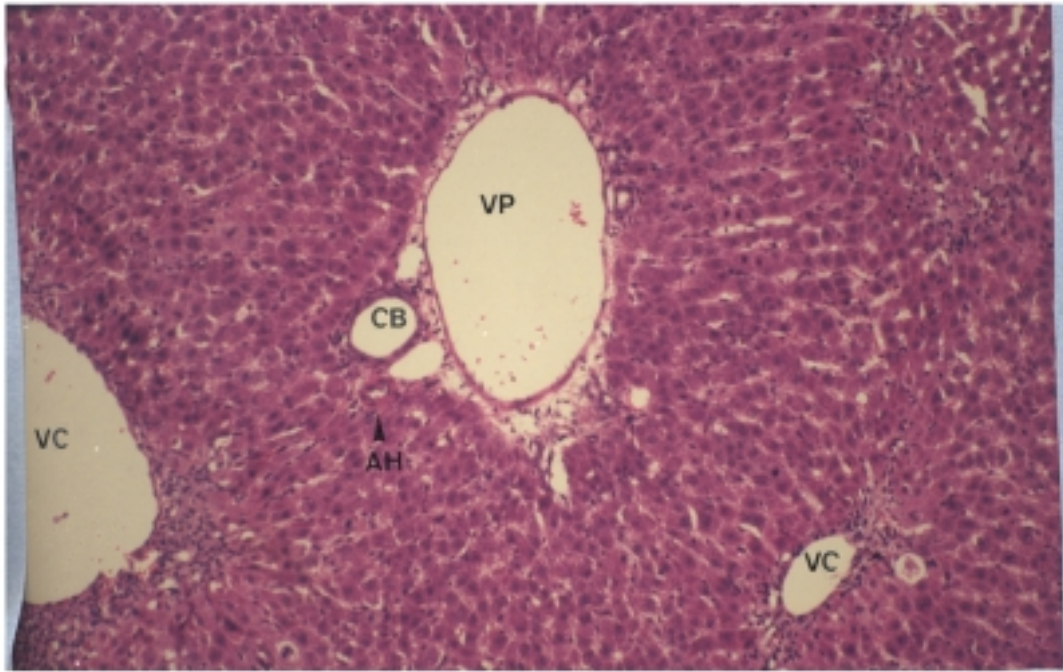


Fig. 11 (x 800)

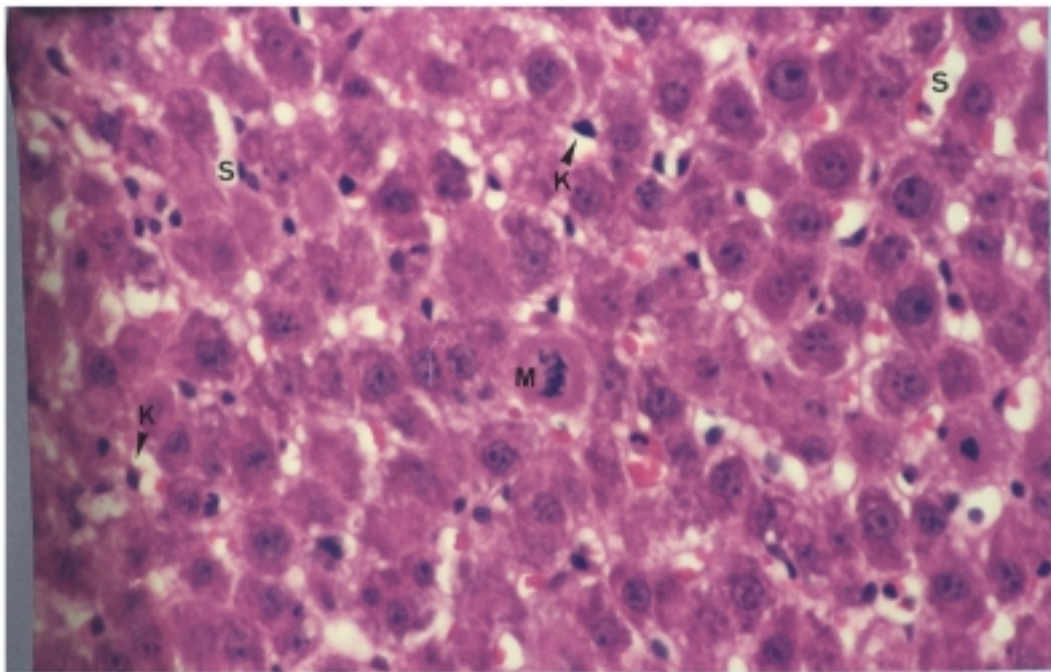


Fig. 12 (x 1600)

3.2.- Citometría de flujo

La técnica relativamente reciente de citometría de flujo permite la evaluación de multitud de parámetros celulares de una gran utilidad en estudios sobre la toxicidad de agentes químicos.

El estudio de las propiedades físicas junto con el de las variaciones en el DNA celular en poblaciones hepatocelulares se consideran análisis de gran precisión para determinar la cito y genotoxicidad de xenobióticos.

3.2.1.- Propiedades físicas en poblaciones de hepatocitos evaluadas por citometría de flujo

En el análisis por citometría de flujo, los hepatocitos aislados de ratas adultas se revelaron como células grandes y heterogéneas con una autofluorescencia intensa verde. Sin embargo, los hepatocitos fetales mostraron un tamaño más pequeño con aspecto homogéneo y una disminución en la emisión verde (Figura 13A y 13C). Los hepatocitos adultos obtenidos de ratas tratadas con tioacetamida se analizaron a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de una dosis subletal de tioacetamida (Figura 13B y 13D). A las 24 horas del tratamiento, los hepatocitos mostraron características citométricas en tamaño y fluorescencia, similares a las encontradas en células adultas. Por el contrario a las 48 horas, e incluso a las 72 horas del tratamiento, los hepatocitos mostraron características citométricas, en tamaño (Figura 13B) y fluorescencia (Figura 13D), similares a las observadas en células fetales (Figura 13A y 13C).

El histograma de la emisión a 530 nm de las poblaciones de hepatocitos adultos, fetales (22 días de gestación) y a las 48 horas del tratamiento con tioacetamida se muestra en la Figura 14. Los hepatocitos TAM (verde) presentan dos picos de emisión

a 530 nm, uno de autofluorescencia positiva (+), que coincide con uno emitido por los hepatocitos adultos y otro de autofluorescencia muy positiva (+++), que coincide con uno de los emitidos por los hepatocitos fetales.

La Figura 15 muestra los histogramas bidimensionales de poblaciones de hepatocitos en los que se presenta la emisión a 530 nm (FL1) en ordenadas, versus tamaño celular (FSC) en abscisas. El histograma A corresponde a hepatocitos adultos, el B a hepatocitos fetales y en el D (en verde) aparece el histograma de los hepatocitos de ratas a las 48 horas de ser tratadas con TAM. Como puede observarse, el histograma de los hepatocitos TAM es similar al que corresponde a la mezcla de adultos y fetales.

En la Figura 16 se muestra el análisis multiparamétrico de la población de hepatocitos aislados de ratas a las 48 horas del tratamiento con TAM. Los parámetros ensayados han sido: tamaño, complejidad y fluorescencia a 530 y 570 nm. El cálculo del porcentaje de las poblaciones muestra una mezcla de células hepáticas con las siguientes características: un 23,8 % corresponde a la población mediana con autofluorescencia muy positiva (+++, amarillo); un 22,6 % a la población pequeña con fluorescencia positiva (+, verde); un 19,8% a la población grande con fluorescencia muy positiva (+++, azul marino) y un 17,9 % a la población mediana con fluorescencia positiva (+, rojo).

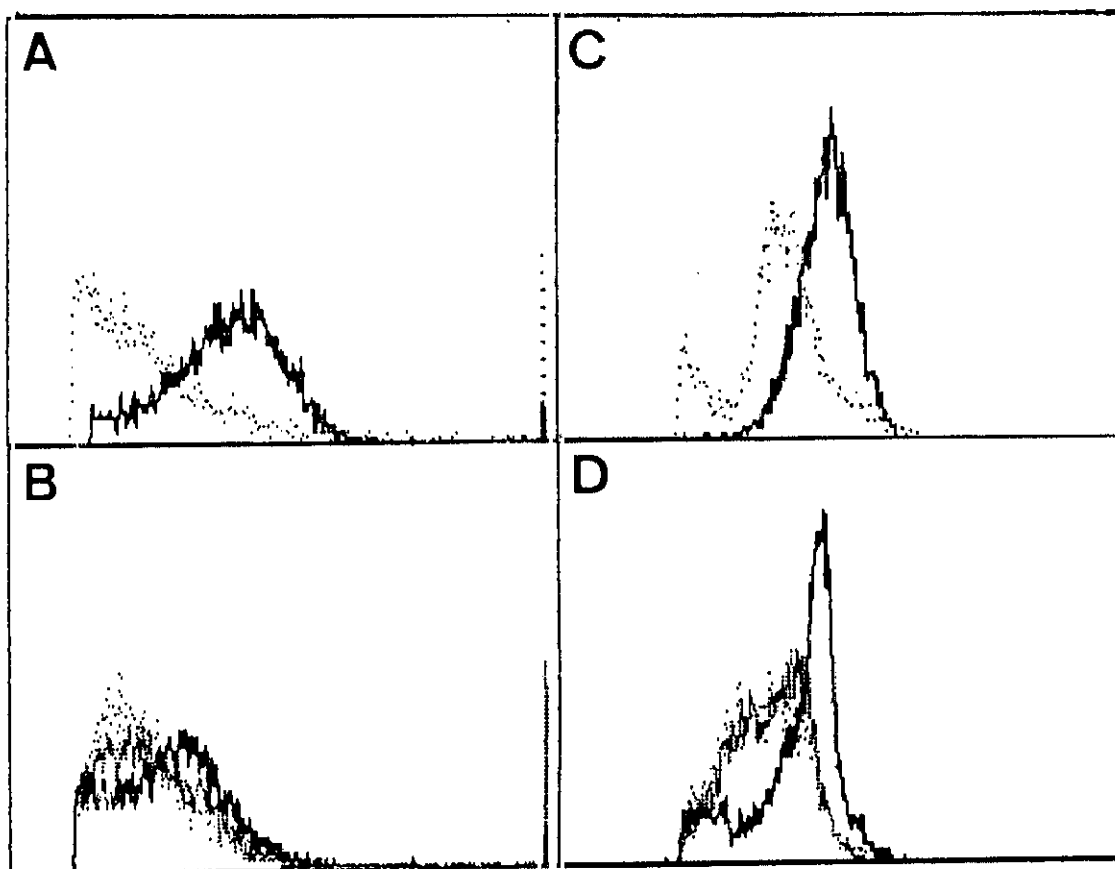


Figura 13.- Análisis citométrico del tamaño y autofluorescencia de las células.

Tamaño

A Hepatocitos adultos (---) y fetales (...)

B Hepatocitos tratados con TAM 24(---), 48(. . .) y 72(...) h

Autofluorescencia a 530 nm

C Hepatocitos adultos (---) y fetales (...)

D Hepatocitos tratados con TAM 24(---), 48 (. . .) y 72 (...) h

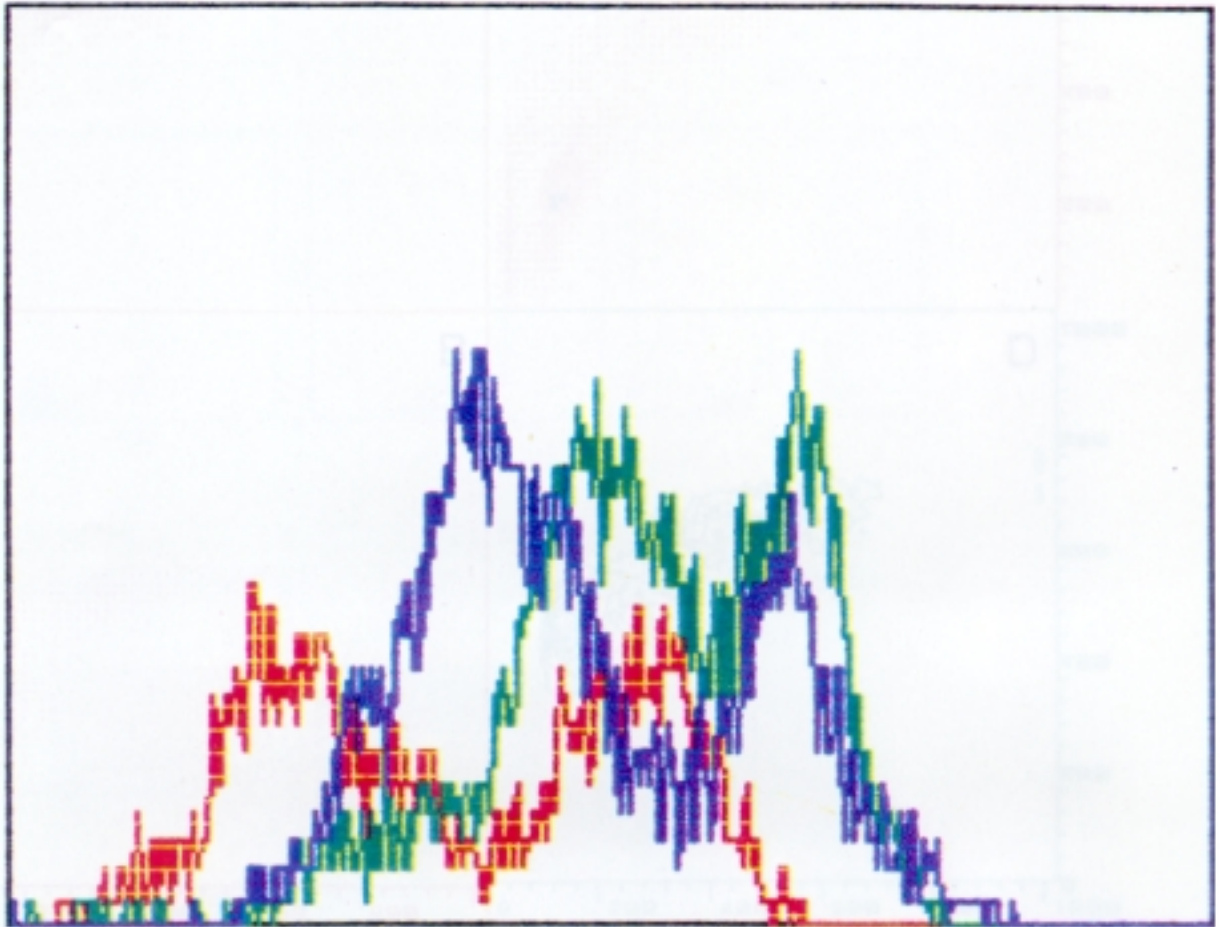


Figura 14.- Histograma de la emisión a 530 nm de las poblaciones celulares.

- hepatocitos adultos
- hepatocitos fetales (21 días de gestación)
- hepatocitos tratados con TAM (48 horas)

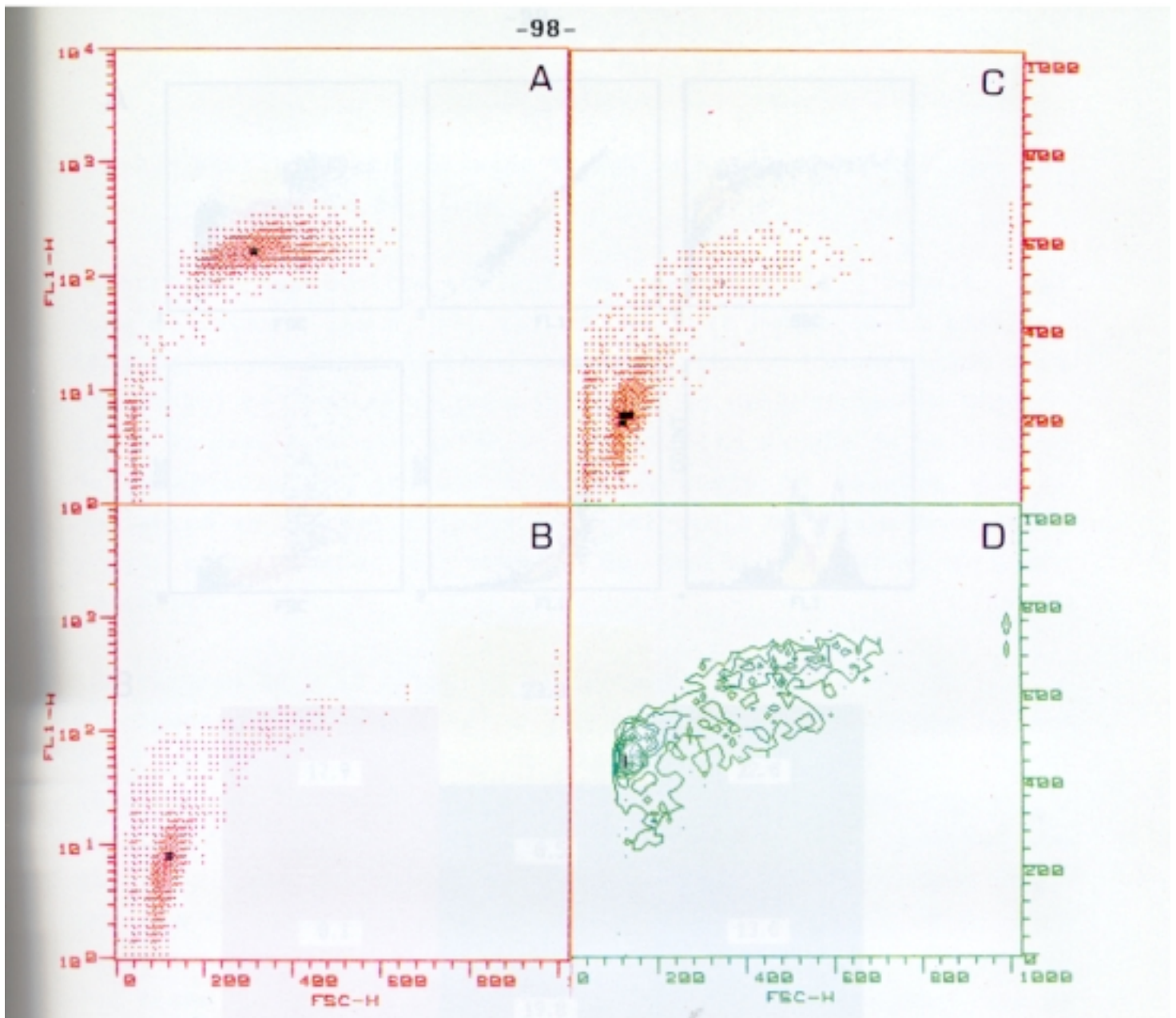


Figura 15.- Histogramas bidimensionales de poblaciones de hepatocitos. En ordenadas emisión a 530 nM (FL1) y en abscisas tamaño celular (FSC).

- (A) hepatocitos adultos
- (B) hepatocitos fetales
- (C) mezcla de hepatocitos adultos y fetales
- (D) hepatocitos TAM

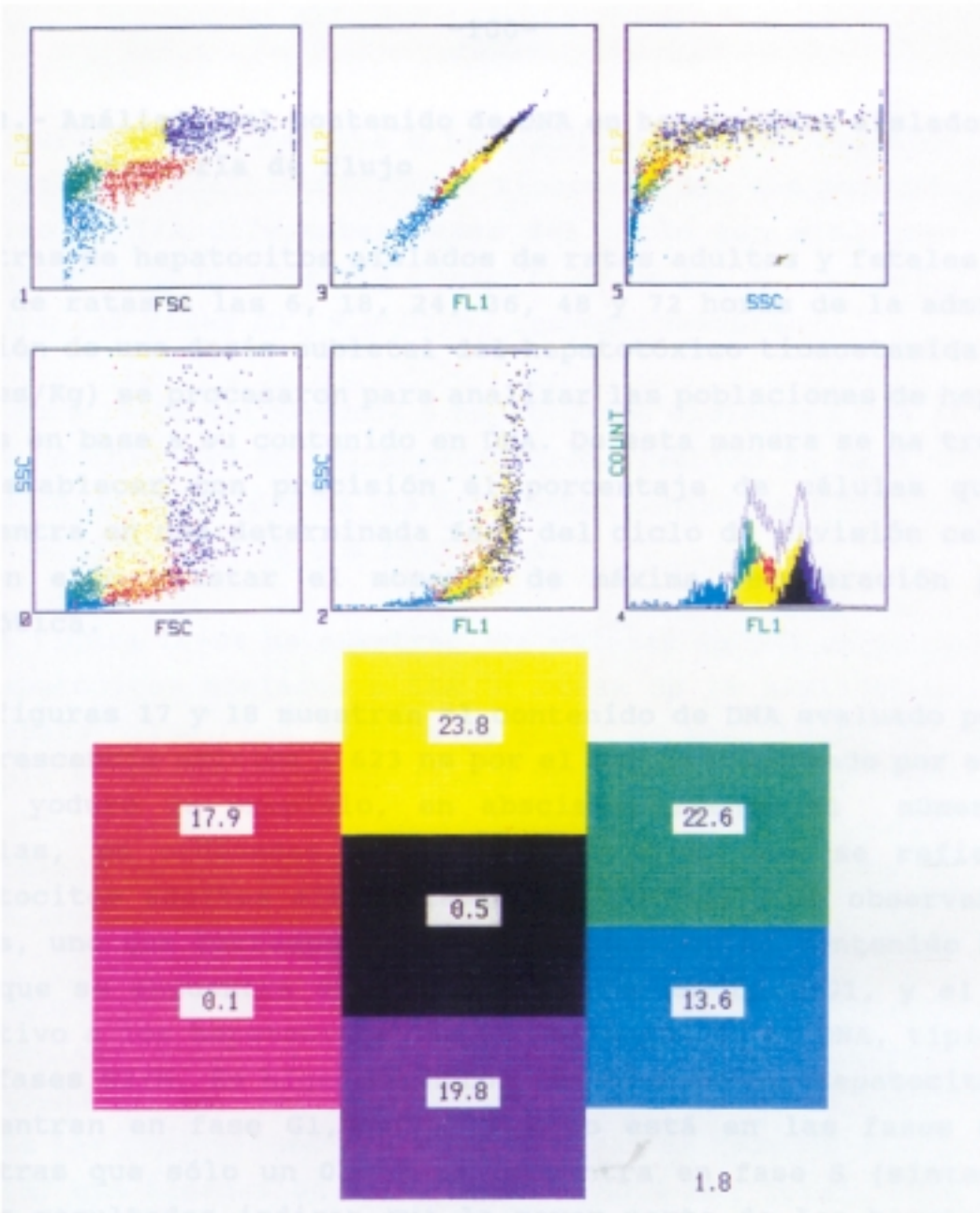


Figura 16.- (A) Análisis multiparamétrico de la población de hepatocitos aislados de ratas tratadas con tioacetamida.

- 0 tamaño (FSC)/complejidad (SSC).
- 1 tamaño (FSC)/fluorescencia (FL).
- 2 fluorescencia (FL)/complejidad (SSC).
- 3 fluorescencia (FL1) 530 nm/fluorescencia (FL2) 570 nm.
- 4 histograma de emisión a 530 nm.
- 5 complejidad (SSC) fluorescencia (FL) 570 nm.

(B) número de células en cada color (%).
Azul claro = población pequeña fluorescencia -
Verde = población pequeña fluorescencia +
Rojo = población mediada fluorescencia +
Amarillo = población mediana fluorescencia ++
Azul marino = población grande fluorescencia +++
Negro = población concurrente de todos los colores.

3.2.2.- Análisis del contenido de DNA en hepatocitos aislados por citometría de flujo

Muestras de hepatocitos aislados de ratas adultas y fetales, así como de ratas a las 6, 18, 24, 36, 48 y 72 horas de la administración de una dosis subletal del hepatotóxico tioacetamida (6.6 mmoles/Kg) se procesaron para analizar las poblaciones de hepatocitos en base a su contenido en DNA. De esta manera se ha tratado de establecer con precisión el porcentaje de células que se encuentra en una determinada fase del ciclo de división celular y con ello ajustar el momento de máxima regeneración post-necrótica.

Las figuras 17 y 18 muestran el contenido de DNA evaluado por la fluorescencia emitida a 623 nm por el complejo formado por el DNA y el yoduro de propidio, en abscisas, frente al número de células, en ordenadas. En la figura 17-A, que se refiere a hepatocitos adultos sin tratamiento (control), se observan dos picos, uno que corresponde a poblaciones con un contenido 2c de DNA que se encuentra en los hepatocitos en fase G1, y el otro relativo a los hepatocitos con un contenido 4c en DNA, típico de las fases G2/M. En hígado control, un 68 % de los hepatocitos se encuentran en fase G1, un 31,3 % lo está en las fases G2/M, mientras que sólo un 0,6 % se encuentra en fase S (síntesis). Estos resultados indican que la mayor parte de los hepatocitos aislados de hígado control se encuentran en la fase G1 del ciclo celular y que en sólo un 0,6 % de células se verifica la síntesis del DNA.

La figura 17-F muestra el histograma de hepatocitos fetales, donde aparecen los dos picos característicos de la fase G1 y de las fases G2/M. El porcentaje de células que sintetizan DNA (fase S), que aparece en la meseta situada entre los dos picos es, en este caso, un 7,3 % .

La figura 18-6 se refiere a hepatocitos adultos aislados a las 6 horas de la administración de tioacetamida. Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo son similares a los encontrados en hepatocitos control: 65 vs 68, 0,7 vs 0,6 y 35 vs 31 para las fases G1, S y G2/M, respectivamente.

La figura 18-18 corresponde a hepatocitos aislados a las 18 horas de la administración del hepatotóxico. También en este caso los porcentajes obtenidos de las diferentes poblaciones son similares a los encontrados en los controles.

En la figura 18-24 se muestran los valores de DNA en poblaciones de hepatocitos aislados a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina. Los resultados ponen de manifiesto un aumento notable en la población en fase S (2,8 vs 0,6). Este incremento, superior a cuatro veces, va acompañado de una disminución en el porcentaje de los hepatocitos en las fases G2/M (3 vs 31) (diez veces menos).

La figura 18-36 muestra el contenido en DNA de poblaciones de hepatocitos aislados a las 36 horas de la administración del hepatotóxico. Se observa un enorme incremento en el contenido en DNA de las poblaciones que se encuentran en fase de síntesis del DNA (S) que alcanza en este punto un 13 % del total. Este valor superior en 200 veces el valor control aparece en la meseta registrada entre los dos picos.

En la figura 18-48 aparecen los picos relativos a la cantidad de DNA en hepatocitos aislados a las 48 horas de la intoxicación. Lo más destacable de las poblaciones de hepatocitos en estos momentos de la intoxicación es que al igual que los aislados a las 36 horas se mantiene la elevada cantidad de células en fase de síntesis del DNA. Estos resultados, que concuerdan con intoxicaciones experimentales llevadas a cabo por otros grupos (Mehendale

y col, 1991) en otros modelos de hepatotoxicidad, indican que el proceso regenerativo iniciado a las 24 horas, llega a su máximo en el período situado entre las 36 y las 48 horas. Esta elevada síntesis de DNA, coincide con una notabilísima elevación en la población que se encuentra en las fases G2/M comparada con la procedente de los hepatocitos aislados a las 36 horas. Por último, la figura 18-72 muestra el análisis del DNA en hepatocitos aislados a las 72 horas de la intoxicación donde se observa con claridad la disminución de la población en fase S, a la vez que se mantiene elevada la población correspondiente a las fases G2/M. Puede deducirse, de estos resultados, que el proceso de síntesis de DNA se encuentra en este período en fase de regresión, pero no así el de mitosis.

En la figura 19 se representan en % las variaciones en el contenido en DNA en las diferentes fases del ciclo celular G1, S y G2 + M en poblaciones de hepatocitos obtenidas a las 6, 18, 24, 36, 48 y 72 horas después de la administración a ratas del hepatotóxico tioacetamida. En esta figura se muestran los valores en DNA de poblaciones adultas (A) y fetales (F), con el objeto de compararlos con los hepatocitos durante el proceso de dediferenciación, regeneración y regresión.

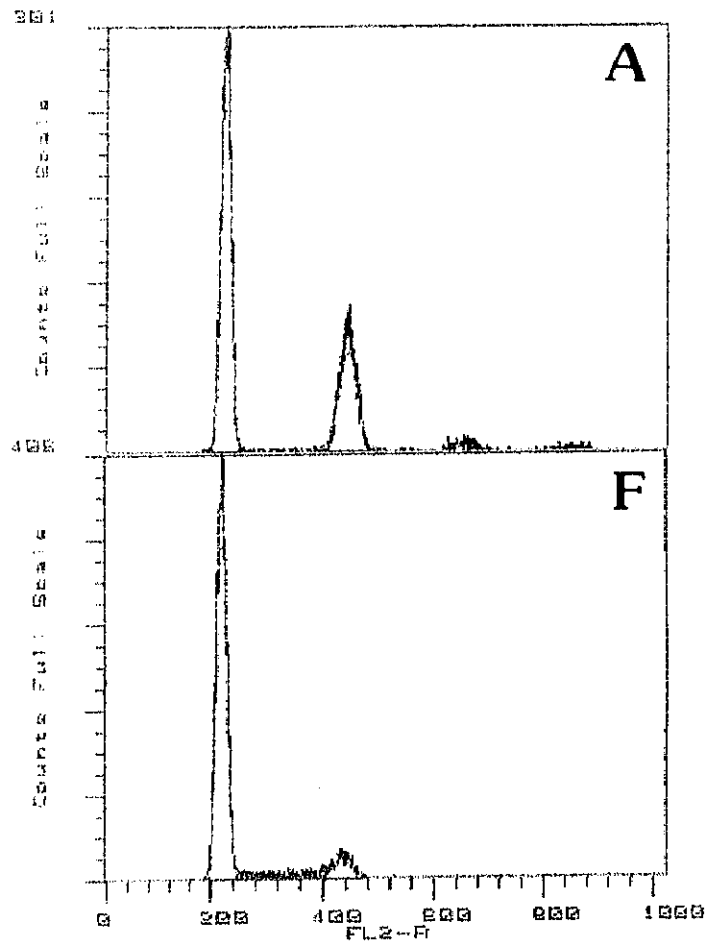


Figura 17.- Contenido en DNA en poblaciones de hepatocitos aislados de ratas adultas (A) y fetales (F).

% en	G1	S	G2 + M
Adultas	68,1	0,6	31,3
Fetales	85,3	7,3	7,4

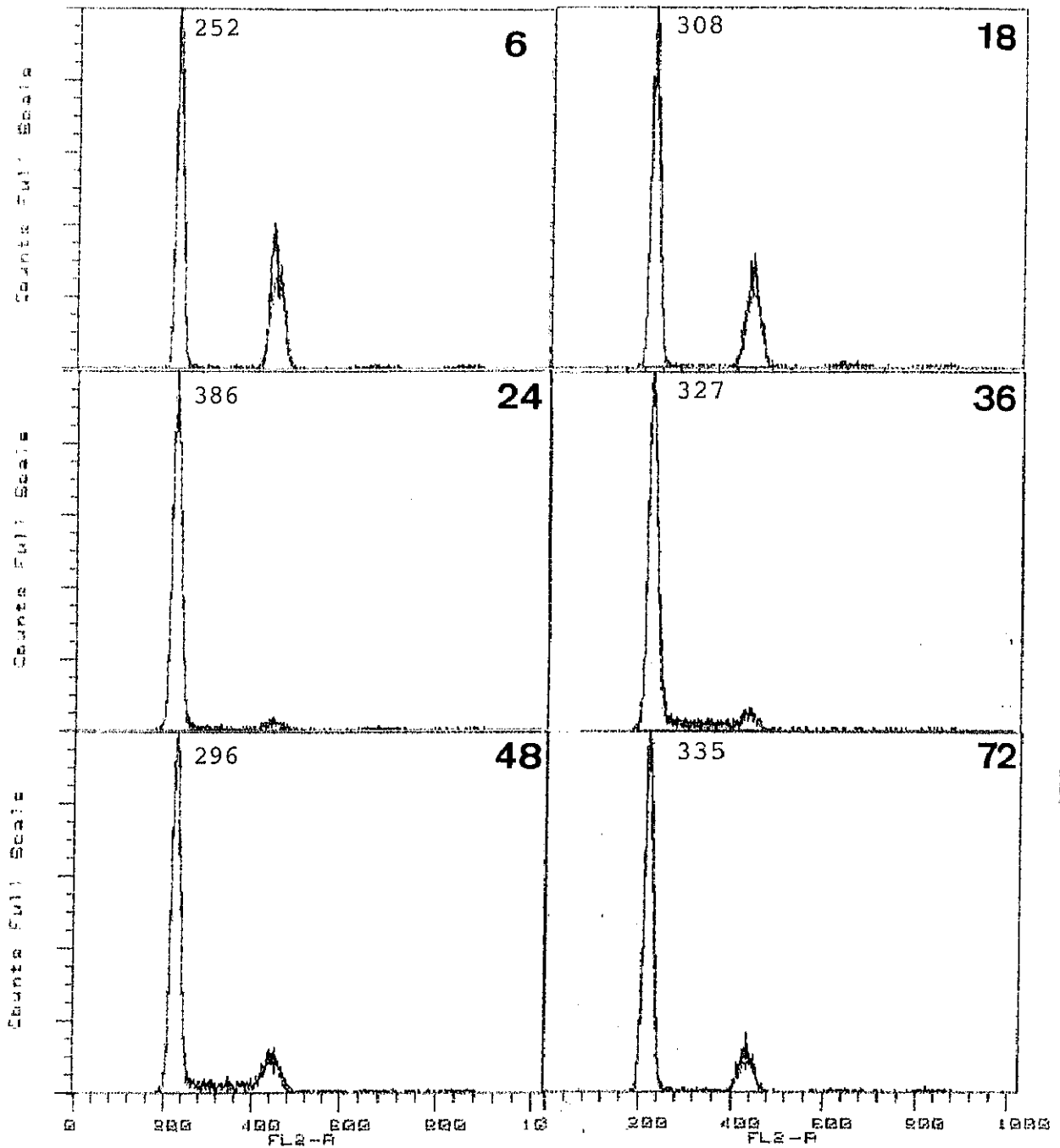


Figura 18.- Contenido en DNA en poblaciones de hepatocitos aislados después de la intoxicación con tioacetamida

% en	G1	S	G2 + M
6 horas	64,5	0,7	34,8
18 "	69,3	0,9	29,8
24 "	94,1	2,8	3,1
36 "	82,1	12,9	5,0
48 "	75,3	11,4	13,3
72 "	84,1	2,2	13,8

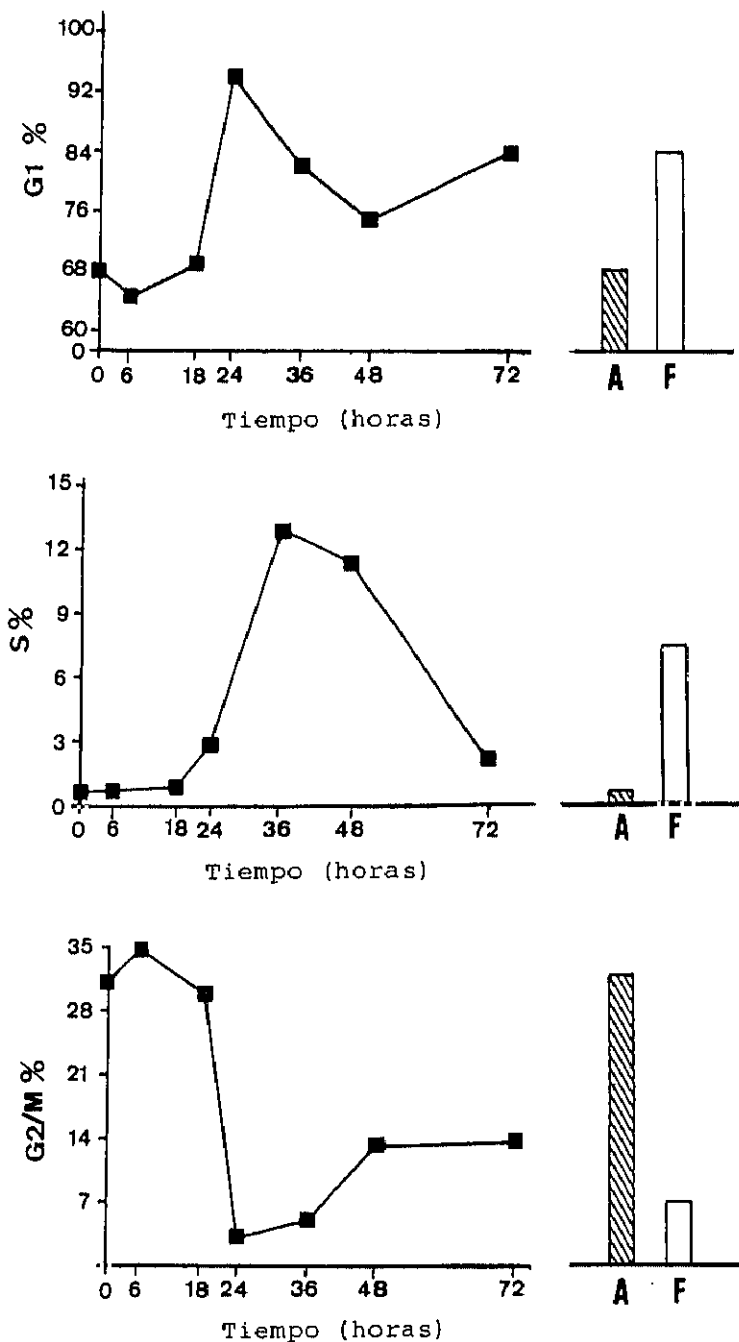


Figura 19.- Variaciones en el contenido en DNA de las poblaciones de hepatocitos en las diferentes fases del ciclo celular a las 6, 18, 24, 36, 48 y 72 horas de la administración de tioacetamida y comparación con los valores obtenidos para hepatocitos adultos (A) y fetales (F).

3.3.- Parámetros determinantes de necrosis hepática

Uno de los síntomas clínicos de la patología hepática es la aparición en plasma sanguíneo de enzimas procedentes de la rotura de los hepatocitos en el proceso de necrosis. Los hepatocitos necrosados vierten su contenido celular al torrente circulatorio y ésta es la causa de que aquellos enzimas más abundantes en la célula funcional hepática aparezcan muy elevados en el plasma. Entre estos enzimas hay que destacar las aspartato y alanina aminotransferasas y la isocitrato NADP deshidrogenasa, cuyas actividades plasmáticas se utilizan como determinantes del grado de necrosis hepática en casos de intoxicación o infección.

3.3.1.- Alteraciones en los niveles séricos de la aspartato aminotransferasa (GOT)

La actividad de la aspartato aminotransferasa se determinó en suero de ratas obtenido a distintos tiempos después del tratamiento con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg). Los diferentes tiempos fueron: 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena porta en ratas anestesiadas con Nembutal (50 mg/Kg) y heparinizadas (50 Us/Kg). Los resultados se expresan en Us por ml de suero considerando como unidad los μ moles de sustrato transformados por minuto a 25°C y son media de 4 determinaciones experimentales diferentes. En la figura 20, se muestra la representación gráfica de esta actividad. El máximo de actividad, 14 veces el valor control, se registró en la muestra de suero obtenida a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina, momento que coincide con el punto máximo de necrosis. A las 48 y 72 horas se registra una marcada disminución de esta actividad enzimática sérica hacia valores considerados normales, lo cual es un índice de la remisión de la necrosis.

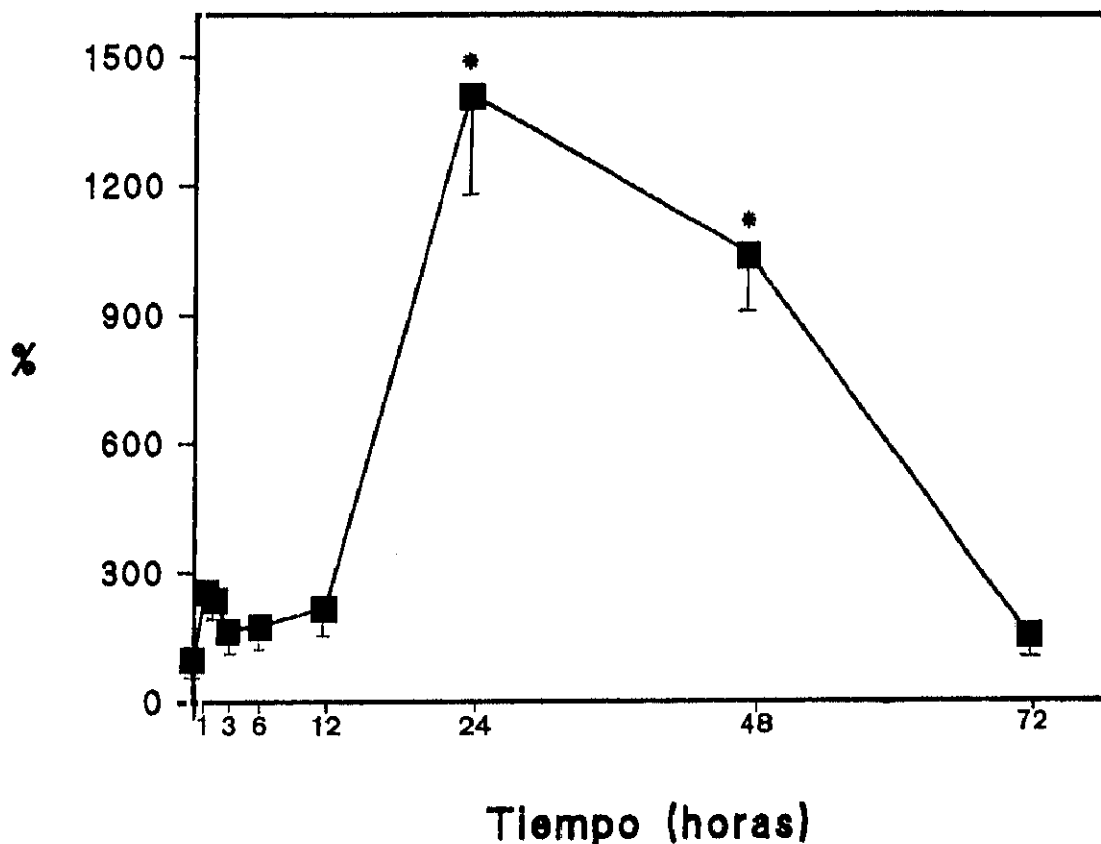


Figura 20.- Aspartato aminotransferasa en suero de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control. El valor control, calculado en plasma de ratas a tiempo 0 fue 34 ± 4 mUs/ml de suero considerando como unidad enzimática aquella cantidad de suero que transforma $1 \mu\text{mol}$ de sustrato a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. La *t* de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al tiempo 0; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa * $p < 0,001$.

3.3.2.- Alteraciones en los niveles séricos de la alanina aminotransferasa (GPT)

Al igual que la aspartato aminotransferasa, la actividad de la alanina aminotransferasa se determinó en suero de ratas obtenido a distintos tiempos después de una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg). Las muestras de sangre procedentes de la vena porta de ratas anestesiadas con Nembutal (50 mg/Kg) y heparinizadas (50 Us/Kg) se tomaron a las 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración de la hepatotoxina.

Los resultados se expresan en mUs/ml de suero considerando como unidad los μ moles de sustrato transformado por minuto a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y su representación gráfica se muestra en la figura 21 en la página 109.

El punto máximo de actividad, 7 veces el valor control, se registró a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina; este momento coincide con el máximo de necrosis.

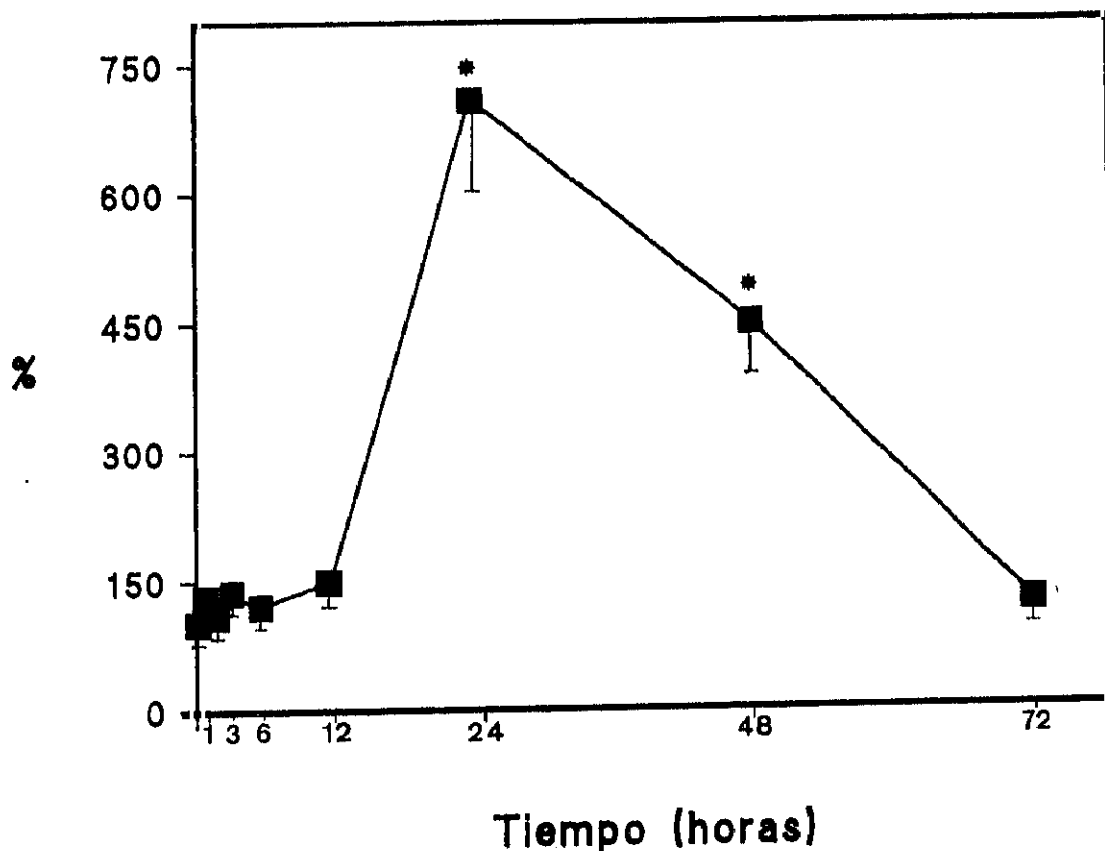


Figura 21.- Alanina aminotransferasa en suero de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control. El valor control, calculado en plasma de ratas a tiempo 0 fue 17 ± 2 mUs/ml de suero, considerando como unidad enzimática aquella cantidad de suero que transforma $1 \mu\text{mol}$ de sustrato a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. La *t* de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al tiempo 0; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa. * $p < 0,001$.

3.3.3.- Alteraciones en los niveles séricos de NADP-isocitrato deshidrogenasa (ICDH)

La actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente del NADP es otro de los parámetros considerado como marcador de la necrosis hepática. Esta actividad se determinó en muestras de sangre de ratas obtenidas de la vena porta previa anestesia con Nembutal (50 mg/Kg) y heparinizadas (50 Us/Kg) a las 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de la administración de una dosis necrogénica (6,6 mmoles/Kg) de tioacetamida.

Los resultados se expresan en μ moles de sustrato transformado por minuto a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y su representación gráfica se muestra en la figura 22 en la página 111.

El punto máximo de actividad, 27 veces el valor control, se registró a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina, que coincide con el momento de máxima necrosis.

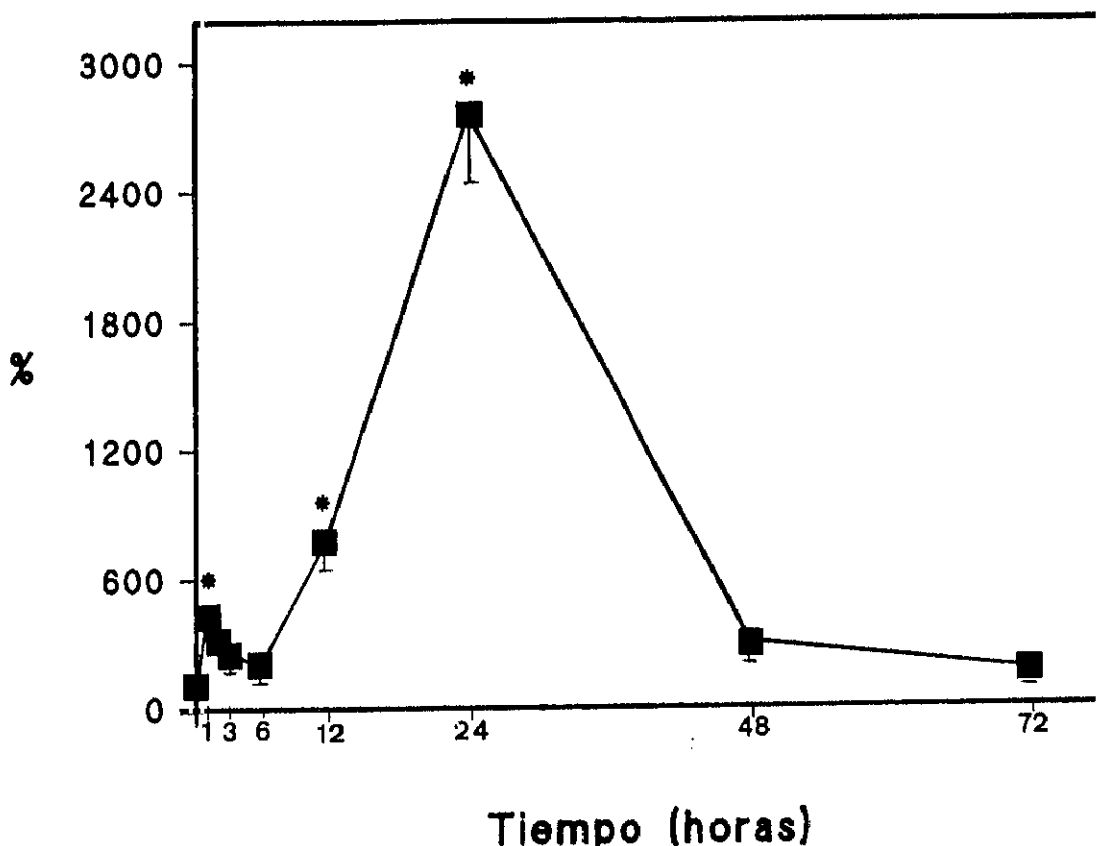


Figura 22.- Actividad isocitrato deshidrogenasa NADP en suero de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control. El valor control, calculado en plasma de ratas a tiempo 0, fue de 16 ± 2 nmol de sustrato transformados por minuto a 25 °C por ml de suero.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al tiempo 0; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa. * $p < 0,001$.

3.4.- Parámetros determinantes de lesión hepática inducida por hepatotóxicos

Existen una serie de parámetros hepáticos cuya determinación es muy útil a la hora de diagnosticar las lesiones hepáticas. La lesión hepática inducida por la tioacetamida se origina por la rápida biotransformación de esta hepatotoxina a tioacetamida S-óxido, la cual a través de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 origina metabolitos electrofílicos que reaccionan por unión covalente con macromoléculas, principalmente aquellas que corresponden a la fracción proteica nuclear (Satyabhama y Padmanaban, 1984).

Entre los parámetros determinantes de lesión hepática, se han evaluado en el presente trabajo la actividad enzimática de la gamma-glutamyl transferasa en suero y la actividad de las glutathion S-transferasas en la fracción soluble hepática, junto con la concentración de glutathion total hepático. Se ha evaluado también la concentración de malondialdehído como indicativa del grado de peroxidación lipídica originado en el proceso hepatotóxico y cuya elevación demuestra la alteración de los lípidos de las membranas celulares que, puede llegar a conducir a la desintegración y rotura de dichas membranas y a la muerte celular (Chien y col, 1977).

3.4.1.- Alteraciones en la actividad sérica de la gamma-glutamil transferasa (GGT)

En suero de ratas obtenido a distintos tiempos: 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración de una dosis subletal del hepatotóxico tioacetamida (6,6 mmoles/Kg) se evaluó la actividad de la GGT, enzima extrahepático encargado de la degradación del glutatión (Mannervik, 1985).

La GGT suele encontrarse elevada en casos de enfermedad hepática obstructiva (hepatobiliar), intoxicación etílica y hepatocarcinogénesis (Cascales y col, 1991).

Las muestras de sangre obtenida por punción de la vena porta en ratas anestesiadas (Nembutal 50 mg/Kg) y heparinizadas, se centrifugaron a 3000xg para separar el suero. Los resultados se expresan en μmols de sustrato (gamma-glutamil p-nitroanilida) transformados por minuto a 25 °C y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y su representación gráfica se muestra en la figura 23 de la página 114.

La actividad GGT ascendió paulatinamente a partir de 1 hora mostrando su punto de actividad máxima a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina con valores superiores a 30 veces el control. A partir de aquí se registró un brusco descenso a las 48 horas presentando valores cercanos a la normalidad.

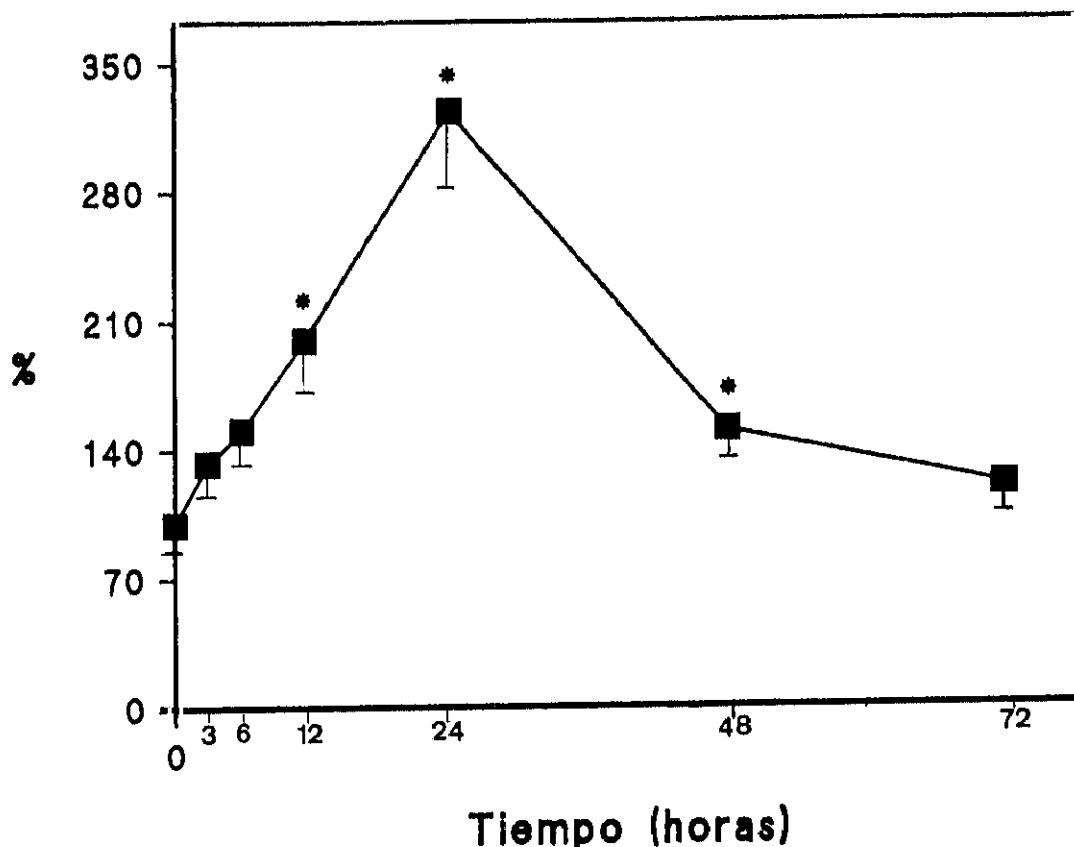


Figura 23.- Actividad gamma-glutamyl transferasa en suero de ratas tratadas con una dosis necr6gica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control. El valor control, calculado en plasma de ratas a tiempo 0, fue $32 \pm 0,4$ μ moles de nitroanilida liberada por minuto a 25 °C por ml de suero.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones t6picas. La t de Student fue calculada por comparaci3n de los resultados frente al tiempo 0; cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consider3 no significativa. * $p < 0,001$.

3.4.2.- Actividad de la glutathion S-transferasa (GST) en fracción soluble de hígado de rata

La importancia de las reacciones catalizadas por las glutathion S-transferasas se basan en que el átomo de azufre del GSH proporciona los electrones para el ataque nucleofílico del sustrato electrofílico, en este caso un metabolito reactivo derivado de la tioacetamida. La elevación de las glutathion S-transferasas en caso de intoxicación puede ser una de las causas de la depleción del glutathion.

La actividad GST se determinó en la fracción soluble de hígado de rata tratada con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg). Las muestras de hígado se tomaron a determinados tiempos después de la administración de la hepatotoxina: 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes y se expresan como μ moles de sustrato transformado por minuto a 25 °C por mg de proteína.

La actividad GST aumentó paulatinamente a partir de los primeros momentos de la intoxicación alcanzando su punto máximo en el período entre las 12 y las 24 horas presentando valores de 160 y 159 %, respectivamente. Posteriormente se registró un proceso de disminución. Los máximos de actividad GST son más tempranos que los de los enzimas marcadores de necrosis.

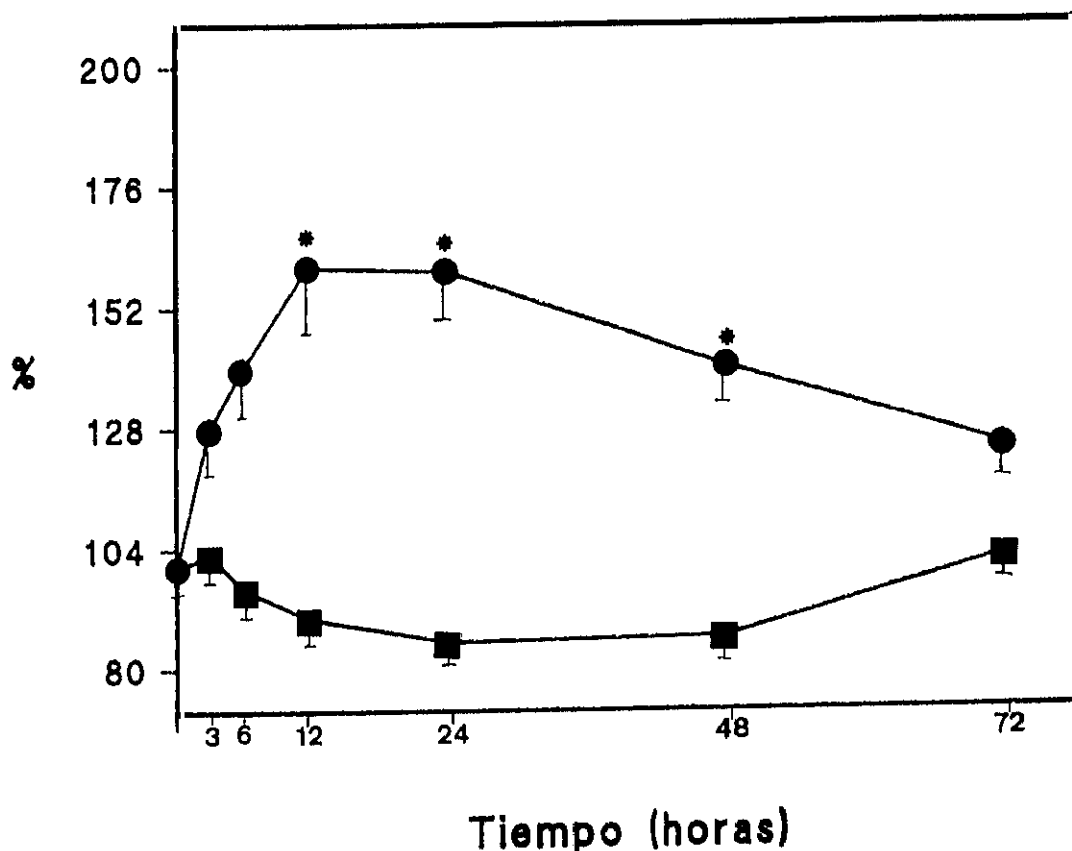


Figura 24.- Actividad glutathione S-transferasa en fracción soluble de hígado de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control. El valor control, calculado en fracción soluble de hígado de ratas a tiempo 0, fue $37 \pm 0,4$ nmol de sustrato transformados por minuto a 25°C por mg de proteína.

Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al tiempo 0, cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa. * $p < 0,001$.

El valor control de las proteínas fue de 95 mg por gramo de hígado.

●--● Glutathione S-transferasa

■--■ Proteínas solubles de la fracción citosólica.

3.4.3.- Niveles en hígado de glutathion y malondialdehido

En extractos hepáticos de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg) se evaluaron las concentraciones de glutathion y malondialdehido.

Las reacciones de detoxificación consumen el GSH hepático a la vez que promueven una activación compensatoria de la síntesis del GSH (Lauterburg y Smith, 1986). Sin embargo, en caso de intoxicación masiva, la velocidad de consumición del GSH en hígado puede sobrepasar la de su síntesis y ello llevará consigo un agotamiento del glutathion hepático.

La concentración de glutathion experimentó una débil subida: de 100 -> 120 % a la primera hora de la administración de la toxina para descender bruscamente a las 3 y a las 6 horas llegando a las 24 horas a presentar sólo un 31 % del valor inicial normal. Posteriormente se registró una recuperación a las 48 horas, y a las 72 horas la concentración de glutathion hepático fue un 82 % del control. La disminución del glutathion hepático resultó ser inversa a la actividad de uno de los enzimas que lo utilizan, la glutathion S-transferasas.

El malondialdehido es un producto derivado de la rotura de las membranas por peroxidación lipídica. Por tanto, la determinación de este metabolito proporciona un índice de la peroxidación lipídica producida por los intermediarios reactivos originados en la biotransformación de hepatotóxicos. La figura 26 muestra la concentración de malondialdehido en homogenados de hígado de ratas tratadas con tioacetamida. Puede observarse un progresivo aumento desde las 6 hasta las 24 horas de la administración del hepatotóxico, alcanzando a las 24 y las 48 horas 145 y 141 % del valor control, respectivamente, indicando con ello la alteración de las membranas celulares.

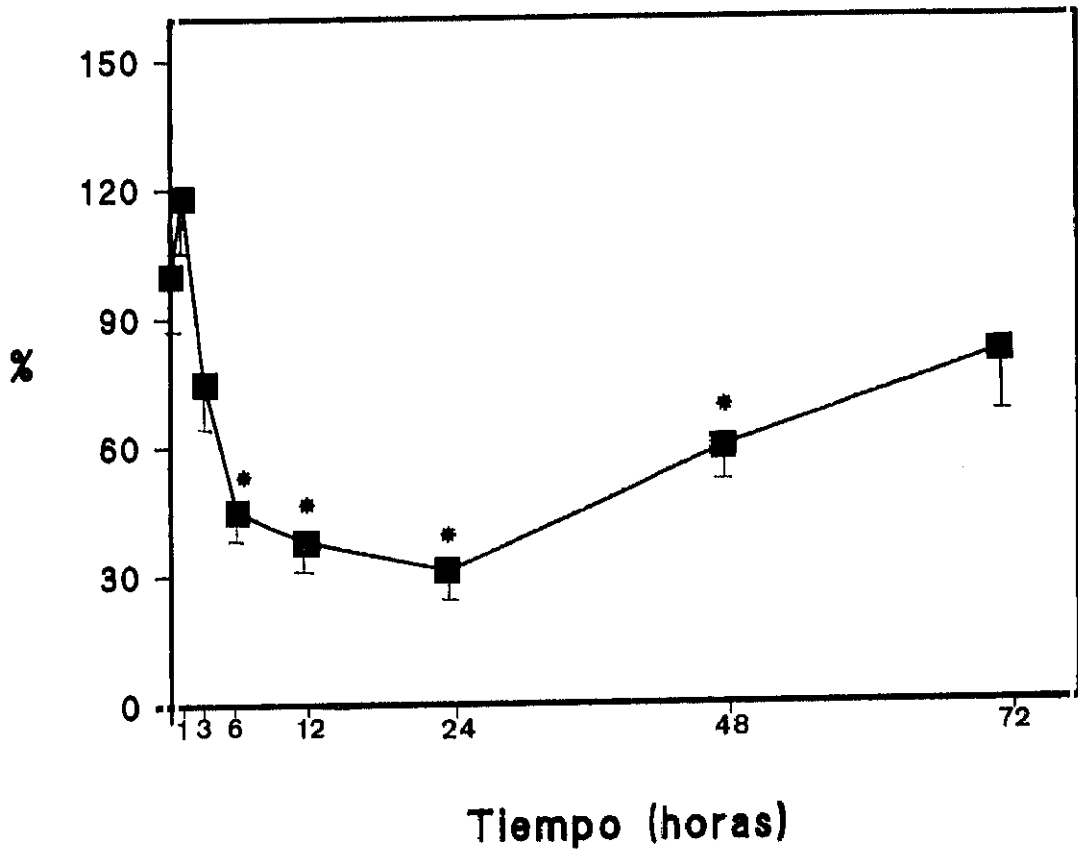


Figura 25.- Concentración de glutathion total en homogenados de hígado de ratas tratadas con una dosis necrogénica de tioacetamida (6,6 mmol/Kg).

Los resultados se expresan en % del valor control, considerando el valor control correspondiente a tiempo 0, $4,1 \pm 0,3$ mM. Los resultados son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (tiempo 0) y cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa. * $p < 0,001$.

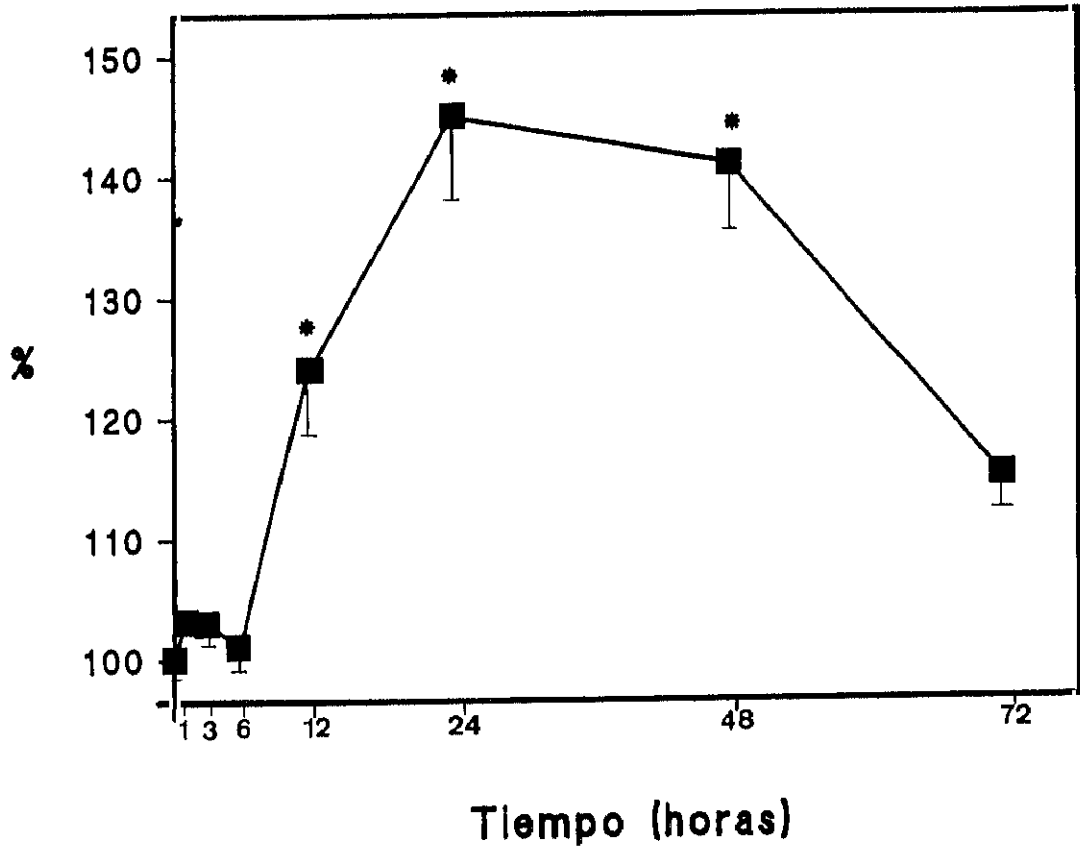


Figura 26.- Concentración de malondialdehído en homogenados de hígado de ratas tratadas con tioacetamida (6,6 mmol/Kg). Los resultados se expresan en % del valor control y son media de cuatro determinaciones experimentales diferentes con sus desviaciones típicas. El valor obtenido en homogenados solubles de hígado control fue $2,6 \pm 0,2$ mM. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (tiempo 0) y cuando esta diferencia fue superior a 0,001 se consideró no significativa. * $p < 0,001$.

3.4.4.- Concentración intracelular del calcio

Hepatocitos aislados de ratas control y ratas tratadas con tioacetamida se marcaron con Fura-2AM y se analizaron en un espectrofluorímetro. Las concentraciones de calcio intracelular se obtuvieron a partir de los datos de fluorescencia mediante la ecuación: $[Ca^{2+}]_i = K_D (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$, siendo $K_D = 224$ (Tsien y col, 1982). La fluorescencia máxima fue determinada tras la adición de 20 μ l de SDS 10 % para romper las células y liberar todo el Fura-2 contenido en ellas. La fluorescencia mínima se obtuvo tras añadir 20 μ l de EGTA 0,5 M/Tris 3 M.

La figura 27 representa las variaciones en la concentración intracelular de calcio (nM) en hepatocitos aislados de ratas control y ratas tratadas a diferentes horas de la administración de tioacetamida. Puede observarse que existe un incremento en la concentración del calcio citosólico libre, desde un valor control de aproximadamente 200 nM a un máximo de alrededor de 500 nM a las 14 horas de la administración del hepatotóxico. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros grupos de investigadores (Orrenius y col, 1989), que afirman que alteraciones en la homeostasis del calcio inducidas por toxinas químicas o condiciones de estrés oxidativo, tienen como resultado una elevación en la concentración de calcio intracelular, incremento que precede a la pérdida de la viabilidad celular.

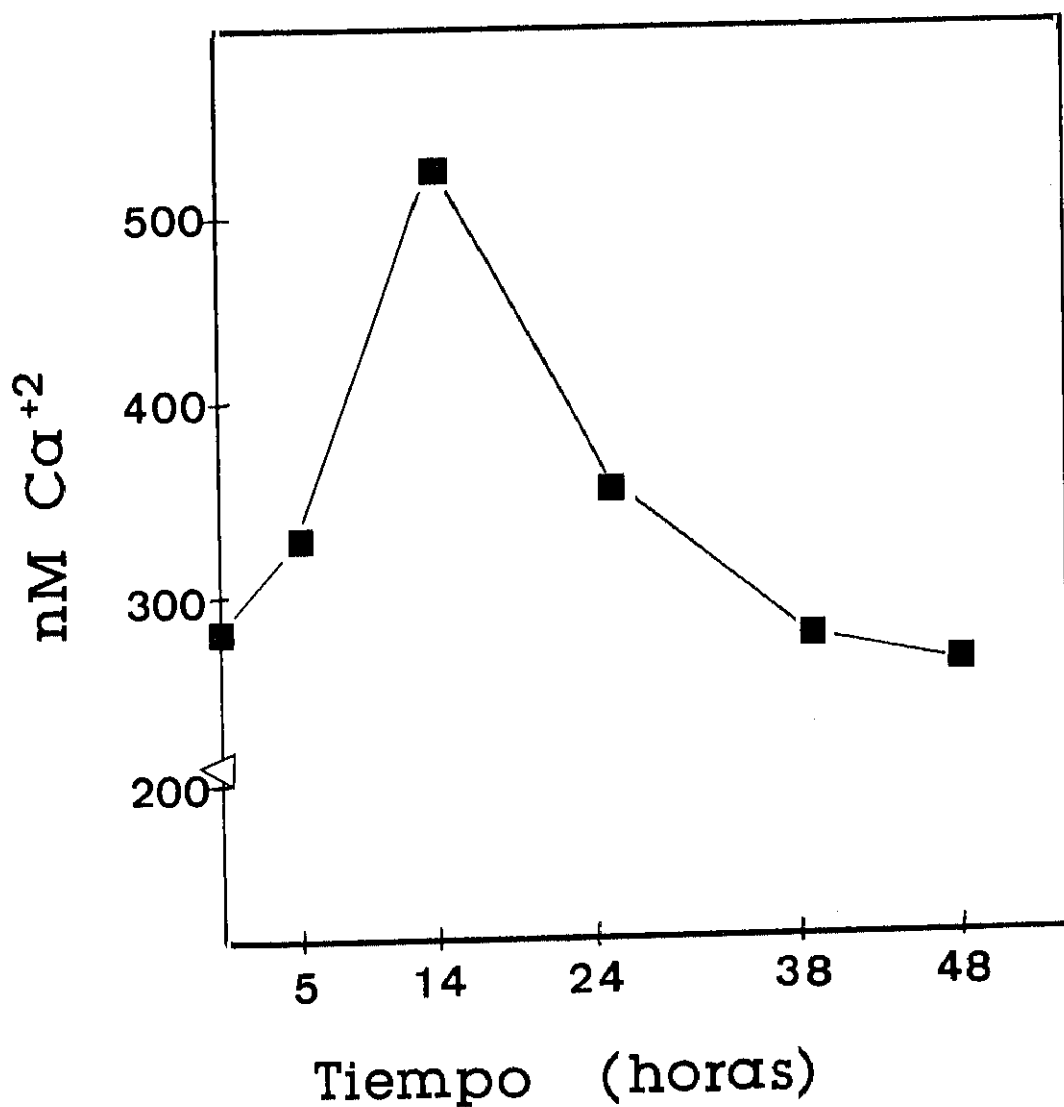


Figura 27.- Concentración de calcio intracelular (nM) en hepatocitos aislados de ratas control y ratas tratadas con tioacetamida a diferentes horas de la administración del hepatotóxico.

3.5.- Efecto mitogénico del suero de ratas tratadas con tioacetamida sobre cultivos de fibroblastos

Para estudiar el efecto de los sueros de ratas control y de ratas tratadas con tioacetamida se procedió a la adición de estos sueros sobre cultivos de fibroblastos. Los resultados expuestos en las figuras 28 y 29 ponen de manifiesto que al ir aumentando la concentración (2 %, 5 % y 10 %) de los diferentes sueros se produce una mayor inhibición en la proliferación de los fibroblastos (incorporación de timidina tritiada). La figura 28 representa la adición de suero procedente de ratas controles. La figura 29 se refiere a la adición de sueros procedentes de ratas tratadas con el hepatotóxico.

Como resumen de los datos obtenidos, la figura 30, muestra los perfiles de estas tres concentraciones (2 %, 5 % y 10 %) a diferentes tiempos de la administración de la tioacetamida. Puede observarse una inhibición producida por la adición de los sueros a las primeras horas de la administración del tóxico para aumentar a partir de las 12 horas. Después de este punto, la incorporación de timidina tritiada vuelve a bajar para ser, a las 24 horas, similar a la obtenida para los sueros control. A las 48 horas existe un ligero aumento con respecto a los controles.

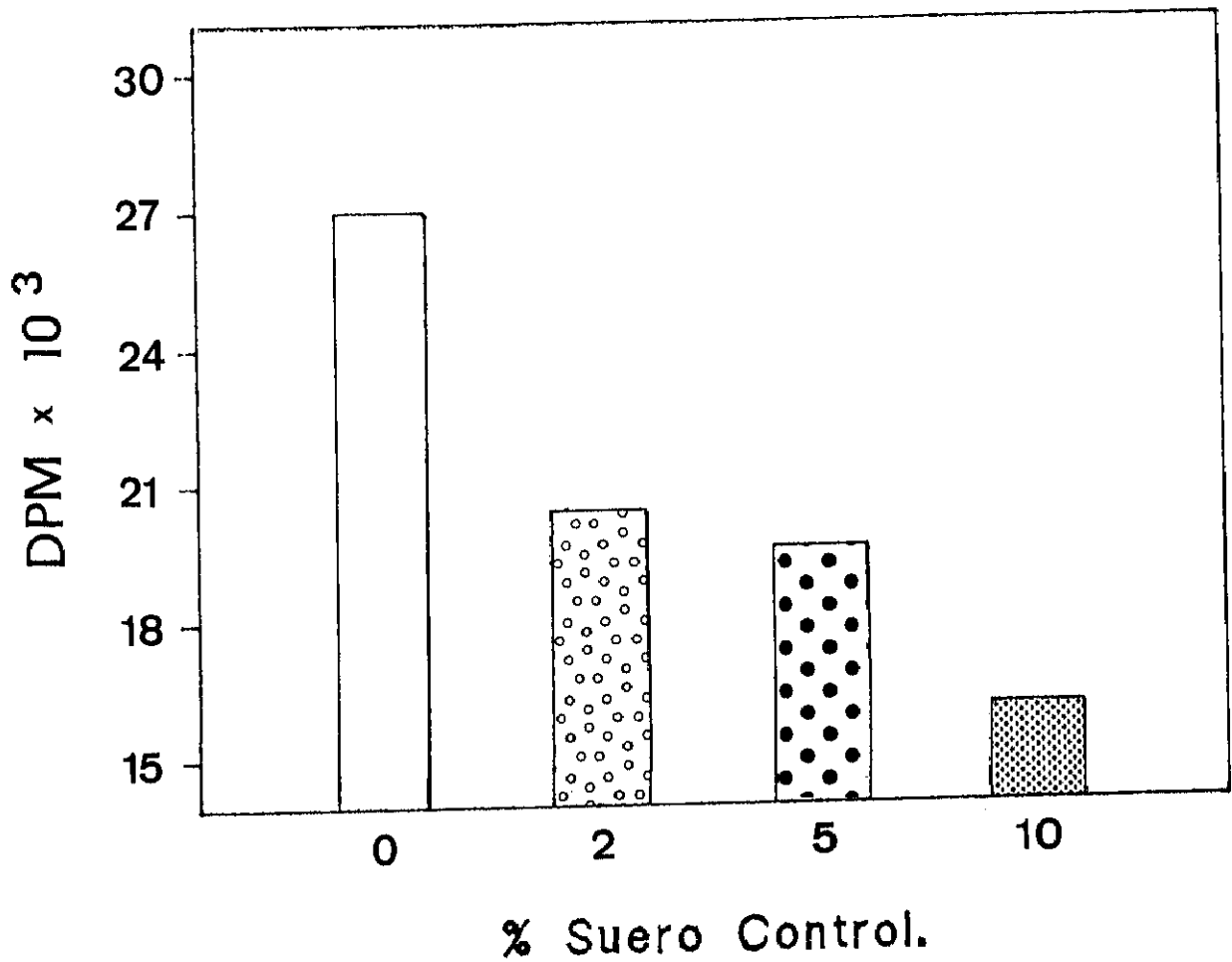


Figura 28.- Incorporación de timidina tritiada a cultivos de fibroblastos después de la adición de suero de ratas control a diferentes concentraciones.

- ninguna adición
- suero al 2 %
- suero al 5 %
- suero al 10 %

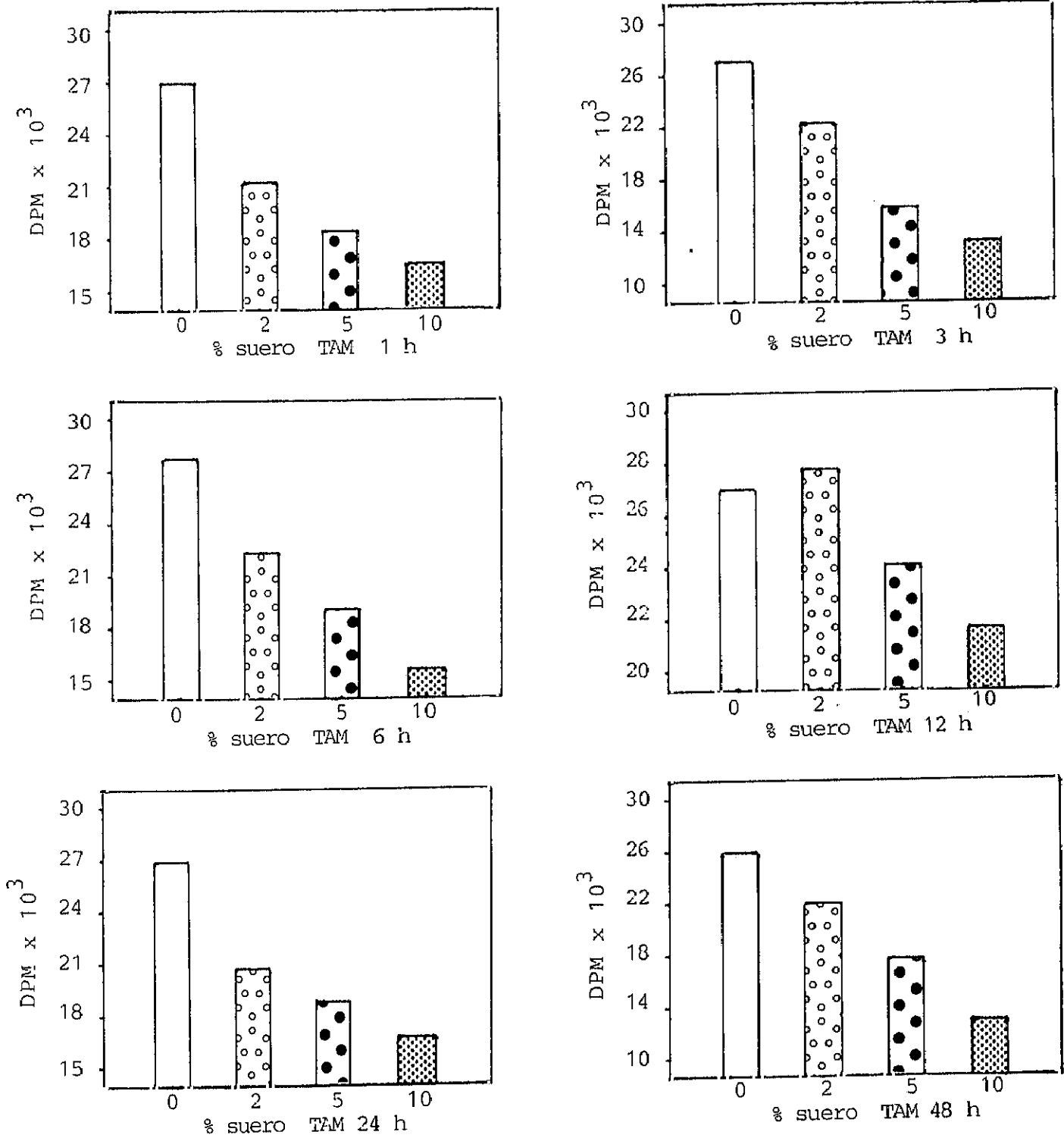
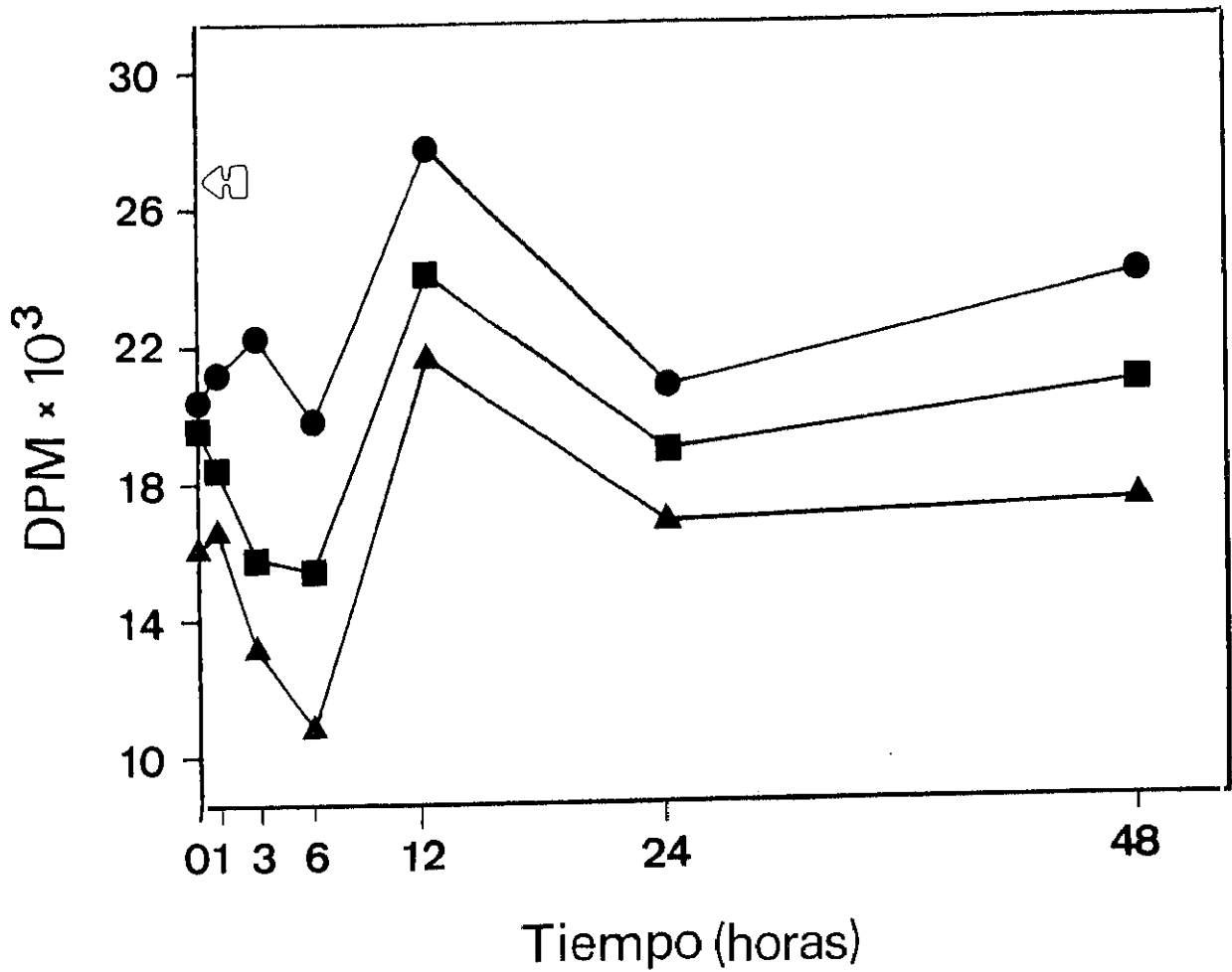


Figura 29.- Incorporación de timidina tritiada a cultivos de fibroblastos después de la adición de suero de ratas tratadas con tioacetamida a diferentes concentraciones.



Figra 30.- Perfiles de incorporación de timidina tritiada a cultivos de fibroblastos tras la adición de sueros a distintas concentraciones procedentes de ratas tratadas con tioacetamida.

- ☞ ninguna adición
- suero al 2 %
- suero al 5 %
- ▲-▲ suero al 10 %

3.6.- Acción del glucagón sobre enzimas relacionados con el metabolismo de carbohidratos

La unión de las hormonas y sus receptores sobre la superficie celular supone uno de los mecanismos reguladores más importantes. En el caso del glucagón, el efecto de la unión a su receptor, puede explicarse por la activación de la adenilato ciclasa, enzima que convierte el ATP en cAMP. El cAMP, a modo de segundo mensajero, transmite el mensaje desde la hormona a la célula.

3.6.1.- Efecto del glucagón *in vivo* sobre las actividades relacionadas con la degradación de carbohidratos

La Tabla 1 muestra el efecto del glucagón administrado *in vivo* en dosis de 0,1 nmol/Kg (10^{-7} M) a ratas control y a ratas 24 y 48 horas después de la dosis de TAM. El glucagón se administró i.p. a ratas 6 min antes del sacrificio. En la fracción soluble hepática se determinaron las actividades: glucógeno fosforilasa a, hexoquinasas, PFK-1, PFK-2, piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa. Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que en esta fase post necrótica, el hepatocito carece de respuesta a la acción del glucagón de inhibir las actividades de los enzimas glucolíticos y de activar los gluconeogénicos. En los controles, la glucógeno fosforilasa a aumenta por efecto del glucagón ($22 \pm 3 \rightarrow 37 \pm 4$; $p < 0,001$), mientras que la glucoquinasa ($20 \pm 2 \rightarrow 10 \pm 1$; $p < 0,001$), la PFK-2 ($125 \pm 10 \rightarrow 80 \pm 6$; $p < 0,001$) y la piruvato quinasa ($400 \pm 38 \rightarrow 166 \pm 5$; $p < 0,001$), disminuyen significativamente. Sin embargo, no existe respuesta al glucagón en estos enzimas de hígado tratado con TAM; a las 24 horas aún pudo observarse alguna respuesta en la glucógeno fosforilasa a ($66 \pm 7 \rightarrow 82 \pm 9$; $p < 0,001$), pero a las 48 horas ninguna de las actividades enzimáticas ensayadas mostró variación alguna. La lactato deshidrogenasa no exhibió variaciones en ninguna de las condiciones señaladas.

Tabla 1.- Efecto del glucagón *in vivo* sobre actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de carbohidratos en la fracción soluble de hígado de rata tratadas con tioacetamida.

enzimas	adicion	control	TAM 24 horas	TAM 48 horas
GPA	---	22 ± 3	66 ± 7	65 ± 7
GK	---	20 ± 2	6 ± 1	6 ± 1
PFK-1	---	18 ± 2	26 ± 2	45 ± 5
PFK-2	---	125 ± 10	113 ± 12	108 ± 12
PK	---	400 ± 38	290 ± 28	326 ± 33
LDH	---	8749 ± 780	8898 ± 790	8987 ± 921
GPA	Glucagón	37 ± 4*	82 ± 9*	65 ± 3
GK	"	10 ± 1*	5 ± 1	6 ± 1
PFK-1	"	17 ± 2	21 ± 2	57 ± 6
PFK-2	"	80 ± 6*	115 ± 11	112 ± 10
PK	"	166 ± 5*	300 ± 29	360 ± 30
LDH	"	8868 ± 890	8630 ± 690	9047 ± 820

El glucagón se administró *in vivo* a ratas 6 minutos antes del sacrificio, en dosis de 0,1 $\mu\text{mol/Kg}$. Las actividades enzimáticas se determinaron en la fracción soluble hepática. Los resultados se expresan en nanomoles de sustrato transformado por minuto por mg de proteína y son media \pm SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. * $p < 0,001$.

3.6.2.- Efecto del glucagón sobre la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos aislados

En la Figura 31 se muestra el efecto del glucagón al ser incubado a 37 °C con hepatocitos aislados y suspendidos en medio DMEM. El glucagón, a la concentración de 10^{-7} M, se añadió a las suspensiones de hepatocitos aislados de ratas control y de hepatocitos aislados de ratas tratadas con tioacetamida (48 horas). A diferentes tiempos 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, se tomaron muestras que fueron inmediatamente centrifugadas en Eppendorf y el sedimento celular obtenido de cada una de ellas, se congeló con N₂ líquido. Posteriormente se extrajo con NaOH 50 mM y se calentó durante 10 minutos a 80 °C. En el extracto obtenido se determinó la concentración de la fructosa 2,6-bis fosfato. Los resultados que se muestran en la Figura 31, están representados en concentraciones de Fru(2,6)P₂ frente al tiempo de actuación del glucagón. Se observa, en el caso de los hepatocitos control, una progresiva caída de las concentraciones de este metabolito ocasionada por efecto del glucagón. Las diferencias fueron muy significativas ($p < 0,001$) a partir de los 6 minutos. Sin embargo, en hepatocitos tratados con tioacetamida no se registraron variaciones, es decir, el glucagón no ejerce efecto alguno inhibitor sobre la PFK-2, o bien, la isoenzima PFK-2 existente en los hepatocitos en regeneración es insensible a la acción inhibitora del glucagón.

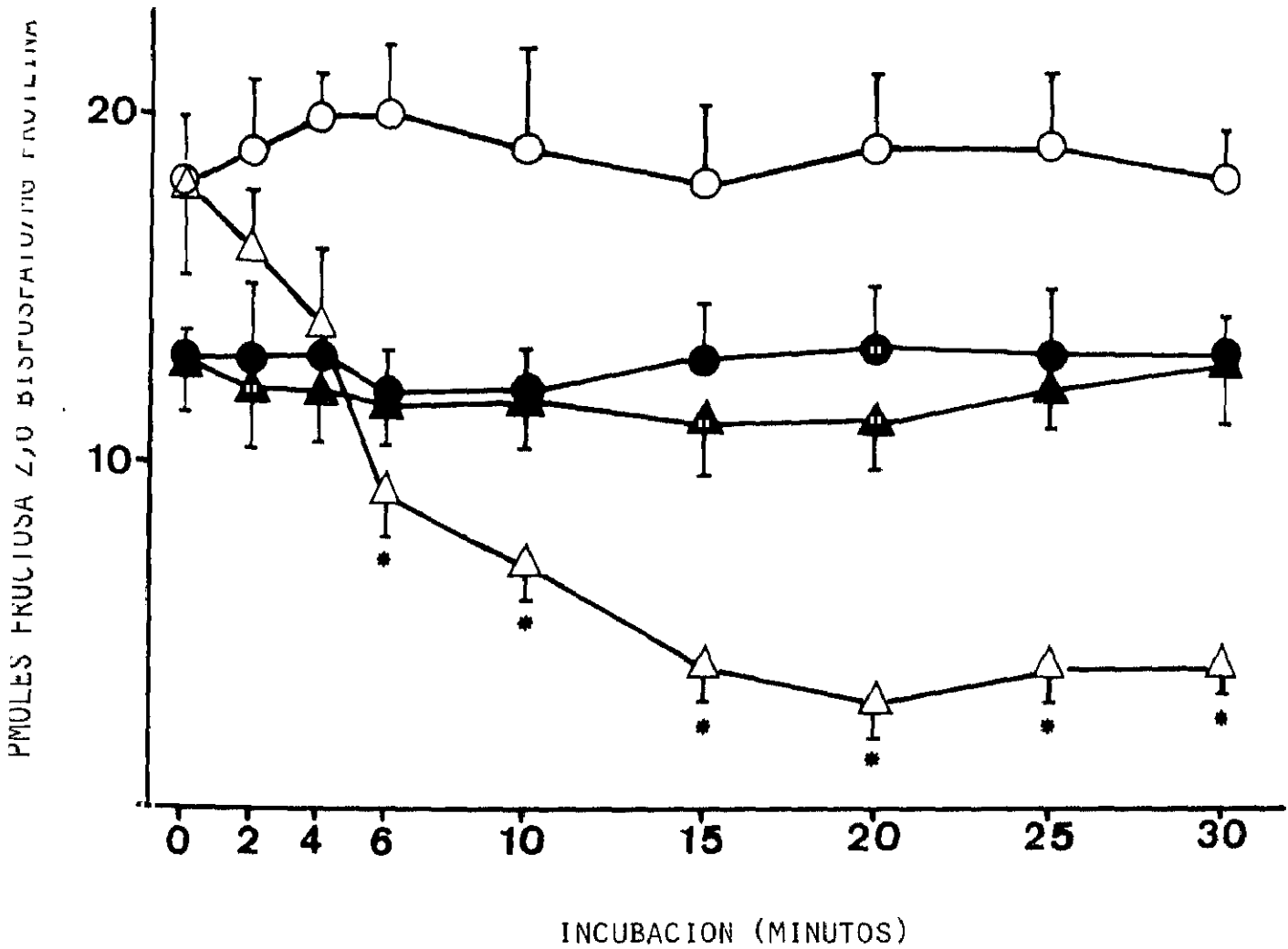


Figura 31.- Efecto del glucagón sobre la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos.

○---○ Control; △---△ Control + glucagón (10^{-7} M).

●---● TAM; ▲---▲ TAM, + glucagón (10^{-7} M).

Los resultados son media \pm SD de duplicados de cuatro experimentos diferentes. * $p < 0,001$.

3.7.- Fructosa 2,6-bisfosfato y actividad PFK-2 en cultivos primarios de hepatocitos. Efecto del PMA, bombesina e insulina

Cultivos primarios de hepatocitos de ratas control y ratas tratadas con tioacetamida se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina para observar si la activación directa de la proteína quinasa C por el PMA o la activación inducida por intercambio de los fosfoinositoles por la bombesina, afectaba la actividad de la PFK-2 y el contenido de la fructosa 2,6-bisfosfato. En la Figura 32 se muestra el efecto del PMA, bombesina e insulina sobre la concentración de la fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos de ratas no tratadas (32A) y tratadas con tioacetamida (32B) incubados a 37 °C por periodos de 2 y 4 horas. En hepatocitos tratados con tioacetamida la fructosa 2,6-bisfosfato mostró un marcado y progresivo incremento por efecto de estas sustancias durante las cuatro primeras horas de incubación. Sin embargo, en hepatocitos de ratas no tratadas el PMA no afectó en absoluto la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato.

El incremento en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos en cultivo de ratas tratadas con tioacetamida en respuesta al PMA, bombesina e insulina dependió del tiempo de incubación y requirió al menos cuatro horas para alcanzar estabilidad (Figura 32B). Los cambios observados en el contenido en fructosa 2,6-bisfosfato después de la exposición de los hepatocitos de ratas control y tratadas con tioacetamida a estos ligandos (bombesina, insulina y PMA en el caso de hepatocitos tratados con tioacetamida), siguieron pautas casi idénticas durante las cuatro horas de incubación. Por el contrario, en los hepatocitos control, cuando se incubaron en presencia de PMA, no se percibieron cambios en el contenido de fructosa 2,6-bisfosfato. Sin embargo, la bombesina retuvo su capacidad para promover una elevación en la concentración de este metabolito en hepatocitos

control al igual que en los tratados con tioacetamida (Figura 31A). Tanto el PMA como la bombesina promueven la activación de la proteína quinasa C, bien directamente, (como el PMA) (Azhar y col, 1987) o indirectamente a través de metabolitos derivados de los fosfoinositoles (como la bombesina) (Hasegawa-Sasaki y col, 1988). La insulina produjo en ambos grupos, control y TAM, un incremento en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato (Probst y Unthan-Fechner, 1985; Muller y col, 1988).

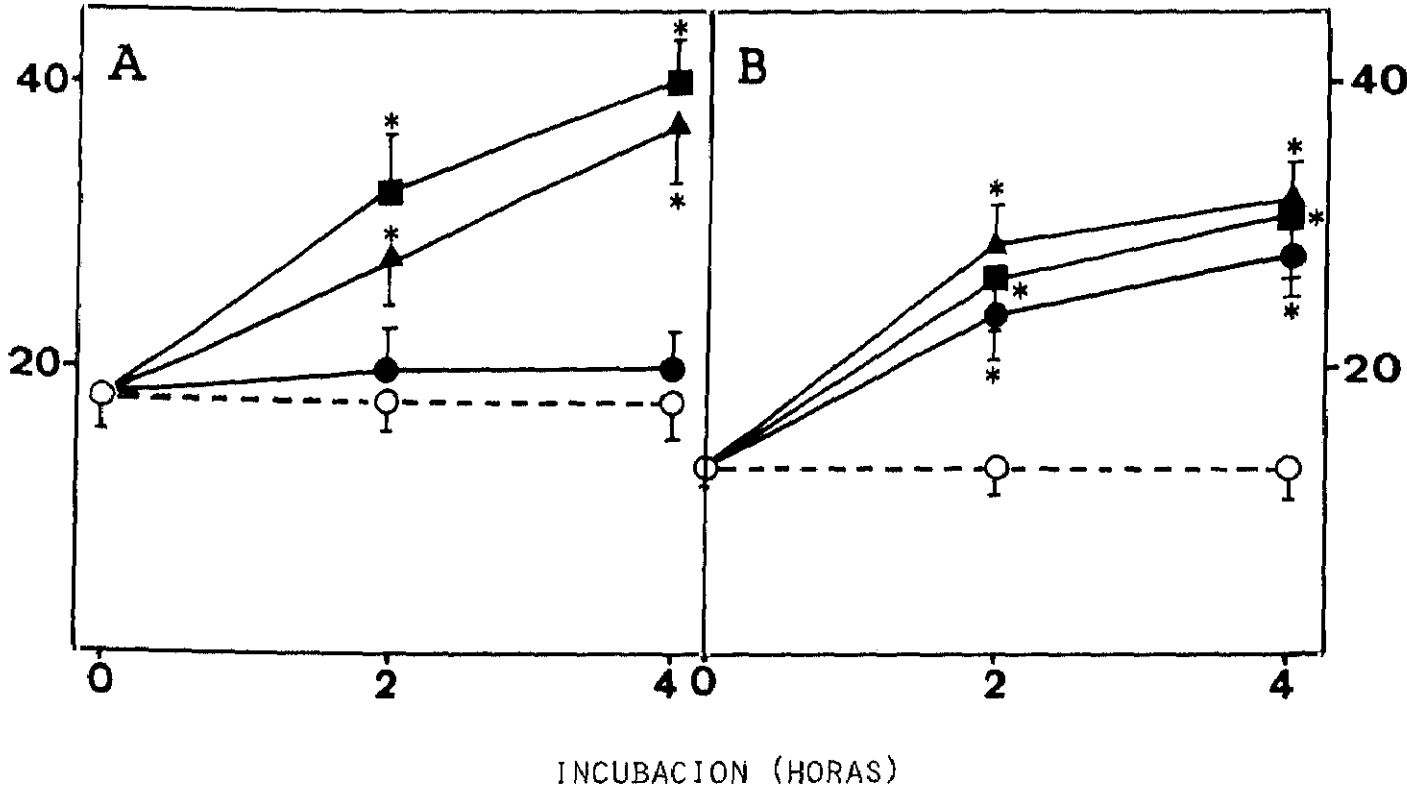


Figura 32.- Formación de fructosa 2,6-bisfosfato en cultivos primarios de hepatocitos control (A) y tratados con tioacetamida (B). Efecto del PMA, bombesina e insulina. ● --- ● PMA 160 nM; ■ --- ■ bombesina 100 nM; ▲ --- ▲ insulina 100 nM y ○ --- ○ nada. Las células se incubaron en medio DMEM suplementado con BSA exento de ácidos grasos. Al cabo de dos horas se reemplazó el medio y se incubaron las células de 1 a 4 horas en presencia de las sustancias indicadas. Los resultados son media \pm SD de duplicados de cuatro experimentos diferentes. * $p < 0,001$.

En las Tablas 2, 3 y 4 se muestran, respectivamente, las concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato, la liberación de lactato y la actividad PFK-2 en hepatocitos de ratas tratadas con tioacetamida y de ratas control incubados durante 4 horas en presencia de PMA, bombesina e insulina y también cuando la bombesina y la insulina se incubaron junto con el PMA. La fructosa 2,6-bisfosfato se incrementó significativamente por efecto del PMA en hepatocitos de ratas tratadas con tioacetamida (215 %; $p < 0,001$), mientras que en hepatocitos de ratas control el PMA no mostró efecto alguno sobre el contenido en fructosa 2,6-bisfosfato. Los cambios observados en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato después de la exposición de los hepatocitos de ratas TAM o controles a factores de crecimiento como la bombesina (10^{-7} M) o la insulina (10^{-7} M) fueron en ambos casos casi idénticos. Tanto en hepatocitos control como en los TAM, la fructosa 2,6-bisfosfato incrementó significativamente cuando se incubaron en presencia de bombesina (222 %; $p < 0,001$ y 230 %; $p < 0,001$, respectivamente), o insulina (211 %, $p < 0,001$ y 253 %; $p < 0,001$ en hepatocitos control y TAM, respectivamente) (Tabla 2). En hepatocitos tratados con TAM, la bombesina y la insulina, cuando se incubaron con PMA, mostraron un sinergismo aparente entre estos factores de crecimiento y el contenido en fructosa 2,6-bisfosfato, ya que se registraron incrementos significativos, tanto en el caso de la bombesina más PMA versus bombesina (146 %; $p < 0,001$) como en el caso de la insulina más el PMA versus insulina (170 %; $p < 0,001$) (Tabla 2).

Tabla 2.- Concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en cultivos primarios de hepatocitos incubados en presencia de PMA, bombesina e insulina.

Adiciones	pmoles/mg proteína	
	Control	TAM
Ninguna	18 ± 2 (100)	13 ± 1 (100)
PMA, 160 nM	20 ± 2 (111)	28 ± 3 (215)*
Bombesina, 100 nM	40 ± 5 (222)*	30 ± 4 (230)*
Bombesina, 100 nM + PMA, 160 nM	42 ± 4 (233)*	44 ± 4 (338)*
Insulina, 100 nM	38 ± 4 (211)*	33 ± 3 (253)*
Insulina, 100 nM + PMA, 160 nM	40 ± 5 (222)*	56 ± 6 (430)*

Cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas control y ratas tratadas con una dosis de tioacetamida (6,6mmoles/Kg), se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina a las concentraciones indicadas, a 37 °C durante cuatro horas. Los resultados, expresados en picomoles de fructosa 2,6-bisfosfato por mg de proteína, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

La Tabla 3 muestra las concentraciones de lactato liberado al medio en cultivos primarios de hepatocitos control y hepatocitos tratados con tioacetamida. Las variaciones en el lactato liberado fueron paralelas a las encontradas para la fructosa 2,6-bis fosfato intracelular. Por tanto, el PMA no influyó sobre la concentración de lactato en caso de los hepatocitos control, mientras que se registró una elevación significativa por efecto del PMA (147 %; $p < 0,05$) en el caso de los hepatocitos TAM. La bombesina y la insulina actuaron en ambas condiciones (control y TAM) produciendo incrementos significativos de lactato. Hay que resaltar que el lactato liberado en hepatocitos TAM, fue un 30% superior que el encontrado en los controles.

La actividad máxima de la PFK-2 (Tablas 4 y 5) se ha determinado a pH 8,5 en cultivos primarios de hepatocitos incubados durante cuatro horas en presencia de concentraciones a saturación de diversos ligandos (PMA, la bombesina y la insulina). Este intervalo de toma de muestras fue el elegido debido a los cambios importantes que tiene lugar durante este período de incubación (Martín-Sanz y col, 1989a). Como se observa en la Tabla 5, es evidente el incremento en la actividad de la PFK-2 en hepatocitos tratados con tioacetamida cuando se incubaron en presencia de PMA (168 %; $p < 0,01$). El débil incremento observado por efecto de la bombesina (126 %) y la insulina (136 %) no fue significativo. En hepatocitos control, el PMA no produjo cambios en la actividad de la PFK-2 (Tabla 4).

Tabla 3.- Concentración de lactato en cultivos primarios de hepatocitos incubados en presencia de PMA, bombesina e insulina.

Adiciones	pmoles/mg proteína	
	Control	TAM
Ninguna	62 ± 6 (100)	86 ± 6 (100)
PMA, 160 nM	59 ± 6 (95)	127 ± 10 (215)*
Bombesina, 100 nM	118 ± 10 (190)*	134 ± 11 (156)*
Bombesina, 100 nM + PMA, 160 nM	108 ± 12 (174)*	154 ± 16 (179)*
Insulina, 100 nM	118 ± 12 (190)*	130 ± 12 (151)
Insulina, 100 nM + PMA, 160 nM	118 ± 16 (190)*	154 ± 16 (179)*

Cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas control y ratas tratadas con una dosis de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg), se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina a las concentraciones indicadas, a 37 °C durante cuatro horas. Los resultados, expresados en micromoles de lactato liberado al medio por mg de proteína, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

Tabla 4.- Actividad de la PFK-2 en cultivos primarios de hepatocitos de rata control incubados en presencia de PMA, bombesina e insulina.

Adiciones	PFK-2 (pmol/min/mg proteína)	
	pH 8,5	pH 6,6
Ninguna	38 ± 2 (100)	19 ± 2 (100)
PMA, 160 nM	36 ± 4 (95)	18 ± 2 (95)
Bombesina, 100 nM	51 ± 4 (134)	27 ± 3 (142)
Bombesina, 100 nM + PMA, 160 nM	60 ± 5 (158)*	31 ± 3 (163)*
Insulina, 100 nM	52 ± 4 (136)	17 ± 2 (89)
Insulina, 100 nM + PMA, 160 nM	56 ± 4 (147)	37 ± 4 (195)*

Cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas macho adultas, se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina a las concentraciones indicadas, a 37 °C durante cuatro horas. Los resultados, expresados en picomoles de fructosa 2,6-bisfosfato formados por minuto y por mg de proteína, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

En las actividades de la PFK-2 a pH 6.6 (Tablas 4 y 5) no se encontraron variaciones significativas en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que indica que estos ligandos no producen diferencias en el estado de fosforilación de la proteína enzimática en el sitio de fosforilación de la proteína quinasa A. Sin embargo, la actividad PFK-2 a pH 8,5 (actividad total) se incrementó por efecto del PMA, en hepatocitos tratados con tioacetamida (Tabla 5) no en controles (Tabla 4), mientras que los otros ligandos, la bombesina y la insulina produjeron incrementos en esta actividad en hepatocitos de ambos grupos. La Tabla 6 muestra el cociente entre ambas actividades de la PFK-2 a pH 8,5/pH 6,6 en la cual parece ser que ninguno de estos agentes produce un cambio cinético aparente en la actividad de este enzima.

Tabla 5.- Actividad de la PFK-2 en cultivos primarios de hepatocitos de rata tratada con tioacetamida incubados en presencia de PMA, bombesina e insulina.

Adiciones	PFK-2 (pmol/min/mg proteína)	
	pH 8,5	pH 6,6
Ninguna	19 ± 2 (100)	10 ± 1 (100)
PMA, 160 nM	32 ± 3 (168)*	18 ± 2 (180)*
Bombesina, 100 nM	24 ± 2 (126)	17 ± 2 (170)
Bombesina, 100 nM + PMA, 160 nM	32 ± 3 (168)*	18 ± 1 (180)*
Insulina, 100 nM	25 ± 3 (136)	14 ± 1 (149)
Insulina, 100 nM + PMA, 160 nM	34 ± 2 (178)*	17 ± 2 (170)

Cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas macho adultas tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (6,6mmol/Kg), se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina a las concentraciones indicadas, a 37 °C durante cuatro horas. Los resultados, expresados en picomoles de fructosa 2,6-bisfosfato formados por minuto y por mg de proteína, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

Tabla 6.- Cociente entre las actividades enzimáticas de la PFK-2 a pH 8,5 y pH 6,6 en hepatocitos de rata incubados en presencia de PMA, bombesina e insulina.

Adiciones	Cociente pH 8,5/6,6	
	Control	TAM
Ninguna	2,0 ± 0,2 (100)	1,9 ± 0,2 (100)
PMA, 160 nM	2,0 ± 0,2 (100)	1,6 ± 0,1 (84)
Bombesina, 100 nM	1,9 ± 0,1 (95)	1,4 ± 0,1 (74)
Bombesina, 100 nM + PMA, 160 nM	1,9 ± 0,1 (95)	1,7 ± 0,1 (89)
Insulina, 100 nM	3,1 ± 1,8 (155)	1,8 ± 0,2 (95)
Insulina, 100 nM + PMA, 160 nM	1,5 ± 0,2 (75)	2,0 ± 0,2 (105)

Cultivos primarios de hepatocitos obtenidos de ratas macho adultas control y tratadas con una dosis subletal de tioacetamida (6,6 mmoles/Kg), se incubaron en presencia de PMA, bombesina e insulina a las concentraciones indicadas, a 37 °C durante cuatro horas. Los resultados, obtenidos por cálculo del cociente de las actividades enzimáticas de la PFK-2 a pH 8,5 y a pH 6,6, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

3.8.- Efecto de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del cAMP sobre la actividad de la PFK-2

Para observar diferencias en el estado de fosforilación de la PFK-2 debido al tratamiento con tioacetamida, el enzima purificado con Blue Sepharosa a partir de hepatocitos aislados de ambos grupos de ratas, se incubó con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del cAMP (PKA). En la Tabla 7 se muestran los valores de la actividad PFK-2 a pH 8,5 y a pH 6,6, lo que demuestra una vez más que, aunque el enzima de ratas control resultó inhibido cuando se ensayó a pH 6,6, no se observó cambio alguno a pH 8,5. Por el contrario, la actividad de la PFK-2 de hepatocitos tratados con tioacetamida no exhibió cambios a pH 6,6 cuando se incubaron en presencia de PKA, mientras que la actividad total PFK-2 (pH 8,5) incrementó notablemente por efecto de la PKA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro laboratorio con enzima fetal (Martín-Sanz y col, 1987a).

Tabla 7.- Actividad PFK-2 en hepatocitos aislados de ratas tratadas con tioacetamida. Efecto de la proteína quinasa A (PKA).

Hepatocitos Adiciones		PFK-2 (pmoles/min/mg proteína)		
		pH 8,5	pH 6,6	pH 8,5/pH 6,6
Control	-----	38 ± 4	19 ± 1,6	2,0 ± 0,2
	PKA + ATP 1 mM	40 ± 3 (105)	8 ± 0,7* (42)	5,0 ± 0,6* (250)
TAM	-----	19 ± 2	10 ± 0,9	1,9 ± 0,1
	PKA + ATP 1 mM	21 ± 2 (110)	8 ± 0,7 (80)	2,6 ± 0,3 (136)

La PFK-2 de hepatocitos aislados de ratas control y tratadas con tioacetamida, purificada con Blue-Sepharosa, se incubó con 0,1 mUnidades de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, a 30 °C durante 10 minutos. Las muestras se utilizaron para determinar la actividad de la PFK-2 a pH 8,5 y a pH 6,6. Los resultados, expresados en picomoles de fructosa 2,6-bisfosfato formados por minuto y por mg de proteína, son media ± SD de cuatro determinaciones experimentales diferentes. La t de Student indica las diferencias estadísticas frente a ninguna adición. *p<0,001.

Los números entre paréntesis indican los porcentajes frente a ninguna adición.

3.9.- Efecto del *sn*-glicerol 3-fosfato sobre la actividad de la PFK-2

Es un hecho conocido que la actividad de la PFK-2 hepática es muy sensible a la inhibición por el *sn*-glicerol 3-fosfato (Probst y Unthan-Fechner, 1985). De acuerdo con esto, el efecto inhibitor del *sn*-glicerol 3-fosfato se ha evaluado sobre la actividad de la PFK-2 purificada con Blue-Sepharosa a partir de hepatocitos de ratas control y tratadas con tioacetamida. La actividad PFK-2 se ensayó con fructosa 6-fosfato 0,1 mM y ATP-Mg 0,5 mM a pH 7,1. Como se muestra en la Figura 33, la PFK-2 procedente de hepatocitos post necróticos, se inhibió en menor grado que la procedente de hepatocitos control, en presencia del *sn*-glicerol 3-fosfato. La K_i fue 0,2 y 3 mM, respectivamente para el enzima procedente de los hepatocitos control y los tratados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la PFK-2 procedente de hepatocitos fetales (Martín-Sanz y col, 1987a).

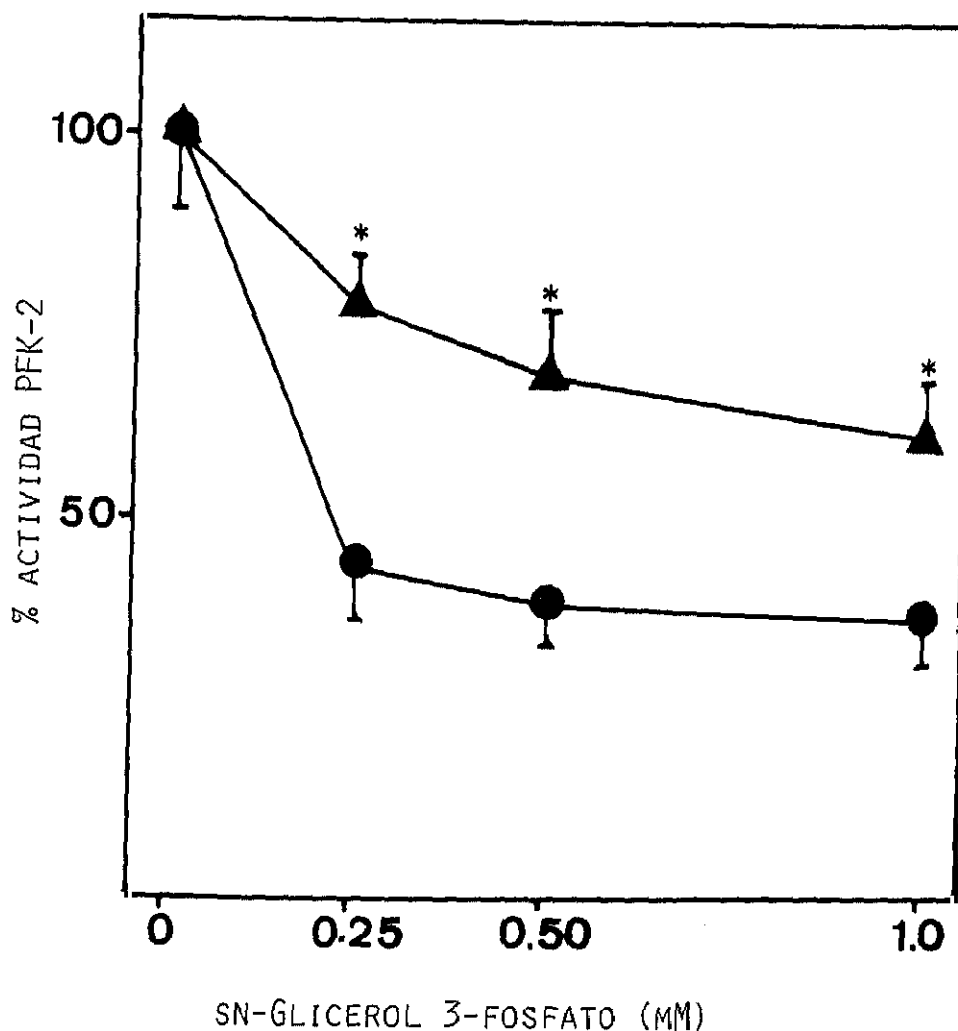


Figura 33.- Efecto del sn-glicerol 3-fosfato sobre la actividad de la PFK-2 en hepatocitos de ratas tratadas con tioacetamida. La actividad PFK-2 purificada con Blue-Sepharosa fue ensayada con fructosa 6-fosfato 0,1 mM y ATP-Mg 0,5 mM a pH 7,1. Las actividades específicas de hepatocitos control (●) y tratados con TAM (▲) correspondientes a los valores 100 % fueron 38 ± 4 y 19 ± 2 pmol/min/mg proteína, respectivamente. Los resultados son media \pm SD de duplicados de cuatro experimentos diferentes. * $p < 0,001$.

3.10.- Actividades hexoquinasas y glucoquinasa en la fracción soluble de hígado de rata

La Figura 34 muestra las actividades de las hexoquinasas, y la glucoquinasa, enzimas encargados de fosforilar la glucosa. Se determinaron por sus distintas afinidades por la glucosa (100 mM y 0,5 mM) y por la fructosa (33 mM), en la fracción soluble de hígado en distintos momentos después del tratamiento con tioacetamida: 12, 24, 36 y 48 horas.

La disminución relativa de la actividad de la hexoquinasa de alta Km (100 mM) o glucoquinasa, registrada a las 12 horas de la administración del tóxico, contrasta con el significativo incremento, muy notable a las 36 y 48 horas, de la hexoquinasa de baja Km (0,5 mM) y de la correspondiente a la fructosa (33 mM). En los mismos homogenados se evaluó la actividad de la lactato deshidrogenasa, la cual no mostró variaciones aparentes en ningún caso.

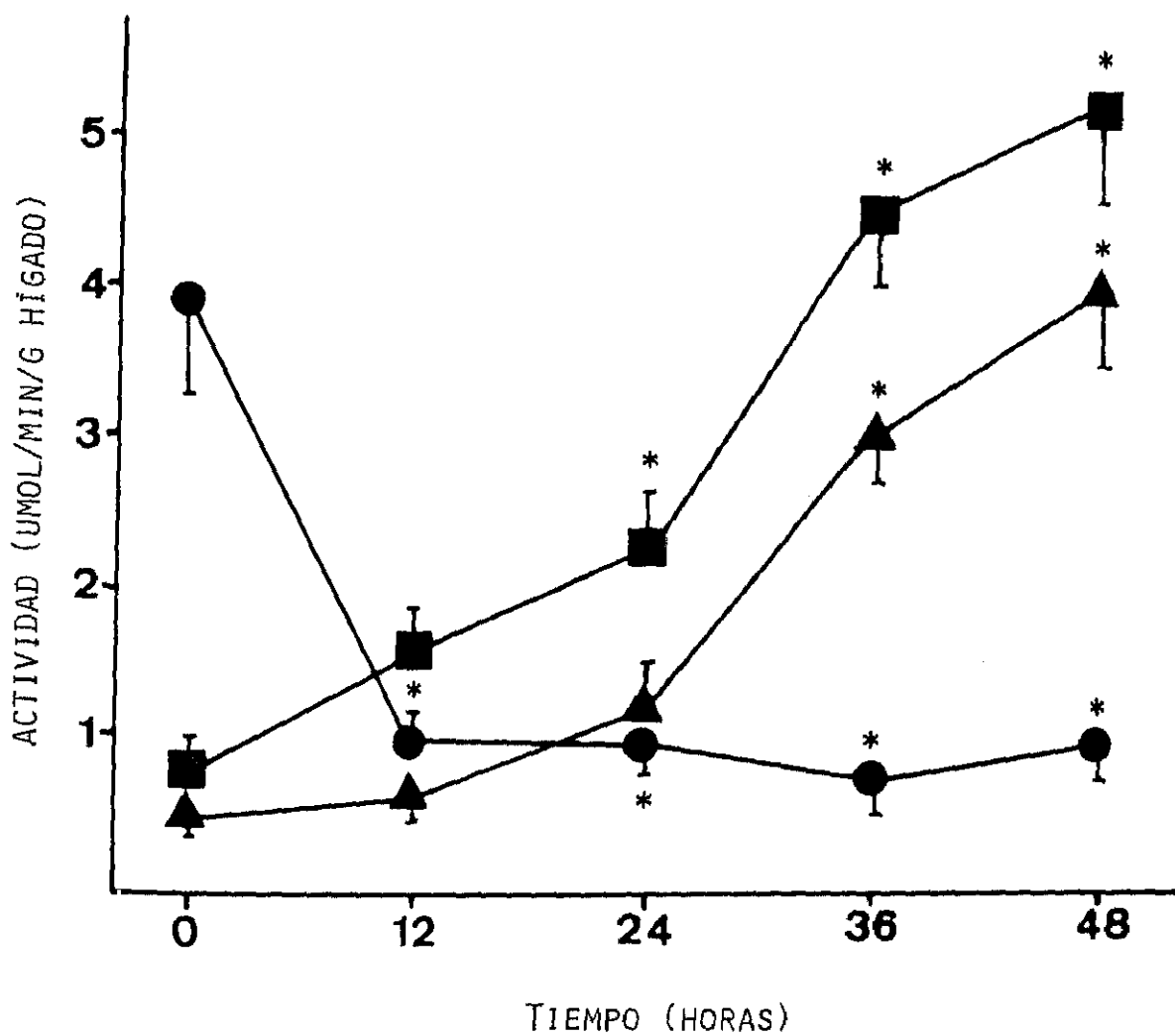


Figura 34.- Actividad de las hexoquinasas a diferentes tiempos después de la administración de tioacetamida.

La actividad se expresa en μ moles de glucosa o fructosa 6-fosfato formados por minuto y por gramo de hígado. ●---● glucosa 100 mM (glucoquinasa); ▲---▲ glucosa 0,5 mM; ■---■ fructosa 33 mM. * $p < 0,001$.

3.11.- Glucógeno hepático y glucosa plasmática

La Figura 35 muestra las concentraciones de glucógeno hepático y glucosa plasmática a distintos tiempos después de la administración de tíoacetamida: 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. Después de la brusca caída en la concentración de glucógeno a las seis horas se registró un descenso progresivo mostrando a las 36 y 48 horas niveles significativamente bajos. La concentración de glucosa plasmática, por el contrario, mantuvo concentraciones muy cercanas a la normalidad con la excepción de un discreto incremento en las primeras seis horas del tratamiento.

La concentración de glucógeno se expresa en g por 100 g de hígado, que se determinó, tanto en extractos de hígado control como en los de hígado TAM. Hay que destacar un pequeño, pero agudo incremento con un pico a las 3 horas, en momentos previos a la dramática caída que tiene lugar a las 6 horas con valores cercanos al 25 %; a partir de aquí la disminución es continua y progresiva alcanzando a las 48 horas valores inferiores al 10 % del valor normal de glucógeno hepático.

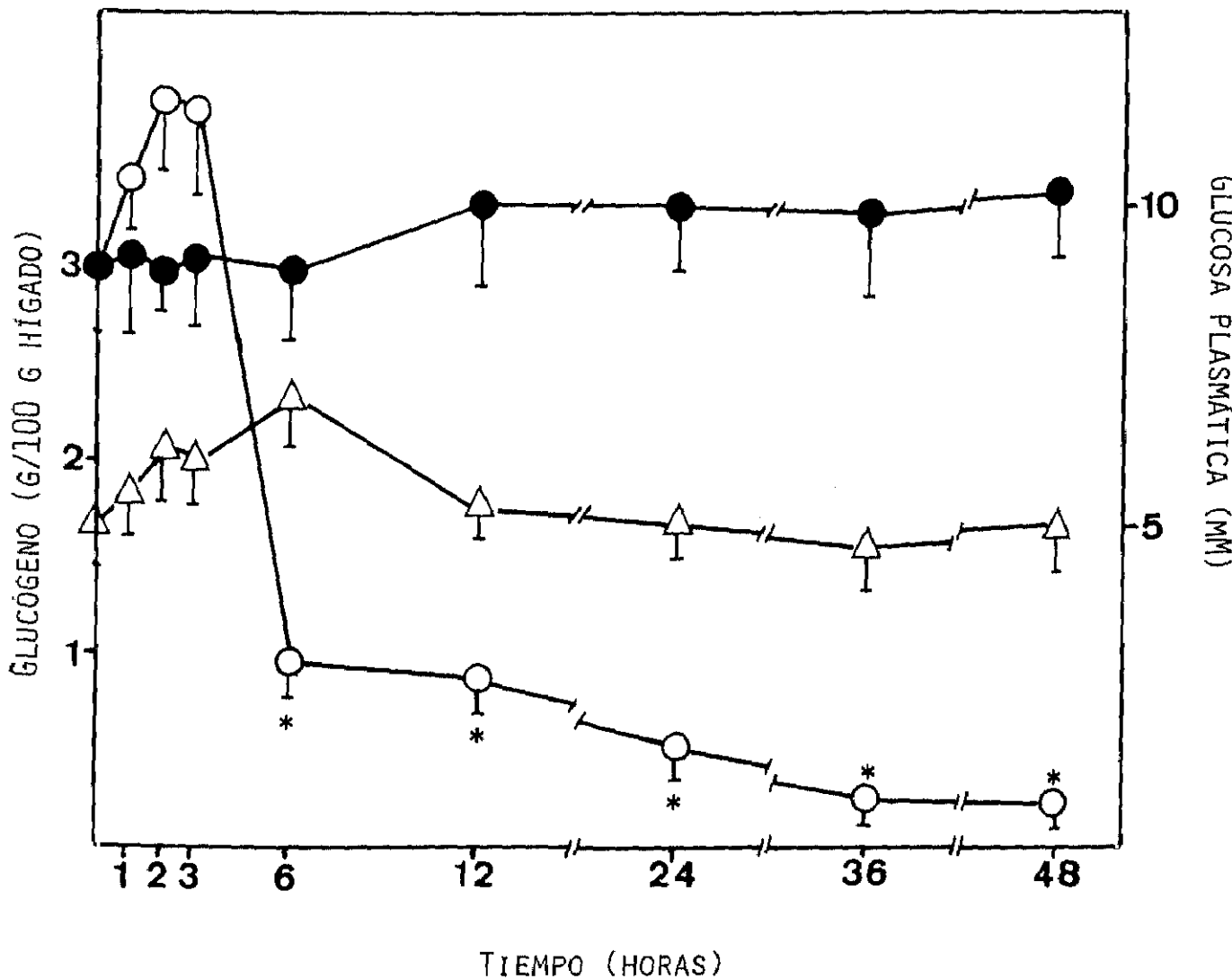


Figura 35.- Cambios en el glucógeno hepático (g/100 g hígado) y glucosa en plasma (mM) a 1, 3, 6, 24, 30 y 48 horas de la administración de tioacetamida. La tioacetamida, en dosis de 6,6 mmoles/Kg, fue administrada intraperitonealmente.

● --- ● glucógeno en hígado de ratas control.

○ --- ○ glucógeno en hígado de ratas tratadas con tioacetamida.

△ --- △ glucosa en plasma de ratas tratadas con tioacetamida.

Los resultados son media \pm SD de duplicados de cuatro experimentos diferentes. * $p < 0,001$.

4.- DISCUSION

La destrucción selectiva de los hepatocitos centrilobulares producida por una dosis subletal de tioacetamida y el estado proliferativo del hígado en regeneración que sigue inmediatamente a la necrosis, ha sido utilizado en el presente trabajo como medio para estudiar la respuesta hepática frente a la agresión de un agente tóxico en su doble aspecto: destrucción celular y regeneración hepatocelular. La necrosis hepática ocasionada por agentes químicos hepatotóxicos se ha relacionado con una serie de eventos; el primero de ellos es la formación de especies químicas reactivas derivadas de la biotransformación del tóxico en el interior de la célula funcional hepática. La gran reactividad de estos metabolitos, en nuestro caso la tioacetamida S-óxido y sus derivados, ocasiona alteraciones en el estado redox celular, en los niveles del glutatión, en las lipoproteínas membranales y en la concentración de calcio intracelular. La necrosis hepática se ha asociado con elevaciones en el contenido de calcio en el hepatocito y en el caso de la necrosis inducida por la tioacetamida, este incremento tiene lugar entre las 18 y las 24 horas de la administración de una dosis necrogénica de esta hepatotoxina (Landon y col, 1986). Este momento coincide, según nuestros resultados con el punto de máxima necrosis.

La regeneración hepatocelular y la restauración hepatolobular que tiene lugar inmediatamente después de la pérdida de células hepáticas por acción del hepatotóxico tioacetamida, se ha tratado de establecer cronológicamente en el modelo experimental del presente trabajo.

4.1. Necrosis hepatocelular y lesión hepática inducida por tioacetamida.

El estudio histopatológico de cortes de hígados obtenidos a dis-

tintos tiempos después de la administración del hepatotóxico tioacetamida, ha podido demostrar que tanto la necrosis hepatocelular como el proceso regenerativo que tiene lugar inmediatamente después, se ponen de manifiesto con una gran claridad a nivel morfológico. La necrosis hepática masiva, que a nivel histopatológico presenta su máximo a las 24 horas de la administración de la hepatotoxina, coincide con el punto de máxima actividad de los enzimas marcadores de la necrosis. Los enzimas ensayados en suero fueron las aspartato y alanina aminotransferasas y la isocitrato deshidrogenasa NADP, cuyos valores, a las 24 horas de la intoxicación, fueron 14, 7, y 27 veces, respectivamente, los correspondientes de estas actividades enzimáticas en condiciones normales. Los cambios observados en las actividades aminotransferasas fueron relativamente débiles hasta las 12 horas, momento en el que se registró una brusca elevación hacia el punto de máxima actividad alcanzado a las 24 horas. También la isocitrato deshidrogenasa presentó variaciones poco apreciables en los momentos iniciales y fue a las 6 horas de tratamiento cuando se observó una brusca elevación que alcanzó también su máximo a las 24 horas. Las actividades séricas de estos tres enzimas marcadores de necrosis descendieron en las muestras obtenidas a las 48 y a las 72 horas hasta valores cercanos a la normalidad.

Los enzimas marcadores de la lesión hepática determinados en el presente trabajo, han sido la gamma-glutamyl transferasa en suero y la glutathion S-transferasa en homogenado hepático. Ambas actividades alcanzaron los valores más elevados en los momentos coincidentes con el punto de máxima necrosis hepatocelular. Se sabe que la gamma-glutamyl transferasa (GGT) es un enzima extracelular cuya actividad se eleva en casos de enfermedad hepatobiliar, intoxicación etílica o estado preneoplásico (Cascales y col, 1991). La GGT es el único enzima conocido que cataliza la hidrólisis del enlace glutamilo del glutathion, lo que representa

el primer paso en la degradación del glutathion. El nivel hepático de este enzima es muy bajo; en nuestro caso la elevada actividad de la GGT puede, junto con la de la GST, ser la causa de la depleción transitoria del glutathion ocasionada por la administración del hepatotóxico tioacetamida. La disminución de la concentración intracelular de glutathion coincide también con los máximos de actividad de la GGT y la GST y es transitoria ya que al brusco descenso que se registra a las 6 horas continua a las 12 y las 24 horas, punto este último en el que se registra el mínimo de concentración con un tercio del valor normal. A partir de este momento la concentración de glutathion intrahepática aumenta a las 48 y 72 horas. En el caso de intoxicación crónica con tioacetamida los niveles de glutathion no experimentaron variaciones (Cascales y col, 1990a y 1991).

Los resultados obtenidos en los momentos iniciales de la intoxicación, se consideran de una gran utilidad a la hora de realizar el diagnóstico de la lesión hepática originada por la administración de un hepatotóxico y su conocimiento es importante cuando se trata de investigar la respuesta hepática frente a la lesión tóxica.

La concentración de malondialdehido se ha determinado en extractos hepáticos tratados con tioacetamida con el objeto de analizar el grado de lesión hepática referida a la peroxidación lipídica y a la degradación de las membranas plasmáticas inducidas por el o los metabolitos reactivos derivados de la biotransformación de este hepatotóxico. Los resultados nos muestran unos incrementos muy notables que se disparan a las 6 horas y que se mantienen especialmente elevados en el período que fluctua entre las 24 y 48 horas, para mas tarde descender. Glutathion y malondialdehido muestran perfiles inversos, pero el descenso del glutathion es anterior al incremento del malondialdehido, lo que está de acuerdo con el hecho de que una disminución de glutathion 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.

4.2. Análisis por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que se dedica al análisis multiparamétrico de un gran número de partículas y entre ellas los hepatocitos en suspensión; cuando se han aislado de ratas que han sufrido un ataque tóxico necrogénico, proporcionan un medio donde estudiar diferentes poblaciones de hepatocitos: hepatocitos remanentes, hepatocitos desdiferenciados en proliferación y hepatocitos recién divididos. Esta técnica es capaz de analizar cuantitativamente y con gran rapidez poblaciones celulares heterogéneas. La autofluorescencia emitida por la mayor parte de las células de mamíferos 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 (Thorell 1980, 1981, 1983; Shapiro, 1989). Esta autofluorescencia es paralela al estado redox de la célula (la fluorescencia verde indica el estado oxidado) y por consiguiente a su estado metabólico (Thorell 1980). El espectro de emisión de fluorescencia de las flavinas tiene un máximo a 530 nm. Nuestros experimentos se han realizado principalmente a 530 nm y los resultados obtenidos están de acuerdo con aquellos observados por Thorell (1983). Por tanto, las variaciones en la emisión detectadas a 530 nm en hepatocitos adultos y fetales, pueden ser debidas a variaciones en el estado redox de la célula. Los hepatocitos fetales mostraron a 530 nm una fluorescencia más baja, que se corresponde con un nivel energético más elevado, mientras que los adultos controles presentaron una fluorescencia elevada, índice de menor energía. El hígado de ratas, por efecto del tratamiento con tioacetamida en las condiciones del presente trabajo, 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 tienen que pasar por un proceso de dediferenciación en el que adquieren propiedades características de los hepatocitos fetales. Nuestros resultados obtenidos por citometría de flujo han permitido detectar a nivel celular, el efecto hepatotóxico de la tioacetamida y también observar, individualmente en un número considerable de hepatocitos, el grado de lesión hepática producida por este xenobiótico. 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.

Una de las aplicaciones más importantes de la citometría de flujo en clínica es la **determinación del DNA genómico** en poblaciones celulares cuya proliferación celular se encuentra alterada como sucede en el caso de tejidos tumorales. En general, el valor del contenido celular de DNA genómico interesa por dos razones: para determinar en una población celular la presencia de células aneuploides, y para conocer el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los hepatocitos normales presentan una estabilidad en cuanto a su contenido en DNA y organización cromosómica. Sin embargo, los hepatocitos en estado proliferativo (regenerantes) se encuentran involucrados en el proceso de reproducción a través del ciclo de división celular que incluye la síntesis programada del DNA para duplicar el DNA genómico de la célula antes de su división. Las células regenerantes, por tanto, poseen un contenido más elevado en DNA que las células quiescentes y este contenido puede variar en cada ciclo de acuerdo con la progresión en la síntesis de DNA. El contenido en DNA de las células que se incorporan al ciclo celular varía con-

tinuamente desde el valor inicial, ($2c$ = diploide), característico de las células en estado de reposo hasta dos veces el valor inicial ($4c$ = tetraploide), cuando se completa la replicación del DNA. El análisis del contenido del DNA de una población celular, una de las aplicaciones más importantes de la citometría de flujo proporciona dos clases de información: 1.- el valor del contenido del DNA genómico (ploidia o índice DNA) de una población celular normal, tumoral, quiescente o proliferante. 2.- la fracción celular que se encuentra en fase de síntesis del DNA (S) o la fracción que sufre la mitosis (M).

La determinación de la ploidia depende de la posición del pico G0-G1 de la muestra en relación con el pico G0-G1 de la población celular diploide utilizada como control. El análisis del ciclo celular requiere la división del histograma en tres áreas que representan las fases G0-G1, S y G2 + M y la integración del área que representa cada fase. La tinción de las células con fluorocromos, tales como el yoduro de propidio, combinado con el análisis cuantitativo célula a célula por citometría de flujo permite la determinación rápida del contenido en DNA de las células con el objeto de conocer, tanto el índice de DNA o ploidia, como la actividad proliferativa de la población.

El hígado regenerante es un modelo de proliferación celular masiva que presenta la propiedad, sobre las células tumorales de ser sincrónoma. En poblaciones de hepatocitos tratados con tioacetamida se ha evaluado la **cantidad de DNA** en cada una de las fases del ciclo celular. Los resultados obtenidos se han comparado con hepatocitos de ratas adultas y fetales. El proceso regenerativo, extraordinariamente rápido en hígado post-necrótico nos llevó a investigar acerca de las variaciones en el contenido de DNA hepatocitario a partir de la administración de una dosis subletal de un agente hepatotóxico como la tioacetamida. En nuestros experimentos se ha observado que 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 concuerda con el punto más elevado de la necrosis y la casi desaparición de la fracción tetraploide. Considerando que el punto mínimo de fracción G2 + M precede en horas al de máxima síntesis del DNA puede deducirse de estos resultados 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 población en fase G1 también se modifica durante el proceso de necrosis y regeneración, llegando a su máximo (94 %) a las 24 horas de la intoxicación, punto en el que el perfil de la distribución de las distintas poblaciones cambia hacia el típico fetal. Es curioso observar como este abrupto cambio de adulto a fetal se verifica en un período de seis horas, desde las 18 a las 24 horas de la intoxicación. Es por tanto interesante insistir que la necrosis afecta mayoritariamente a las poblaciones tetraploides y que es realmente la pérdida celular la que desencadena la síntesis del DNA. Queda por demostrar la vinculación entre la síntesis del DNA y la mitosis pues, a las 72 horas aún no se ha llegado a establecer el perfil adulto en las poblaciones de hepatocitos.

El mecanismo que controla la regulación de la iniciación de la mitosis es común a todos los eucariontes:

1.- La activación proteína quinasa p34, producto del gen *cdc2*, es el mecanismo central que induce a las células a entrar en mitosis. Esta quinasa fosforila proteínas clave necesarias para la mitosis. La actividad quinasa p34 mantiene a la célula en el estado M y para la salida de M se requiere la inactivación de p34 (fosforilación) y la acción de fosfatasas. 2.- p34 forma un com-

plejo con las ciclinas. Las ciclinas se requieren para la activación de p34 y se degradan (proteólisis) cuando las células salen de M lo cual contribuye a la inactivación de p34. 3.- La activación de p34 se asocia con la defosforilación de los residuos de tirosina y treonina. La permanencia de las células en la fase M depende de una proteína, la p80 producto del gen *cdc25*.

La vinculación entre las fases S y M está mediada a través de la p80 la cual activa a la p34. La intervención de p80 en esa vinculación puede explicar, parcialmente, las diferencias aparentes entre los ciclos proliferativos de las células somáticas y las células embrionarias en lo concerniente a los controles **feedback** y frenado, que generan las relaciones de dependencia dentro del ciclo celular. En células de embriones en las primeras fases de división, como ocurre en las regenerantes, el bloqueo de la replicación del DNA puede no prevenir que se verifique la mitosis. Con elevados niveles de p80 no es operativa la vinculación entre S y M que es lo que ocurre en células embrionarias. Sin embargo, en células somáticas, la p80 se encuentra limitada para establecer la dependencia S-M. Hemos observado que en los momentos iniciales de la intoxicación, la síntesis del DNA es tan baja como en los adultos control y ello hace que la mitosis sea también baja porque, al parecer existe una dependencia entre S y M. En hígado adulto esta dependencia va a proporcionar un acúmulo de células tetraploides. Cuando las células comienzan a dividirse en el proceso regenerativo adquieren propiedades de células embrionarias.

4.3. Efecto mitogénico del suero de rata después de la administración de tioacetamida.

Se sabe que la pérdida de hepatocitos origina la formación de factores de crecimiento séricos (Michalopoulos y col, 1982; Andus y col, 1991), que van a ser responsables de la proliferación

celular en el proceso regenerativo. Este efecto mitogénico se ha puesto de manifiesto en nuestro modelo experimental sometiendo cultivos secundarios de fibroblastos aislados de embrión de pollo, a la acción de suero de ratas obtenido después de la administración de tioacetamida. Se ha observado que el suero de ratas no tratadas (control) inhibe el crecimiento de fibroblastos en cultivo evaluado por incorporación de ³H-timidina. La aparición de estos factores de crecimiento en suero precedió en 12 horas el punto de máxima necrosis. Los valores obtenidos demuestran la existencia de estos factores que promueven la proliferación de células en cultivo. Sin embargo, no se sabe si el brusco descenso en la actividad mitogénica que se registra a las 24 horas sea debido a un descenso en la transcripción de estos activadores de la proliferación o más bien a una mayor aparición en suero de factores inhibidores que, se originan en etapas posteriores a los inductores con el objeto de evitar una proliferación celular incontrolada.

4.4. Calcio y proliferación celular.

Son muchos los autores que atribuyen al calcio el papel principal en la muerte celular inducida por xenobióticos (Orrenius y col, 1987 y 1988). Una elevación sostenida del calcio intracelular procedente del calcio extracelular y debida a alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática trae consigo la activación de una serie de enzimas degradativos: fosfolipasa A, glucógeno fosforilasa a, endonucleasas, etc, que ocasionarán la muerte celular. Sin embargo, la elevación del calcio intracelular debido a la cascada de reacciones ocasionadas por la acción de los factores de crecimiento sobre quinasas, fosfoinositoles, segundos mensajeros y liberación del calcio del retículo endoplásmico, origina una elevación transitoria del calcio citosólico que ayuda a la activación de proteína quinasas, especialmente la proteína quinasa C, cuya activación se encuentra involucrada en

la proliferación celular. En el presente trabajo se ha realizado una evaluación de los niveles intracelulares del calcio en poblaciones de hepatocitos obtenidos después de la administración de tioacetamida y se ha observado un incremento paulatino que alcanza su valor más elevado a las 14 horas.

4.5. Efecto de hormonas y mitógenos sobre la PFK-2.

En regeneración hepática post necrótica, al igual que en la inducida por hepatectomía parcial, tienen lugar cambios similares a los observados en hígado en respuesta al ayuno. Entre éstos, cabe destacar la desaparición del glucógeno por incremento de la glucogenolisis y una disminución del flujo glucolítico (Katz, 1979). Estos cambios están regulados por influencias hormonales. Durante la regeneración hepática se han descrito diversas transiciones de isoenzimas hepáticos de tipo adulto a otros isoenzimas que corresponden a un estado menos diferenciado. Esto ocurre con la glucoquinasa (Sato y col, 1969) y el tipo L de la piruvato quinasa (Bonney y col, 1973; Garnett y col, 1974), que sufren transiciones a formas isoenzimáticas menos diferenciadas. En el modelo experimental de regeneración hepática inducida por la tioacetamida, se ha investigado la sensibilidad a hormonas y mitógenos y se han analizado las variaciones en los niveles de glucógeno, en la actividad de enzimas glucogenolíticos y glucolíticos, en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato y en la actividad de la PFK-2 durante las primeras 48 horas después de la administración del tóxico. Se han determinado también las alteraciones en las propiedades reguladoras de este enzima para detectar una posible transición isoenzimática similar a la descrita por Loiseau y col (1988) en células de hepatoma.

Hay que destacar en nuestros resultados que, tanto los enzimas glucogenolíticos (la glucógeno fosforilasa a) como los glucolíticos (hexoquinasas, glucoquinasa, fosfofructoquinasa-1, fosfo-

fructoquinasa-2 y piruvato quinasa) ensayados, fueron insensibles al efecto inhibitor del glucagón que se administró *in vivo* a ratas 48 horas después de la tioacetamida y seis minutos antes del sacrificio. También, en cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas tratadas con tioacetamida, el glucagón no produjo respuesta alguna en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, metabolito que en condiciones normales disminuye significativamente por efecto del glucagón, debido al efecto inhibitor que produce esta hormona sobre la actividad de la PFK-2.

El control hormonal del metabolismo de carbohidratos en hepatocitos de mamíferos implica la interconversión entre las formas activa e inactiva de enzimas reguladores clave mediante la acción de proteína quinasa dependientes del cAMP y Ca^{2+} -calmodulina (Pilkis y col, 1988). La acción de agonistas α_1 , adrenérgicos está mediada a través de la hidrólisis del fosfatidilinositol-bisfosfato y la movilización del calcio (Berridge e Irvine, 1984). Los efectos del glucagón van también unidos a una elevación del calcio citosólico (Charest y col, 1983), en los cuales están involucrados mecanismos dependientes (Blackmore y Exton, 1986; Staddon, 1989) o no del cAMP (Wakelan y col, 1986), relacionados con la rotura de los inositol fosfolípidos.

Las diferencias más relevantes entre los hepatocitos de hígado en regeneración y los hepatocitos de hígado adulto control, se han observado en el mecanismo de respuesta de la proteína quinasa C posterior a la activación por los ésteres de forbol (PMA). Los hepatocitos control carecen de esta respuesta, mientras que las células hepáticas tratadas con tioacetamida (post necróticas) y los hepatocitos fetales (Martín-Sanz y col, 1989a), muestran un notable incremento en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato y en la actividad de la PFK-2 cuando se exponen a concentraciones de PMA en el rango de la activación máxima de la PKC (160 nM).

El mecanismo mediante el cual la presencia de PMA actúa elevando la concentración de la fructosa 2,6-bisfosfato y la actividad del enzima que lo produce, la PFK-2, en hepatocitos en regeneración inducida por una dosis necrogénica de un hepatotóxico, tiene que involucrar necesariamente al estímulo de la actividad de la proteína quinasa C, ya que este enzima es el receptor biológico de los ésteres de forbol. La comparación de los resultados obtenidos con este ligando (PMA) en hepatocitos de ratas tratadas con tioacetamida y de ratas control, como también de células hepáticas fetales (Cascales y col, 1992b), nos fuerza a pensar que la actividad de la PFK-2 en hepatocitos regenerantes y en fetales se encuentra controlada por esta proteína quinasa dependiente de calcio. Se ha demostrado que la proteína quinasa C activada interfiere con la unión de ligandos a los receptores α_1 de los hepatocitos (Corvera, 1986).

No se conoce todavía el mecanismo mediante el cual la activación de la proteína quinasa C por el PMA estimula la actividad de la PFK-2, aunque se ha demostrado la existencia de un efecto directo de la proteína quinasa C sobre el estado de fosforilación y sobre las propiedades catalíticas de la PFK-2 (Rider y Hue, 1986; Kitakawa y col, 1988). En nuestros experimentos, la incubación de los hepatocitos fetales con PMA, bombesina e insulina no ocasionó cambios en la afinidad de la PFK-2 por la fructosa 6-fosfato en el rango de pH entre 6,6 y 8,5. Sin embargo, la fosforilación de la PFK-2 de miocardio (la forma de 58 kDa) por la proteína quinasa C, produjo un incremento de dos veces la V_{max} en la PFK-2 sin afectar la afinidad de este enzima por su sustrato, la fructosa 6-fosfato (Kitakawa y col, 1988). A pesar de esto, la PFK-2 fetal se fosforila por la proteína quinasa C, pero ello no le hace exhibir cambio cinético alguno (Cascales y col, 1992b).

Se sabe que la bombesina induce una vía de transducción de señales, en la que interviene la activación de una fosfolipasa

específica de fosfatidil inositoles, que genera diacilglicerol en la membrana plasmática y un incremento en los niveles de calcio citosólico (Hasegawa-Sasaki y col, 1988). El diacilglicerol y el calcio son activadores de la proteína quinasa C (Nishizuka, 1984). Sin embargo, no parece probable la intervención de la proteína quinasa C en la elevación de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos no tratados (control), ya que la activación directa de la proteína quinasa C por el PMA no ocasionó la respuesta observada en el caso de la bombesina. El efecto de la bombesina sobre estas células puede explicarse a través de su capacidad de movilizar el calcio, y este elemento al estimular la degradación del glucógeno origina el incremento de la fructosa 2,6-bisfosfato. Otra posible explicación de la elevación de la actividad de la PFK-2 inducida por la bombesina podría ser que los cambios producidos por este mitógeno refuerzan la estabilidad de la proteína enzimática y con ello su respuesta a los ligandos.

Las elevaciones en el contenido de fructosa 2,6-bisfosfato y en la actividad de la PFK-2 producidas por la insulina son similares a las producidas por la bombesina, a pesar de que la insulina actúa por mecanismos independientes del calcio o de la proteína quinasa C. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Muller (1988) en hepatocitos cultivados durante 48 horas. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la insulina eleva la actividad PFK-2, pero es posible que sea mediante la estabilización del enzima, ya que en animales diabéticos la menor actividad PFK-2 se debe a una disminución en el contenido de la proteína enzimática, pero no en el de su mRNA (Crepin y col, 1988).

El análisis de la actividad de la PFK-2 mostró diferencias entre los enzimas procedentes de hígado de rata control o tratado con TAM. La incubación de la PFK-2 parcialmente purificada con la subunidad catalítica de la proteína quinasa A no modificó la

actividad enzimática en hepatocitos de ratas tratadas con tioacetamida. Además, la sensibilidad de la inhibición por el *sn*-glicerol 3-fosfato fue notablemente menor en el caso del enzima procedente de ratas TAM. A partir de estos resultados y de otros obtenidos anteriormente con hepatocitos fetales (Martín-Sanz y col, 1987a), puede deducirse que los hepatocitos en regeneración inducida por tioacetamida contienen, como los fetales, una forma de PFK-2 diferente a la que se encuentra en hígado control.

En sistemas secretores, los ésteres de forbol producen una respuesta limitada que puede aumentar considerablemente mediante la adición de un ionóforo del calcio (Abdel-Latif, 1986). En el hepatocito de 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 (Berridge e Irvine, 1984), incrementando el calcio citoplasmático desde 0,1-0,2 μM hasta 0,5-1,0 μM . El calcio activa la glucógeno fosforilasa quinasa y estimula la degradación del glucógeno, mientras que la proteína quinasa C inhibe la glucógeno sintetasa (Bourne y De Franco, 1989).

Estos mecanismos son los que han de estar implicados en la brusca disminución en la concentración de glucógeno, que se observa a las 6 horas de administrar el hepatotóxico, antes de la iniciación de la síntesis del DNA. También el incremento en los niveles de cAMP encontrados por Rosa y col (1991) en hígado en regeneración junto con la actividad de la proteína quinasa dependiente del cAMP, pueden contribuir a la degradación del glucógeno.

El calcio citoplasmático puede elevarse también por despolarización de la membrana abriendo los canales de calcio en la membrana plasmática (Reuter y Porzig, 1988). El diacilglicerol puede pro-

ceder de otros lípidos diferentes al fosfatidilinositol-bisfosfato. Por ejemplo, se ha descrito que la insulina estimula la actividad de la fosfolipasa C para hidrolizar un derivado complejo del fosfatidilinositol (Saltiel y col, 1986) que genera diacilglicerol y un segundo mensajero que activa la fosfodiesterasa dependiente del cAMP.

Numerosos ejemplos demuestran que la vía calcio-fosfoinositoles y la vía cAMP pueden ser divergentes en algunas células, mientras que en otras, sus acciones pueden ser paralelas (Berridge, 1987).

El cAMP y los segundos mensajeros de los fosfoinositoles actúan concertadamente para estimular la liberación de la glucosa hepática (Edelman y col, 1987). Las alteraciones inducidas por mitógenos en la concentración del calcio citoplasmático presentan un interés especial por desencadenar y regular la proliferación celular. La entrada de calcio en la célula por medio de un ionóforo simula la acción del EGF y del PDGF e induce la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-myc* (Moolenaar y col, 1986).

5.- CONCLUSIONES

1.- La administración intraperitoneal a ratas 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. Este punto fue determinado por observación de la morfología de cortes de hígado y por la elevación en suero de actividades enzimáticas marcadoras de la necrosis (GOT, GPT y ICDH).

2.- Los incrementos en la actividad de la glutathion S-transferasa y de la gamma-glutamyl transferasa unidos a la depleción de glutathion y a la concentración elevada de malondialdehído y de calcio intracelular, son pruebas de lesión hepática y lipoperoxidación. La depleción del glutathion (6h) precedió al incremento de malondialdehído (24-36h).

3.- La aparición de factores de crecimiento en suero de ratas tratadas con tioacetamida fué máxima a las 12 horas de administrar el hepatotóxico y mínima a las 24 horas, por tanto precede en 12 horas a la necrosis.

4.- Los hepatocitos aislados de hígado de ratas tratadas con tioacetamida muestran comportamientos diferentes al de los hepatocitos de rata adulta. Entre éstos hay que citar:

a) Por análisis citométrico del tamaño, complejidad y autofluorescencia a 530 nm se ha demostrado la existencia de poblaciones diferentes con características de adultos, fetales e intermedios.

b) El análisis citométrico del DNA genómico en las distintas fases del ciclo celular durante la necrosis y regeneración ha mostrado, a las 24 y 48 horas perfiles con una elevada analogía con los fetales.

c) La adición de glucagón a cultivos de hepatocitos de ratas con tioacetamida no produjo variación alguna en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, mientras que en hepatocitos control el efecto de esta hormona inhibió notablemente la formación de este metabolito. El glucagón administrado *in vivo* no produjo respuesta alguna en los enzimas: glucógeno fosforilasa a, hexoquinasa, glucoquinasa, PFK-2 y piruvato quinasa.

d) La concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos tratados con TAM fue un 30 % menor que en hepatocitos control, mientras que la liberación de lactato fue superior.

e) La PFK-2 purificada parcialmente de hepatocitos post necróticos fue poco sensible a la inhibición del *sn*-glicerol 3 fosfato.

f) En cultivos primarios de hepatocitos post necróticos, el PMA, al igual que la bombesina y la insulina, produjo un notable incremento en la actividad de la PFK-2 y la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato. Sin embargo, los hepatocitos control no respondieron a la acción del PMA.

5.- A las 6 horas de la administración de tioacetamida el glucógeno descendió bruscamente mostrando a las 48 horas niveles inferiores al 10 % del control. La glucosa plasmática no experimentó variaciones.

6.- Por efecto de TAM la glucoquinasa (glucosa 100 mM) descendió a las 6 horas, mientras que las hexoquinasas (glucosa 0,5 mM y fructosa 33 mM) incrementaron paulatinamente hasta alcanzar a las 36 y 48 horas actividades significativamente elevadas.

7.- Estos resultados sugieren la existencia de formas isoenzimáticas en hígado en regeneración post necrótica inducida por la tioacetamida análogas a las que se encuentran en hígado fetal.

6.- BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Latif A.A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of seconds messengers. *Pharmacol. Rev.* **38**, 227-272 (1986).
- Anderson M.E., R.J. Bridges y A. Meister. Durect evidence for interorgan transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves gamma-glutamyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 848-853 (1980).
- Andus T., J. Bauer y W. Gerok. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* **13**, 364-375 (1991).
- Anghileri L.J., M.C. Crone-Escanye, J.A. Martin y J. Robert. Calcium and ATPase activity during hepatic intoxication with thioacetamide. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **24**(5), 270-273 (1986).
- Asami O., I. Ihara, N. Shimidzu, S. Shimidzu, Y. Tomita, A. Ichihara y T. Nakamura. Purification and characterization of hepatocyte growth factor from injured liver of carbon tetrachloride-treated rats. *J. Biochem.* **109**, 8-13 (1991).
- Azhar S., J. Butte y E. Reaven. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat liver: subcellular distribution, purification and characterization of multiple forms. *Biochemistry* **26**, 7047-7057 (1987).
- Bellomo G, S.A. Jewell, H. Thor y S. Orrenius. Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6842-6846 (1982).
- Bergmeyer H.U., M. Grabl y H.E. Walter. Reagents for enzymatic analysis. Hexokinase. En : *Method of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn. Vol II, pp 222-223. Verlag Chemie. Weinheim (1984).
- Berridge M.J. y R.F. Irvine. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321 (1984).
- Berridge M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 159-193 (1987).
- Berridge M.J. y R.F. Irvine. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **167**, 19-24 (1989).

- Blackmore F.P. y J.H. Exton. Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum fluoride and glucagon. Modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* **261** 11056-11063 (1986).
- Bommer U.A., I. Junghahn y H. Bielka. The role of the cytosolic fraction and of initiation Factor e IF-2 for changes of the rate of protein synthesis during liver regeneration. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 445-450 (1987).
- Bonney R.J., H.A. Hopkins, P.R. Walker y V.R. Potter. Glycolytic isoenzymes and glycogen metabolism in regenerating liver from rats on controlled feeding schedules. *Biochem. J.* **136**, 115-124 (1973).
- Boobis A.R., D.J. Fawthrop y D.S. Davies. Mechanisms of cell death. *TIPS* **10**, 275-280 (1989).
- Bourne H.R. y A.L. De Franco. Signal transduction and intracellular messengers. En: *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer* (ed R.A. Weinberg) pp 97-124. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York (1989).
- Boynton A.L. y J.F. Whitfield. Stimulation of DNA synthesis in calcium-deprived T5113 liver cells by the tumor promoters fenobarbital, saccharin and 12-O-tetradecanoyl-forbol 13-acetate. *Cancer Res.* **40**, 4541-4545 (1980).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- Braun L., J.E. Mead, M. Panzica, R. Mikuno, G.I. Bell y N. Fausto. Transforming growth factor mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1539-1543 (1988).
- Brenner D.A., K.S. Koch y H.L. Leffert. Transforming growth factor a stimulates proto-oncogene *c-jun* expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes. *DNA* **8**, 279-285 (1989).
- Brown K.D., J. Blay, R.F. Irvine, J.P. Heslop y M.J. Berridge. Reduction of epidermal growth factor receptor by heterologous of phosphoinositides and the activation of Protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 377-384 (1984).
- Bucher N.L.D., U. Patel y S. Cohen. Hormonal Factors and liver growth. *Adv. Enzyme Reg.* **16**, 205-213 (1978).
- Bucher N.L.D. Thirty years of liver regeneration: a distillate. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* **9**, 15-26 (1982).

- Capiod T., A.C. Field, D.C. Ogden y C.A. Sandford. Internal perfusion of guinea-pig hepatocytes with buffered Ca^{2+} or inositol 1,4,5-triphosphate mimics noradrenaline activation of K^+ and Cl^- conductances. *FEBS Lett* **217**, 247-252 (1987).
- Carr B.I., I. Hayashi, E.L. Branum y H.L. Moses. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res* **46**, 2330-2334 (1986).
- Carrol N.V., R.W. Longley y J.H. Roe. The determination of glycogen in liver and muscle by the use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* **220**, 583-593 (1956).
- Cascales C., P. Martín-Sanz, R.A. Pittner, R. Hopewell, D.N. Brindley y M. Cascales. Effects of an antitumoural rhodium complex on thioacetamide-induced liver tumour in rats. Changes in the activities of ornithine decarboxylase, tyrosine aminotransferase and of enzymes involved in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2655-2661 (1986).
- Cascales C., L. Bosca, P. Martín-Sanz, D.N. Brindley y M. Cascales. Translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to microsomal membranes in thioacetamide-induced liver tumours in rats. *Toxicology Lett.* **47**, 9-16 (1989).
- Cascales M., B. Feijóo, S. Cerdán, C. Cascales y A. Santos-Ruiz. The effect of thioacetamide on urea cycle enzymes of rat liver. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **17**, 129-132 (1979).
- Cascales M., E.M. Robles-Chillida, B. Feijóo, S. Cerdán, P. Martín-Sanz y A. Santos Ruiz. Alteraciones producidas por la tioacetamida sobre las aminotransferasas GOT y GPT y la glutamato deshidrogenasa en hígado de rata. Estudio ultraestructural. *Rev. Esp. Fisiol.* **38**, Suppl., 105-112 (1982).
- Cascales M., P. Martín-Sanz y C. Cascales. Liver functionality and enzymes related to peroxidation in experimental hyperplastic noduligenesis. *3 Hepatologische Symp. Friedrich-Schiller Univ. Jena.* pp 185-196 (1990a).
- Cascales M. y P. Martín-Sanz. Regeneración Hepática. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias* vol. 13 CSIC, pp 129-146. Madrid (1990b).
- Cascales M., P. Martín-Sanz, D.G. Craciunescu, I. Mayo, A. Aguilar, E.M. Robles-Chillida y C. Cascales. Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis* **12**, 233-240 (1991).

- Cascales M., P. Martín-Sanz, A. Alvarez, M. Sánchez-Pérez, C. Díez-Fernández y L. Boscá. Isoenzyme of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis. *Hepatology*, en prensa (1992a).
- Cascales M., P. Martín-Sanz y L. Boscá. Phorbol esters, bombesin and insulin elicit differential responses on phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphate system in primary cultures of foetal and adult hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* (en prensa) (1992b).
- Cerdán S. Efecto de la tioacetamida sobre las rutas alternantes del metabolismo glucolítico en hígado de rata. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid (1978).
- Cerdán S., M. Cascales y A. Santos Ruiz. Effect of thioacetamide on the pentose phosphate pathway and other NADP-linked enzymes of rat liver cytosol. Chronology of perturbations and metabolic significance. *Mol. Pharmacol* 19, 451-455 (1981).
- Cobbold, P.H. y T.J. Rink. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmatic free calcium. *Biochem. J.* 248, 313-328 (1987)
- Cornell R.P., B.L. Liljequist y K.F. Bartizal. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* 11, 916-922 (1990).
- Corvera S., K.R. Schwarz, R.M. Graham y J.A. García-Sainz. Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell α_1 -adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* 261, 520-526 (1986).
- Costa A.K., T.M. Schieble, D.F. Heffel y J.R. Trudell. Toxicity of calcium ionophore A 23.187 in monolayers of hypoxic hepatocytes. *Toxicol Appl. Pharmacol* 87, 43-47 (1987).
- Crepin K.M., M.I. Darville, L. Hue y G.G. Rousseau. Starvation or diabetes decrease the content but not the mRNA of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS lett.* 227, 136-140 (1988).
- Crissman H.A., A.P. Stevenson, R.J. Kissane y R.A. Tobey. Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometric analysis. En: *Flow Cytometric and Sorting*. (Melamed M.R., P.F. Mullaney, M.L. Mendelsohn, eds). New York, John Wiley and Sons, 243-261 (1979).
- Cruise J.L., S.J. Knechtle, R.R. Bollinger, C. Kuhn y G. Michalopoulos. α_1 adrenergic effects and liver regenerator. *Hepatology* 7, 1189-1194 (1987).

- Charest R., P.F. Blackmore, B. Berthon y J.H. Exton. Changes in free cytosolic Ca^{2+} in hepatocytes following α_1 -adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* **258**, 8769-8773 (1983).
- Chieli E. y G. Mavaldi. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* **31**, 41-52 (1984).
- Chien K.R., S. Abrams, R.G. Pfau y J.L. Farber. *Am. J. Pathol.* **88**, 539-558 (1977).
- Dallas, C.E. y Evans, D.L. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* **345**, 557-558 (1990)
- Díez-Fernández C., L. Boscá y M. Cascales. Regeneración post-necrótica en hígado inducida por hepatotóxicos. En: *Mecanismos de Hepatotoxicidad* (M. Cascales). Instituto de España-Espasa Calpe. Madrid (1992).
- Dybing E., E. Soderlund, L.T. Haug y S.S. Thorgeirsson. Metabolism and activation of 2-acetylaminofluorene in isolated rat hepatocytes. *Cancer Res.* **39**, 3268-3275 (1979).
- Dyroff M.C. y R.A. Neal. Studies of the mechanism of metabolism of thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **23**, 219-227 (1983).
- Edelman A.M., D.K. Blumental y E.G. Krebs. Protein serine/threonine kinase. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 567-613 (1987).
- Ekberg S., L. Carlsson, B. Carlsson, H. Billig y J.O. Janson. Plasma growth hormone pattern regulates epidermal growth factor (EGF) receptor messengers ribonucleic acid levels and EGF binding in the rat liver. *Endocrinology* **125**, 2158-2166 (1989).
- Enat R., D.M. Jefferson, N. Ruiz-Opazo, Z. Gatmaitan, A. Leinwand y L.M. Reid. Hepatocyte proliferation "in vitro": its dependence of the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1411-1415 (1984).
- Farris M.W., G.A. Pascoe y D.J. Reed. Vitamin E reversal of the effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. *Science* **227**, 751-754 (1985).
- Fausto N. Messenger RNA in regeneration liver: implications for the understanding of regulated growth. *Mol. Cell Biochem.* **59**, 131-142. (1984).
- Fausto N. Hepatic Regeneration. En: *Hepatology, A textbook of Liver Disease*, 2nd ed., Zakim D y Boyer TD eds. (Philadelphia: WB Saunders Co), pp 49-65 (1990).

- Feingold K.R., M. Soued y C. Grunfeld. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis in the liver of intact rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 576-582 (1988).
- Fisher B., N. Gunduz, E.A. Saffer y S. Zheng. Relation of estrogen and its receptor to rat growth and regeneration. *Cancer Res.* **44**, 2410-2415 (1984).
- Fiske C.H. e Y. Subbbarow. *J. Biol. Chem* **81**, 629 (1929).
- Francavilla A., P. Ove, L. Polimeno, C. Sciascia, M.L. Coetza, y T.E. Starzl. Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. *Cancer Res.* **46**, 1318-1323 (1986).
- Francavilla A., P. Ove, L. Polimeno, C. Sciascia, M.L. Coetza, R. Pellicci y S. Todo. Different response to epidermal growth factor of hepatocytes in culture isolated from male and female rat liver: inhibitor effect of estrogen on binding and mitogenic effect of epidermal growth factor. *Gastroenterology* **93**, 597-605 (1987).
- Friedman J.M., E.Y. Chung y J.E. Darnell. Gene expression during liver regeneration. *J. Mol. Biol.* **179**, 37- (1984).
- Fujii H. y S. Miwa. Pyruvate kinase U.V. method. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp. 496-501. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- García-Sainz JA. y T. Hernández-Sotomayor. Inhibitors of protein kinase C block the α_1 -adrenergic refractoriness induced by phorbol 12-myristate 13-acetate, vasopressin and angiotensin. *Eur. J. Biochem.* **163**, 417-421 (1987).
- Garnett M.E., R.D. Dyson y F.N. Dost. Pyruvate kinase isozyme changes in parenchymal cells of regenerating rat liver. *J. Biol. Chem.* **249**, 5222-5226 (1974).
- Gaub J. y J. Iversen. Rat liver regeneration after 90 % partial hepatectomy. *Hepatology* **4**, 902-907 (1984).
- Gillette J.R. *Biochem. Pharmacol* **23**, 2785-2797 (1974).
- Gohda E., H. Tsubouchi, H. Nakayama, S. Horono, O. Sakiyama, K. Takahashi, H. Miyazaki, S. Hashimoto e Y. Daikuhara. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with hepatic failure. *J. Clin. Invest.* **81**, 414-419 (1988).
- Graf P., S. Vom Dahl y H. Sies. Sustained oscillations in intracellulaire calcium concentrations upon hormonal stimulation of perfused rat liver. *Biochem. J.* **241**, 933-936 (1987).

- Griffith O.W. y S.S. Tate. The apparent glutathione oxidase activity of gamma-glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* 255, 5011-5014 (1980).
- Gruppusso P.A. Expression of hepatic transforming growth factor receptor during late gestation in the foetal rat. *Endocrinology* 125, 3037-3043 (1989).
- Gruppusso P.A., J.E. Mead y N. Fausto. Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* 50, 1464-1469 (1990).
- Guguen-Guillouzo C., M.F. Szajnert y D. Glaise. Isozyme differentiation of aldolase and pyruvate kinase in foetal, regenerating, preneoplastic and malignant rat hepatocytes during culture. *In vitro* 17, 369-376 (1988).
- Habig W.H., M.J. Pabst y W.B. Jakoby. Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139 (1974).
- Hasegawa-Sasaki H., F. Lutz y T. Sasaki. Pathway of phospholipase C activation initiated with platelet-derived growth factor is different from that initiated with vasopressin and bombesin. *J. Biol. Chem.* 263, 12970-12976 (1988).
- Horder M. y R. Rej. Alanine aminotransferase: L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2. Routine UV method. En: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn. Vol III, pp. 444-456. Verlag Chemie. Weinheim (1984).
- Hue L., F. Bontemps y H.G. Hers. The effect of glucose and of potassium on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and glycogen synthetase in isolated rat liver preparation. *Biochem. J.* 152, 105-114 (1975).
- Hue L., J.E. Feliú y H.G. Hers. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. *Biochem. J.* 239, 135-139 (1978).
- Hue L y M.H. Rider. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245 313-324 (1987).
- Huerta-Bahena J., R. Villalobos-Molina y J.A. García-Sainz. Roles of alpha and beta-adrenergic receptors and adrenergic responsiveness of liver cells formed after partial hepatectomy. *Biochem. Biophys. Acta* 763, 112- (1983).
- Hunter A.L., M.A. Holscher y R.A. Neal. Thioacetamide induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 439-448 (1977).

- Hunter E. Biological Techniques for avian sarcoma viruses. *Methods in Enzymology* 58, 379-393 (1979)
- Jacob R. Calcium oscillations in electrically non-excitable cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 427-438 (1990).
- Jamso J.O., S. Ekberg, S.B. Hoath, W.G. Beamer y L.A. Frohman. Growth hormone enhances hepatic epidermal growth factor receptor concentration in mice. *J. Clin. Invest.* 82, 1871-1876 (1988).
- Jewell S.A., G. Bellomo, H. Thor, S. Orrenius y M.T. Smith. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217, 1257-1259 (1982).
- Jirtie R.L. y G. Michalopoulos. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res.* 42, 3000-3004 (1982).
- Johnson A.C., S.H. Garfield, G.T. Marlino e I. Pastan. Expression of epidermal growth factor receptor proto-oncogene mRNA in regenerating liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 412-418 (1988).
- Jones D.P., D.J. McConkey, P. Nicotera y S. Orrenius. Calcium activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 264, 6698-6643 (1989).
- Kan M., J.S. Huang, P.E. Mansson, H. Yasumitsu, B. Carr y W.L. McKeehan. 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 (1989).
- Karasik A. y C.R. Kahn. Dexamethasone-induced changes in phosphorylation of the insulin and epidermal growth factor receptor and their substrates in intact rat hepatocytes. *Endocrinology* 123, 2214-2222 (1988).
- Kashimata M., M. Hiramatsu y N. Minami. Sex difference in epidermal growth factor receptor levels in rat liver plasma membrane. *Endocrinology* 122, 1707-1714 (1988).
- Katz N. Correlation between rates and enzyme levels of increased gluconeogenesis in rat liver and kidney after partial hepatectomy. *Eur. J. Biochem.* 98, 535-542 (1979).
- Kitakawa K., K. Kangawa, H. Matsuo y K. Uyeda. Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase: Fructose 2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 16796-16801 (1988).

- Krebs H.A., N.E. Cornell, P. Lund y R. Hems. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism* (eds F. Lundsquist y N. Tygstrup) Copenhagen, Munksgaard, pp 726-750 (1974),
- Kuma S.-I., M. Inaba, H. Ogata, K. Inaba, T. Okumura, K. Saito y M. Yamamoto. Effect of human recombinant interleukin-6 on the proliferation of mouse hepatocytes in the primary culture. *Immunobiology* **180**, 235-242 (1990).
- Kunst A., B. Draeger y J. Ziegenhorn. D-glucose: UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphat dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed Bergmeyer H.U.) 3rd edn Vol VI, pp. 163-172. Verlag Chemie, Weinheim (1984).
- Kutty R.K., Y. Singhi, G. Santostasi y G. Krishna. Maitotoxin-induced liver cell death involving loss of cell ATP following influx of calcium. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **101**, 1-10 (1989).
- La Brecque D.R. In vitro stimulation of cell growth by hepatic stimulatory substance. *Am. J. Physiol.* **242**, G281-G288 (1982).
- La Brecque D.R., M. Wilson y S. Foguerty. Stimulation of HTC hepatoma cell growth in vitro by hepatic stimulatory substance (HSS). *Exp. Cell Res.* **150**, 419-424 (1984).
- Landon E.J., R.J. Naukam y B.V. Rama Sastry. Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 697-705 (1986).
- Lauterburg B.H. y C.V. Smith. Stimulation of hepatic efflux and turnover of glutathione by methionine in the rat. *Eur. J. Clin. Invest.* **16**, 494-499 (1986).
- Lauterburg B.H. Early disturbance of calcium translocation across the plasma membrane in toxic liver injury. *Hepatology* **7**, 1179-1183 (1987).
- Leffert H.L., K.S. Koch, T. Morgan y B. Rubalcava. Hormonal control of rat liver regeneration. *Gastroenterology* **76**, 1470-1482 (1979).
- Lemasters J.J., J. DiGiuseppi, A.L. Nieminen y B. Herman. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* **325**, 78-81 (1987).
- Loiseau A.M., M.H. Rider, D. Foret, G.G. Rousseau y L. Hue. Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo-2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose-2,6-bisphosphatase. *Eur J. Biochem.* **175**, 27-32 (1988).

- Luetteke N.C. y G.K. Michalopoulos. Partial purification and characterization of a hepatocyte growth factor produced by rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* **45**, 6331-6337 (1985).
- Lynch C.J., R. Charest, S.B. Boccino, J.H. Exton y P.F. Blackmore. Inhibitor of hepatic I-adrenergic effects and binding by forbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* **260**, 2844-2851 (1985).
- Mannervik B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. *Advances Enzymol* **57**, 357-417 (1985).
- Martín-Sanz P., M. Cascales y L. Boscá. Fructose 2,6-bisphosphate in isolated foetal hepatocytes. *FEBS letters* **255**, 37-42 (1987a).
- Martín-Sanz P., C. Cascales, A. Gómez, D.N. Brindley y M. Cascales. Effect of a rhodium complex on alterations of hepatic function in thioacetamide-induced hyperplastic noduligenesis in rats. *Carcinogenesis* **8**, 1685-1690 (1987b).
- Martín-Sanz P., M. Cascales y L. Boscá. Glucagon-induced changes in fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase in cultured rat foetal hepatocytes. *Biochem. J.* **257**, 795-799 (1989a).
- Martín-Sanz P., C. Cascales y M. Cascales. Lipogenesis and cholesterogenesis *de novo* in liver and adipose tissue. Alterations of lipid metabolism by effect of short- and long-term thioacetamide administration to rats. *Carcinogenesis* **10**, 477-481 (1989b).
- McConkey D.J., P. Nicotera, P. Hartzell, G. Bellomo, A.H. Wyllie y S. Orrenius. Glucocorticoides activate a suicide process in thimocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch. Biochim. Biophys.* **269**, 365-370 (1989a).
- McConkey D.J., P. Hartzell, J.F. Amador-Pérez, S. Orrenius y M. Jondal. Calcium-dependent killing of immature thimocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.* **143**, 1801-1806 (1989b).
- McConkey D.J. y S. Orrenius. Cellular signaling in thymocyte apoptosis. En: "*Apoptosis: The molecular basis of cell death*", (L.D. Tomei y F.O. Cope, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., pp 227-246 (1991).
- Mead J.E. y N. Fausto. Transforming growth factor may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1558-1562 (1989).

- Mehendale H.M. Role of hepatocellular regeneration and hepatolobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem. Pharmacol* **42**, 1155-1162 (1991).
- Mesland D.A.M., G. Los y H. Spiele. *Exp. Cell Res.* **135**, 431-435 (1981).
- Meyer T. y L. Stryer. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5051-5055 (1988).
- Michalopoulos G.K., H.D. Cianculli, A.R. Novotny, A.D. Kligerman, S.C. Strom y R.L. Jirtle. Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.* **42**, 4673-4682 (1982).
- Michalopoulos G.K., K.A. Houk y M.L. Dolan. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.* **44**, 4414-4419 (1984).
- Michalopoulos G.K. Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J.* **4**, 176-187 (1990).
- Mirabelli F., A. Salis, V. Marinoni et al. Menadione-induced bleb formation in hepatocytes is associated with the oxidation of thiol groups in actin. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 261-269 (1988).
- Miyazawa K., H. Tsubouchi, D. Naka, K., Takahashi, M. Okigaki, N. Arakaki y T. Nakayama. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 967-973 (1989).
- Montesano R., K. Matsumoto, T. Nakamura y L. Orci. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**, 901-908 (1991).
- Moolenaar W.H., R.J. Aerts, L.G.J. Tertoolen y S.W. de Laat. The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J. Biol. Cell* **261**, 279-284 (1986).
- Muller A., K. Unthan-Fechner e I. Probst. Activation of phosphofruktokinase 2 by insulin in cultured hepatocytes without accompanying changes of effector levels or cAMP-stimulated protein kinase activity ratios. *Eur. J. Biochem.* **176**, 415-420 (1988).
- Nagelkerke J.F., P. Dogterom, J.G.M. De Bont y G.J. Mulder. Prolonged high intracellular free calcium concentrations induced by ATP are not immediately cytotoxic in isolated rat hepatocytes. Changes in biochemical parameters implicated in cell toxicity. *Biochem. J.* **263**, 347-353 (1989).

- Nakamura T., Y. Tomita y A. Ichiara. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* **94**, 1029-1035 (1983a).
- Nakamura T., K. Yoshimoto, Y. Nakayama, Y. Tomita y A. Ichiara. Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7229-7233 (1983b).
- Nakamura T., K. Nawa y A. Ichiara. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1450-1459 (1984a).
- Nakamura T., K. Nawa y A. Ichiara. Partial characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1650-1659 (1984b).
- Nakamura T., H. Teramoto y A. Ichiara. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6489-6493 (1986).
- Nakamura T., K. Nawa, y A. Ichiara. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS letters* **224**, 311-316 (1987)
- Nakamura T., N. Arakaki y A. Ichiara. Interleukin-1 is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* **179**, 488-497 (1988).
- Nakamura T., T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura y K. Tashiro. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440-443 (1989).
- Nakanuma Y., T. Terada, S. Terasaki, K. Ueda, A. Nonomura, E. Kawahara y O. Matsui. 'Atypical adenomatous hyperplasia' in liver cirrhosis: low-grade hepatocellular carcinoma or borderline lesion?. *Histopathology* **17**, 27-35 (1990).
- Nakata R., I. Tsukamoto, M. Miyoshi y S. Kojo. Liver regeneration in streptozocin-diabetic rats. *Biochemical Pharmacology* **35**, 865-867 (1986)
- Ngala-Kenda J.F., B. De Hemptinne y L. Lambotte. Role of metabolic overload in the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy in the rat. *Eur. J. Surg. Res.* **16**, 294-(1984).
- Nicotera P., M. Moore, F. Mirabelli, G. Bellomo y S. Orrenius. Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} ATPase activity

by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Lett* **181**, 149-153 (1985).

- Nicotera P., P. Hartzell, C. Baldi, S.-A. Svensson, G. Bellomo y S. Orrenius. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. *J. Biol. Chem.* **261**, 14628-14635 (1986).
- Nicotera P., D.J. McConkey, D.P. Jone y S. Orrenius. ATP stimulates Ca^{2+} uptake and increases in the free Ca^{2+} concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 453-457 (1989).
- Nicotera P., G. Bellomo y S. Orrenius. The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 484-494 (1990).
- Niehaus W.G., Jr. Samuelsson y E.D. Wills. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem. J.* **113**, 315-341 (1969).
- Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**, 693-698 (1984).
- Noll F. L-(+)-Lactate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed Bergmeyer H.U.) 3rd edn. Vol VI, pp 582-588. Verlag Chemie, Weinheim (1984).
- Obaseki A.O., A. Jayaraj y W.R. Porter. Effect of thioacetamide-induced hepatic necrosis on the regioselective metabolism of S-warfarin by rat liver mixed-function oxidase enzymes. *Biochem. Pharmacol* **32**, 2385-2391 (1983).
- Orrenius S. y G. Bellomo. En: *Calcium and Cell Function* (ed Cheung W.Y.) pp 186-208. Acad. Press. Orlando Florida (1986).
- Orrenius S. y P. Nicotera. On the role of calcium in chemical toxicity. *Arch. Toxicol. Suppl.* **11**, 11-19 (1987).
- Orrenius S., D.J. McConkey, D.P. Jone y P. Nicotera. Ca^{2+} activated mechanisms in toxicity and programmed cell death. *ISI Atlas Sci. Pharmacol.* **1**, 319-324 (1988).
- Orrenius S., D.J. McConkey, G. Bellomo y P. Nicotera. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 281-285 (1989).
- Pascoe G.A. y D.J. Reed. Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 209-224 (1989).
- Pegg A.E., R.T. Borchard y J.K. Coward. Inhibition of polyamine

- production in mouse fibroblasts. *Biochem. J.* **194**, 79-89 (1981).
- Pessayre D. Mécanismes des hépatites médicamenteuses. *Med. Sci.* **2**, 373-379 (1987).
 - Petersen K.F., B.A. Hansen y H.E. Poulsen. Hepatic regeneration following glucagon treatment. *Horm. Metab. Res.* **19**, 239-241 (1987).
 - Petropoulos C.J., J.M. Lemire, D. Goldman y N. Fausto. Homology between rat liver RNA populations during development, regeneration and neoplasia. *Cancer Res.* **45**, 5114- (1985).
 - Pietri F., M. Hilly, M. Claret y J.P. Mauger. Caractérisation de deux états interconvertibles du récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate dans les hépatocytes de rat. *Gastroenterol Clin. Biol.* **14**, 710-714 (1990).
 - Pilkis S.J., M.R. El-Maghrabi y T.H. Claus. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 755-783 (1988).
 - Pilkis S.J. y T.H. Claus. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis. Regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Res. Nutr.* **11**, 465-515 (1991).
 - Presta M., M. Statuto, M. Rusnati, P. Dell'Era y G. Ragnotti. Characterization of Mr 25,000 basic fibroblasts growth factor form in adult, regenerating, and foetal rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1182-1189 (1989).
 - Probst I. y K. Unthan-Fechner. Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **153**, 347-353 (1985).
 - Rej R. y M. Horder. Aspartate aminotransferase. L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1. Toutine UV method. en: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn. Vol III, pp 416-424. Verlag Chemie. Weinheim (1984).
 - Reuter H. y H. Porzig. Calcim Channels: Diversity and complexity. *Nature (London)* **336**, 113-114 (1988).
 - Richman R.A., T.H. Clauss, S.J. Pilkis y D.L. Friedman. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3589-3593 (1976).
 - Rider M.H. y L. Hue. Phosphorylation of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase C and

comparison of the fructose-2,6-bisphosphate activity of the two enzymes. *Biochem. J.* **240**, 57-61 (1986).

- Rooney T.A., E.J. Sase y A.P. Thomas. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 17131-17141 (1989).
- Rosa J.L., F. Ventura, J. Carreras y R. Bartrons. Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase during liver regeneration. *Biochem. J.* **270**, 645-649 (1990).
- Rosler M. y W. Schoner. Antagonizing effects of phorbol 12-myristate 13-acetate on hormonally stimulated gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes involve activity changes of pyruvate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 185-190 (1990).
- Rozengurt E., K.D. Brown y P. Pettican. Vasopressin inhibition of epidermal growth factor binding to cultured mouse cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 716-722 (1981).
- Rubin J.S., A.M-L. Chan, D.P. Bottaro, W.H. Burgess, W.G. Taylor, A.C. Cech, D.W. Hirschfield, J. Wong, T. Miki, P.W. Finch y S.A. Aaronson. A broad spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 415-419 (1991).
- Rupniak H.T., J.G. Gladdene y D. Paul. The "in vivo" effects of a polyamine analogue on tissue stem cell proliferations. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **18**, 1353- (1982).
- Russel W.E., R.J. Coffey Jr, A.J. Ouellette y H.L. Moses. Type transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5126-5130 (1988).
- Saltiel A.R., J.A. Fox, P. Sherline y P. Cuatrecasas. Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science* **233**, 967-972 (1986).
- Sandgren E.P., R.D. Palmiter, J.L. Heckel, C.C. Daugherty, R.L. Brinster y J.L. Degen. Complete Hepatic Regeneration after Somatic Deletion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell* **66**, 245-256 (1991)
- Sato S., T. Martsushima y T. Sugimura. Hexokinase isozyme patterns of experimental hepatomas of rats. *Cancer Res.* **29**, 1437-1446 (1969).
- Satyabhama S. y G. Padmanaban. Effect of thioacetamide on cytochrome P-450 synthesis in rat liver. *Biochem. J.* **218**, 371-

- 377 (1984).
- Saunders J.W. *Science* **154**, 604-612 (1966).
 - Sell S. Is there a liver stem cell?. *Cancer Res* **50**, 3811-3815 (1991)
 - Sessa A., M.A. Desiderio y M. Baizini. Diamine oxidase activity in regenerating rat liver and in 4-diethylaminoazobenzene-induced and Yoshida AH130 hepatomas. *Cancer Res.* **41**, 1929- (1981).
 - Sessa A., M.A. Desiderio y A. Perin. Diamine oxidase activity induction in regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **698**, 11- (1982).
 - Shapiro H.M. *Practical Flow Cytometry*, Alan R. Liss, Nueva York. (1989).
 - Shoyab M. y G.T. Todaro. Specific high affinity cell membrane receptors for biological active phorbol and ingenol esters. *Nature* **288**, 451-455 (1980).
 - Skov Olsen P., S. Boesby, P. Kirkegaard, K. Therkelsen, T. Almdal, S.S. Poulsen y E. Nex. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* **8**, 992-996 (1988).
 - Slack J.M. Peptide regulatory factors in embryonic development. *Lancet* **1**, 1312-1315 (1989).
 - Smith M.T., N. Loveridge, E.D. Wells y J. Chayen. The distribution of glutathione in the rat liver lobule. *Biochem. J.* **182**, 103-108 (1979).
 - Solt D. y E. Farber. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**, 701-703 (1976).
 - Staddon J.M. y R.G. Hansford. Evidence indicating that the glucagon-induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in hepatocytes is mediated by an increase in cyclic AMP concentration. *Eur. J. Biochem.* **179**, 47-52 (1989).
 - Stalmans W. y H.G. Hers. The stimulation of liver phosphorylase by AMP, fluoride and sulfate. *Eur. J. Biochem.* **54**, 341-350 (1975).
 - Starzl T.E., K.A. Porter, J.A. Francavilla, J. Benichou y C.V. Putman. Hepatotrophic factors. *Ciba Symposium*. Elsevier, Amsterdam, pp. 112-129 (1977).

- Stournaras C., G. Drewes, H. Blackholm, I. Merkler y H. Faulstich. Glutathionyl (cysteine-374) actin forms filaments of low mechanical stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1037, 86-91 (1990).
- Strain A.J., A. Frazer, D.J. Hill y R.D. Milner. Transforming growth factor beta inhibits DNA synthesis in rat hepatocytes isolated from normal and regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 436-442 (1987).
- Tabor C.W. y H. Tabor. 1-4 diaminobutane (putrescine) spermidine and spermine. *Ann. Res. Biochem.* 45, 285-306 (1976).
- Tabor C.W. y H. Tabler. Polyamines. *Ann. Res. Biochem.* 53, 749-790 (1984).
- Tate y Meister. Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.*, 249, 7593-7602 (1974).
- Thomas G.E. y D.J. Reed. Effect of intracellular Ca⁺⁺ omission on isolated hepatocytes. I. Induction of oxidative stress and cell injury. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 245, 493-500 (1988a).
- Thomas G.E. y D.J. Reed. Effect of intracellular Ca⁺⁺ omission on isolated hepatocytes. II. Loss of mitochondrial membrane potential and protection by inhibitors of uniport Ca⁺⁺ transduction. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 245, 501-507 (1988b).
- Thor H., F. Mirabelli, A. Salis, G.M. Cohen, G. Bellomo y S. Orrenius. Alterations in hepatocyte cytoskeleton caused by redox cycling and alkylating quinones. *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 397-407 (1988).
- Thorell B. Intracellular redox-states as basis for cell characterization by flow cytometry. *Blood Cells* 6, 745-748 (1980).
- Thorell B. Flow cytometry analysis of cellular endogenous fluorescence simultaneously with emission from exogenous fluorochromes, light scatter and absorption. *Cytometry* 2, 39-43 (1981).
- Thorell B. Flow cytometry monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels. *Cytometry* 4, 61-65 (1983).
- Trump B.F. y W.J. Mergner. En: *The inflammatory Process* (vol 1, 2nd ed) (Zweifach B.W., Grant L. y McCluskey R.T., eds) pp 115-217. Academic Press (1974).
- Tsien R.Y., T. Pozzan y T.J. Rink. *Nature* (London) 295, 68-71 (1982).

- Tsien R.Y. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci* 11, 419-424 (1988).
- Tsukamoto I. y S. Kojo. Effect of phorbol ester on rat liver regeneration. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2871-2872 (1987).
- Van Schaftingen E., L. Hue y H.G. Hers. Control of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in insolated hepatocytes by glucose and glucagon. *Biochem. J.* 192 887-895 (1980).
- Van Schaftingen E., L. Hue y H.G. Hers. Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon- sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem. J.* 192 897-901 (1980).
- Van Schaftingen E. D-Fructose 2,6-bisphosphate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U., ed) 3rd edn, Vol IV, pp 335-341. Verlag Chemie Weinheim (1984).
- Vasault A. Lactate dehydrogenase. L-Lactate: NAD⁺ oxido-reductase EC 1.1.1.27. U.V. method with pyruvate and NADH. En: *Method of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp. 118-126. Verlag Chemie, Weinheim (1987).
- Vielh P., H. Magdelénat, Y. Remvikos y B. Dutrillaux. Analysis of DNA content. En: *Guides to Clinical Aspiration Biopsy. Flow Cytometric.* (P. Vielh). Igaku-Shoin, New York-Tokyo, 21-57 (1991).
- Vindelov L.L., I.J. Christensen y N.I. Nissen. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* 3, 323-327 (1983).
- Vos R.M.E. y P.J.P. Bladeren. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interactions* 75, 241-265 (1990).
- Wahlefeld A.W. y H.U. Bergmeyer. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H.U.) 3rd edn, Vol III, pp. 352-356 Verlag Chemie, Weinheim (1987)
- Wakelan M.J.O., G.J. Murphy, V.J. Hruby y M.D. Houslay. *Nature (London)* 323, 68-71 (1986).
- Weiss J.M., K.J. Lembach y R.J. Boucek. A comparisson of ornithine decarboxylase from normal and SV40-transformed 3T3 mouse fibroblasts. *Biochem. J.* 194, 229-239 (1981).
- Wharton W., E. Loef, W.J. Pledger y E.J. O'Keefe. Modulation of the epidermal growth factor receptor by platelet derived

growth factor and cholera toxin. Effects of mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5567-5571 (1982).

- Witte C.L. y M.H. Witte. Hepatic circulation. En: *The liver Normal and Abnormal (part A)* (ed F.F. Becker), Marcel Dekker, Inc, New York. pp 11-54 (1974)
- Wollemberg G.K., E. Semple, B.A. Quinn y M.A. Hayes. Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic and neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* **47**, 6595-6599 (1987).
- Woods N.M., K.S.R. Cuthbertson y P.H. Cobbold. Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes. *Cell Calcium* **8**, 79-100 (1987).
- Wyllie A.H. *Nature* **284**, 555-556 (1980).
- Wyllie A.H. En: *Cell Death in Biology & Pathology* (Bowen I.D. y Locksley R.A., eds) pp 9-34, Chapman y Hall (1981).
- Yamada S., K. Fujiwara, Y. Oka, N. Masaki y H. Oka. Role of cell-surface modulator of DNA synthesis in liver regeneration. *J. Biochem.* **101**, 1385-1389 (1987)