

## INTRODUCCION

ANGEL SANTOS RUIZ

Es altamente honroso para mí introducir esta monografía sobre Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo. La elección para este encargo eventual, por parte de sus autores, parece que ha sido democrática; y me pregunto si en tal decisión no habrá influido, subconscientemente, aquella expresión de Joubert: «*Quand mes amis son borgnes, je les regarde de profil*». En cualquier caso doy por seguro que la amistad habrá también tenido parte y por supuesto, en lo que me atañe, figura como razón principal de ingerencia, puesto que implica uno de los aspectos más nobles de la vida humana: el afecto desinteresado de Aristóteles; la estima recíproca o bilateral de Platón; la virtud moral de Santo Tomás ...

Creo muy laudable que se haya impulsado esta publicación porque considero que es una transmisión clara del interés por profundizar en esa dimensión, permanentemente actual y difícil, cual es la fenomenología biológica del acontecer oxidativo. Mi referencia selectiva en las páginas que siguen, procurará que no sea excesiva y sé bien que no es labor mollar hacerlo con galanura. Por ello evitaré, en lo posible, entrar en el laberinto inaugurado por Descartes que pretende demostrarlo todo, hasta lo evidente; el juego es tentador, pero ocurre que, una vez en la maraña, a veces falla la recuperación del sentido real.

\* \* \*

### **El porqué de una monografía**

Insisto en que, en el complicado panorama actual, los valiosos y constantes avances científicos enmarcan el riesgo de que el horizonte pierda su sentido de servicio y dé paso a la rutina informadora. No está de más, por tanto, el tomar actitudes pertinentes a la conservación de los que son, opino, fines científicos enriquecedores, principal objetivo de una relevante monografía. Esta se ha editado con desprendida pulcritud por la Fundación Casares Gil de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España, entidad, que a todas luces, merece agradecimiento y plácemes por iniciativa tan encomiable.

No cabe duda que las gentes se identifican tanto por los rasgos congénitos como por el sello que les imprimen los grupos sociales de que proceden. Las costumbres, el nivel cultural y la situación económica, entre otras causas, gravitan indefectiblemente sobre su realizar en el correr del tiempo. El paisaje en que se ha desenvuelto el ser y estar de esta publicación ha sido tan eminentemente investigador que lo ambienta y lo explica. No es una mera exigencia plástica, sino que permite llegar mejor a su yo, y liberarle de interpretaciones parciales y caprichosas. Es indudable que su vital telón de fondo ha sido en lo fundamental lo bioquímico y todo lo que a él concierne.

Ante todo conviene resaltar que, como resultado de una grata y eficaz colaboración, surgieron las materias específicas que componen este volumen. Al procurar la rigurosidad en el orden de inserción de los diversos asuntos a tratar se llegó a la conclusión de escoger dieciséis temas. Todos ellos, cuidadosamente preparados, han contribuido a una armónica realización conjunta de atrayente formato. Los apartados están acertadamente seleccionados con profusión de ilustraciones encajadas con mesura y entendidas como apropiado instrumento de comunicación adecuada y estética.

\* \* \*

### **Un encargo bien cumplido**

Lejos están los autores de este opúsculo de los interlocutores de una tertulia retórica. Aunque de diferente procedencia, poseen el denominador común de ser investigadores de cabeza y corazón. Su trabajo ha sido felizmente plasmado y, en este aspecto, no es exagerado afirmar que su letra lleva consigo, como en tantos y cuantos casos, un poderoso catalizador de actitudes reverenciales. Ello explica que argumentos refutables en un intercambio de impresiones se antojan inexpugnables cuando se presentan en hoja impresa, la cual induce al acatamiento. La señalización es estática, pues viene dada de antemano por el desarrollo que cada autor ha conferido a su argumento. La habilidad del lector deberá consistir fundamentalmente, en convertir la lectura en una conversación interior; en crear un dinamismo acertado de recíproca interacción entre el intelecto vigilante y la materia legible que yace en la obra que maneja.

La pluralidad de temario y redactores de estas páginas no ha constituido motivo de fragilidad y dispersión. No diré que tengan la plenitud de los discursos ciceronianos, pero sí afirmo que todo lo descrito ha resultado bien combinado. Tanto que apenas se advierten los puntos de articulación y soldadura, cuya visibilidad hubiese restado al conjunto esa fuerza que da apariencia natural de cuerpo vivo. Consecuentemente, podría decirse que entre los ejecutores, ha existido una «*concordia discors*», esto es: presentan entre sí diferencias particulares inmersas en una coincidencia de puntos de vista generales.

Dentro del plantel de relatores de esta obra sería arduo destacar a alguien salvo a la ejemplar coordinadora María Cascales Angosto. No obstante parece razonable una sucinta referencia nominal —con mi excepción— en neutral y riguroso orden alfabético: Alberto Alvarez-Barrientos, David Andrés-García, Esther Ardite, Gustavo Barja de Quiroga, Robert C. Callaghan, Carlos Cañete-Nicolás, José Vicente Castell Ripoll, M.<sup>a</sup> Dolores Catalá, Anna Colell, Virginia Corrochano, Carmen Díez-Fernández, Eraci Drehmer, José Carlos Fernández-Checa, Lourdes Fernández-Simón, Carmen García-Ruiz, María José Gómez-Lechón, Antoni Iradi, Montse Marí, Jesús Marín, Merce Miranda, Salvador Moncada, Juan Manuel Montero Vázquez, Albert Morales, Pilar Muñiz, José Enrique O'Connor Blasco, María Rosario Oliva, Sten Orrenius, Federico V. Pallardo, Elías Manuel Robles-Chillida, Guillermo T. Sáez, Miguel Angel Santos-Ruiz, Nuria Sanz Menéndez, Juan Sastre, Andrew F.G. Slater, Victoria Valls, José Viña y Asunción Zaragoza Castellano. Se trata de personas con labor de resonancia científica y superior calidad; gran parte con eco internacional y las demás camino de ello. No son, ciertamente, inconclusas promesas sino bien estimadas realidades; y al escribir esto, deseo y espero estar bien lejos de dar satisfacción a agazapadas vanidades o de supervalorar individuales.

Lo histórico no avanza de forma lineal pero, en cualquier caso, lo decisivo es que sucesos primordiales dejan una luz encendida como antorcha que no se extingue y a la que puede recurrirse en nuestros días en que el hombre busca el origen y solución de sus inquietudes, de sus apetencias y de sus necesidades. Los colaboradores de este libro han eliminado, prácticamente, lo accesorio dado que el acúmulo episódico no refuerza la energía ni el hábito vital de lo abordado no caen, *a priori*, en la máxima de Carlyle: «*History, a distillation of rumour*». De un expositor de minucias a un creador de situaciones hay análoga distancia que de un alfarero a un escultor. Ha cuadrado, pues, retomar enjundiosos textos como los que en el sumario se aluden y revalorizar por igual etapas nuevas o postergadas, a través de erudición, rigor conceptual y lenguaje exigente. Todo ello equivale a expresar que los escritores no inventan sino que recuerdan y relatan con estilo propio; su fruto, como aquí ocurre, cambia mayoritariamente de sabor, de forma y de perfume, dentro de la irreductible individualidad. Se da el «revelare» y el «criterion»: un aporte de voces y miradas; un conjunto inquietante y original que ayuda al descubrimiento imaginativo. El sincronismo entre los diferentes colaboradores es a todas luces —digámoslo una vez más— evidente. Sin acudir a erudiciones envolventes, ni a enfadosas pedanterías, facilitan la entrada en la polifacética ágora del estrés oxidativo.

Al fin y al cabo un libro es comparable con un ser vivo: puede ir señalado con colores más o menos intensos o llevar, como paloma mensajera, multiformes nuevas. El lector lo cogerá o lo dejará, según tenga o carezca de aquello que buscaba. A mi parecer son aleccionadores estos capítulos; su atinada interpretación de los mecanismos oxidantes, autoriza a asignar a tan esclarecedora prosa aquel fragmento de la lírica de Jaroslav Seifert: «Oigo lo que no oyen los demás, pies descalzos pisando terciopelo». Como eficiente comprobación de lo antedicho incluyo, a ren-

glón seguido, relación de los argumentos contemplados: Radicales libres y antioxidantes; Fármacos y hepatotoxicidad: Mecanismos moleculares de la hepatotoxicidad por fármacos; Sistemas de transporte del glutatión a través de la membrana plasmática y mitocondrial; Glutatión, antioxidantes y envejecimiento; Hepatotoxicidad y senescencia; Radicales libres y modificación oxidativa del DNA. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana; Proteínas del estrés y hepatotoxicidad; Regulación redox de la muerte celular por apoptosis, Estrés oxidativo y homeostasis del calcio; Oxido nítrico y enfermedades vasculares; Estrés oxidativo inducido por intoxicación etílica en hígado; Metabolismo oxidativo de la cocaína en hígado; Hepatotoxicidad de la ciclosporina A. Fármaco de elección en la terapia de los trasplantes; La enfermedad inflamatoria intestinal y radicales libres de oxígeno; Análisis del estrés oxidativo por citometría de flujo; Microscopía confocal y estrés oxidativo en células.

\* \* \*

### Aspectos previos del acontecer oxidativo

En la actualidad es cada vez más frecuente asignar a los radicales libres una misión primordial en el mecanismo de toxicidad de diversos compuestos químicos. Los radicales libres, incluyendo las especies activas de oxígeno, se producen tanto en las condiciones fisiológicas normales como en las patológicas. En consecuencia, las células desarrollan una serie de sistemas de defensa frente a su acción perniciosa

a) *Estrés oxidativo*. Cuando la generación de especies activas de oxígeno y radicales libres sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes defensivos, se induce una situación de estrés oxidativo que, en mayor o menor grado, puede llegar a producir lesiones celulares reversibles o irreversibles. No hay que olvidar que los seres vivos se encuentran inmersos en una atmósfera que contiene oxígeno, cuya molécula es un biradical y posee dos electrones desapareados. Afortunadamente, en la configuración de la molécula de  $O_2$  estos electrones aparecen en diferentes orbitales, lo que al limitar su reactividad permiten que las moléculas orgánicas no sufran una oxidación espontánea y explosiva. Por otra parte, en la reducción del oxígeno molecular a agua se incorporan cuatro electrones y se genera así un aporte energético que utilizan los seres vivos para sus procesos metabólicos. Sin embargo, en dicha reducción se generan especies intermedias reactivas como subproductos de la cadena respiratoria mitocondrial, que presentan gran toxicidad cuando no se eliminan de manera adecuada.

La generación de dichas especies activas aparece incrementada en variados estados patológicos y en el envejecimiento. Cada vez son más las enfermedades en cuya etiología se encuentran agentes prooxidantes y cuya terapéutica tiende a asociarse con la administración de compuestos inhibidores de la oxidación.

b) *Proteínas del choque térmico*. Las proteínas del choque térmico —HSP, *Heat Shock Proteins*, o proteínas del estrés—, las denominadas «chaperoninas» o más bien «carabinas», están siendo ahora objeto de una gran atención por escogidos grupos de investigadores. Son proteidos que ayudan al plegamiento de otros, y a su restauración o eliminación cuando la lesión es irreversible. Su descubrimiento tuvo lugar en condiciones de estrés térmico pero, recientemente, se ha señalado que están involucrados en situaciones de estrés intracelular. Entre las distintas respuestas del genoma celular, la calificada de *heat shock* (HS) implica una adaptación que incluye la regulación de genes HS y la función de las antes citadas HSP. La inducción de la transcripción de las HSP constituye una respuesta rápida frente a situaciones de estrés agudo o crónico. Entre los estímulos que conducen a la expresión de los genes HSP cabe citar los agentes que desnaturalizan las proteínas, los estados fisiológicos alterados y la respuesta inmune; en todos estos casos es imprescindible un incremento de la síntesis proteica. Unas HSP son constitutivas mientras que otras se sintetizan bajo la influencia de diversos perturbadores celulares, entre los que se citan los derivados del estrés oxidativo. La expresión de las HSP se regula a nivel transcripcional. El incremento de la transcripción en respuesta a una situación de estrés necesita la unión del *heat shock factor*, (HSF), a una secuencia del DNA, que se localiza en la región promotora de los genes inducibles por calor. El HSF se encuentra en forma inactiva en el citoplasma de células no estresadas, pero un aumento en la temperatura o en el estrés, lo activa mediante su traslocación al núcleo y su oligomerización. La conversión del HSF monómero inactivo a HSF oligómero activo es condición esencial para la transcripción de la HSP en mamíferos y concretamente en el ser humano.

c) *Drogas de abuso*: Desde tiempo ha, el etanol o alcohol etílico es la droga de abuso más utilizada por el ser humano de todos los tiempos; en nuestro mundo es cada vez más acusada la incidencia de la enfermedad hepática alcohólica, especialmente entre la población joven. La intoxicación etílica, tanto aguda como crónica, está íntimamente relacionada con el estrés oxidativo resultante de una elevada producción de radicales libres y también con una disminución de la defensa antioxidante. Los cambios inducidos en la peroxidación de lípidos y las lesiones del DNA son pruebas de esta alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante. El aumento adaptativo de los mecanismos hepáticos de defensa solamente contrarresta parcialmente la masiva generación de radicales libres prooxidantes en casos de intoxicación etílica crónica.

Otra droga de abuso, la cocaína, origina efectos hepatotóxicos, tanto en animales de experimentación como en seres humanos. La toxicidad de este estupefaciente se debe tanto a la formación de radicales libres derivados de su metabolismo oxidativo como a las especies activas de oxígeno que se generan como subproductos. Es destacable la potenciación de su toxicidad cuando se ingiere unida al etanol, debido a la formación de un metabolito que surge de la reacción entre ambas sustancias, el cocaetileno. Además cada día es más alto el abuso simultáneo de ambas drogas dado que el efecto euforizante de la cocaína resulta más duradero cuando se ingiere unida el etanol.

A pesar de lo anterior, hay que tener muy en cuenta que las situaciones de estrés oxidativo también es posible que sean provocadas en el organismo por compuestos empleados con fines terapéuticos. Este es el caso, por ejemplo, de la ciclosporina, fármaco de elección en la terapia de los trasplantes, cuyo uso se encuentra limitado por su neuro, nefro y hepatotoxicidad. En el caso concreto del hígado, la ciclosporina libera especies reactivas de oxígeno, por lo que una posible perspectiva terapéutica residiría en su administración conjunta con agentes antioxidantes.

d) *Senescencia*. Se han expuesto teorías variopintas para explicar el envejecimiento, que se han ido descartando por falta de apoyo experimental. Hoy día la causa que atribuye a los radicales libres de oxígeno una acción predominante en la senescencia tiene cada vez más adeptos. El efecto de la senescencia sobre los sistemas involucrados en la defensa hepatocelular frente al estrés oxidativo, originado por la hepatotoxicidad de fármacos, recibe cada vez más atención. Sin duda, una parte elevada de nuestra sociedad, que suele ser la que consume mayor cantidad de fármacos, exhibe una mayor casuística de reacciones adversas inesperadas. Estas respuestas nocivas pueden ser debidas a que el envejecimiento incrementa la sensibilidad al daño hepatotóxico de los fármacos o afecta a su vida media. Los medicamentos pueden convertirse en letales si su biotransformación es lenta, o no ejercer su efecto terapéutico si su biotransformación es rápida; este segundo caso cabe que ocurra cuando el anciano recibe simultáneamente dos o más medicamentos y uno de ellos acelera la biotransformación de los otros. Por ello, el conocimiento de los mecanismos de toxicidad, de la interacción de los fármacos y de las alteraciones que se derivan del envejecimiento, ayudará a diseñar pautas de terapia geriátricas y, por tanto, una medicina preventiva más racional y menos costosa que las utilizadas hasta el momento.

e) *Terapia antioxidante*. Lógicamente el tratamiento del estrés oxidativo preocupa a los investigadores. Los ensayos llevados a cabo hasta ahora confirman que su prevención parcial se logra mediante suplemento de antioxidantes como los tocoferoles y el ácido ascórbico, los precursores del glutatión como la N-acetilcisteína o la inducción de enzimas implicados en la eliminación de las especies activas de oxígeno o radicales libres, como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. Los antioxidantes pueden actuar, en general, a través de cuatro mecanismos biológicos fundamentales: reduciendo la producción de radicales libres, como los quelantes de los derivados activos del hierro; atrapando directamente los radicales libres, como la glutatión transferasa; interrumpiendo los procesos de peroxidación (vitamina E); reforzando las reservas naturales de defensa antioxidativa.

Cuando una situación de estrés oxidativo llega a un punto irreversible origina la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis. Concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno inducen la necrosis, mientras que concentraciones bajas son responsables del suicidio celular o apoptosis, la cual puede ser prevenida por la acción de antioxidantes.

f) *El óxido nítrico*. Supongo que, en conexión con estos temas es aconsejable reseñar, aunque sea muy brevemente, las apasionantes investigaciones de Salvador Moncada concernientes al denominado NO u óxido nítrico, quien consiguió demostrar que la génesis de este compuesto, a partir de la arginina, por las células endoteliales vasculares, estaba involucrada en las propiedades del denominado *endothelium derived relaxing factor* (EDRF). Posteriormente su grupo de trabajo aclaró que el NO es la molécula endógena responsable de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble en tejidos varios, como el cerebro, la glándula adrenal o las plaquetas. El NO es, asimismo, un factor citotóxico liberado por los macrófagos activos después de la agresión inmune. Estas dos propiedades, comunicación intercelular y citotoxicidad, están subordinadas a la producción de NO cuantitativamente diferente por dos isoformas de la oxido nítrico sintasa (NOS). Una es constitutiva, citosólica, dependiente del calcio y la calmodulina y libera picomoles de NO en respuesta a estímulo a través de receptor. En la otra su expresión génica es inducible por estímulos inmunológicos; es citosólica, independiente del calcio, libera nanomoles de NO durante períodos sostenidos y su producción es inhibida por glucocorticoides. Ambas formas dependen del NADPH y de la tetrahidrobiopterina. El óxido nítrico es una molécula pequeña gaseosa con una elevada reactividad que se difunde en el músculo vascular liso donde activa la guanilato ciclasa soluble dando lugar al cGMP que es el responsable de la relajación muscular y de la dilatación de los vasos sanguíneos. Las evidencias acumuladas desde el descubrimiento de la vía L-arginina indican la relevancia del NO en biología. El óxido nítrico es el mecanismo de transducción de la guanilato ciclasa soluble y activa otros enzimas. Como tal, el NO proporciona las bases bioquímicas a una variedad de funciones biológicas; es un efector inmunológico que explica el fenómeno de la inmunidad no específica, por la que desempeña funciones idóneas fisiológicas y posee propiedades de defensa del huésped.

Como final de este apartado parece prudente destacar el papel de las nuevas tecnologías en el estudio del estrés oxidativo que han colaborado en la detección de especies activas y en la observación del efecto de agentes tóxicos sobre su generación intracelular en tiempo y espacio. La citometría de flujo permite evaluar en pocos minutos multitud de parámetros celulares, requiriendo para ello muy pocas células en suspensión. Por otra parte, la microscopía de fluorescencia y confocal detecta con elevada resolución cambios intracelulares evidenciables mediante fluorocromos específicos. Tales técnicas se encuentran en pleno desarrollo y suponen un futuro alentador para la resolución de problemas fisiopatológicos de etiología hasta la fecha desconocida.

\* \* \*

### **Todavía algo más**

La ciencia desde tiempos de los árabes ha tenido dos funciones: capacitarnos para conocer; prepararnos para hacer. Los helenos, con la excepción de Arquíme-

des, sólo se interesaron en conocer, pero la ciencia española ha procurado que sus integrantes hagan. Ha habido voluntad y dedicación a tareas varias; se ha dado entendimiento para la búsqueda de nuevas rutas del conocimiento y sea esto dicho sin petulancia. Hoy, a propósito de esta publicación concreta, pareceme que muchos podemos estar de acuerdo en una justa y calurosa apología. Y lo afirmo enfrentándome con el creciente grado de intelectualización que tiende a hurtar afectividad. No quisiera dar la razón en este caso a Guiraud, para quien el hombre moderno se encuentra desorientado en el deseo.

La ciencia hispana, con insistencia laudable, ha intentado mejorar su calidad a través de una labor honesta e ingente a la que fielmente se han entregado mujeres y hombres. Con el brotar un día y otro de una doble corriente: el servicio a la sociedad; la individual satisfacción. Es verídico que alguna vez se ha estado expuesto, por circunstancias múltiples —incomprensiones, desacertados planteamientos, celotipias— a caer en tierra, pero ha resurgido cual Ave Fénix, en enfático decir, y conseguido proseguir la tarea con renovado ímpetu. Un trabajo rentable es obvio si se mantienen las causas nobilísimas que pueden permitirle: dedicación, desprendimiento, sabiduría; como escribía Rubén Darío, se debe realizar: «porque es bello el bien». En este aspecto, en España grupos selectos de investigadores se han afanado en tareas conducentes a difundir la verdad que, como es lógico, no es pertenencia individual de nadie sino común patrimonio.

Consecuentemente es de presumir, justificadamente, que esta obra sea de ahora en adelante de aleccionadora consulta y a ella acudan los interesados en sus saberes bioquímicos genuinos. Al introducir y aconsejar su lectura he intentado no ser un cronista ensalzador, pero a mi entender, ofrece una información suficiente junto a un mapa de saberes atractivos para el erudito, como el reparto del índice lo demuestra elocuentemente. En conjunto es un mensaje destacable apoyado en una comunicación jugosa y atrayente. La clave está en su misma itinerancia: es una misión y no un pasatiempo; es un propósito y no una casualidad.

Reitero que esta obra implica un recorrido por el mundo oxidativo, transformante e inquisidor. De ahí que su manejo imponga una exigencia redoblada, fiel a lo manifiesto en el texto de una parte y de otra atenta a lo que los distintos capítulos apuntan de posible plenitud. La capacidad de articular la simultaneidad de lo alejado con el despliegue actual de acontecimientos y figuras, fundiéndose en un sólo devenir, establecen una trama densa. Hay un *animus* bueno y un *animus* malo. El fracasado, el avasallador, el ambicioso, tienen un *animus* peyorativo que se manifiesta en sus apreciaciones; en cambio el hombre honesto, lleva dentro de sí un *animus* meyorativo que se trasluce igualmente en sus juicios. Quisiera y espero, que mi intervención presentadora sea, como señalaba al comienzo, la del amigo: constructiva, amable y oportuna.

Y termino ya. El pecado de desmesura —la *hybris* de los griegos— atenta contra los límites que nos impone nuestra condición de seres finitos y temporales

y no quisiera yo rebasarlos en esta disertación. Mi encargo no podía ser otro que un genérico apuntar desde impresiones equilibradas. Supongo que habrá quedado diáfana mi alineación de la subjetividad. Solamente he intentado refrendar las positivas derivaciones de esta monografía que desde ahora se somete a pública utilización y enjuiciamiento.

En conexión con todo lo anterior desearía que ninguno de los que lean estas mis deshilvanadas líneas sienta en su ánimo la comezón de actualizar la rima de San Juan de la Cruz:

«No quiera enviarme  
de hoy más ya mensajero  
que no saben decirme lo que quiero...»

## REFERENCIAS

1. Boyer PD (1975), *Oxidation-Reduction*. en *The Enzymes*, Vol XIII. Academic Press New York
2. Cascales Angosto M y Santos Ruiz A (1997), *Curso sobre Estrés Oxidativo*. Real Academia de Farmacia. Instituto de España. Abril. Madrid.
3. Florkin M y Stotz EH (1967), *Biological Oxidations*. en *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier Pub. Co. New York
4. Gille G y Sigler K (1995), *Oxidative stress in living cells*. *Folia Microbiol* 40, 131-152.
5. Green DE (1940), *Mechanisms of Biological Oxidations*. Cambridge University Press. New York
6. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA y Mossman BT (1993), *Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage*. *Lab Invest* 69, 261- 274.
7. Lehninger AL (1971), *Bioenergetics*. WA Benjamin Inc California.
8. Maney V y Veeger C (1963), *Biological Oxidations*. *Ann Rev Biochem* 32, 579.
9. Moncada S (1992), *The L-arginine:nitric oxide pathway*. *Acta Physiol Scand* 145, 201-227
10. Racker E (1965) *Mechanisms of Bioenergetics*. Academic Press New York.
11. Santos-Ruiz A (1987), Discurso de presentación pronunciado con motivo de la publicación del libro «Homenaje al Farmacéutico» Madrid 24 de Noviembre.
12. Stewart R (1964), *Oxidation mechanisms*. Benjamin Inc. New York.
13. Villar-Palasi V, Cabezas Fernández del Campo JA y Santos-Ruiz A. (1977), *Tratado de Bioquímica* 5ª edición. Editorial Augusta SA, Barcelona
14. Wieland H (1932) *On the mechanisms of oxidation*. Yale University Press. New Haven

# RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

GUSTAVO BARJA DE QUIROGA  
Departamento Biología Animal II.  
Facultad de Biología  
Universidad Complutense de Madrid

## SUMARIO

---

1. LA TOXICIDAD DEL OXIGENO
2. RADICALES LIBRES
3. FUENTES DE RADICALES LIBRES
4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA
5. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS
6. DAÑO OXIDATIVO AL ADN
7. ANTIOXIDANTES
  - 7.1. Superóxido dismutasas
  - 7.2. Catalasas
  - 7.3. Glutation peroxidasas
  - 7.4. Glutation reductasas
  - 7.5. Regulación génica de las enzimas antioxidantes
  - 7.6. Ascorbato
  - 7.7. Glutation.
  - 7.8. Vitamina E
  - 7.9. Carotenoides
  - 7.10. Otros antioxidantes
8. CONCLUSION
9. BIBLIOGRAFIA

## 1. LA TOXICIDAD DEL OXIGENO

Se suele admitir que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los organismos animales fueron realizados por Paul Bert a finales del siglo pasado. Sin embargo, Carl Wilhem Sheel ya describe por primera vez los efectos negativos del oxígeno sobre los seres vivos en 1777 (1). Esto ocurría sólo dos años después de que Sheele y Joseph Priestley (2) descubrieran a la vez e independientemente esta molécula. Desde el siglo pasado y durante los primeros seis decenios del presente se han ido acumulando datos descriptivos sobre la letalidad y las consecuencias patológicas de la exposición animal a altas presiones parciales de oxígeno. Así, se ha descrito que la toxicidad del O<sub>2</sub> es mayor cuanto más alta sea la tasa metabólica de la especie animal considerada. Esto tiene que ver probablemente con la alta letalidad de este gas en los homeotermos (como los mamíferos), y con el aumento de sensibilidad al oxígeno de los poiquilotermos conforme se eleva la temperatura.

En los mamíferos y en el hombre existen tres órganos especialmente sensibles *in vivo*. Si se trata a muchos mamíferos con oxígeno puro a tensiones normobáricas se produce la muerte en períodos tan cortos como 72 horas por daño al tejido pulmonar, uno de los expuestos a tensiones de oxígeno más altas en el organismo, acompañado en las etapas finales de edema y hemorragia (efecto Lorraine-Smith). La utilización de concentraciones menores de oxígeno (incluso inferiores al 50%) a presión normal, puede causar ceguera irreversible en niños prematuros por daño a la retina (fibroplasia retrolental). Si se suministra oxígeno puro, pero a presiones hiperbáricas (a más de 2-3 atmósferas), aparece una toxicidad aguda sobre el sistema nervioso (efecto Paul Bert) que se manifiesta con estados convulsivos que recuerdan a la epilepsia «de gran mal» y que pueden dar lugar a la muerte en horas o minutos según la dosis de exposición empleada. Hoy sabemos que el tejido nervioso es altamente sensible al oxígeno y su mayor resistencia *in vivo* en relación al pulmón se debe a su menor grado de hiperóxía tisular resultante de la saturación de la hemoglobina a presiones parciales del orden de sólo 100 mm de Hg.

A pesar de la gran acumulación de descripciones sobre los efectos nocivos del oxígeno a muchos niveles de observación, durante mucho tiempo se careció de teorías que pudiesen explicar su toxicidad. El primer mecanismo general propuesto consistió en suponer que el oxígeno inactivaba enzimas que presentaban grupos

tiólicos esenciales en su forma reducida, -SH, (3). Aunque este mecanismo se ha demostrado experimentalmente para algunas enzimas como la nitrogenasa bacteriana, la glutamato descarboxilasa de cerebro de pollo, o la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (4), está claro hoy en día que no puede explicar más que una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno. No deja de ser interesante, sin embargo, que uno de los principales sistemas protectores frente a este tipo de inactivación sea el tripéptido glutation, una substancia importante en la defensa frente a los radicales libres.

## 2. RADICALES LIBRES

Hoy sabemos que la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo. La teoría de la toxicidad del oxígeno por radicales libres fue propuesta por primera vez por la investigadora argentina Rebeca Gershan en 1954 (5) como consecuencia de sus experimentos con  $O_2$  hiperbárico y de las observaciones previas de Ozorio de Almeida sobre la similitud de las alteraciones histológicas producidas por el oxígeno hiperbárico y por las radiaciones, ya que se sabía que estas últimas dañan en gran medida a través de la generación de radicales libres. Rebeca tuvo también la habilidad de unir a estas observaciones con el concepto clásico expuesto por Michaelis en 1940 «toda oxidación (o reducción) solo puede producirse en pasos de oxidaciones (o reducciones) de carácter univalente» (6), que fue desechado debido en gran medida a la oposición y autoridad de Otto Warburg, quien defendía el carácter tetravalente de las oxidaciones biológicas como el que hoy sabemos que se da a nivel de la citocromo oxidasa mitocondrial. La teoría no recibió sin embargo un impulso definitivo hasta el descubrimiento de la superóxido dismutasa en 1969 por Joe McCord e Irwing Fridovich (7), lo que ponía de manifiesto la existencia y relevancia de un radical libre (el superóxido) en las células aerobias.

La vía univalente de reducción del oxígeno (Fig. 1) da lugar a tres formas «incompletamente reducidas» del oxígeno entre éste y el agua, el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo (OH). El radical superóxido, contrariamente a puntos de vista previos, carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  en la reacción de Fenton o Haber-Weiss da lugar a OH (Fig. 2). El verdadero papel del  $O_2^-$  en esta reacción es el de actuar como reductor del hierro. Como se observa, el  $O_2^-$  necesita al  $H_2O_2$  para poder producir la especie oxidante (OH), mientras que el  $H_2O_2$  no necesita al  $O_2^-$  para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia del  $H_2O_2$  en las células a concentraciones muy superiores a las del  $O_2^-$ , convierte al peróxido de hidrógeno en una especie con gran capacidad de generar daño oxidativo a pesar de no ser un

## O<sub>2</sub>, VIA UNIVALENTE

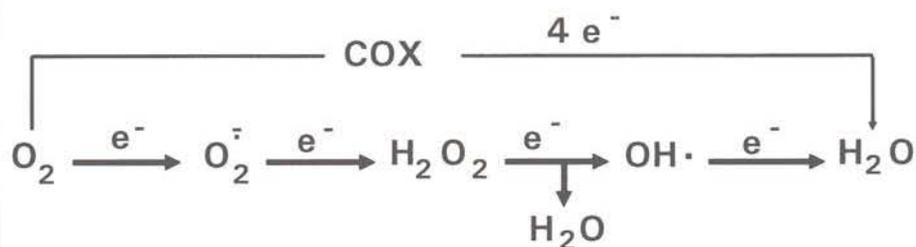


Figura . 1 En la vía univalente de reducción del oxígeno se forman especies activas incompletamente reducidas por adición secuencial de electrones de uno en uno en el siguiente orden: radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). En cambio, la adición de cuatro electrones al oxígeno, como ocurre en la citocromo oxidasa mitocondrial (COX), permite su reducción a agua sin que se liberen radicales de oxígeno.

## HABER-WEISS, FENTON

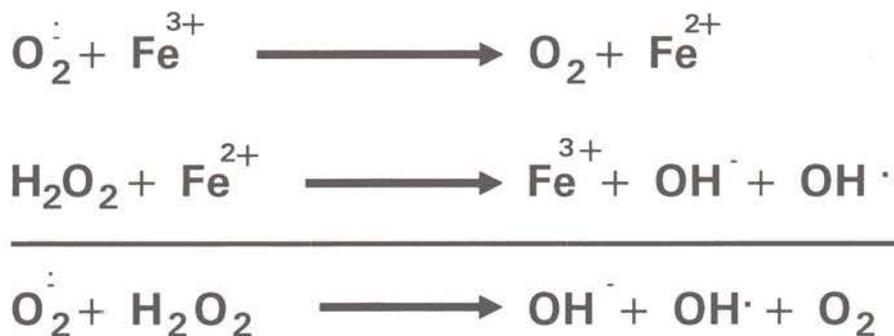


Figura 2. En la reacción de Haber-Weiss o de Fenton, el superóxido reduce el hierro férrico a ferroso, y éste reduce monoelectrónicamente al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical hidroxilo, altamente reactivo. El hierro no se consume en el proceso, actuando como catalizador del mismo. El cobre puede substituir al hierro oscilando entre las valencias +2 y +1.

radical libre. El OH es considerado hoy el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque existen otros iniciadores propuestos. Esta sustancia sin carga neta es una de las especies más reactivas presentes en el organismo. Su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula a 2-3 diámetros moleculares de su lugar de formación. La alta reactividad del OH impide su difusión a largas distancias a través de la célula, papel que le correspondería al  $H_2O_2$ . Este último sería, por tanto, también responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares. Se ha demostrado generación de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  por parte de enzimas y mediante la autooxidación de moléculas biológicas en casi todas las fracciones celulares incluyendo la citosólica, mitocondrial, peroxisómica, microsómica así como en las membranas plasmática y nuclear. La presencia simultánea de estas dos sustancias (o sólo de  $H_2O_2$ ) puede generar OH en la mayoría de los rincones celulares. La necesidad de la presencia de metales de transición en la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre (los más abundantes en los sistemas biológicos) en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo.

Por otra parte, si al oxígeno basal (forma triplete), que es un biradical con espines paralelos, se le suministra energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad (oxígeno singlete). Las reacciones oxidativas en las que interviene el oxígeno singlete se manifiestan y son cuantificables por la emisión espontánea de quimioluminiscencia de baja intensidad en todo tipo de células. La mayoría de los autores han dejado de considerar al singlete como iniciador biológico del daño oxidativo. De todas formas, uno de los mejores marcadores del singlete es la emisión de quimioluminiscencia. Dicha emisión es la base de métodos de medida del estrés oxidativo de máxima sensibilidad, aunque presentan la desventaja de no poseer especificidad en cuanto a la especie emisora.

### 3. FUENTES DE RADICALES LIBRES

En los tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias. Esto se debe a que estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden siempre, en último término, del metabolismo del oxígeno por la vía univalente. De los cuatro Complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el Complejo I (8) y en el Complejo III (9). En el caso del Complejo I, los candidatos más probables como generadores de radicales libres parecen ser los centros hierro-sulfurados (10), mientras que en el caso del complejo III se ha debatido intensamente sobre si podrían corresponder a la semiquinona (9) o al citocromo b (11). Entre las posibles consecuencias de esta producción mitocondrial de radicales libres se encuentran enfermedades como el Parkinson (12) o el mismo proceso del envejecimiento (13), durante el cual se sabe que el daño oxidativo al ADN mito-

condrial es mucho más acusado que en el núcleo, y parece acumularse exponencialmente con la edad (14). Esto podría contribuir a la acumulación de deleciones y mutaciones que se da en los tejidos post-mitóticos de este ADN en los individuos viejos.

Cuantitativamente, la segunda fuente principal de radicales libres son los fagocitos del sistema inmune. Al encontrarse con un agente infeccioso, las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento muy acusado de su consumo de oxígeno llamado «estallido respiratorio». Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir de oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las pentosas (15-17). Estos radicales libres contribuyen de forma acusada a la destrucción o inactivación del agente infeccioso de modo directo, o por combinación con halógenos como el cloro para generar agentes extremadamente reactivos como el hipoclorito o las monocloraminas. El complejo NADPH oxidasa está compuesto, al menos, por una flavoproteína y un citocromo b heterodimérico de membrana, a los que se les suman dos proteínas citosólicas (p67 y p47) durante la activación del complejo. En dicha activación intervienen fosfolipasas C y D reguladas por proteínas G, y el mecanismo intracelular incluye aumentos de concentración de calcio y fosforilación de las proteínas p67 y p47, procesos que parecen estar modulados por GTP y magnesio. La importancia de la generación de radicales libres en la defensa frente a las infecciones se pone de manifiesto en la enfermedad crónica granulomatosa en el hombre, en la que se produce una deficiencia congénita de NADPH oxidasa que da lugar a infecciones recurrentes por bacterias y hongos y a la muerte entre la infancia y la madurez. Aunque la producción de radicales libres por los fagocitos es útil para el organismo, en muchos procesos patológicos se produce infiltración secundaria de estas células del sistema inmune en los órganos afectados. De este modo, se ha propuesto que el daño oxidativo durante la hiperóxia, el síndrome de isquemia-reperusión, el ejercicio, la endotoxina en el choque séptico, la esclerosis múltiple, el humo del tabaco, las fibras de asbestos u otros procesos puede deberse, en parte, a la producción excesiva de radicales libres por las células fagocíticas. También se sabe que la inflamación crónica está asociada con el aumento de la frecuencia de muchos tipos de cánceres. Esto podría deberse al daño prolongado producido por las células fagocíticas en el material genético del tejido inflamado, que podría dar lugar a los procesos de iniciación y/o promoción tumoral y a su fijación mediante mitosis (18).

Otro papel relevante de los radicales libres en relación con los procesos patológicos es su producción durante el síndrome de isquemia-reperusión. La comprensión de este fenómeno es primordial, ya que la isquemia cerebral y de miocardio es la principal causa de muerte en las sociedades avanzadas. El daño irreversible durante la isquemia se debe fundamentalmente a la falta de oxígeno, que da lugar a caída de la concentración de ATP, degradación de AMP y acumulación de hipoxantina, a la vez que se estimula la glucólisis anaerobia con la consiguiente

acidificación del tejido. La reperfusión a tiempo es esencial para evitar la necrosis tisular. Sin embargo, se sabe que durante la reperfusión se produce un daño adicional debido a la producción de radicales de oxígeno. La hipótesis clásica para explicarlo (19) consiste en la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a la forma xantina oxidasa durante la isquemia. Al llegar la reoxigenación, estando presentes tanto la enzima como su sustrato, se produce la conversión de la hipoxantina en xantina y ácido úrico. Los electrones liberados por la hipoxantina no pasan al NAD como ocurre con la forma deshidrogenasa de la enzima, ya que la forma oxidasa los cede al oxígeno molecular, formando radicales libres. Otro mecanismo alternativo consiste en el aumento del grado de reducción de los transportadores de electrones de la cadena mitocondrial durante la isquemia hasta valores cercanos al 100%, debido a la falta de aceptor natural, el oxígeno. Al aparecer súbitamente el oxígeno durante la reperfusión, dichos electrones son fácilmente cedidos al mismo a partir de dicha cadena, aumentando de forma acusada la generación de radicales libres. Se ha propuesto también la intervención de los fagocitos durante el síndrome de isquemia-reperfusión. Los radicales libres también están implicados en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que es esencial para su fagocitosis por macrófagos que los convierte en células espumosas. Dichas células intervienen en la formación de la placa arteriosclerótica en las paredes de los vasos sanguíneos, un proceso básico que estimula la aparición de las enfermedades cardiovasculares.

Muchos de los procesos anteriores relacionan a los radicales libres con procesos dañinos para el organismo. De todos modos, cuando sus niveles se controlan adecuadamente, los radicales libres también intervienen en procesos útiles para el individuo. Esto es quizás lo que ha impedido su eliminación en el curso de la evolución, según se ha revisado recientemente (20). Dichos usos útiles incluyen procesos muy variados como la defensa frente a la infección, la destoxicación de xenobióticos, la reducción de ribonucleósidos, las acciones de hidroxilasas y dioxigenasas, la carboxilación del glutámico, la señalización celular por óxido nítrico (un radical libre), la detección de la  $pO_2$  en el cuerpo carotídeo, la transducción intracelular de señales a través de factor nuclear kappa-B y los productos génicos c-fos y c-jun, la modulación de segundos mensajeros como el GMP cíclico, las acciones de prostaglandinas y leucotrienos, la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea, el potencial de membrana, la elevación antipolisérmica de la membrana de fecundación, la defensa interindividual en los insectos, o la bioluminiscencia (21-34). Se ha descrito también un papel para los radicales libres durante la generación de calor mediante termogénesis sin escalofrío (35).

#### 4. PEROXIDACION LIPIDICA

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En el caso más conocido y quizás más importante desde el punto de vista de la toxicidad aguda —la peroxidación lipídica— la iniciación consiste en la extracción de un electrón de un carbono

contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el  $\text{OH}^\cdot$  (Fig. 3). De entre todas las macromoléculas presentes en los tejidos animales, los ácidos grasos poliinsaturados son los más sensibles al ataque por radicales libres debido a la posesión de dobles enlaces. Se forma así un radical alquil ( $\text{L}^\cdot$ ) que se convierte en peroxil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) por adición de oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ), puede dar lugar a propagación de la peroxidación al generar otro radical alquil ( $\text{L}^\cdot$ ) en el ácido graso contiguo en la membrana. La propagación explica el carácter de reacción en cadena de la peroxidación lipídica, mediante la cual una sola iniciación puede dañar un gran número de moléculas. La reacción se termina por la reacción de radicales (por ejemplo de tipo alquil) contiguos, dando lugar a puentes cruzados ( $\text{L-L}$ ), o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído (el marcador más ampliamente utilizado), el 4-hidroxinonanal o alcanos que aparecen en el aire espirado (base del único método de medida no invasivo). Aunque estos procesos se han estudiado fundamentalmente con ácidos grasos insaturados y sus ésteres, parecen darse procesos análogos con otros lípidos como los esteroides. Los productos de los lípidos autooxidados son normalmente muy complejos porque se pueden

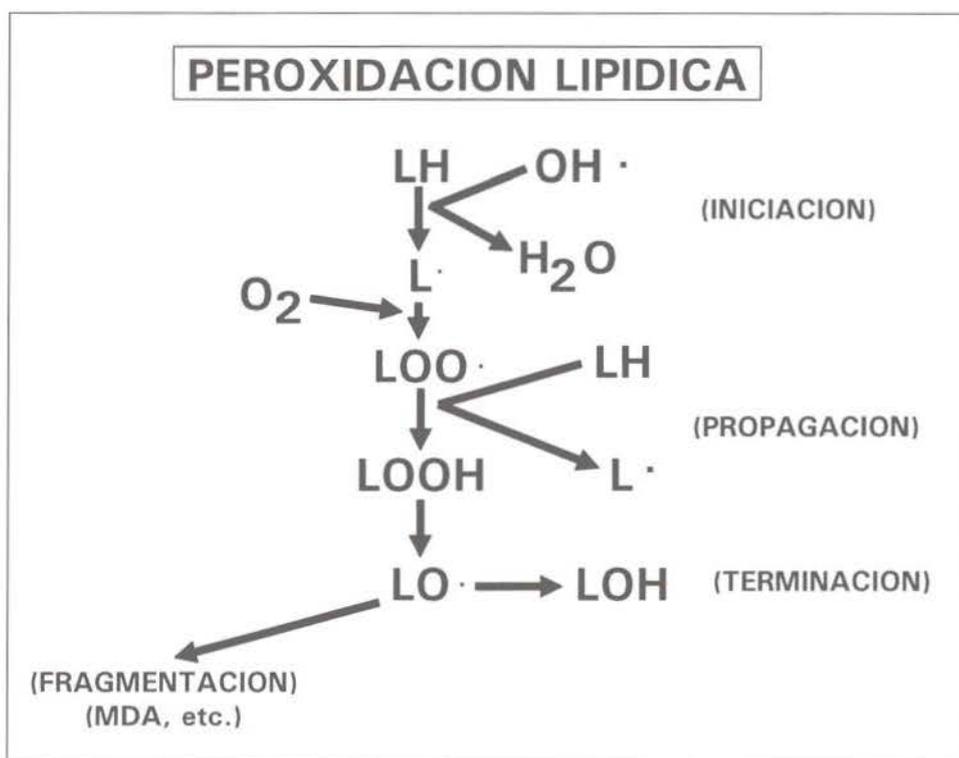


Figura 3. Esquema resumen de las reacciones principales de la peroxidación lipídica.  $\text{LH}$  = lípido intacto;  $\text{L}^\cdot$  = radical lipídico alquil;  $\text{LOO}^\cdot$  = radical lipídico peroxil;  $\text{LOOH}$  = hidroperóxido lipídico;  $\text{LO}^\cdot$  = radical lipídico alcoxil;  $\text{LOH}$  = hidróxido lipídico (estable).

formar muchas sustancias distintas con solo unas pocas reacciones básicas de propagación. Además, los productos de la autooxidación, los hidroperóxidos y los peróxidos cíclicos, son a su vez especies muy reactivas, lo que da lugar a la formación de productos secundarios. Parte de las investigaciones más recientes están enfocadas a aclarar la peroxidación en sistemas agregados como las LDL. En estos modelos se sabe que tanto el tamaño de partícula como la presencia de tocoferoles puede tener una importancia capital para la cinética de la autooxidación (36).

El hierro es un estimulador de la peroxidación lipídica, pudiendo participar en las reacciones de iniciación o propagación. De acuerdo con esto, la desferroxiamina es un potente inhibidor de la peroxidación lipídica estimulada por hierro. La peroxidación lipídica inducida por hierro se estimula mediante bajas concentraciones de un reductor como el ascorbato (peroxidación no enzimática), o tiene lugar con la participación de NADPH como reductor y de cadenas de transporte electrónico como la microsomal (peroxidación enzimática). La peroxidación lipídica puede también ser estimulada por el oxígeno singlete, el ozono, o radicales halógenos. Se suelen utilizar muchas técnicas para estimar la peroxidación lipídica, como el consumo de oxígeno, la valoración de peróxidos mediante yodo o enzimas, valorando dienos conjugados, la producción de hidrocarburos volátiles en el aire espirado, la pérdida de ácidos grasos insaturados, la producción de quimioluminiscencia, la acumulación de pigmentos fluorescentes, la valoración de aldehídos o malonaldehído mediante el test del ácido tiobarbitúrico. Todos estos métodos son perfectamente válidos en modelos de peroxidación estimulada *in vitro*, pero tienen problemas de interferencia con sustancias no relacionadas con la peroxidación lipídica cuando se aplican a materiales biológicos *in vivo*. Recientemente se ha puesto en marcha la que parece ser la única técnica disponible con suficiente sensibilidad y especificidad para estudios *in vivo*: la medida de hidroperóxidos de fosfolípidos por detección quimioluminiscente post-columna tras separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-HPLC (37,38).

## 5. DAÑO OXIDATIVO A PROTEINAS

Aunque se ha dedicado mucha más atención a la peroxidación lipídica, hoy sabemos que también se producen ataques similares por parte de radicales libres a proteínas o ácidos nucleicos. Los productos de estas oxidaciones se acumulan en proporciones menores, lo que ha dado lugar a que hayan pasado desapercibidos durante largo tiempo. Sin embargo estos procesos pueden ser de extrema importancia por el carácter cualitativo del daño o por la mayor dificultad de reparación del mismo, como puede ocurrir en el caso del ADN. Las proteínas pueden ser atacadas incluso a nivel de estructura primaria, y algunos grupos han mostrado que la oxidación en residuos de aminoácidos discretos sirve de marcador para sistemas proteolíticos no dependientes de ATP, para los que se han propuesto nombres como el de macroxiproteínasa, que habrían sido especialmente diseñados en la evolución para eliminar proteínas oxidadas (39).

Muchos estudios, entre los que destacan los liderados por el grupo de Stadtman, han dado lugar a la conclusión de que el  $H_2O_2$  y las formas reducidas del hierro y el cobre, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo radicales libres que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. Este proceso se considera pues específico del *sitio* de unión del metal. En muchas enzimas este *sitio* de unión de metales puede ser el centro activo. Entre los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo en las proteínas se encuentran la histidina, la prolina, la arginina, la lisina y la cisteína. Como consecuencia se forman grupos carbonilo, o se producen conversiones de unos aminoácidos en otros, como ocurre con la transformación de histidina en asparragina. Los grupos carbonilo aparecen en varios sistemas de oxidación *in vitro*, como los relacionados con el citocromo P-450, los sistemas metal/ascorbato, o los que utilizan xantina oxidasa. Según Stadtman y colaboradores, el contenido en carbonilos aumenta durante el envejecimiento en roedores y humanos (40). La medida del daño oxidativo a proteínas en muestras biológicas se suele realizar mediante la valoración de grupos carbonilos por barrido espectrofotométrico o mediante isótopos. Estas técnicas son suficientemente sensibles pero no están libres de interferencias. Los intentos de desarrollar métodos más específicos por HPLC no han rendido, hasta el momento, resultados suficientemente satisfactorios.

## 6. DAÑO OXIDATIVO AL ADN

Los radicales libres reaccionan con los componentes del ADN mediante adición o abstracción. En presencia de oxígeno, se forman radicales peroxil por adición del mismo a las bases o al azúcar del ADN. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el ADN dan lugar a un gran número de productos. También se forman puentes cruzados ADN-proteína. Muchos de estos productos encontrados *in vitro* también aparecen en el ADN de tejidos animales tras el tratamiento con sustancias que estimulan la generación de radicales libres. Según los estudios liderados por Bruce Ames (18), el daño oxidativo al ADN y la mitogénesis son dos causas importantes del cáncer. En los mamíferos, las altas tasas metabólicas y la longevidad corta están asociadas con una alta frecuencia de daño oxidativo al ADN y con una alta frecuencia de cánceres, y lo inverso ocurre en animales como el hombre con baja tasa metabólica y alta longevidad. Incluso en los humanos se ha calculado que se producen como media 10.000 impactos de daño oxidativo al ADN de origen endógeno por día (41), una cantidad cientos de miles de veces superior a la causada por la radiación natural de fondo.

El número de productos del ataque a las bases del ADN por radicales libres supera la veintena. Uno de los primeros en valorarse por HPLC con detección ultravioleta fue la timina glicol. La baja sensibilidad de este tipo de detección ha dado lugar en los últimos años a la valoración de gran número de productos por cromatografía de gases-espectrometría de masas, o de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) por HPLC con detección electroquímica. La primera técnica permite la

valoración simultánea de muchos productos, mientras que la segunda sólo valora uno. Además, la detección de masas permite una identificación inequívoca, mientras que en el caso de la HPLC-EC ésta se basa solo en el tiempo de retención en la columna. Sin embargo, recientemente ha quedado claro que los valores mucho más altos (hasta un orden de magnitud) obtenidos con la detección de masas se deben a artefactos generados durante la manipulación (imprescindible) de las muestras. Por eso, parece que la técnica de preferencia sería la de HPLC con detección electroquímica (EC), aunque algunos autores no descartan que en este caso se subestime, en lugar de sobreestimarse, el nivel de daño oxidativo al ADN.

Al menos en el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega de nuevo un papel importante en el daño oxidativo, al ser uno de los contraiones de la macromolécula. Si el  $H_2O_2$  llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando radical hidroxilo que ataca en ese mismo lugar al azúcar o a la base, produciendo roturas de la hebra y modificaciones en las bases. Estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos. Esto explicaría la asociación epidemiológica positiva entre los depósitos de hierro y el riesgo de cáncer. Otros autores piensan que el cobre puede también cumplir un papel similar al del hierro en la mediación del daño oxidativo al ADN nuclear.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear (42). Esto se debe, sobre todo, a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además, el ADN mitocondrial en el hombre está tan «empaquetado» que todo él codifica. También carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del ADN nuclear. Como consecuencia de todo esto, las deleciones y mutaciones del ADN mitocondrial son también mayores que en el ADN nuclear. Además, el daño oxidativo y las deleciones del ADN mitocondrial aumentan exponencialmente con la edad en el corazón humano (43). Este y otros hechos han llevado a pensar que el daño oxidativo al ADN mitocondrial juega un papel determinante en el envejecimiento (44).

De todas formas, la mayor parte de los genes se encuentran en el núcleo, no en la mitocondria. Es interesante resaltar que se ha descrito también un aumento de la 8-OHdG con la edad en varios tejidos de rata (41), aunque el hallazgo no es compartido por todos los autores (45). Pero es especialmente importante que los niveles de 8-OHdG en el ADN nuclear son tanto menores cuanto mayor es la longevidad máxima de la especie animal, mostrando el hombre los niveles mínimos de todos los mamíferos estudiados hasta la fecha, que son menos longevos que él (46, 47). Esto es lo que cabría esperar si una baja producción mitocondrial de radicales libres da lugar a un menor daño oxidativo al ADN (44), molécula sobre la que hay acuerdo generalizado en su importancia capital para el envejecimiento. El problema actual es la falta de conocimiento acerca del mecanismo por el cual el daño oxidativo se transmite desde las mitocondrias hasta el núcleo, dando lugar a una menor

alteración en el ADN nuclear en las especies longevas. Se ha propuesto una posibilidad para explicarlo (48), pero hasta ahora no hay resultados experimentales que la hayan puesto a prueba. La idea más popular de que el daño oxidativo mitocondrial daría lugar a una crisis energética por déficit en la producción de ATP y fracaso subsiguiente en la homeostasis celular en innumerables procesos dependientes de energía, parece ser contradicha por trabajos experimentales que indican que la respiración y la fosforilación oxidativa continúan intactas en las mitocondrias de individuos viejos (49). En cualquier caso, se sabe que en la membrana nuclear existe también una cadena de transporte electrónico de función fisiológica incierta que también genera radicales libres, aunque de modo mucho menos intenso que en las mitocondrias. Debido a la ausencia de métodos adecuados, aún no es posible saber cuál es su contribución relativa al daño oxidativo total del ADN. La información disponible sugiere, sin embargo, que las especies animales con longevidades elevadas poseen una baja intensidad de generación de radicales libres y/o una alta actividad de reparación de su ADN (44).

## 7. ANTIOXIDANTES

Los datos presentados en las secciones anteriores muestran que siempre existe un cierto nivel de daño oxidativo, lo cual supone que una fracción de los radicales libres generados en el organismo son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, la mayor parte de los radicales libres -al menos en muchas partes de la célula- son eliminados mediante antioxidantes. De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido solo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de radicales libres. Este equilibrio se puede dar con altos niveles de generación y destrucción o viceversa, como ocurre en las distintas especies animales (44). También puede darse dentro de una misma especie en distintas condiciones. Así, cuando aumenta la producción de radicales libres, debido a causas exógenas —o endógenas como puede ocurrir en el ejercicio o el hipermetabolismo— se puede dar una regulación compensadora a la alza en las defensas antioxidantes. Cuando este equilibrio entre generación y destrucción de radicales libres se altera, la célula entra en un proceso degradativo patológico. De aquí la importancia del estudio de los distintos sistemas antioxidantes celulares.

### 7.1. Superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que eliminan el radical superóxido. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta  $O_2$  molecular, mientras que la otra se reduce a  $H_2O_2$ . Por tanto, más que *eliminar* formas activas del oxígeno, esta enzima transforma una (el superóxido) en la otra (el  $H_2O_2$ ). Esto probablemente explica resultados aparentemente paradójicos, en los que un exceso de enzima puede llevar al individuo a una situación deletérea. Esto se ha

visto en animales o células transgénicas con aumento del número de copias del gen de la SOD y se ha propuesto que podría estar implicado en el síndrome de Down, ya que el gen de la SOD citoplásmica se encuentra en el cromosoma 21 en el hombre. La enzima citoplásmica fue descubierta por Joe McCord e Irwin Fridowich en 1969 (7), lo que supuso un impulso definitivo para el desarrollo de la investigación biomédica sobre radicales libres.

La constante de velocidad de la reacción catalizada por la SOD es del orden de  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , lo que hace que casi esté limitada únicamente por la difusión. Existen dos formas moleculares en los animales: la SOD Cu-Zn (el átomo de Cu es el que realiza directamente la dismutación) abunda en el citoplasma, es dimerica y tiene un peso molecular bajo (30 kDa); la SOD Mn (el átomo de manganeso realiza la dismutación) abunda en las mitocondrias, es tetramérica y tiene un peso molecular mayor (80 kDa). La SOD Cu-Zn se inhibe en presencia de cianuro o de dietilditiocarbamato (DDC), mientras que la SOD-Mn no resulta inhibida. Esto se suele aprovechar para medir las dos formas en homogeneizados celulares. Sin embargo, la interacción del cianuro o el DDC con el sistema generador o detector de  $\text{O}_2^-$ , junto con la frecuente inhibición incompleta de la SOD-Cu-Zn y la gran desproporción de las dos formas (del orden de 9:1) en tejidos como el hígado dificulta la obtención de resultados fiables con ese tipo de métodos. En las procariotas existen SOD con número variable de subunidades y con Fe, Mn o ambos como metal. La secuencia de aminoácidos de la SOD de procariotas guarda homología con la SOD-Mn de los animales pero no con la SOD Cu-Zn, lo que está de acuerdo con la hipótesis del origen simbiótico de las mitocondrias. Se ha descrito otra SOD-Cu-Zn dimerica, presente en líquidos extracelulares como el plasma, la linfa o el líquido sinovial, que podría ser de especial relevancia en el control de las reacciones inflamatorias. El marcaje inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales sugiere que la SOD Cu-Zn es predominantemente peroxisómica, al menos en fibroblastos humanos y en células de tumores hepáticos. Su localización citosólica podría deberse a la rotura de los peroxisomas durante la homogeneización (50).

## 7.2. Catalasas

Las catalasas catalizan dos tipos de reacciones. En la reacción *catalítica* se produce la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno. Una se oxida a oxígeno y la otra se reduce a dos moléculas de agua. En la reacción *peroxidativa* se utiliza un sustrato inespecífico como reductor para transformar una sola molécula de peróxido de hidrógeno en dos de agua. Es decir, en este caso la enzima actúa como una peroxidasa. La enzima tiene una  $K_M$  y una  $V_{max}$  muy altas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que la convierte en principio en más adecuada para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  celular cuando su concentración sube mucho. Es una de las enzimas más activas que se conocen, exhibiendo una actividad molecular de 5.600.000 moléculas de peróxido de hidrógeno por minuto por molécula de enzima. Abunda en los peroxisomas en animales como la rata, pero en otras especies como el cobayo hay datos

que apoyan su presencia en el citosol. Su peso molecular es muy alto (240 kDa) y es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de Fe realiza el intercambio redox.

### 7.3. Glutation peroxidadas

Las glutatión peroxidadas (GPx) eliminan hidroperóxidos utilizando GSH (glutatión reducido) como reductor. Esta actividad fue descubierta por Mills en la década de los cincuenta. Una forma enzimática es dependiente de Se, elemento que es esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína, es tetramérica y tiene entre 76 y 105 kDa. Elimina tanto hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos ( $H_2O_2$ ). La otra forma no contiene selenio, tiene un peso molecular menor, es dimérica (al menos en algunas de sus formas) y sólo es capaz de eliminar ROOH. En rata se ha demostrado que esta segunda forma corresponde a las mismas moléculas que las glutatión transferasas (que intervienen en la detoxificación de xenobióticos) con subunidades  $Y_a$  o  $Y_c$ .

Las GPx están presentes en el citosol y en las mitocondrias (principalmente GPx-Se en este último caso). Su  $K_M$  y  $V_{max}$  por el  $H_2O_2$  son bajas, lo que las hace idóneas para eliminar concentraciones pequeñas de  $H_2O_2$  y complementarias respecto a la catalasa. No pueden trabajar en la fracción lipídica, por lo que eliminarían los ROOH lipídicos, reduciéndolos a sus formas estables (ROH), sólo tras la liberación previa del ácido graso peroxidado desde la membrana al citosol por parte de fosfolipasas. El grupo de Ursini ha caracterizado recientemente, sin embargo, otra GPx dependiente de Se que trabajaría directamente en la fracción lipídica. Esta GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos (PH-GPx) se distribuye en muchos tejidos, es más resistente a la deficiencia en selenio y requiere más selenio para mostrar toda su actividad (51). Existen otras GPx en el plasma antigénicamente diferentes de las citosólicas. Son glucoproteínas, con un  $M_r$  de 22.500 según la determinación por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y podrían proceder del riñón (52).

### 7.4. Glutation reductasas

Las glutatión reductasas reducen una molécula de glutatión oxidado (GSSG) a dos de GSH a expensas de equivalentes de reducción en forma de NADPH. Puesto que el pool de GSH celular es limitado y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula, esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento de la eliminación de  $H_2O_2$  por la vía de la GPx, así como para la reconstitución del GSH oxidado no enzimáticamente. Las GSH reductasas presentan FAD unido a la enzima, que es esencial al actuar como coenzima. Están presentes en el citosol y en las mitocondrias. Puesto que la glutatión reductasa precisa a su vez de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, las enzimas de la vía de las

pentosas glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (productoras citosólicas de NADPH) constituyen una segunda línea de defensa antioxidante.

### 7.5. Regulación génica de las enzimas antioxidantes

Las concentraciones de enzimas antioxidantes en las células están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente en respuesta a factores de transcripción que detectan cambios en el nivel de estrés oxidativo (53). Durante la evolución han aparecido equipos específicos de genes con promotores especialmente diseñados para este propósito. La exposición de *E. coli* y *S. typhimurium* al  $H_2O_2$  induce hasta 30 proteínas detectadas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Algunas se han identificado y se solapan con las inducidas por choque térmico u otras formas de estrés oxidativo. La inducción está controlada por una proteína OxyR que se une al ADN al oxidarse en presencia de peróxido de hidrógeno. El locus génico que corregula estas proteínas de estrés se denomina *oxyR* y controla a la catalasa, la GSH reductasa, y la alquilhidroperoxidasa. Otro locus génico diferente, llamado regulón *soxR* (que responde a superóxido), controla nueve proteínas incluyendo a la SOD-Mn, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la endonucleasa IV (implicada en la reparación del ADN), así como proteínas ribosómicas (S6) o de membrana (OmpF). El locus está formado por los genes *soxR* y *soxS*, separados sólo por 85 pares de bases. El sistema también responde a agentes que generan radicales libres por ciclos redox (como el paraquat), o a descensos en los niveles de NAD(P)H celular. En los eucariotas los mecanismos de regulación se conocen mucho menos, aunque parecen jugar un papel importante los propios cofactores metálicos de las enzimas antioxidantes Cu, Fe, Mn y Se. Varias hormonas y citocinas también parecen tener un papel en los animales. Así, el factor de necrosis tumoral (TNF) y algunas interleucinas inducen la SOD en el pulmón de rata (54) y aumentan la expresión de la catalasa, la GPx y la GSH reductasa. Las actividades de la SOD y de la catalasa también aumentan en el riñón o el pulmón de roedores tras el tratamiento con estrógenos o dexametasona (55).

### 7.6. Ascorbato

Los antioxidantes de bajo peso molecular son también muy importantes para la homeostasis redox. La idea de que el ascorbato es un reductor importante en el organismo fue introducida por primera vez por Szent-Györgyi en 1928 (56) y el concepto de su enorme importancia para la salud humana fue enfatizado durante varias décadas por otro premio Nobel, Linus Pauling. Esta sustancia, que sólo es una vitamina (Vit. C) en muy pocos animales como el hombre o el cobayo, puede existir en tres estados redox: ascorbato (reducido), radical semidehidroascorbato (AFR; tras la oxidación monoeléctrica del ascorbato) y dehidroascorbato (DHA; tras la oxidación bielectrónica del ascorbato). Puede eliminar el  $O_2^{\cdot -}$ , el  $OH^{\cdot}$  o el  $H_2O_2$  y también extinguir singlete (57). El DHA, aunque muy inestable, puede ser

reducido de nuevo a ascorbato a partir de equivalentes de reducción del NADPH mediante la catálisis por una DHA reductasa (58) o por enzimas dependientes de GSH que corresponderían (59) o no (60) a tioltransferasas. También se ha descrito recientemente una AFR reductasa en la membrana plasmática que reduce AFR extracelular a partir de NADH (61). La medida de la razón DHA/ascorbato puede constituir un buen estimador del estrés oxidativo celular (62).

Se sabe que niveles apropiados de ascorbato en la dieta, mucho mayores que los necesarios para evitar el escorbuto, reducen drásticamente el daño oxidativo *in vivo* a lípidos y proteínas en animales como el cobayo que, igual que el hombre, no pueden sintetizar este antioxidante (63). Una revisión reciente indica que los niveles de ascorbato disminuyen de forma consistente con la edad en el hombre y que este efecto no se debe a un descenso en su ingesta (63). Además, los niveles tienden a ser inferiores en varones que en mujeres (63). El posible papel protector del ascorbato y otros antioxidantes naturales en la dieta frente al desarrollo de cánceres (64), enfermedades cardiovasculares (65), cataratas (66) y otras enfermedades degenerativas (63) se basa, en gran medida, en estudios epidemiológicos o de intervención en humanos y es objeto de intenso debate en la actualidad. Según algunos autores, el carácter preventivo ampliamente aceptado de las dietas ricas en frutas y verduras frente a muchos cánceres podría deberse a su alto contenido en antioxidantes como el ascorbato.

### 7.7. Glutation

Se trata de un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicocola que constituye el principal tiol no protéico celular. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas. Protege de la oxidación a grupos -SH esenciales de las proteínas. También puede reaccionar con radicales libres como el  $O_2^{\cdot -}$  o el  $OH^{\cdot}$ . Al reaccionar con oxidantes, el GSH se oxida a GSSG, que presenta un puente disulfuro entre dos moléculas de glutatión. El GSSG es muy tóxico para las células, motivo por el cual éstas tienden a mantener una razón GSSG/GSH hepática enormemente baja (hasta 0.03 o menor), mediante la reducción del GSSG a GSH con la glutatión reductasa, o exportando activamente el GSSG al exterior celular. Hasta tal punto es esto así que la medida de la razón GSSG/GSH se considera un estimador fiable del grado de estrés oxidativo tisular. También se ha descrito la capacidad del GSH para realizar reacciones de «extinción» del  $O_2$  singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo (triplete). El GSH interviene también en muchas funciones normales de catálisis, metabolismo y transporte en las células.

Gracias a los trabajos del grupo de Meister (67) se sabe que el GSH y el ascorbato interactúan de forma cooperativa (67, 68). Así, el ascorbato es capaz de proteger a los cobayos y a las ratas recién nacidas (que no sintetizan el ácido

ascórbico) de la deficiencia en GSH causada por la inhibición de su síntesis tras el tratamiento con butionina sulfoximina (67). Los ratones adultos, que sí sintetizan el ascorbato, resisten sin embargo esta ausencia de GSH, aunque muestran anomalías en varios tejidos, especialmente en las mitocondrias. Dichas alteraciones remiten tras la suplementación de la dieta con ascórbico, manipulación que eleva los niveles de GSH (69). El tratamiento con ésteres de GSH también es capaz de evitar el escorbuto en cobayos sometidos a dietas sin vitamina C (67).

### 7.8. Vitamina E

En la naturaleza existen ocho sustancias con actividad vitamina E, el d- $\alpha$ , d- $\beta$ , d-gamma, y d-delta tocoferol y los correspondientes tocotrienoles. De ellos, el d- $\alpha$ -tocoferol es el que muestra más actividad biológica y constituye el estándar de comparación. La vitamina E suele ser el principal antioxidante de las membranas en las células animales. Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Su solubilidad en la membrana le permite la accesibilidad directa a grupos peroxil (ROO) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales serían entonces degradados hasta alcoholes (estables) por la GPx. La importancia capital de esta reacción es que impide que los radicales ROO oxiden a otra sustancia orgánica; es decir, impide la reacción de propagación (multiplicativa), que es la principal causante de la peroxidación lipídica. Otro mecanismo posible es la reacción con radicales alcoxil (RO), lo que podría ser de utilidad (limitando también la propagación) en caso de que la degradación de hidroperóxidos por la vía de la GPx no hubiese sido totalmente eficiente. En ambos casos al reaccionar la vitamina se convierte en radical tocoferilo (VitEO). Puesto que el pool de vitamina E celular es pequeño, el sistema sólo es funcional si la forma reducida de la vitamina E (VitEOH) se regenera a la misma velocidad con la que se degrada. Se ha propuesto que este papel regenerador podría correr a cargo del ascorbato, ocurriendo la interacción en la interfase citosol-membrana, lo que plantearía la posibilidad de que ambas sustancias trabajen en tándem desde el punto de vista redox. Esto se ha visto muchas veces *in vitro* (70, 71) pero aún no está del todo claro *in vivo* (72, 73).

La vitamina E es particularmente importante en los orgánulos, tejidos y dietas que contienen niveles relativamente altos de ácidos grasos poliinsaturados, para evitar su degradación oxidativa. Esto ocurre en el cerebro, las mitocondrias o animales tratados con dietas ricas en aceites de pescado. Una de las fuentes dietéticas más concentradas de vitamina E es el aceite de germen de trigo que contiene más de 1 gramo por Kg. La absorción eficiente de la vitamina E necesita la presencia de sales biliares en el intestino, por lo cual su suplementación aislada no es efectiva a menos que se realice con las comidas. Datos recientes sugieren que la suplementación con sólo 100 mg de vitamina E/día tras las comidas durante un mes es capaz de disminuir el estrés oxidativo en humanos adultos sanos (74).

## 7.9. Carotenoides

Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas, y en los animales se obtienen también a partir de la dieta. Tienen una gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción como la del O<sub>2</sub> singlete a triplete y también pueden interaccionar con radicales libres a presiones parciales bajas de oxígeno como las que puede haber en los tejidos. Se han descrito casi 600 carotenoides diferentes (75). Sin embargo, solo algunos de ellos aparecen en cantidades apreciables en los tejidos y el plasma. Entre estos últimos se encuentran el  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, la luteína, el licopeno, la zeaxantina y la criptoxantina. Además de su papel antioxidante, muchos carotenoides son precursores de la vitamina A, funcionan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, y protegen contra la sensibilización por la radiación luminosa. Su capacidad antioxidante se ha demostrado en soluciones homogéneas, liposomas, lipoproteínas, membranas biológicas, células y animales enteros. La capacidad antioxidante en microsomas y mitocondrias hepáticas de rata se muestra a niveles entre 0.1 y 100  $\mu$ M según el prooxidante y el sistema utilizado (75).

El  $\beta$ -caroteno y los tocoferoles se protegen mutuamente frente a la pérdida por oxidación (76) y muestran efectos sinérgicos en microsomas (77). También se han descrito interacciones positivas de los carotenos con la SOD, el ascorbato y otros antioxidantes en los tejidos (75). La revisión de la literatura indica que la mayor parte de los trabajos muestran una capacidad antimutagénica (78) y anticarcinogénica (79) de los carotenoides en modelos animales, aunque aún no existen evidencias directas de que esta capacidad se deba a su actividad antioxidante. Lo mismo se puede decir de los estudios epidemiológicos realizados en humanos, que sugieren que los carotenoides pueden disminuir el riesgo de cáncer y otras enfermedades degenerativas (80).

## 7.10. Otros antioxidantes

Existen otras muchas sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta. No se tratan en esta revisión por concisión pero deben ser mencionadas. Entre ellas se encuentran el ácido úrico, la bilirrubina, la transferrina y la ferritina (por ligar hierro en plasma o tejidos), los quelantes de iones metálicos, proteínas como la ceruloplasmina que tienen actividad ferroxidasa, polifenoles, flavonoides, aminas aromáticas, haptoglobinas, o el ácido lipoico. Entre los antioxidantes fenólicos potentes presentes en el mundo vegetal se encuentran la curcumina, las catequinas, la quercetina, el kaempferol o el ácido caféico. Aunque en las décadas pasadas se habló de la ubiquinona fundamentalmente como el generador mitocondrial de radicales libres (9), hoy sabemos que esta sustancia actúa fundamentalmente como antioxidante (81-83), mientras que dicha generación mitocondrial ocurre sin duda en transportadores de electrones como el Complejo I (8, 10).

Recientemente se ha propuesto que la hormona de origen pineal melatonina, que interviene en el control de los ritmos circadianos, sería el antioxidante más potente, especialmente en el núcleo celular (84). Sin embargo en muchos casos, como parece ocurrir con la melatonina, esta capacidad antioxidante se da a concentraciones que no parece que se alcancen *in vivo*. A fin de cuentas, una infinidad de sustancias son susceptibles de interactuar con los radicales libres simplemente porque éstos son muy reactivos. Pero para que la sustancia sea estrictamente un antioxidante *in vivo*, dicha interacción debe darse a las concentraciones que ocurren en los tejidos y el líquido extracelular. Esto se cumple sin ninguna duda al menos en el caso de los antioxidantes a los que se ha dedicado una sección propia en esta revisión. Hace aproximadamente una década se habló del papel antioxidante de los estrógenos, posibilidad que hoy prácticamente ya no se investiga. Entre los antioxidantes sintéticos se encuentran el ebselen (que mimetiza a la GPx), la N-acetilcisteína, los ésteres de GSH, el probucol, la  $\alpha$ -fenil N-tert-butilnitrona, la nitecapona, la penicilamina, los lazaroides, los aminosalicilatos, los nitroxidos, el tamoxifeno, o los plasmalógenos.

## 8. CONCLUSION

En resumen, el oxígeno es una de las moléculas más necesarias para los seres vivos, pero también muestra toxicidad porque su metabolismo en las células da lugar a la formación de radicales libres en cantidades pequeñas pero significativas. La fracción de estos radicales que no es interceptada antes de alcanzar una macromolécula causa modificaciones en los lípidos insaturados, las proteínas y el ADN. Este daño oxidativo parece estar implicado en la aparición de muchas enfermedades degenerativas como las cardiovasculares, el Parkinson o el cáncer. El daño oxidativo al ADN parece ser importante en relación con el envejecimiento, fenómeno que se encuentra en la raíz de esas enfermedades y que ocurre en todos los humanos adultos por muy sanos que se encuentren. Para evitar el exceso de radicales libres, han aparecido una serie de defensas antioxidantes. Unas son endógenas, como las enzimas antioxidantes y el glutatión, y están controladas por *loci* génicos que pueden inducirse para hacer frente a incrementos agudos del estrés oxidativo. Otras son exógenas, como las vitaminas E y C y los carotenoides, y se pueden obtener con una dieta equilibrada. Mientras que para hacer frente a excesos transitorios de radicales libres la mejor solución parecen ser los antioxidantes, los animales que han aumentado su longevidad y han enlentecido su envejecimiento a lo largo de la evolución parecen haber elegido como solución más eficiente disminuir la intensidad de generación endógena de radicales libres, así como aumentar su capacidad de reparación del daño al ADN.

Esta introducción general sobre radicales libres, daño oxidativo y antioxidantes debe servir como ventana para asomarse a la amplia variedad de temas interesantes cubiertos en este volumen, que cubren la farmacología, toxicología y patología del estrés oxidativo en el organismo joven y viejo y algunos de los métodos más sofisticados disponibles para valorarlo.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Scheele CW (1777), Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer. Uppsala and Leipzig. Section 2. En: Scheele CW, «The collected papers of Carl Wilhelm Scheele». Bell and Sons, London 1931 y Kraus Reprint Co., New York, 1971, pp. 85-178.
2. Priestley J (1775), Experiments and observations on differents kinds of air. Vol. II, Sections III-V. En: Priestley J. «The discovery of oxygen» Part I. Edinburgh: The Alembic club, 1923, pp. 29-103.
3. Stadie WC y Haugaard N (1945), Oxygen poisoning. V. The effect of high oxygen pressure upon enzymes: Succinic dehydrogenase and cytochrome oxydase. *J Biol Chem* 161: 175-180.
4. Tjioe G y Haugaard N (1972), Oxygen inhibition of cristalline glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and disappearance of enzyme sulfhydryl groups. *Life Sci* 11: 329-335.
5. Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954), Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* 119: 623-626.
6. Michaelis L (1946), Fundamentals of oxidation and respiration. *Am Sci* 34: 573-596.
7. McCord JM y Fridovich I (1969), Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
8. Turrens JF y Boveris A (1980), Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191: 421-427.
9. Boveris A, Cadenas E y Stoppani OM (1976), Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 153: 435-444.
10. Herrero A y Barja G (1997), Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev*. En prensa.
11. Nohl H y Jordan W (1986), The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Comms* 138: 533-539.
12. Shapira AHV (1995), Mitochondria, free radicals, neurodegeneration and aging. En: (Cutler R, Packer L, Bertram J, Mori A eds.) *Oxidative Stress and Aging*. Birkhäuser, Basel, pp. 159-169.
13. Harman D (1972), The biological clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147.
14. Eimon PM, Chung SS, Lee CM, Weindruch R, Aiken JM (1996), Age-associated mitochondrial DNA deletions in mouse skeletal muscle: comparison of different regions of the mitochondrial genome. *Develop Genetics* 18: 107-113.
15. Bellavite P (1988), The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad Biol Med* 4: 225-261.
16. Ward P, Warren JS y Johnson KJ (1988), Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad Biol Med* 5: 403-408.
17. Morel F, Doussiere J y Vignais PV (1991), The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201: 523-546.
18. Ames BN y Shigenaga MK (1993), Oxidants are a major contributor to cancer and aging. En: *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Chinchester, England, pp. 1-15.
19. McCord J (1987), Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 46: 2402-2406.
20. Barja G (1993), Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Rad Res Comms* 18: 63-70.
21. Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L y Hochstein P (1990), Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Rad Biol Med* 8:145-152.
22. Fontecave M, Graslund A y Reichard P (1987), The function of superoxide dismutase during the enzymatic formation of the free radical of rubonucleotide reductase. *J Biol Chem* 262: 12332-12337.

23. Reichard P y Ehrenberg A (1983), Ribonucleotide reductase-a radical enzyme. *Science* 221: 514-519.
24. Radi R, Beckman JS, Bush KM y Freeman BA (1991), Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 226: 4244-4250.
25. White AA, Karr DB y Patt CS (1982), Role of lipooxygenase in the O<sub>2</sub>-dependent activation of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem J* 204: 383-393.
26. Burke TM y Wolin MS (1989), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cGMP may function as an O<sub>2</sub> sensor in the pulmonary artery. *J Appl Physiol* 66: 167-170.
27. Wharton AR, Montgomery ME y Kent RS (1985), Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 76: 295-302.
28. Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA y Serhan CN (1987), Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* 237: 1171-1176.
29. Kanabus-Kaminska J.M. y Girardot J.M. (1984), Inhibition of vitamin-K-dependent carboxylase by metal ions and metal complexes: a reassessment. *Arch Biochem Biophys* 228: 646-652.
30. Handin RI, Karabin R y Boxer GJ (1977), Enhancement of platelet function by superoxide. *J Clin Invest* 59: 959-965.
31. Scott JA y Rabito CA (1988), Oxygen radicals and plasma membrane potential. *Free Rad Biol Med* 5: 237-246.
32. Shapiro BM (1991), The control of oxidant stress at fertilization. *Science* 252: 533-536.
33. Aneshansley DJ (1983), Thermal concomitants and biochemistry of the explosive discharge mechanism of some little known bombardier beetles. *Experientia* 39: 366-368.
34. Henry JP, Monny C, Michelson AM (1975), Characterization and properties of Pholas luciferase as a metalloprotein. *Biochemistry* 14: 3458-3466.
35. Barja de Quiroga G, López-Torres M, Pérez-Campo R, Abelenda M, Nava MP, Puerta ML (1991), Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue. *Biochem J* 277: 289-292.
36. Porter NA, Cldwell SE, Mills KA (1995), Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30: 277-290.
37. Miyazawa T, Fujimoto K, Suzuki T, Yasuda K (1994), Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymol* 233C: 324-332.
38. Cadenas S, Lertsiri S, Otsuka M, Barja G y Miyazawa T (1996), Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid. *Free Rad Res* 26: 485-493.
39. Pacifici RE, Salo DC y Davies KJA (1989), Macroxyprote-inase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Rad Biol Med* 7: 521-536.
40. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA y Markesbery WR (1991), Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10540-10543.
41. Fraga CG, Shinegaga MK, Park J-W, Degan P y Ames BN (1990), Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4533-4537.
42. Richter Ch, Park JW y Ames BN (1988), Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci* 85: 6465-6467.
43. Ozawa T (1995), Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exper Gerontol* 30: 269-290.
44. Barja G. (1996), Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento. *Rev Esp Geront Geriatr* 31: 153-161.
45. Hirano T, Homma Y y Kasai H (1995), Formation of 8-hydroxyguanine in DNA by aging and oxidative stress. En: (Cutler R, Packer L, Bertram J, Mori A eds.), *Oxidative Stress and Aging*. Basel: Birkhäuser, pp. 69-76.

46. Adelman R, Saul RL y Ames BN (1988), Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 2706-2708.
47. Cutler RG, Antioxidants and aging (1991). *Am J Clin Nutr* 53: 373S-379S.
48. Richter Ch. (1988), Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 241: 1-5.
49. Hansford RG (1983), Bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 726: 41-28.
50. Keller GA, Warner TG, Steimer KS y Hallewell RA (1991), Cu,Zn, Superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7381-7385.
51. Weitzel F, Ursini F y Wendel A (1990), Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochem Biophys Acta* 1036: 89-94.
52. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H y Moriuchi T (1991), Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem (Tokyo)* 109: 918-923.
53. Harris ED (1992), Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6: 2675-2683.
54. Visner GA, Block ER, Burr IM, Nick HS (1991), Regulation of manganese superoxide dismutase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 260:L444-L449.
55. Clerch LB, Iqbal J y Massaro D (1991), Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *Am J Physiol* 260: L428-L433.
56. Szent-Gyorgyi A (1928), Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem J* 22: 1387-1409.
57. Sies H y Stahl W, Sundquist AR (1992), Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 669: 7-20.
58. Rose RC y Bode AM (1993), Biology of free radical scavenger: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 7: 1135-1142.
59. Wells WW, Xu DP (1994), Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg Biomembr* 26: 369-377.
60. Maellaro E, Del Bello B, Sugherini L, Santucci A, Comporti M y Casini AF (1994), Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem J* 301:471-476.
61. Navas P, Villalba JM y Córdoba F (1994), Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1197: 1-13.
62. Barja G, Hernanz A (1994), Vitamin C, Dehydroascorbate, and Uric acid in Tissues and Serum: High-Performance Liquid Chromatography. *Methods in Enzymol.* 234D:331-337.
63. Barja G (1996), Ascorbic acid and aging. En: (J.R. Harris ed.), «*Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*». Plenum Press, New York, USA. Vol. 25, pp. 157-188.
64. Blot W.J, Li J.Y, Taylor P.R, Guo W, Dawsey S, Wang G.Q, Yang C.S, Zheng S.F, Gail M, Li G.Y, Yu Y, Liu B, Tangrea J, Sun Y, Liu F, Fraumeni J.F, Zhang Y.H, Li B (1993), Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Nat. Cancer Inst.* 85:1483-1491.
65. Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stahelin HB, Eichholzer M, Luedin E (1993), Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 57: 787S-797S.
66. Vitale S, West S, Hallfrisch J, Alston C, Wang F, Moorman C, Muller D, Singh V y Taylor HR (1993), Plasma antioxidants and risk of cortical and nuclear cataract. *Epidemiol* 4: 195-203.
67. Meister A (1994), Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269: 9397-9400.
68. Winkler BS, Orselli SM y Rex TS (1994), The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Rad Biol Med* 17: 333-349.

69. Jain A, Martensson J, Mehta T, Krauss AN, Auld PAM y Meister A (1992), Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type-2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5093-5097.
70. Niki E (1991), Vitamin C as an antioxidant. *World Rev Nutr Diet* 64: 1-30.
71. Yi OS, Han D y Shin HK (1991), Synergistic antioxidative effects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system. *J Am Oil Chem Soc* 68: 881-883.
72. Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M y Barja G (1995), Vitamin E protects from lipid peroxidation without depressing antioxidants in the guinea pig liver in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 27: 1175-1181.
73. Cadenas S, Lertsiri S, Otsuka M, Barja G y Miyazawa T (1996), Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid. *Free Rad Res* 26: 485-493.
74. Cadenas S, Rojas C, Méndez J, Herrero A y Barja G (1996), Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy humans under normal conditions. *Pharmacol Toxicol* 79: 247-253.
75. Krinsky NI (1993), Actions of carotenoids in biological systems. *Annu Rev Nutr* 13: 561-587.
76. Palozza P y Krinsky NI (1991), The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene. *Free Rad Biol Med* 11: 407-414.
77. Palozza P y Krinsky NI (1992),  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 297: 184-187.
78. Krinsky NI (1993), Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann NY Acad Sci* 686: 229-242.
79. Rousseau EJ, Davison AJ y Dunn B (1992), Protection by  $\beta$ -carotene and related compounds against oxygen mediated cytotoxicity and genotoxicity. *Free Rad Biol Med* 13: 407-433.
80. Byers T y Perry G (1992), Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr* 12: 139-159.
81. Beyer RE (1992), An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol* 70: 390-403.
82. Ernster L y Forsmark-Andrée P (1993), Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig* 71: S60-S65.
83. Kanno T, Utsumi T, Takehara Y, Ide A, Akiyama J, Yoshioka T, Horton A y Utsumi K (1996), Inhibition of neutrophil-superoxide generation by  $\alpha$ -tocopherol and coenzyme Q. *Free Rad Res* 24: 281-289.
84. Reiter RJ (1995), Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging Clin Exp Res* 7: 340-351.

# FARMACOS Y HEPATOTOXICIDAD: MECANISMOS MOLECULARES DE LA HEPATOTOXICIDAD POR FARMACOS

JOSE V. CASTELL Y MARIA JOSE GOMEZ-LECHON  
Unidad de Hepatología Experimental. Centro de Investigación.  
Hospital Universitario La Fe.  
Avda de Campanar 21, 46009 Valencia.

## SUMARIO

---

1. LA HEPATITIS DE ORIGEN IATROGENICO
2. MECANISMOS MOLECULARES EN LA HEPATOTOXICIDAD INTRINSECA
3. ESTUDIO «IN VITRO» DE HEPATOTOXINAS INTRINSECAS
4. HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRASICA
5. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LAS HEPATITIS ALERGICAS
6. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA CONFIRMAR IN VITRO UN DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS ALERGICA
7. BIBLIOGRAFIA

## 1. LA HEPATITIS DE ORIGEN IATROGENICO

Las sustancias capaces de producir daño al hígado, y en concreto a los hepatocitos, se denominan hepatotoxinas. Entre ellas se suele distinguir hepatotoxinas intrínsecas e idiosincrásicas (1, 2). Las primeras, producen lesiones en todos los individuos expuestos por encima de una cierta concentración, mientras que las segundas producen daño hepático sólo en algunos individuos, en ocasiones sin que exista aparente correlación con la dosis administrada. Las hepatotoxinas intrínsecas pueden actuar sobre los hepatocitos de manera directa (hepatotoxinas activas), o tras ser metabolizados por enzimas hepáticos (hepatotoxinas latentes).

La hepatotoxicidad idiosincrásica puede ser, bien la consecuencia de un metabolismo anormal del compuesto en individuos susceptibles que producen cantidades excesivas de metabolitos tóxicos (idiosincrasia metabólica), o bien el resultado de un ataque por parte del sistema inmune hacia hepatocitos que han estado en contacto con el fármaco (hepatitis alérgica). Hay ciertos hechos diferenciales que ayudan a discriminar entre la hepatitis alérgica y la toxicidad debida a idiosincrasia metabólica, y es el hecho de que la primera se presenta siempre tras varias administraciones asintomáticas del fármaco (periodo previo de sensibilización), se observa una recurrencia de la lesión hepática tras la administración fortuita de una pequeña dosis, hay eosinofilia, fiebre e infiltrado inflamatorio en el hígado. Las lesiones hepáticas cuya causa es el metabolismo anormal del fármaco son, por el contrario, dosis-dependiente en los individuos susceptibles y pueden aparecer tras la primera administración del medicamento.

El daño causado por los fármacos a los hepatocitos puede ser citotóxico, genotóxico o metabólico (1). La mayoría de la hepatotoxinas intrínsecas producen efectos citotóxicos sobre los hepatocitos, lo que se traduce en cambios morfológicos importantes (vacuolización, esteatosis, acidofilia etc.) y se acompaña de aumentos de enzimas citosólicos hepáticos en el suero. Las genotoxinas son sustancias que producen daños al ADN, lo que puede dar origen a la aparición de hepatocarcinomas primarios. Finalmente, los xenobióticos pueden alterar el metabolismo de los hepatocitos sin causarles la muerte celular. Esto se manifiesta como alteraciones de su capacidad funcional y, en particular, de la captación, conjugación y secreción de ácidos biliares, cuyo resultado final es la alteración del flujo hepático biliar (colestasis).

El hígado desempeña un papel clave en el metabolismo de los xenobióticos modificándolos químicamente para convertirlos en metabolitos más solubles y, en definitiva, más fácilmente eliminables (reacciones de biotransformación). Aunque estas reacciones generalmente conllevan una disminución del potencial tóxico (razón por la cual se les conoce también con el nombre de reacciones de detoxificación) hay muchos casos en los que el propio metabolismo del fármaco es la causa primaria del daño hepático (reacciones de bioactivación). Este suele ser el caso en las reacciones catalizadas por los citocromos P450 que, en el transcurso de la oxidación, pueden generar intermedios metabólicos más reactivos capaces de reaccionar con nucleófilos, unirse covalentemente a macromoléculas o iniciar en la célula reacciones radicalarias en cadena con el resultado de daño celular (2,3). Para contrarrestar estos efectos, los hepatocitos poseen eficaces mecanismos de defensa (enzimas especializados, moléculas reductoras y mecanismos de reparación de ADN y proteínas). En última instancia, es el balance entre la bioactivación, detoxificación y los mecanismos de defensa, lo que determina si la biotransformación de un xenobiótico, llegará a producir daño a los hepatocitos.

Por lo general el daño producido por xenobióticos conduce a un tipo de muerte celular conocido como necrosis, que es precedida por una alteración drástica de la homeostasis celular, y acompañada de cambios en la morfología de las organelas citoplásmicas, aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y salida de componentes citosólicos al espacio extracelular, y un proceso inflamatorio en las áreas circundantes (4).

El otro tipo de muerte celular, apoptosis, se caracteriza por una condensación progresiva de la cromatina nuclear, colapso celular con pérdida de contacto entre células vecinas, y ruptura de la célula con la formación de vesículas acidófilas conocidas como cuerpos apoptóticos. Hay cada vez más evidencias que muestran que la mayoría de los compuestos capaces de producir necrosis de los hepatocitos, pueden también iniciar un proceso apoptótico. De hecho, hay pocas evidencias de que la necrosis inducida por fármacos en el hígado ocurra en total ausencia de apoptosis (4).

## 2. MECANISMOS MOLECULARES EN LA HEPATOTOXICIDAD INTRINSECA

*Alteración del metabolismo celular.* Una de las manifestaciones más frecuentes de hepatotoxicidad es la alteración de las funciones metabólicas del hepatocito por un fármaco o sus metabolitos. Ciertos compuestos pueden actuar como inhibidores enzimáticos, del transporte de iones, o competir con metabolitos celulares en rutas metabólicas del hepatocito (antimetabolitos, tales como galactosamina, etionina, etc). Otro modo de actuación de las hepatotoxinas es la alteración del balance energético de las células, al incrementar la demanda de energía (aumento del consumo de ATP), disminuir la producción de ATP, o ambos procesos a la vez (5). La

disminución de ATP es, de hecho, uno de los fenómenos comunes a muchos procesos tóxicos inducidos por fármacos que con frecuencia precede los estadios irreversibles de la lesión celular (6).

Un ejemplo característico de un aumento de demanda energética por parte de las células, es la síntesis *de novo* de glutatión. El glutatión intracelular es el agente más eficaz frente a intermedios reactivos de naturaleza electrofílica y especies activas del oxígeno. La concentración intracelular del glutatión oxidado no puede superar un cierto nivel, por lo que en el caso de no ser reducido de manera efectiva por la glutatión reductasa, es eliminado de la célula. Esto tiene como resultado, la disminución en términos absolutos de su contenido intracelular, lo que requiere síntesis *de novo* que conlleva una importante demanda de ATP (Figura 1). Una situación similar ocurre cuando un metabolito es eliminado por conjugación con glutatión y los mecanismos de recuperación (hidrólisis del ácido glutámico y glicina, y conversión renal a ácido mercaptúrico) están saturados (6).

La mitocondria es una importante diana de la toxicidad por fármacos. La alteración de la función mitocondrial tiene efectos inmediatos sobre el balance energético de las células, lo que constituye un fenómeno clave en el inicio de la necrosis hepática (7). Varios mecanismos pueden estar implicados en el origen de la lesión mitocondrial: a) inhibición del metabolismo mitocondrial, por ejemplo la fosforilación oxidativa y/o el transporte electrónico (8); b) cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana mitocondrial, como consecuencia del daño oxidativo (peroxidación lipídica tras depleción del glutatión mitocondrial; 8); c) disminución del potencial de membrana por moléculas que se intercalan en la membrana lipídica y d) daño al ADN mitocondrial. En los dos primeros casos la consecuencia es una menor capacidad para síntesis de ATP que se observa de manera inmediata. En el tercero, la toxicidad, por efecto de una disfunción mitocondrial, puede aparecer a medio plazo.

*Peroxidación lipídica.* La peroxidación lipídica es uno de los procesos más frecuentemente implicados en la hepatotoxicidad por fármacos (9). Se trata de una reacción radicalaria que conduce a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular y que en presencia de oxígeno y lípidos insaturados se propaga muy fácilmente. La oxidación de los lípidos da lugar a la formación de un gran número de productos de degradación (hidroperóxidos, aldehidos, cetonas, etc.). La primera consecuencia de este proceso es la profunda alteración de las propiedades fisicoquímicas de las membranas y, como consecuencia de ello, de la funcionalidad de los enzimas allí ubicados (10). Las células utilizan diversas estrategias para prevenir los efectos de una peroxidación lipídica incontrolada: a) inactivación de las especies activas (radicalarias) de oxígeno; b) neutralización de los radicales formados y con ello la inhibición de la reacción radicalaria en cadena, y c) reparación de los lípidos dañados (reducción de los hidroperóxidos lipídicos). La superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa junto con el GSH constituyen los agentes celulares más eficaces contra radicales y especies activas de oxígeno. Finalmente,

antioxidantes tales como la vitamina E, presente en las membranas biológicas, actúan inhibiendo la propagación de la peroxidación lipídica.

*Estrés oxidativo.* El término de estrés oxidativo fue definido por Sies (11) como una alteración del balance entre agentes oxidantes y antioxidantes en la célula. En células aerobias, existe una cierta generación de especies activas de oxígeno como consecuencia de los procesos oxidativos de la respiración. Cosa que también puede ocurrir por una disminución de la capacidad antioxidante de la célula debida a cambios fisiológicos o nutricionales. Ello no constituye estrés oxidativo. Sin embargo, cuando como consecuencia del metabolismo de un xenobiótico hay un aumento de especies activas de oxígeno, acompañado de una disminución de equivalentes de GSH, el balance celular queda desplazado hacia procesos oxidativos (11). El resultado inmediato es un aumento de la peroxidación lipídica, alteración de la funcionalidad de la membrana e, indirectamente, la incapacidad de la célula para generar su propia energía y mantener la homeostasis iónica.

Los compuestos que con más facilidad pueden provocar un estrés oxidativo son aquellos capaces de sufrir repetidos ciclos de oxidación y reducción en el interior de la célula. Un ejemplo representativo de este tipo de toxinas son las quinonas que pueden causar daño celular a través de dos mecanismos (Fig. 1). En primer lugar

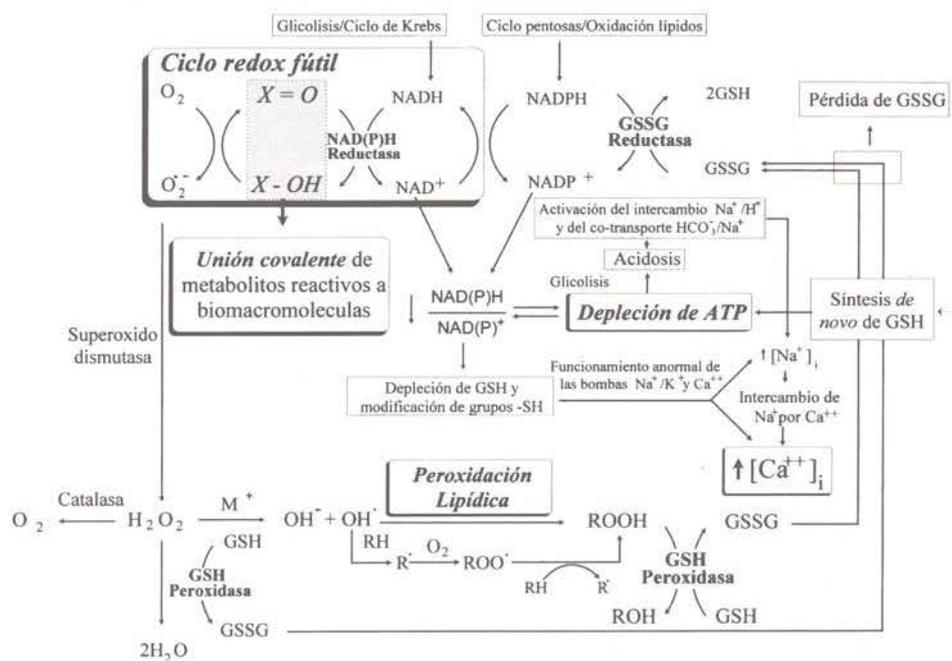


Figura 1. Mecanismos generales en la hepatotoxicidad mediada por fármacos.

las quinonas son compuestos electrofílicos capaces de reaccionar con nucleófilos tales como los grupos tiol del glutatión y las proteínas. Puesto que el glutatión juega un papel clave en la protección de la célula frente a las especies activas de oxígeno, su depleción hace a la célula más vulnerable.

En segundo lugar, ciertas flavoproteínas (citocromo P450 reductasa) catalizan la reducción de las quinonas a semiquinonas, a expensas de NADPH. Esta reacción, a diferencia de la catalizada por la diaforasa (reducción a hidroquinona), genera una especie parcialmente reducida (semiquinona) que fácilmente reacciona con el oxígeno molecular y en una reacción de oxidación, se abstrae un electrón de la semiquinona, oxidándose a quinona. El oxígeno por su parte genera el anión radical superóxido. La quinona es reducida de nuevo por la citocromo reductasa entrando así el xenobiótico en un ciclo repetido de oxidación-reducción (*redox cycling*) cuyo balance estequiométrico es la reducción parcial del oxígeno a expensas de NADPH y la subsecuente producción de anión superóxido (Figura 1).

En el hepatocito existe suficiente actividad superóxido dismutasa para garantizar la rápida conversión del anión superóxido a agua oxigenada, que a su vez puede ser descompuesta bien por la catalasa, o reducida por la glutatión peroxidasa. No obstante lo cual, en presencia de iones metálicos ( $Fe^{++}$ ), el agua oxigenada genera radical  $OH\cdot$ , especie reactiva capaz de abstraer H de lípidos con enlaces insaturados y, generando radicales derivados del lípido, iniciar un proceso de peroxidación lipídica.

Una de las consecuencias importantes del estrés oxidativo inducido por xenobióticos es la modificación de los grupos -SH (oxidación, S-tiolación) de proteínas. Las ATPasas dependientes de calcio son proteínas cuya actividad enzimática es particularmente sensible al estado de sus grupos tioles por lo que su oxidación se traduce en su incapacidad de bombear iones (12, 13).

En la mitocondria hepática ocurre una situación particular: esta organela carece de catalasa por lo que el agua oxigenada generada (bien durante la fosforilación oxidativa, bien a través de *redox cycling* es reducida solamente por la glutatión peroxidasa a expensas del glutatión mitocondrial que es convertido en GSSG. Como quiera que no existe transporte de GSSG hacia el citosol, el balance GSH/GSSG disminuye notablemente y el glutatión tiene que regenerarse a expensas de la reducción de GSSG por el metabolismo mitocondrial. Como consecuencia de ello, la mitocondria es particularmente vulnerable a los xenobióticos capaces de deplecionar GSH.

*Alteraciones de la homeostasis intracelular del calcio.* El calcio intracelular tiene funciones reguladoras sobre la actividad de distintas enzimas, al tiempo que actúa como segundo mensajero de hormonas, factores de crecimiento etc. La concentración de calcio intracelular es muy baja ( $10^{-7}M$ ) en comparación con la de los fluidos extracelulares ( $1-2 \times 10^{-3}M$ ). Los mecanismos de entrada de iones calcio hacia el interior de las células son generalmente los canales voltaje-dependientes activa-

dos por cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática y canales activados por interacciones ligando-receptor (14). Solo de los segundos existen evidencias experimentales claras de que sean operativos en los hepatocitos.

En condiciones normales, la entrada de calcio en el citosol, es contrarrestada por un proceso activo de extrusión de iones hacia el exterior por una calcio-ATPasa de membrana, o por un sistema  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  antiport. La concentración de calcio en el citosol está también controlado por una activa captación de dichos iones tanto hacia la mitocondria como hacia el retículo endoplásmico (Figura 2). La fuerza motriz que arrastra la captación del calcio por la mitocondria es el potencial de membrana que se genera como consecuencia de la fosforilación oxidativa, mientras que en el retículo endoplásmico, la captación se hace por una bomba de calcio dependiente de ATP.

Hay diversos mecanismos por los que una hepatotoxina puede alterar los niveles intracelulares de calcio, por ejemplo, aumentando la entrada de calcio desde el medio extracelular. Pero en los hepatocitos, el mecanismo más frecuente es la salida desde los reservorios intracelulares mitocondria y retículo endoplásmico (Figura 2). Una segunda posibilidad es la alteración de su recaptación hacia las organelas antes mencionadas, o su bombeo hacia el exterior. Aunque existen xenobióticos capaces de interferir el funcionamiento de las ATPasas, la mayoría de ellos actúan indirectamente modificando las propiedades de la membrana (por ejemplo como consecuencia de una peroxidación lipídica), deplecionando los niveles de glutatión (lo que puede llevar a una pérdida de actividad enzimática por modificación de grupos -SH), o bien por una disminución del estado energético de la célula (bajos niveles de ATP).

Cualquiera de los fenómenos antes señalados pueden dar lugar a un aumento sostenido de los niveles de calcio intracelular. La consecuencia inmediata es la formación de protuberancias en la membrana (blebs), fenómeno causado por la desorganización del citoesqueleto y ruptura de proteínas implicadas en el anclaje del citoesqueleto a la membrana celular (15). También se produce activación de fosfolipasas y de proteasas no lisosomales que causan daño irreversible en los componentes celulares (Figura 2). Una elevada concentración de calcio puede provocar la activación de endonucleasas y la fragmentación del DNA similar a lo que se observa en la muerte celular por apoptosis (15).

*Unión covalente del fármaco a proteínas.* En el curso de la biotransformación de xenobióticos pueden formarse especies químicas más reactivas (electrofilos, radicales, conjugados inestables) capaces de reaccionar con macromoléculas celulares formando aductos estables (16). Entre los grupos funcionales más frecuentemente implicados cabe destacar carbonilos  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturados, aldehidos, epóxidos, y algunos ésteres (conjugados con ácido glucurónico, o con sulfato).

Las proteínas, ADN y ARN son las macromoléculas diana de la unión covalente. Por lo general el grado de formación de aductos covalentes fármaco-macromo-

## Alteración de la homeostasis del calcio y sus efectos

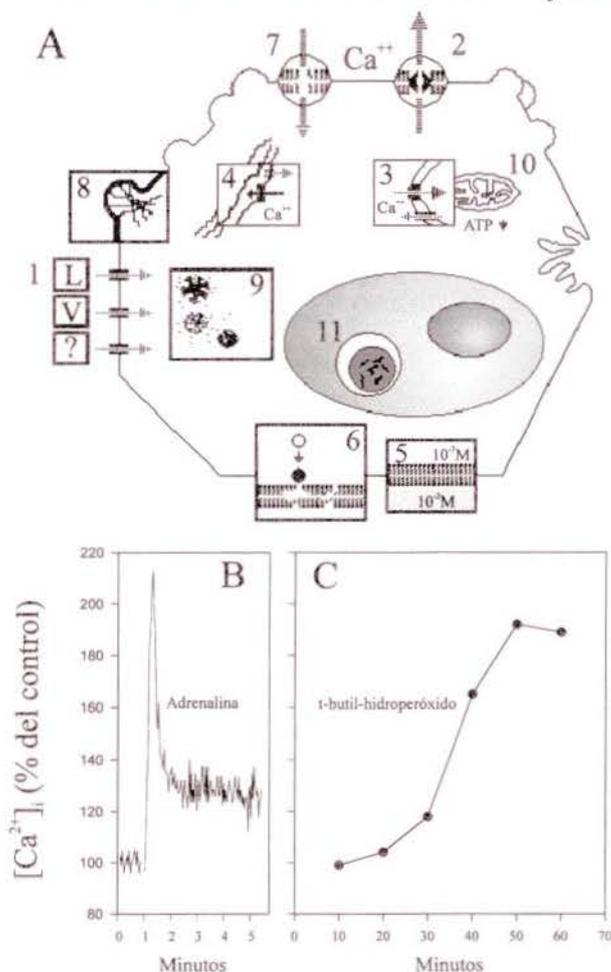


Figura 2. *Alteración de la homeostasis del calcio inducida por fármacos y sus consecuencias.* (A) La entrada de iones calcio hacia el interior de las células se produce, en condiciones fisiológicas, a través de canales (voltaje y ligando dependientes), de los que sólo los segundos son operativos en los hepatocitos (1). La entrada de calcio, es contrarrestada por calcio-ATPasa y un sistema  $Na^+/Ca^{++}$  antiport (2). En el hepatocito, la concentración de calcio en el citosol está también controlado por una activa captación por la mitocondria (3) y el retículo endoplásmico (4), que hace que la concentración citosólica sea baja respecto al medio externo (5). Hay diversos mecanismos por los que una hepatotoxina puede alterar los niveles intracelulares de calcio entre ellos alteraciones de la membrana como consecuencia de una peroxidación lipídica (6, 7), e interferencia en el funcionamiento de las ATPasas. La consecuencia es la formación de protuberancias en la membrana («blebs», 8), activación de fosfolipasas, proteasas e hidrolasas (9), incapacidad de la célula de producir suficiente ATP (10), y la activación de endonucleasas y la fragmentación del DNA (11). A diferencia de lo que ocurre cuando un hepatocito es estimulado mediante una señal fisiológica (epinefrina) en donde el aumento del  $Ca^{++}$  intracelular es rápido y transitorio (B), las hepatotoxinas producen un aumento más lento pero duradero (C).

lécua depende de la proporción del fármaco transformado en metabolito reactivo, de su vida media (difusión del lugar de formación), y de la capacidad para reaccionar con grupos funcionales de la macromolécula diana. La localización celular de los aductos depende tanto del lugar de generación como de la naturaleza y reactividad del metabolito reactivo. El retículo endoplásmico, por ejemplo, lugar de la ubicación del complejo enzimático P450, es donde con más frecuencia se localizan los aductos fármaco-proteína (17), aunque también se han encontrado en la membrana celular (16). Ello parece consecuencia lógica de la proximidad al lugar de formación de las especies reactivas y, de hecho, las isoformas del P450 ubicadas en

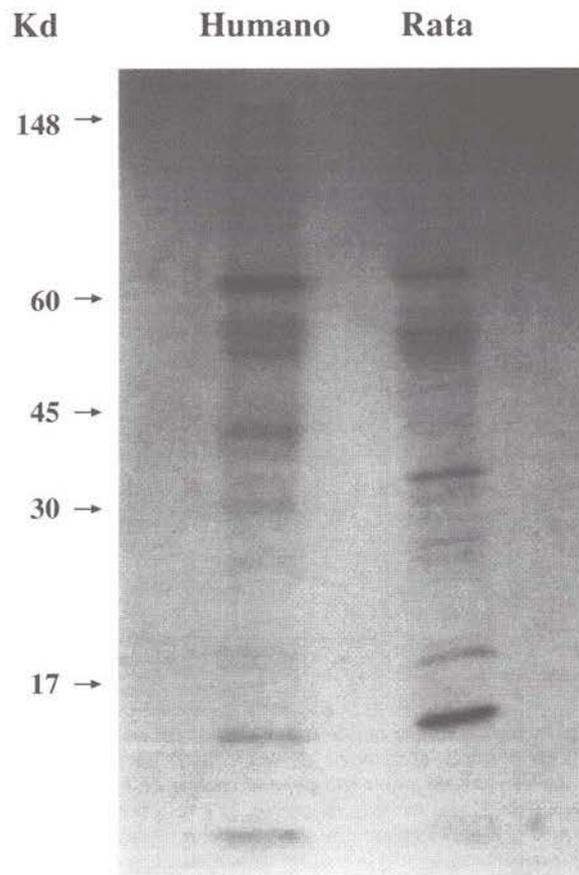


Figura 3. *Unión covalente de diclofenac a proteínas hepáticas.* Durante la metabolización del diclofenac por los hepatocitos se forman conjugados con ácido glucurónico capaces de reaccionar con proteínas hepáticas. La incubación de hepatocitos con  $^{14}\text{C}$ -diclofenac, y su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía, revela la existencia en el citosol de hepatocitos humanos de múltiples bandas radioactivas, correspondientes a aductos fármaco-proteína.

el retículo endoplásmico son las proteínas diana más frecuentes (17, 18), si bien otras proteínas celulares (ATPasas dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ , carboxilesterasas, GSH-transferasas) han sido también implicadas en la formación de aductos (17, 19).

Aunque la unión covalente es un fenómeno que con frecuencia ocurre en el curso del proceso tóxico, solo en algunas ocasiones ha podido asociarse con una lesión celular específica. Tal es el caso de la toxicidad por bromobenceno y paracetamol (17, 18), en las que parece existir una directa correlación entre el grado de unión covalente y la magnitud del daño celular. Sin embargo, con los análogos bromofenol y N-acetil aminofenol, la situación es la contraria: la unión covalente observada, no guarda relación con el efecto tóxico (17). Finalmente, existen casos tales como el del diclofenac, en los que la unión covalente guarda una relación inversa con la hepatotoxicidad. La unión del fármaco a las proteínas (20), tiene lugar vía transacilación del glucurónido del diclofenac (Figura 3). Por el contrario, la toxicidad del diclofenac, está asociada a su metabolización por el P450 (21). Ambas vías ocurren simultáneamente, y por tanto, cuanto más diclofenac se conjuga, mayor es la unión covalente, pero menor su metabolización por el P450, con la consiguiente generación de metabolitos tóxicos (17, 22).

### 3. ESTUDIO «IN VITRO» DE HEPATOTOXINAS INTRINSECAS

Enfrentados ante cómo diseñar una estrategia experimental para el estudio *in vitro* de la hepatotoxicidad, varios son los puntos que debemos considerar: a) El modelo *in vitro* adecuado para el fin que se pretende; b) establecer qué parámetros son los adecuados para la detección de los efectos tóxicos; y c) determinar el valor predictivo del modelo. En relación al primero de los puntos las posibilidades son: 1) la utilización de cultivos primarios, hepatocitos, obtenidos directamente del hígado, que retienen en gran medida las funciones típicas del órgano de donde provienen, pero que tienen en cultivo una vida corta; 2) uso de líneas celulares (hepatomas) que por lo general retienen sólo una parte de la expresión de funciones organoespecíficas, pero cuya vida es ilimitada; y 3) utilización de células manipuladas genéticamente, que comparten ciertas propiedades de las líneas continuas y de los cultivos primarios. El uso de los dos primeros permite discernir si la toxicidad observada afecta a una función basal de la célula, o por el contrario es específica de la célula diferenciada. El uso de células manipuladas genéticamente y que expresan CYP específicos, ha encontrado un extraordinario campo de aplicación en los estudios del metabolismo de fármacos para determinar, de una manera inequívoca, si un determinado citocromo está implicado o no en la producción de un metabolito (23-26).

Siendo el hombre el destinatario final de la mayor parte de los productos sanitarios, y no siendo éticamente aceptable el ensayo de sustancias activas sobre voluntarios sanos sin los previos y dilatados estudios sobre animales, se plantea en la práctica una situación peculiar en la que los efectos de los compuestos se examinan en modelos animales, sin tener la constancia previa de si serán o no los más idóneos

## Screening *in vitro* de hepatotoxicidad por fármacos

### 1) Citotoxicidad basal / hepatoespecífica

Hepatocito	Hepatoma	Célula no hepática	Tipo de toxina
			
+	+	+	No hepatoespecífica
+	-	-	Hepatoespecífica ( <i>latente</i> )
+	+	-	Hepatoespecífica ( <i>activa</i> )

Curvas dosis/respuesta para la determinación de la Máxima Concentración No Tóxica (MCNT)

### 2) Efectos sobre el metabolismo celular

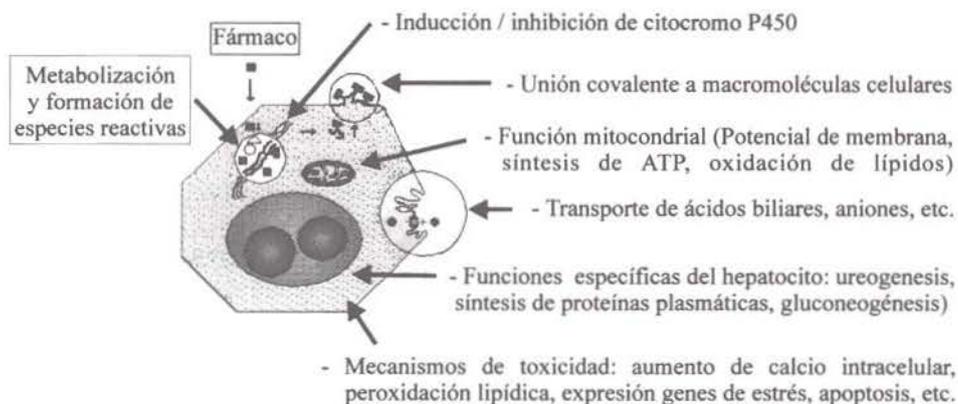


Figura 4. *Screening in vitro* de la hepatotoxicidad potencial de nuevos fármacos. Mediante la utilización de modelos celulares es posible distinguir si el efecto tóxico observado afecta a funciones básicas de toda célula (citotoxicidad basal), si la toxicidad es inherente a la propia molécula (toxinas activas) o si, por el contrario, la toxicidad solo se observa en hepatocitos como consecuencia de la metabolización del xenobiótico (toxinas latentes). Ello debe seguirse de un estudio más detallado para tratar de averiguar las consecuencias que sobre las funciones hepáticas pudieran tener concentraciones de dicho compuesto, en el rango que las que cabe esperar en el hígado *in vivo*.

para predecir los efectos en humanos. Diferencias en el metabolismo, o susceptibilidad del ser humano, en comparación con la especie animal utilizada en los ensayos preclínicos, suele ser la causa más frecuente de una toxicidad inesperada, y la paralización del desarrollo del nuevo fármaco. En este sentido, los modelos celulares *in vitro* derivados de células humanas pueden desempeñar un papel puente entre los ensayos en animales y en humanos, permitiendo una investigación más directa de los efectos potenciales del nuevo compuesto sobre el destinatario final: el hombre.

Los ensayos de toxicidad que pueden realizarse *in vitro*, entran dentro de dos categorías generales (Figura 4): a) ensayos de citotoxicidad basal, destinados a evaluar efectos sobre funciones vitales de las células (tests de viabilidad celular tales como MTT, liberación de enzimas, rojo neutro); b) ensayos dirigidos a la detección de toxicidad organo-específica, es decir, del efecto de los xenobióticos sobre funciones hepatoespecíficas tales como gluconeogénesis, ureogénesis, síntesis de proteínas plasmáticas, transporte de aniones etc.; así como la investigación de los mecanismos de toxicidad, antes mencionados, que subyacen tras los efectos observados.

Los modelos *in vitro* son una simplificación de la mucho más compleja realidad del un animal o el ser humano. Por ello, a la hora de interpretar los resultados *in vitro*, hay que tener presente: a) la importancia de la función celular afectada (si es esencial para el hepatocito, o de relevancia para la homeostasis del organismo); b) la toxicocinética del compuesto en estudio (si se dispone de datos experimentales *in vivo* o su estimación mediante modelos PBPK), para determinar el factor de riesgo de toxicidad calculado en base a la concentración tóxica *in vitro*, y a la que están expuestos los hepatocitos *in vivo*; por último c) la reversibilidad de los efectos tóxicos una vez eliminado el fármaco.

#### 4. HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRASICA

La hepatotoxicidad idiosincrásica es un fenómeno tóxico, difícilmente predecible sobre la base de la estructura química del compuesto, que ocurre solamente en ciertos individuos, y que no es fácilmente reproducible en animales de laboratorio, por lo que es muy complejo anticipar su existencia durante el desarrollo de un nuevo fármaco. En el origen de este fenómeno cabe distinguir dos posibles situaciones: el compuesto resulta ser tóxico para un individuo concreto porque en él, el fármaco se metaboliza de manera singular (idiosincrasia metabólica), o bien existe una respuesta desproporcionada frente al fármaco (reacción de hipersensibilidad), que aparece tras un periodo previo de administración asintomático.

*Idiosincrasia metabólica.* Los seres humanos muestran diferencias en cuanto a su capacidad para metabolizar xenobióticos. La mayoría de estas diferencias se deben a variaciones fenotípicas (sobre- o infraexpresión de un determinado enzima de biotransformación. Las isoformas 1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 3A3, 3A4 y 3A5, son las

que muestran un mayor grado de variabilidad y que generalmente es debido a factores tales como la edad, sexo, hábitos alimenticios y sociales, factores ambientales etc. (3). También algunas enzimas de fase II, tales como la glucoronil transferasa y la glutatión-S-transferasa, muestran variaciones de tipo fenotípico.

Existe también un pequeño número de enzimas, cuya diferente actividad en seres humanos tiene una base genética. Las isoformas 2C19, 2D6, y la N-acetiltransferasa constituyen tres ejemplos clásicos de enzimas de los que se conocen distintas mutaciones que se traducen en una menor (a veces pérdida) o mayor actividad enzimática (27). Como resultado de ello, cuando un fármaco es metabolizado por enzimas que muestran una variabilidad fenotípica o genotípica, sus perfiles metabólicos pueden diferir notablemente de un individuo a otro. Una primera consecuencia de la sobre- o infraexpresión de un enzima es la diferente velocidad de metabolización y eliminación del fármaco, lo que influye sobre su eficacia terapéutica. Una segunda consecuencia, no menos importante, es la posible toxicidad debida a la sobreproducción de un metabolito tóxico, que en los demás individuos es minoritario.

*Mecanismos implicados en la hepatitis alérgica.* Los fenómenos que subyacen en una hepatitis alérgica por medicamentos son notablemente complejos, no obstante van siendo conocidos paulatinamente en sus aspectos mecanísticos. En esencia, se requiere que un fármaco sea susceptible de desencadenar una respuesta inmune que finalmente irá dirigida contra el hepatocito produciendo en él citolisis (necrosis hepática), o alteraciones de su función (colestasis). Cabe concebir este proceso como una sucesión de etapas necesarias, pero que en ningún caso constituyen *per se* la causa determinante de la hepatitis alérgica medicamentosa (Figura 5).

En primer lugar, la mayoría de los fármacos y sus metabolitos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, y por tanto, incapaces de desencadenar una respuesta inmune por sí mismos. Por ello parece necesario que dicho fármaco tenga que unirse previamente a proteínas (28). De esta forma, el conjugado metabolito/proteína, puede poner en marcha una respuesta inmunológica. La unión covalente del fármaco o metabolito a una proteína celular (haptización) parece ser, pues, una condición *sine quae non* para el inicio de una respuesta inmune (29). Pero ciertamente no es una condición suficiente, por cuanto se conoce la existencia de fármacos que durante su metabolismo dan origen a la formación de aductos, sin que la incidencia clínica de hepatitis alérgicas sea significativa. El grado de unión covalente de un fármaco a proteínas está asociado a su conversión en una especie química más reactiva por enzimas de biotransformación (generalmente P450), a su vida media, a la capacidad para reaccionar con macromoléculas celulares y a los mecanismos de defensa/repación de las células (30,31).

El siguiente paso debe ser que el neoantígeno se haga accesible a la vigilancia del sistema inmune. Los fármacos capaces de unirse covalentemente a proteínas hepáticas lo hacen generalmente a proteínas citosólicas o microsomales. Sin embar-

go, para que estos neoantígenos sean accesibles a las células del sistema inmune, deben ser liberadas al exterior, o estar presentes en la membrana celular. Cabe imaginar por ello distintas posibilidades: a) el metabolito reacciona con el citocromo P-450 que lo generó, formando un aducto que sigue una ruta vesicular hasta la membrana plasmática, y termina por exponerse al exterior (32,33); b) el metabolito reactivo tiene una vida media lo suficientemente larga que le permite difundir desde su lugar de formación y reaccionar con proteínas de membrana (o con proteínas cuyo destino final es la membrana (34); c) el metabolito reacciona con proteínas, cuyo destino final es la membrana celular, tales como las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad.

El inicio de una respuesta inmune frente al neoantígeno requiere que éste sea debidamente presentado a linfocitos  $T_H$ . Esto puede ocurrir por distintos mecanismos. En una vía que podemos denominar clásica, los aductos fármaco-proteína tras endocitosis por células profesionales presentadoras de antígenos, son procesados y presentados a las células  $T_H$ , asociados a proteínas MHC-II. Dependiendo de la interacción de la célula presentadora de antígeno con linfocitos  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ , se desencadenará una respuesta celular (inflamación), o una respuesta humoral (con producción de inmunoglobulinas). Hay datos que sugieren que en el hígado, las células de Kupffer podrían actuar como células presentadoras de antígenos (35). Sin embargo, no se ha podido aportar evidencias directas que demuestren de manera convincente su participación en el caso de las hepatitis iatrogénicas.

Una vía alternativa, podría implicar directamente a los hepatocitos. Solamente las células presentadoras de antígeno expresan proteínas MHC-II, pero estudios recientes indican que los hepatocitos pueden expresar estas proteínas cuando se les incuban con interferón y citoquinas ( $TNF\alpha$ ). Si en estas circunstancias, el fármaco se uniese a proteínas MHC-II, el propio hepatocito podría actuar como una célula, no profesional, presentadora de antígeno, contribuyendo de esta manera a desencadenar la respuesta inmune (36).

La respuesta inmune en los pacientes con hepatitis inducidas por fármacos puede manifestarse bajo dos formas: humoral y celular. Homberg y colaboradores (37) en el trabajo más exhaustivo realizado hasta la fecha (>150 casos), estudiaron la presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con hepatitis inducidas por diferentes fármacos. Basados en sus resultados cabe clasificar las hepatitis causadas por fármacos en 4 grupos:

- a) Existencia en el suero de anticuerpos contra el fármaco; metabolitos, conjugado fármaco-proteína etc.: halotano (38,39); amodiaquina (40,41);
- b) con anticuerpos anti-citocromo P-450: ácido tienflico (42, 43); dihidralazina, (44); carbamazepina (45,46);
- c) con autoanticuerpos (ej. anti-músculo liso, anti-mitocondria y anti-núcleo): clometacina, fenofibrato, oxifenisatina y papaverina (36); y finalmente

d) pacientes en los que no se ha detectado la presencia de ninguno de estos tipos de anticuerpos: hepatitis inducidas por fármacos tan heterogéneos como ajmalina, aminopterina, isaxonina, isoniazida, fenilbutazona y troleandromicina (34,37).

En contra de lo que cabría esperar, el primero de los grupos no es el más frecuente, y sólo en muy pocos casos ha podido demostrarse inequívocamente la existencia de anticuerpos dirigidos contra neoantígenos derivados del fármaco (41, 47-49). Cabe imaginar que una causa sea el uso de una metodología inadecuada. Por lo general, los anticuerpos se ensayan frente al fármaco sospechoso. Sin embargo, en el paciente, la respuesta humoral puede haber sido dirigida frente a metabolitos, o frente a aductos fármaco-proteína contra los que los anticuerpos, caso de haber sido enfrentados, hubieran dado una clara respuesta positiva.

Un cierto tipo de fármacos hepatotóxicos tales como el tienílico (grupo 2), dan lugar a la formación de anticuerpos dirigidos, no contra el hapteno, sino contra el citocromo P-450 implicado en su metabolismo. Estos anticuerpos tienen el carácter de autoanticuerpos, es decir, reconocen también el citocromo de hepatocitos que no han sido tratados con el fármaco y dicha reacción no es inhibible ni por el fármaco ni por sus metabolitos. Están descritos en la literatura varios ejemplos en los que ha podido demostrarse la existencia de autoanticuerpos dirigidos contra CYP1A2 (45), y CYP2C8/9 en hombre (42-46) y contra CYP2C11 en rata (42).

La respuesta inmune dirigida hacia el fármaco no parece que sea el factor primario en la patología del tercero de los grupos. Dada la semejanza de esas hepatopatías con las hepatitis autoinmunes de tipo I (asociadas con la presencia de autoanticuerpos contra núcleo, mitocondria y actina), se ha sugerido que dichos fármacos podrían despertar, indirectamente, una enfermedad autoinmune latente o romper la tolerancia inmunológica contra autoantígenos (37).

Existe también un componente celular en la hepatitis alérgica por fármacos mediada, en parte, por linfocitos T citotóxicos y que ha podido ser evidenciada en ciertos tipos de hepatitis yatrogénicas (carbamazepina, dilevalol ; 50-52). Las evidencias en favor de la existencia en dichos pacientes de una subpoblación linfocitaria sensibilizada contra el fármaco parten del hecho de que es posible estimular la proliferación de linfocitos periféricos al incubarlos *in vitro* con el fármaco, o con alguno de sus metabolitos (50-52). Un dato muy interesante a este respecto es el hecho de que la estimulación linfocitaria tiene lugar con mucha mayor efectividad cuando el antígeno (fármaco) está unido a una fracción de proteínas hepáticas de membrana (51), que cuando se estimula con el fármaco solo. Ello sugiere que la asociación del fármaco a moléculas de membrana, posiblemente proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad, debe jugar un papel importante en el inicio de la respuesta inmune (Figura 5).

No cabe descartar, que otras células del sistema inmune puedan también participar en el ataque a hepatocitos. Los macrófagos, via anticuerpos dirigidos contra

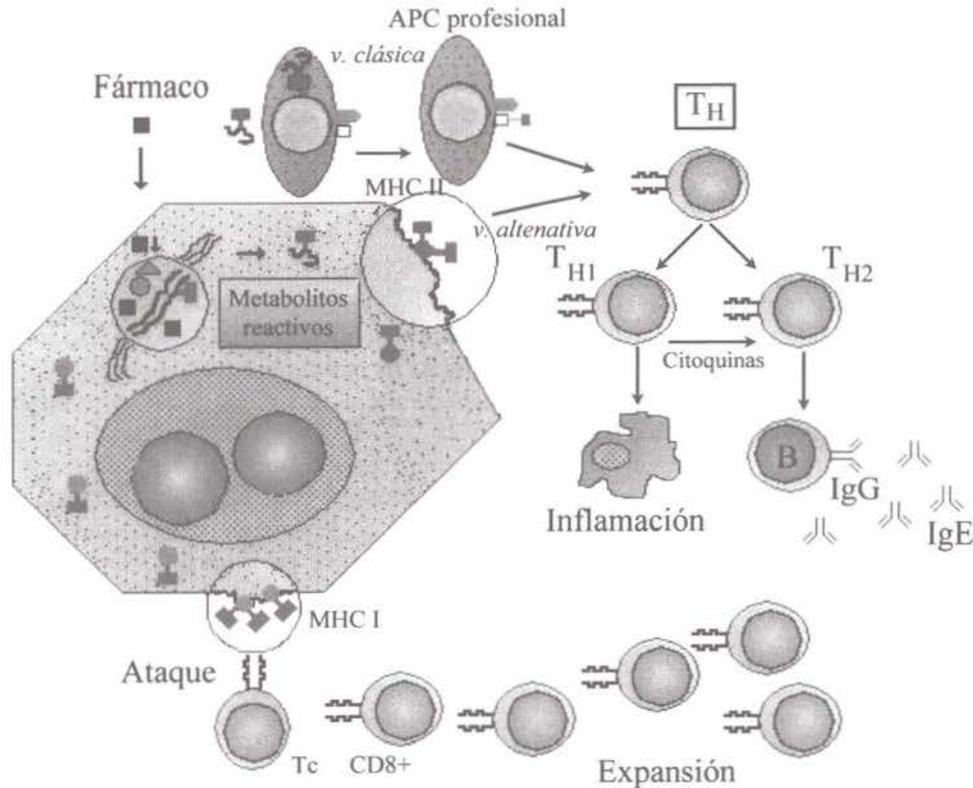


Figura 5. **Mecanismos implicados en la hepatitis alérgica.** La mayoría de los fármacos son compuestos de bajo peso molecular incapaces de desencadenar una respuesta inmune por lo que su unión a proteínas celulares parece ser una condición previa. Este neoantígeno debe hacerse accesible a la vigilancia del sistema inmune y ser debidamente presentado a linfocitos  $T_H$ . Dependiendo que la célula presentadora de antígeno (APC) interaccione con linfocitos  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ , se desencadenará una respuesta celular (inflamación), o humoral (producción de inmunoglobulinas). Una vía alternativa podría implicar a los hepatocitos, quienes bajo el estímulo de interferon y citoquinas ( $TNF\alpha$ ) pueden expresar MHC-II, con lo que podrían actuar como una célula presentadora de antígeno, no profesional.

el fármaco, así como también las células K, podrían estar implicadas en la destrucción de los hepatocitos.

## 5. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LAS HEPATITIS ALERGICAS

La hepatitis alérgica puede manifestarse clínicamente de varias formas: a) una forma fundamentalmente colestásica, y con una reducida necrosis hepática, b) con aumento de los marcadores de necrosis hepática y un moderado aumento de la bilirubina sérica, o c) una forma mixta en la que tanto necrosis como colestasis son importantes. La forma más frecuente de hepatitis alérgica, y la de mejor pronóstico,

es aquella que se manifiesta con colestasis y un moderado daño hepatocelular. Las más graves son las que se manifiestan como una necrosis masiva (en ocasiones como hepatitis fulminante) y que pueden llegar a tener consecuencias fatales para el paciente. Las razones por las que se dan uno u otro tipo de alteración hepática no son obvias, ni son fácilmente asimilables a un tipo de fármaco determinado. Lo interesante del caso es que un mismo fármaco puede producir los tres tipos de respuestas en distintos pacientes.

Cabe plantearse, en primer lugar, la relación existente entre la respuesta inmune y las manifestaciones clínicas de las hepatitis. Los casos de necrosis hepatocelular parecen ser debidas a la destrucción mediada principalmente por células  $T_C$ , si bien no cabe excluir la participación de otras células. El mecanismo de ataque por parte de las células del sistema inmune es probablemente muy similar al que tiene lugar en las hepatitis autoinmunes y hepatitis víricas (53). En ese sentido, la participación de anticuerpos dirigidos contra el fármaco pudiera tener también un papel relevante. Por ejemplo, en el caso de la hepatitis por halotano, la incubación de hepatocitos, previamente expuestos al anestésico, con el suero de individuos sensibilizados seguido de la adición de células mononucleares, resulta en la destrucción de los hepatocitos (54, 55).

La existencia de autoanticuerpos (p. ej. anti citocromo P450), pudiera ser más bien la consecuencia que la causa de la hepatitis (56). Pese a ser un hallazgo frecuente, no resulta evidente el papel que pudieran tener los anticuerpos anticitocromos en las manifestaciones clínicas de la hepatitis alérgica. Cabe especular que, como consecuencia de la muerte del hepatocito y la salida al exterior de antígenos citoplasmáticos, entre ellos los citocromos, se desencadene la producción de autoanticuerpos cuya antigenicidad podría verse incrementada por la presencia de aductos fármaco-proteína. Por otra parte, la presencia en la membrana plasmática de los hepatocitos de aductos fármaco-citocromo P-450 (32,33), posiblemente resultado de un transporte minoritario de estas enzimas hacia el exterior, facilitaría su reconocimiento por anticuerpos y el ataque por células del sistema inmune.

Las hepatitis alérgicas cuya manifestación clínica es la colestasis sin necrosis del hepatocito, no solo son las más frecuentes sino también las más desconocidas desde el punto de vista mecanístico. Se trata de una alteración funcional de los hepatocitos, en la que se ve perturbada la captación de aniones a través de la membrana sinusoidal, y su activo transporte hacia la membrana canalicular. La ausencia de lisis celular, parece excluir un papel predominante de las células  $T_C$  en el mecanismo de esta hepatitis. Por otra parte, estas células conservan su funcionalidad hepática *in vivo* (ej. gluconeogénesis, ureogénesis). Cabe imaginar que la interacción con anticuerpos dirigidos contra antígenos de membrana (citocromos, aductos fármaco-proteína etc.), alterando las propiedades de la membrana, podría indirectamente afectar la actividad funcional de proteínas implicadas en el transporte de aniones, ácidos biliares y bilirubina. Recientemente, en el caso de una hepatitis alérgica por eritromicina (41), ha podido demostrarse cómo anticuerpos dirigidos contra el fármaco, presentes

en el suero de enfermos, son capaces de unirse a la membrana del pseudo-canalículo biliar de hepatocitos en cultivo incubados con el fármaco.

## 6. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA CONFIRMAR «IN VITRO» UN DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS ALERGICA

Aparte de una exhaustiva anamnesis y de la exclusión de otras etiologías, no existe en la práctica un procedimiento que permita determinar con precisión el fármaco causal de una hepatopatía alérgica. Una confirmación inequívoca de la etiología inmunológica de una hepatitis requiere poner de manifiesto la existencia de una respuesta inmune dirigida contra el correspondiente fármaco, (bien anticuerpos, o bien linfocitos T sensibilizados). La naturaleza de la respuesta inmunológica (raramente mediada por IgE) y el tipo de manifestación hepática asociada, hace que las pruebas alérgicas convencionales resulten poco útiles. Un experimento de provocación *in vivo* para confirmar el diagnóstico está fuera de toda consideración por razones éticas.

Idealmente debiera ser posible el demostrar la sensibilización de un paciente a un determinado fármaco mediante ensayos inmunológicos *in vitro*. Dichos ensayos debieran ir dirigidos a evidenciar o la existencia de anticuerpos o la de linfocitos sensibilizados frente al fármaco. Se han desarrollado ensayos de laboratorio para el diagnóstico de las hepatitis alérgicas, pero su valor es limitado. El radio-alergosorbent test (RAST) ha resultado de utilidad en la detección de IgE dirigidas contra ciertos fármacos (penicilinas) pero de muy poco valor en muchos otros casos (57). Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de anticuerpos dirigidos contra el fármaco no es un hallazgo frecuente en las hepatitis alérgicas. Una posible explicación sería el que los anticuerpos hayan sido ensayados frente al fármaco sospechoso, mientras que los anticuerpos hayan sido dirigidos contra metabolitos del fármaco, o aductos fármaco-proteína. Se han conseguido resultados prometedores en la detección de anticuerpos dirigidos contra fármacos, mediante la utilización de hepatocitos humanos que, incubados previamente con el fármaco, son expuestos al suero del paciente (41). Esta aproximación tiene la ventaja de que a través de los hepatocitos se generan los posibles metabolitos, así como los correspondientes aductos susceptibles de ser reconocidos por el anticuerpo.

Por otra parte, solo en una minoría de pacientes con hepatitis yatrogénica ha podido demostrarse la existencia de linfocitos sensibilizados frente al fármaco sospechoso usando tests de proliferación celular. Esta baja sensibilidad, que da lugar a cerca de un 50% de falsos negativos (57, 58), podría deberse a varias razones:

- a) que el mecanismo de la toxicidad idiosincrásica no sea de naturaleza inmunológica;
- b) que la respuesta inmune vaya dirigida, no al fármaco sino, a alguno de sus metabolitos;

## Identificación de células T sensibilizadas por fármacos

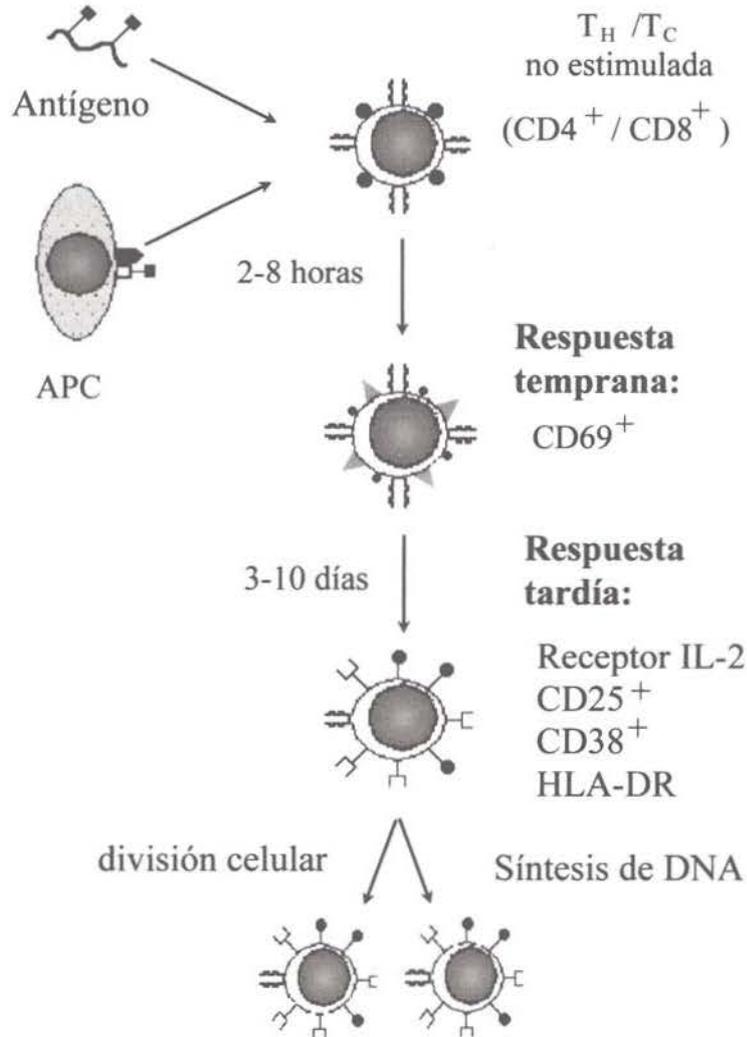


Figura 6. *Identificación de linfocitos T sensibilizados por fármacos.* La síntesis de DNA y la proliferación celular es el resultado final del fenómeno de activación linfocitaria que va precedida de la activación de distintos marcadores ( $CD-25$ ,  $CD-71$ ). El antígeno de membrana  $CD-69$  es uno de los más tempranos. Aparece en el transcurso de las primeras horas y se expresa en células T, B y NK activadas bien por antígenos o mitógenos. Su análisis en conjunción con la expresión de otros marcadores constitutivos de células T ( $CD-4$ ,  $CD-8$ ) es útil para demostrar la existencia de linfocitos sensibilizados frente un determinado fármaco en pacientes.

c) que el fármaco/metabolito no sea capaz, por sí mismo, de estimular la proliferación de los linfocitos si no está unido a una macromolécula;

d) que se trate de un antígeno poco potente y/o que requiera de una adecuada presentación para estimular a los linfocitos;

e) que los linfocitos en el ensayo de proliferación estén bajo el efecto de posibles inhibidores producidos por otras células presentes en el ensayo (prostaglandinas producidas por células supresoras).

La síntesis de DNA y la proliferación celular es el resultado final del fenómeno de activación linfocitaria, pero que requiere varios días para poder ser apreciada inequívocamente. Generalmente se utiliza como criterio la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, pero la necesidad de mantener las células en cultivo durante varios días para poder detectar el fenómeno de síntesis de DNA, aumenta la complejidad del ensayo.

Con vistas a su utilización en el diagnóstico clínico de las hepatopatías alérgicas, cabe considerar otro tipo de marcadores (Figura 6). El antígeno de membrana CD-69 es uno de los marcadores más tempranos que se expresan en todas las células T, B y NK activadas bien por antígenos o por mitógenos. El CD-69 es una proteína que no se detecta en células mononucleares periféricas, pero que en el transcurso de muy pocas horas aparece en todas las estirpes de linfocitos estimulados con el antígeno (58,59). La expresión de esta proteína (60) no requiere el concurso de otras células o señales (citoquinas) y precede a la aparición de los marcadores CD-25, y CD-71. La expresión transitoria del CD-69 en linfocitos, comparada con la expresión constitutiva de otros marcadores de células T (por ej. CD-4, CD-8), abre la posibilidad de utilizarla como indicador de la existencia de linfocitos sensibilizados frente un determinado fármaco en pacientes. En conjunción con un sistema capaz de generar metabolitos del fármaco (p. ej. hepatocitos humanos), la utilización del CD-69 podría constituir una aproximación clínicamente útil para demostrar en pacientes, la existencia de linfocitos sensibilizados frente un determinado fármaco.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Zimmerman HJ y Ishak KG (1995), General aspects of drug-induced liver diseases. *Gastroenterol. Clin North America* 24: 739-758.
2. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X y Bort R (1977), *In vitro* investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. En "*In vitro* Methods in Pharmaceutical Research" (Castell JV and Gómez-Lechón MJ, Eds.) pp. 375-410. Academic Press, London.
3. Guengerich FP. Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity. *Tox Let* 1990; 70: 133-138.
4. Columbano A (1995), Cell death: Current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes *in vivo*. *J Cel Biochem* 58: 181-190.
5. Swartz MN (1995), Mitochondrial toxicity: New adverse drug effects. *New Eng J Med* 333: 1146-1148.
6. Reed JD (1990), Glutathione: Toxicological implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30: 603-631.

7. Rosser BG y Gores GJ (1995), Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108: 252-275.
8. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B y Lemasters JJ (1995), Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 307: 99-106.
9. Poli G, Albano E y Dianzani MU (1987), The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 45: 117-142.
10. Ross D (1989), Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J Pharm Pharmacol* 41: 505-511.
11. Sies H (1991), Oxidative stress: introduction. In «Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants». (H Sies, Ed), Academic Press. London.
12. Boobis AR, Duncan J, Fawthrop J y Davies DS (1989), Mechanisms of cell death. *Trends Pharmacol Sci* 10: 275-280.
13. Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli et al. (1992), Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca<sup>2+</sup> concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 52: 1342-1346.
14. Spedding M. y Paoletti R. (1992), Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol Rev* 44: 363-376.
15. Shen W, Kamendulis LM, Ray SD y Corcoran GB (1992), Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca<sup>2+</sup>-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol. Appl Pharmacol* 112: 32-40.
16. Hinson JA y Roberts DW (1992), Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 471-510.
17. Boelsterli UA, Lanzotti A, Goldlin C y Oertle M (1992), Identification of cytochrome P-450IIB1 as cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 20: 96-101.
18. Holtzman JL (1995), The role of covalent binding to microsomal proteins in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Drug Metab Rev* 27: 277-297.
19. Kenna JG, Knight TL y Pelt FN (1993), Immunity to halothane metabolite-modified proteins in halothane hepatitis. *Ann NY Acad Sci* 685: 646-661.
20. Hargus, SJ, Amouzedeh HR, Pumford NR et al (1994), Metabolic activation and immunohistochemical localization of liver protein adducts on the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol* 7: 575-582.
21. Ponsoda X, Bort R, Jover R, Gómez-Lechón MJ y Castell JV (1995), Molecular mechanisms of diclofenac hepatotoxicity: cell injury is associated to the metabolism of the drug and is precluded by a decrease in ATP levels. *Toxic in vitro* 9: 439-444.
22. Kretz-Rommel A y Boelsterli UA (1994), Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac in rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Dispos* 22: 956-961.
23. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gómez-Foix AM, Alam T, Gerard RD y Newgard CB (1994), Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods in Cell Biol* 43: 161-189.
24. Castell JV, Hernández D, Gómez-Foix AM, Guillén I, Donato T y Gómez-Lechón MJ. (1997), Adenovirus-mediated gene transfer into human hepatocytes: Analysis of the biochemical functionality of transduced cells. *Gene Therapy* 4: 455-464.
25. Castell JV y Gómez-Lechón MJ (1992), The *in vitro* evaluation of the potential risk of hepatotoxicity of drugs. In "In vitro alternatives to animal pharmacotoxicology". (JV Castell and MJ Gómez-Lechón, Eds), pp. 179-204. Farmaindustria, Barcelona.
26. Crespi CL, González FJ, Steimel DT, Turner TR, Gelboin HV, Penman BW y Langenbach R (1991), A metabolically competent human cell lines expressing five cDNAs encoding procarcinogen and promutagen-activating enzymes. *Chem Res Toxicol* 4: 566-572.
27. Lecoœur S, Bomierbaler E, Challine D et al (1994), Specificity of *in vitro* covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity: comparison with two directly hepatotoxic drugs. *Chem Res Toxicol* 7: 434-442.

28. Lecoœur S, Bomierbaler E, Challine D et al (1994), Specificity of *in vitro* covalent binding of tienilic acid metabolites to human liver microsomes in relationship to the type of hepatotoxicity: comparison with two directly hepatotoxic drugs. *Chem Res Toxicol* 7: 434-442.
29. Park BK y Kitteringham NR (1990), Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metab Rev* 22: 87-144.
30. Timbrell JA (1991), Principles of biochemical toxicology. Taylor and Francis, London.
31. González FJ y Gelboin HV (1991) Human cytochromes P450: Evolution, catalytic activities and interindividual variations in expression. En: New Horizons in Biological Dosimetry. pp. 11-20. Wiley-Liss, Inc.
32. Loeper JV, Descatoire M Maurice M et al (1993), Cytochromes P450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 104: 203-216.
33. Robin MA, Maratrat M, Loeper J et al (1995), Cytochrome P4502B follows a vesicular route to the plasma membrane in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* 108: 1110-1123.
34. Loeper JV, Descatoire M, Amouyal P et al. (1989), Presence of covalently bound metabolites on rat hepatocyte plasma membrane proteins after administration of isaxonine a drug leading to immunoallergic hepatitis in man. *Hepatology* 9: 675-678.
35. Rubinstein D, Roska AK y Lipsky PE (1987), Antigen presentation by liver sinusoidal lining cells after antigen exposure *in vivo*. *J Immunol* 138: 1377-1382.
36. Knoll P, Löhr H, Treichel V, Dienes HP, Lohse A, Schlaack J y Gerken G (1995), Parenchymal and non-parenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Z Gastroenterol* 33: 613-620.
37. Homberg JC, Abuaf N, Helmy-Khalil S et al (1985), Drug induced hepatitis associated with anticytoplasmic organelle autoantibodies. *Hepatology* 5: 72-727.
38. Kenna JG, Neuberger J y Williams (1988), Evidence for expression in human liver of halothane-induced neoantigens recognized by antibodies in sera from patients. *Hepatology* 8: 1635-1641.
39. Night TL, Scarchard KM, Van Pelt FN y Kenna JG (1994), Sera from patients with halothane hepatitis contain antibodies to halothane-induced liver antigens which are not detectable by immunoblotting. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 1325-1333.
40. Clarke JB, Neftel K, Kitteringham NR y Park BK (1991), Detection of antidrug IgG antibodies in patients with adverse drug reactions to amodiaquine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 95: 369-375.
41. Gómez-Lechón MJ, Carrasquer J, Berenguer J y Castell JV (1996), Evidence of antibodies to erythromycin in serum of a patient following an episode of acute drug-induced hepatitis. *Clin Exp Allergy* 26: 590-596.
42. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D et al (1987), Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci* 85: 551-555.
43. Pons C, Dansette PM, Amar C et al (1991), Detection of human hepatitis anti liver kidney microsomes (LKM2) autoantibodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P-450 IIC11. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 1328-1334.
44. Bourdi M, Gautier JC, Mircheva J et al (1992), Anti liver microsomes autoantibodies and dihydralazine-induced hepatitis: specificity of autoantibodies and inductive capacity of the drug. *Mol Pharmacol* 42: 280-285.
45. Leeder JS, Riley RJ, Cook VA y Spielberg SP (1992), Human anti-cytochrome P450 antibodies in aromatic anticonvulsant-induced hypersensitivity reactions. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 360-367.
46. Beaune Ph, Pessayre D, Dansette P et al (1994), Autoantibodies against cytochromes P450: Role in human diseases. *Adv Pharmacol* 30: 199-245.
47. Pohl LR, Kenna JG, Satoh H, Christ D y Martin JL (1989), Neoantigens associated with halothane hepatitis. *Drug Metab Rev* 20: 203-217.
48. Satoh H, Martin BM, Schulick AH et al (1989), Human anti-endoplasmic reticulum antibodies in sera of patients with halothane-induced hepatitis are directed against a trifluoroacetylated carboxylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 322-326.

49. Butler LE, Thomanssen D, Martin JL et al (1992), The calcium-binding protein calreticulin is covalently modified in rat liver by a reactive metabolite of the inhalation anesthetic halothane. *Chem Res Toxicol* 5: 406-410.
50. Pirmohamed M, Kitteringham NR, Breckenridge AM y Park BK (1992), Detection of autoantibody directed against human liver microsomal protein in a patient with carbamazepine hypersensitivity. *Br J Clin Pharmacol* 33: 183-186.
51. Tsutsui H, Terano Y y Sakagami C et al (1992), Drug-specific T cells derived from patients with drug-induced allergic hepatitis. *J Immunol* 149: 706-716.
52. Victorino MM, María VAJ y Pinto LA (1992), Evidence for prostaglandin-producing suppressor cells in drug-induced liver injury and implications in the diagnosis of drug sensitization. *Clin Exp Immunol* 87: 132-137.
53. Marcellin P y Benhamou JP (1995), Autoimmune disorders associated with hepatitis C. En *Progress in Liver Diseases*, vol. 10. pp. 247-268. (Boyer JL, Ockner RK, eds.) WB. Saunders Company, Philadelphia.
54. Vergani D, Mieli-Vergani G, Alberti A et al (1980), Antibodies to the surface of halothane-altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane-associated hepatitis. *N Eng J Med* 303: 183-186.
55. Neuberger J, Gimson AES, Davis M y Williams R (1983), Specific serological markers in the diagnosis of fulminant hepatic failure associated with halothane anaesthesia. *Br J Anaesth* 15:743-749
56. Manns MP (1994), Autoantibodies in chronic hepatitis: Diagnostic reagents and scientific tools to study etiology, pathogenesis, and cell biology. En: *Progress in Liver Diseases*, Vol XII. (Boyer JL y Ockner RK, eds.) WB. Saunders Company, Philadelphia.
57. Fraft D y Wide L (1976), Clinical patterns and results of radioallergosorbent test (RAST) and skin tests in penicillin allergy. *Br J Dermatol* 94: 593-601.
58. María VAJ y Victorino RMM (1994), Lymphocyte proliferative response to drugs: Analysis of the value of a 24-well lymphocyte culture system. *Toxic. in vitro* 5: 1041-1044.
59. María VAJ, Pinto L y Victorino MM (1994), Lymphocyte reactivity to ex-vivo drug antigens in drug-induced hepatitis. *J Hepatol* 21: 151-158.
60. Nakamura S, Sung SSJ, Bjorndahl JM y Fu SM (1989), Human T cell activation IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen ES-1. *J Exp Med* 169: 677-689.
61. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL et al (1992), TNF- $\alpha$  production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* 22: 1253-1259.
62. López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E et al (1993), Molecular cloning, expression and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal transmitting receptors. *J Exp Med* 23: 2993-2997.

# **SISTEMAS DE TRANSPORTE DEL GLUTATION A TRAVES DE MEMBRANA PLASMATICA Y MITOCONDRIAL**

CARMEN GARCIA-RUIZ, ALBERT MORALES, ANNA COLELL,  
MERCER MIRANDA, MONTSE MARI, ESTHER ARDITE  
y JOSE C. FERNANDEZ-CHECA.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad de Hepatología, Consejo Superior  
de Investigaciones Científicas (CSIC), Hospital Clínic i Provincial, Universidad de Barcelona.

## **SUMARIO**

---

1. INTRODUCCION
2. IMPORTANCIA DEL GLUTATION Y SU TRANSPORTE HEPATICO
3. CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE SINUSOIDAL Y CANALICULAR DE GSH
4. SIGNIFICADO DEL TRANSPORTE HEPATICO DE GSH
5. CLONAJE DEL TRANSPORTADOR SINUSOIDAL Y CANALICULAR DE GSH
6. GLUTATION MITOCONDRIAL: IMPORTANCIA Y TRANSPORTE
  - 6.1. Importancia y fisiología
  - 6.2. Transporte mitocondrial de GSH
7. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

A pesar de que el glutatión (GSH) fue descubierto en 1888 por De Rey-Pailhade, su función ha empezado a conocerse sólo a partir de las últimas tres décadas. El GSH es una molécula con una gran eficacia estructural. Este tripéptido está constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina; el glutamato y la glicina, juegan un papel fundamental en la determinación de su destino metabólico mientras que la cisteína, a través de su sulfidrilo, es responsable de sus funciones. La primera etapa en la síntesis del GSH es la unión entre el glutamato y la cisteína. Esta unión se realiza a través del grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato en vez del  $\alpha$ -carboxilo como ocurre normalmente en la mayoría de los péptidos, lo que determina una resistencia a la hidrólisis por peptidasas; de hecho, la única enzima existente en la naturaleza capaz de hidrolizar al GSH es la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GT), ectoenzima presente en la superficie externa de ciertos tipos de células. El aminoácido terminal, glicina, es fundamental en la especificidad estructural de las enzimas dependientes de GSH y confiere una protección frente a la degradación intracelular producida por la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa.

El GSH participa en una diversidad de funciones celulares, algunas de ellas determinadas por su papel como cofactor de varias enzimas de la fase II de biotransformación como la glutatión transferasa (GST). Dichas enzimas metabolizan una variedad de sustancias electrofílicas mediante conjugación con el GSH, dando lugar a la formación de tioéteres que son potencialmente eliminados tras su transporte a la bilis. Las peroxidasas dependientes de GSH eliminan peróxidos tanto de hidrógeno como orgánicos. En dicha acción, el GSH se oxida a GSSG. Sin embargo, la GSH reductasa reduce dicha especie oxidada a su forma reducida a expensas de equivalentes de reducción (NADH). La coordinación de esta serie de reacciones enzimáticas que utilizan el GSH como coenzima constituye el denominado ciclo redox del GSH cuya acción es fundamental para garantizar la funcionalidad de múltiples procesos celulares.

## 2. IMPORTANCIA DEL GLUTATION Y SU TRANSPORTE HEPATICO

La clave de muchas de las funciones que desempeña el GSH radica en el grupo tiol de la cisteína. Además de las que ya se han señalado cabe añadir: 1) desintoxi-

cación de electrófilos inestables tras su transformación en tioéteres; 2) actuación como la principal fuente celular de almacenamiento de cisteína, sirviendo como vehículo para su transporte a otros órganos; 3) mantenimiento de los tioles proteicos esenciales, previniendo la oxidación de grupos -SH o reduciendo uniones disulfuros inducidas por estrés oxidativo. Las peroxidasa dependientes de GSH eliminan peróxidos tanto de hidrógeno como orgánicos. En dicha función, el GSH se oxida a GSSG. Sin embargo, la GSH reductasa reduce dicha especie molecular a la forma reducida. La coordinación de esta serie de reacciones enzimáticas que utilizan el GSH como coenzima constituyen el denominado ciclo redox del GSH, cuya acción es fundamental para garantizar los múltiples procesos celulares; 4) conjugación con compuestos endógenos formando aductos como intermediarios en el metabolismo de prostaglandinas, leucotrienos y varias hormonas; 5) reducción de ribonucleótidos a deoxiribonucleótidos; 6) modulación de procesos relacionados con los microtúbulos. Dichas funciones son algunas de las que se han descrito hasta la fecha, siendo esenciales para un funcionamiento normal de la célula.

Una característica fundamental de la regulación del GSH lo constituye su metabolismo interorgánico. En este sentido el GSH se puede considerar como un almacén intracelular de cisteína, un aminoácido tóxico debido a la rápida autooxidación de su tiol inestable, lo que contrasta con el tiol estable del GSH. La cisteína en forma de GSH se recupera extracelularmente, en un proceso que se inicia con la hidrólisis del GSH por la  $\gamma$ -GT, seguido del transporte del dipéptido cisteinilglicina al interior celular. De esta manera, el destino de la cisteína está ligado a la presencia de enzimas que pueden liberarla a partir del GSH. El GSH se sintetiza en todas las células de mamíferos, aunque los principales órganos que regulan el GSH y la cisteína son el hígado, pulmón y riñón. El hígado transporta GSH al plasma y a la bilis, mientras que el riñón lo libera a los túbulos. Puesto que la ruptura del enlace  $\gamma$ -glutamil por la  $\gamma$ -GT es siempre el primer paso en la ruptura del GSH, sólo aquellas células con  $\gamma$ -GT y dipeptidasa en la superficie externa pueden iniciar el metabolismo del GSH plasmático (1). El GSH liberado desde el hepatocito, puede ser hidrolizado en sus aminoácidos constituyentes y posteriormente reutilizados por el mismo órgano (homeostasis intraorgánica) o puede ser transferido a través de su distribución en el plasma a otros órganos distales capaces de metabolizar el GSH (homeostasis interorgánica). Para que este proceso tenga una clara significación es necesario una fuerza conductora que permita un transporte concentrativo del medio extracelular ( $\mu$ M) al interior celular (mM), venciendo el gradiente electroquímico. Un transporte de GSH dependiente de sodio ha sido descrito en enterocitos, células renales, células alveolares tipo II y vesículas de membranas derivadas de dichas células (2).

Teniendo en cuenta el papel central del hígado en la regulación interorgánica del GSH, un paso fundamental lo constituye la liberación del GSH del hepatocito. En los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de información sobre la fisiología celular del transporte hepático de GSH utilizando una variedad de modelos experimentales tales como hígado perfundido, suspensión de hepatocitos, cultivos

primarios de hepatocitos, vesículas de membrana enriquecida en el polo sinusoidal y canalicular y últimamente en estudios de expresión molecular de cDNAs de los transportadores hepáticos de GSH.

El transporte de GSH en ambos polos del hepatocito se reconoció hace unos 15 años (3, 4). Inicialmente, se pensó en un proceso de difusión. Sin embargo, estudios en vesículas de membrana mostraron una capacidad saturable (5, 6). Estudios posteriores en hígado perfundido utilizando varios tratamientos para variar la concentración intracelular de GSH indicaron que el transporte sinusoidal de GSH era saturable con una  $K_m$  de 3-7mM (7, 8), sin indicio de saturabilidad en el transporte canalicular de GSH hasta niveles de 12 $\mu$ mol/g hígado (9, 10). A pesar de ausencia de saturabilidad, la secreción biliar es inhibible por ciertos aniones orgánicos e inducible por fenobarbital, lo que sugería la participación de una proteína transportadora (12). Estudios con vesículas de membrana han ayudado a elucidar la discrepancia que supone la falta de saturabilidad indicando la presencia de un transportador de muy baja afinidad con una  $K_m$  de 16mM (11, 12).

### 3. CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE SINUSOIDAL Y CANALICULAR DE GSH

Las comparaciones más directas entre el transporte de GSH en ambos polos del hepatocito han sido llevadas a cabo utilizando preparaciones de membrana plasmática enriquecida en el polo sinusoidal y canalicular del hepatocito. A pesar de que dicho modelo de estudio es útil en la comparación de características de transporte, su interpretación está limitada por dos inconvenientes principales; la posible contaminación de las preparaciones con otras estructuras subcelulares y la orientación de las vesículas de membrana (inside-out y right-side out). No obstante, los hallazgos de dichos estudios han sido confirmados en otros modelos de mayor integridad funcional y fisiológica. La Tabla I resume las características de los dos sistemas de transporte. El transporte en ambos dominios de la membrana es facilitativo con cinética de saturación y con características de trans-estimulación. Esta característica indica que el transporte de GSH es simétrico, siendo capaz de operar en ambas direcciones dependiendo del gradiente de GSH a través de la membrana. Sin embargo, puesto que la concentración intracelular de GSH es varios órdenes de veces mayor que la del GSH plasmático, en condiciones fisiológicas, el transporte de GSH opera en el sentido de liberación desde el interior del hepatocito. El potencial eléctrico de membrana (despolarización) aumenta el transporte de GSH, lo que sugiere que el GSH es transportado con carga neta negativa (11, 12, 13, 14). Estudios cinéticos revelan una diferencia muy significativa de  $K_m$  de más de 2 veces entre el transporte sinusoidal y canalicular en el rango de concentración fisiológica de GSH.

En condiciones normales el transportador sinusoidal funciona al máximo de su capacidad debido a que la concentración fisiológica de GSH supera la  $K_m$  hacia el GSH. Por tanto, la regulación coordinada entre el transporte de GSH hepático y su

Tabla I. Características fisiológicas del transporte hepático de glutatión reducido

	Sinusoidal	Canalicular
Trans-estimulación.....	SI	SI
Dependencia de ATP.....	NO	NO
Dependencia de potencial de membrana.....	SI	SI
Cis-inhibición por BSP-GSH.....	SI	NO
Cis-inhibición por BSP.....	SI	SI
Trans-inhibición por:		
Metionina y cistationina.....	SI	NO
Inducción por fenobarbital ( $V_{max}$ ).....	NO	SI

Los parámetros de estudio se determinaron en preparaciones de vesículas de membrana enriquecida en el polo sinusoidal y canalicular del hepatocito.

utilización extrahepática no están determinadas por cambios fisiológicos en la concentración de GSH, sino más bien por cambios en la fuerza motriz del transportador (potencial eléctrico de membrana) o mediante fosforilación. En condiciones de depleción de GSH hepático, el transporte sinusoidal disminuye. En cambio, el transporte canalicular opera muy por debajo de su  $K_m$ . Debido a esto, existe una relación directa entre el GSH hepático y el transporte biliar, de manera que fluctuaciones en la concentración intracelular de GSH inciden sobre la velocidad de secreción de GSH a la bilis.

En el trabajo original de Inoue et al (5, 6) se describió un componente de alta afinidad tanto en vesículas de membrana sinusoidal (junto con un componente de baja afinidad) como canalicular (con un único componente de alta afinidad). En nuestros resultados con ambos tipos de vesículas de membrana, hemos observado un componente de alta afinidad y de baja afinidad de manera inconsistente. Este hecho junto con las observaciones de Ishikawa *et al* (15), sugieren que el componente de alta afinidad podría ser justificado por la unión de alta afinidad del GSH a las glutatión S-transferasas (GST), enzimas que están presentes en las preparaciones de vesículas de membrana. Por ello es virtualmente imposible discernir si el componente de alta afinidad es el resultado de transporte o unión a las GST. Incluso, si dicho componente realmente existiese, su contribución al transporte neto de GSH sería despreciable debido a su extraordinaria baja capacidad, aunque pueda representar una ruta de transporte para otras sustancias.

Estudios comparativos de la especificidad de inhibición del transporte sinusoidal y canalicular han establecido una sensibilidad a ciertos aniones orgánicos como el aducto dinitrofenol-GSH (DNP-GSH) y bromosulfaleína (BSP) libre ( 11, 12,

13, 14). Sin embargo, la BSP conjugada con el GSH (BSP-GSH) inhibe el transporte sinusoidal de GSH en hígado perfundido, hepatocitos aislados y vesículas (14, 15). De manera análoga, los aminoácidos tioésteres, metionina y cistationina inhiben exclusivamente el transporte sinusoidal de GSH en vesículas de membrana mediante un mecanismo trans (17, 18, 19).

#### 4. SIGNIFICADO DEL TRANSPORTE HEPATICO DE GSH

La mayor parte del GSH en plasma proviene del transporte sinusoidal del hepatocito liberando GSH al torrente circulatorio. El GSH plasmático posee una vida media muy corta (1min) y es rápidamente degradado en otras células extrahepáticas liberando cisteína que es posteriormente utilizada en células diana mediante un transporte de la misma al interior celular. Esta cisteína «recuperada» mediante la hidrólisis del GSH es utilizada en la síntesis de GSH. Como se ha comentado anteriormente, ciertos tipos de células epiteliales poseen un sistema de transporte de GSH intacto acoplado al movimiento de Na<sup>+</sup>. Sin embargo, la contribución neta de esta sistema de utilización del GSH plasmático al mantenimiento de la concentración de GSH intracelular es controvertida.

El transporte biliar del GSH es cuantitativamente muy importante. Entre sus funciones cabe citar: 1) Suministro de GSH o sus aminoácidos constituyentes a las células epiteliales del ducto biliar e intestino. 2) Constituye un determinante del flujo biliar independiente de ácidos biliares. La concentración biliar de GSH es del orden de mM, de manera que su secreción constituye un componente fundamental de la fuerza osmótica necesaria para la generación del flujo biliar. 3) Ruta alternativa de transporte de aniones orgánicos. Otros aniones orgánicos aparte del BSP-GSH, cis inhiben y trans estimulan el transporte de GSH en vesículas de membrana canalicular (11). El transporte de BSP en vesículas canaliculares en ausencia de ATP aumenta cuando se establece un potencial de membrana positivo y tras el tratamiento con fenobarbital. Cuando se examina la competición de transporte, el GSH cis inhibe y trans estimula el transporte de BSP. Por ello, ambos aniones parecen compartir un transportador común en vesículas de membrana canaliculares. El principal mecanismo de transporte de aniones orgánicos es a través del sistema de alta afinidad dependiente de ATP el cual transporta aniones orgánicos de diversidad estructural incluyendo conjugados de GSH y GSSG. La concentración de los sustratos aniónicos orgánicos de este tipo de transportador son muy bajas en hepatocitos debido a la acción de su transporte activo de manera que la cis inhibición de la secreción de GSH se observa sólo cuando dichos aniones orgánicos se acumulan en la célula (cuando se produce una infusión de aniones orgánicos o cuando se produce una mutación en el transportador dependiente de ATP). Por tanto, estos dos transportadores parecen operar en paralelo: por una parte el transportador multiespecífico de baja afinidad cuya función primordial es la de secretar GSH y por otra, el transportador dependiente de ATP que secreta aniones orgánicos a la bilis. Si la concentración de aniones orgánicos en bilis supera cierto nivel podrían

interaccionar con el transportador de GSH transestimulando la secreción de GSH. El anión orgánico transportado en intercambio por GSH sería secretado de nuevo a la bilis por la acción del transportador dependiente de ATP. Este modelo de acción permitiría explicar la falta de GSH en bilis de ratas con una mutación en el transportador canalicular de alta afinidad dependiente de ATP (EHBR) como consecuencia de la acumulación intracelular de sustratos que normalmente serían secretados por dicha ruta pudiendo competir por el GSH en su transporte biliar (12). Además, ello establece un transporte activo secundario de GSH lo que explicaría el hecho de que la concentración de GSH en bilis sea tan elevada en comparación con la concentración intracelular del mismo.

## 5. CLONAJE DEL TRANSPORTADOR SINUSOIDAL Y CANALICULAR DE GSH

Recientemente hemos descrito la expresión funcional del transporte bidireccional de GSH en oocitos de *Xenopus Laevis* después de la microinyección de mRNA total de hígado de rata (20). Fraccionamiento del mRNA resulta en la identificación de dos especies individuales que expresan actividad de transporte de GSH cuando se inyectan en oocitos. De ellas, una fracción de tamaño 2.0-2.5 kb expresa un transporte sensible a inhibición por BSP-GSH, metionina y cistationina (19, 20) consistente con la expresión del transportador sinusoidal, y otra de tamaño 3.5-4.0 kb insensible a inhibición por dichos agentes, consistente con la expresión del transportador canalicular de GSH.

A partir de los cDNA preparados de las correspondientes fracciones de mRNA de hígado de rata descritas anteriormente se obtuvieron dos clones individuales después de múltiples subdivisiones de las colonias (21, 22). De cada subdivisión se prepara y microinyecta cRNA, sintetizado a partir del cDNA de las colonias, en los oocitos para examinar transporte de GSH tanto en modalidad de eflujo de GSH como de entrada de GSH hacia el oocito. Los clones aislados de esta manera, denominados RsGshT y RcGshT, retienen las mismas propiedades de sensibilidad e insensibilidad a la inhibición mediante BSP-GSH, metionina y cistationina, respectivamente. La magnitud de la expresión es dependiente de la cantidad de cRNA inyectada en el oocito para ambos clones. Si ello se expresa según la cantidad de RNA en nanogramos, se obtiene un enriquecimiento de expresión de ambos clones con respecto al mRNA total de varios cientos de veces (21, 22).

La Tabla II resume las características de los clones del transportador sinusoidal y canalicular. No existen homologías en las secuencias entre los dos transportadores ni con ningún otro descrito hasta la fecha. Análisis de hidrofobicidad (Kyte-Doolittle) reveló la presencia de al menos 10 y 4 dominios de transmembrana para el clon RcGshT y RsGshT, respectivamente. Como se ha señalado anteriormente, el tratamiento con fenobarbital induce selectivamente la secreción de GSH a la bilis y no al torrente circulatorio, fenómeno confirmado utilizando vesículas enriquecidas en

Tabla II. Comparación de las características del transportador sinusoidal (RsGshT) y canalicular (RcGshT) de glutation reducido.

Características	Clon	
	RsGshT	RcGshT
Tamaño (kb) .....	2.8	4.0
Región codificante .....	1.0	2.5
Masa predecible (kDa) .....	39.9	95.8
Aminoácidos .....	353	835
$K_m$ para GSH (mM) .....	2.8	6.6
Inhibición:		
Metionina .....	+	—
Cistationina .....	+	—
BSP-GSH .....	+	—
Inducción por fenobarbital .....	—	+

el polo sinusoidal y canalicular en donde el fenobarbital incrementa significativamente la  $V_{max}$  del transporte canalicular de GSH (Tabla I). Por tanto, dicha inducción selectiva por el fenobarbital constituye un importante criterio adicional diferenciador de ambos transportadores. mRNA de hígado de rata obtenido tras un tratamiento *in vivo* con fenobarbital e hibridado con los oligonucleótidos de ambos transportadores, revela un aumento de 3-5 veces de RcGshT sin efecto alguno para el RsGshT. Análisis por Northern blot para ambos transportadores ponen de manifiesto una desigual localización en los diversos tejidos examinados. Así mientras que el mRNA de RsGshT se localiza exclusivamente en hígado, tanto de rata como en línea celular humana HepG2, el del RcGshT se encuentra en prácticamente todos los tejidos examinados hasta ahora incluyendo, riñón, cerebro, intestino y pulmón (21, 22). La hibridación obtenida con ambos oligonucleótidos es de 2.8 y 4.0 kb para el RsGshT y RcGshT, respectivamente.

La ausencia de homología en la secuencia entre ambos transportadores descarta la posibilidad de que sean el resultado de un único gen sometido a un procesamiento alternativo o consecuencias de modificaciones posteriores a la traducción. La secuencia de RsGshT determinaría su expresión específica en hígado, lo cual sería consistente con el hecho de que el hígado sea el principal suministrador de GSH al torrente circulatorio para su disposición metabólica en otras células distales extrahepáticas. En vista de la importancia que dicho transportador (RsGshT) tiene en la regulación de GSH, el estudio de su papel en ciertas situaciones fisiopatológicas sería fundamental a la vista de las múltiples funciones celulares que el GSH ejerce. En situaciones de infección vírica, tanto en hepatopatías por virus C como en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se produce una depleción del GSH plasmático. Es de gran interés el determinar la expresión de dicho transportador en

estas situaciones puesto que su expresión deficiente contribuiría a los profundos efectos sistémicos que se observan en dichas situaciones como una alteración del sistema inmune y cerebro observados en pacientes con HIV. Por otra parte, una sobreexpresión del transportador sinusoidal sería el responsable del mayor suministro de GSH al plasma como se ha observado en condiciones de estrés, endotoxemia y shock séptico (23) aumentando el aporte de defensas antioxidantes en plasma y otras células extrahepáticas para compensar el ambiente de prooxidación observado en dichas situaciones.

El transportador canalicular se localiza en riñón (21), contribuyendo a la secreción apical del GSH de las células epiteliales del túbulo renal, lo que constituye un elemento fundamental del ciclo del  $\gamma$ -glutamil en el riñón. Se conoce muy poco sobre el transporte apical en el epitelio intestinal o en pulmón. Sin embargo, en el caso del pulmón es de interés el que la concentración de GSH en el fluido alveolar sea muy elevada (mM) (24). Asimismo, es de gran interés la presencia de mRNA del RcGshT en cerebro aunque su función es desconocida. Sin embargo, aunque se ha detectado transporte de GSH a través de la barrera encefalopoyética, se ha observado que los astrocitos transportan GSH (25).

## 6. GLUTATION MITOCONDRIAL: IMPORTANCIA Y FUNCION

El GSH intracelular existe compartimentalizado en el citosol y en un pool intraorganular. Edwards y Westerfeld en 1952 (26), mostraron por primera vez, la existencia de más de un pool de GSH en hígado y basándose en observaciones que los efectos nutricionales tienen sobre el GSH hepático, propusieron la existencia de un pool estable y otro pool metabolizable. Vignais y Vignais (27) y Jocelyn *et al.* (28) realizaron estudios para identificar el pool de GSH compartimentalizado, observando que mitocondrias aisladas de hígado de rata contienen una pequeña fracción de tiol no-proteico, constituido fundamentalmente por GSH. La idea de que el GSH mitocondrial es distinto del citoplasmático proviene de estudios sobre el turnover del GSH celular. La capacidad que distintos agentes tienen para disminuir o aumentar selectivamente los niveles de GSH en la mitocondria, en comparación con el citosol, sugieren que el pool de GSH mitocondrial está física y metabólicamente separado del citosólico.

### 6.1. Importancia y función

El pool de GSH mitocondrial, que representa de un 10 a un 15% del contenido total intracelular, se encuentra en una concentración similar a la del citosol, de 5 a 9mM. El GSH mitocondrial participa en un ciclo redox a través de las actividades GSH peroxidasa/reductasa. El GSH mitocondrial podría ser fundamental en la reducción de hidroperóxidos endógenos por la GSH peroxidasa. Como consecuencia del metabolismo aeróbico, que en células eucarióticas ocurre fundamentalmente en

la mitocondria, se produce un estrés oxidativo endógeno. Incluso bajo condiciones fisiológicas, la reducción de oxígeno molecular a agua en la cadena respiratoria es incompleta y da lugar a la formación de especies tóxicas del oxígeno. Es conocido, que la mitocondria de hígado de rata perfundido, produce alrededor de 50 nmol de  $H_2O_2$  /min /g, lo que representa un 2-4% del consumo de oxígeno mitocondrial. Si el peróxido de hidrógeno no se reduce a agua puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo, especie muy reactiva, que daría lugar a la formación de peróxidos lipídicos los cuales podrían dañar las membranas mitocondriales y sus funciones. Puesto que la mitocondria carece de catalasa, la detoxificación de hidroperóxidos, formados tanto bajo condiciones fisiológicas o como consecuencia de reacciones de bio-reducción, en la que drogas se activan a un derivado inestable, depende exclusivamente de la GSH peroxidasa. Esta enzima utiliza GSH reducido el cual es convertido a GSSG. El ciclo redox del GSH emplea NADPH y el potencial reductor de NADH de la matriz mitocondrial, para proveer GSH, gracias a la reducción de GSSG, reacción catalizada por la GSSG-reductasa. El papel del ciclo redox de GSH mitocondrial en hígado, es la de regular la oxidación mitocondrial. Se sabe que en mitocondria aislada, distintos oxidantes disminuyen la captación de oxígeno molecular produciendo un turnover de GSH completo cada 10 minutos. El consumo continuo de equivalentes reductores por el sistema de GSH debe de equilibrarse mediante la formación continua de NADPH en la mitocondria. Bajo condiciones de máximo estrés oxidativo el conjunto celular NADPH/NADP<sup>+</sup> se activa al menos una vez por minuto.

El GSH mitocondrial juega también un papel fundamental manteniendo la viabilidad celular mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana interna, manteniendo los grupos sulfhidrilos en estado reducido (29). Si este sistema se compromete, se produciría una alteración de la homeostasis del calcio celular, un primer paso en el daño celular, ya que la mitocondria puede secuestrar grandes cantidades de calcio (30, 31, 32). La oxidación de GSH y de nucleótidos de piridina en mitocondria precede a un incremento en la permeabilidad de calcio en la membrana interna. Esto sugiere que el estrés oxidativo o la depleción aguda de GSH afectan el estado redox en la mitocondria. La inactivación de proteínas debido a la oxidación del grupo tiol de la cisteína es un fenómeno general que tiene lugar en un amplio número de enzimas. Se piensa que la homeostasis del calcio y del tiol está interrelacionada bien directamente o bien a través de nucleótidos de piridina. Aunque la regulación mitocondrial de calcio citosólico no se produce fisiológicamente, en condiciones patológicas la mitocondria se convierte en un potente regulador de las concentraciones de calcio citosólico. Varios grupos han mostrado una correlación entre la disminución de GSH mitocondrial y la incapacidad de la mitocondria de secuestrar calcio (33, 34). Asimismo se ha descrito que el paracetamol disminuye los niveles de GSH mitocondrial más específicamente que su regioisómero, 3'-hidroxiacetanilida, lo que se relaciona con la formación de aductos proteicos en la mitocondria y con la alteración de la homeostasis del calcio celular repercutiendo en la inhibición de la bomba de calcio de la membrana plasmática. Alteraciones del ciclo del calcio en la membrana interna de la mitocondria, pueden

ser un factor muy crítico en la regulación de la concentración de calcio citosólico, y por consiguiente en la inducción de daño celular. Así el rojo de rutenio—inhibidor del sistema uniporte del calcio mitocondrial— previene bajo determinadas condiciones, el estrés oxidativo y el daño celular asociado con el mismo.

Uno de los papeles protectores del GSH mitocondrial frente a la citotoxicidad se ha puesto de manifiesto en estudios en hepatocitos aislados, donde el daño desencadenado por ácido etacrínico se relaciona con una disminución de los niveles de GSH mitocondrial, mientras que la disminución del nivel de GSH citosólico no afecta a la viabilidad celular. Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por hidropéroxido-tert-butilo, produce una acumulación en la mitocondria de GSSG, debido a la incapacidad de la mitocondria de transportar GSSG, lo que provoca una disminución del control respiratorio. La deficiencia en el transporte de GSSG indica que la mitocondria podría ser más susceptible a la oxidación de tioles proteicos que el resto de la célula.

El GSH mitocondrial no sólo previene la lesión celular inducida por la sobreproducción de radicales libres sino que puede controlar la expresión génica. Los radicales libres del oxígeno actúan como segundos mensajeros y representan un mecanismo versátil de control celular en la regulación génica. Puesto que la mitocondria es la mayor fuente de producción de radicales libres en las células y el GSH en este compartimento subcelular controla el tono basal de estas especies reactivas, el GSH mitocondrial regularía la expresión de genes nucleares controlados por factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo como el NF- $\kappa$ B (45). De esta manera, el GSH mitocondrial no sólo es vital para la propia mitocondria sino que jugaría un papel crítico en el control de las consecuencias extramitocondriales originadas por una limitación en la concentración del GSH intramitocondrial. El defecto selectivo del transporte de GSH mitocondrial por el consumo crónico de etanol se traduce en una depleción selectiva de los niveles de GSH mitocondrial. Dicha depleción ocasiona una perturbación en la funcionalidad mitocondrial (39, 40, 46). En estas circunstancias, el hepatocito alcohólico experimenta una inducción del factor de transcripción NF- $\kappa$ B activando la expresión de citoquinas inflamatorias y sus receptores. Estas observaciones, han llevado a proponer que la alteración del transporte mitocondrial de GSH por alcohol podría contribuir o ser un factor regulador en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica (8, 29, 46).

La mitocondria es un blanco selectivo de la acción de citoquinas, como el TNF. Múltiples estudios llevados a cabo en células susceptibles al TNF, han demostrado la necesidad de la funcionalidad mitocondrial para desencadenar los efectos citotóxicos del TNF (47, 48).

El mecanismo por el que el TNF ejerce dicho efecto no está bien definido. No obstante, estudios recientes han demostrado que la ceramida, uno de los segundos mensajeros lipídicos generados en respuesta a la acción del TNF, ejerce un efecto

directo sobre la cadena respiratoria mitocondrial aumentando la generación de radicales libres (49). El GSH mitocondrial ejerce un papel crítico como defensa en la protección de la mitocondria frente al estrés oxidativo inducido en el propio compartimento celular (49, 50).

## 6.2. Transporte mitocondrial de GSH

Como se ha expuesto anteriormente el GSH mitocondrial ejerce un papel fundamental en la regulación de importantes funciones que garantizan un funcionamiento de la fosforilación oxidativa necesaria para la síntesis del ATP utilizado en múltiples funciones celulares. Diversos estudios han mostrado en varios tipos de células y órganos que la depleción del GSH mitocondrial resulta en disfunción y muerte celular, que se previene empleando derivados del GSH más permeables (35, 36, 37, 38, 39, 40). A pesar de la alta concentración de GSH en la matriz mitocondrial, la mitocondria no sintetiza GSH *de novo*, por lo que el GSH mitocondrial procede de la operación de un sistema de transporte (RmGshT) que transporta GSH del citosol a la matriz (37, 41, 42, 43). Sin embargo, a pesar de la importante función que juega dicho transportador, se conoce muy poco sobre sus propiedades. Recientemente hemos expresado el transportador mitocondrial de GSH de hígado de rata en mitocondrias de oocitos *Xenopus laevis* en una estrategia similar a la utilizada en la expresión de los transportadores plasmáticos de GSH (RsGshT y RcGshT) (44).

Los oocitos de *Xenopus* contienen una densidad de mitocondrias muy elevada. Sin embargo el aislamiento de la fracción mitocondrial requiere el uso de gradiente continuo de sacarosa para la eliminación de la clara y proteína pigmentaria del hemisferio animal. El nivel de GSH mitocondrial en oocitos controles es del orden de 6-8 veces menor que el encontrado en mitocondrias de hepatocitos de rata, con un nivel de GSH citosólico de 11-13 nmol/8 oocitos (20, 44). Dichos valores de GSH en ambos compartimentos subcelulares son muy similares entre oocitos microinyectados con agua o mRNA de hígado. De ahí que sea necesaria la microinyección de oocitos con GSH para proveer el sustrato necesario para expresar la actividad del transportador mitocondrial. Por tanto, las mitocondrias de oocitos inyectados con GSH dos horas antes de su aislamiento después de 3 días de la microinyección de mRNA de hígado de rata poseen unos niveles de GSH 3-4 veces más que las mitocondrias de oocitos inyectados con mRNA pero no con GSH. El transporte mitocondrial de GSH retiene unas características similares a las observadas en mitocondrias de hígado de rata, como la estimulación por la hidrólisis de ATP. Esta característica de transporte es única para este sistema de transporte, puesto que los otros transportadores, RsGshT y RcGshT son insensibles a la hidrólisis de ATP.

El incremento de la cantidad de mRNA de hígado inyectado en oocitos contribuye a la expresión proporcional de la capacidad de transporte del GSH a la mi-

tocondria. La expresión requiere de un período de 3-5 días de incubación de los oocitos microinyectados con mRNA para la manifestación de la expresión. Esta expresión del GSH mitocondrial en oocitos de *Xenopus* tras microinyección del mRNA de hígado es el resultado del procesamiento y traducción del mRNA de hígado inyectado en vez de la consecuencia de la activación de un gen endógeno del oocito activado tras la manipulación genética del mismo, puesto que dicha actividad es inhibida por el pretratamiento de oocitos con emetina (inhibidor selectivo del proceso de traducción citoplásmica) e insensible al tratamiento con actinomicina D.

Estudios de la caracterización funcional del transporte expresado en oocitos en relación con las características conocidas de los otros transportadores de membrana de GSH revelaron una insensibilidad a la competición *cis* por inhibidores de RsGshT y RcGshT, mientras que los compuestos que no afectan a estos transportadores inhiben el transporte de GSH mitocondrial en oocitos. El transporte endógeno del GSH en mitocondrias de oocitos inyectados con agua (controles) es insensible a la presencia de ATP y a la inhibición por glutamato, lo que indicaría que esta contribución al transporte mitocondrial de GSH expresado en los oocitos no es debido a la expresión del transportador de GSH mitocondrial de hígado sino a una ruta alternativa de transporte diferente o la consecuencia de un fenómeno de unión inespecífica del GSH a la membrana mitocondrial, ya que dicho transporte endógeno es similar a 37°C y 4 °C.

El mRNA total de hígado fue fraccionado en tamaño tras centrifugación en gradiente de sacarosa. De dichas especies de distinto tamaño, sólo una expresó actividad de transporte de GSH en mitocondria de oocitos. Esta fracción de tamaño de 3.0-3.5 kb conserva unas características de transporte similares a las observadas en mitocondrias de oocitos inyectados con mRNA total de hígado: estimulación por ATP, inhibición por glutamato e insensibilidad a inhibidores como DNP-GSH, BSP-GSH, BSP, GSSG, metionina y cistationina. Considerando la diferencia en la cantidad de mRNA inyectado en oocitos (33 ng de mRNA total frente a 3-5 ng de la fracción de 3.0-3.5 kb de tamaño) se observa un incremento de actividad de 2-3 veces en la capacidad de transporte de GSH mitocondrial en oocitos inyectados con la fracción de mRNA, que corresponde a un enriquecimiento respecto a la cantidad de mRNA inyectado de 20-30 veces. Finalmente, oocitos inyectados con la fracción de mRNA que expresa transporte mitocondrial no resulta en expresión de transporte de GSH en oocitos intactos, ni las mitocondrias de oocitos microinyectados con RsGshT o RcGshT muestran capacidad de transporte del GSH, lo que sugiere que el transportador mitocondrial del GSH de hígado es un gen distinto a los otros dos transportadores de membrana. Estos estudios constituyen el fundamento para el clonaje de este transportador mitocondrial de GSH esencial para la regulación de múltiples funciones mitocondriales y celulares.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Fernández-Checa JC, Lu S, Ookhtens M, DeLeve L, Kannan R, Runnegar M, Yoshida H, García-Ruiz C, Kulenkamp J y Kaplowitz N. (1993), Hepatic anion transport and bile secretion: physiology and pathophysiology. In hepatic transport and bile secretion (N. Tavoloni and P. Berk, eds), pp. 345-395, Raven Press, Inc, New York.
2. Lash LH y Jones DP (1984), Renal glutathione transport: characterization of the sodium-dependent system on the basal lateral membrane. *J Biol Chem* 259: 14508-14514.
3. Bartoli GM y Sies H. (1978), Reduced and oxidized efflux of glutathione from rat liver. *FEBS Lett* 86:89-91.
4. Eberle D, Clarke R y Kaplowitz N (1981), Rapid oxidation in vitro of glutathione in bile. *J Biol Chem* 256: 2115-2117.
5. Inoue M, Kinne R, Tran T y Arias IM (1983), Glutathione transport across hepatocyte plasma membranes: analyses using isolated rat liver-canalicular membrane vesicles. *Eur J Biochem* 134: 4671-471.
6. Inoue M, Kinne R, Tran T y Arias IM (1984), Glutathione transport across hepatocyte plasma membranes: analyses during isolated rat liver-sinusoidal membrane vesicles. *Eur J Biochem* 138: 491-495.
7. Ookhtens M, Corvasce D, Hobdy K, Aw TY y Kaplowitz N (1985), Sinusoidal efflux of glutathione in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 75: 258-265.
8. Fernández-Checa JC, Ookhtens M y Kaplowitz N (1989), Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione: relationship of cytosolic GSH to efflux and mitochondrial sequestration. *J Clin Invest* 83: 1247-1252.
9. Kaplowitz N, Eberle D, Petrini J, Touloukian J y Kuhlenkamp J (1983), Factors influencing the efflux of GSH into bile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 224: 141-147.
10. Ookhtens M y Maddatu TM (1991), Mechanism of change in hepatic sinusoidal and biliary glutathione efflux with age. *Am J Physiol* 261:G648-G656.
11. Fernández-Checa JC, Ookhtens M y Kaplowitz N (1993), Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of GSH and organic anions in rat liver canalicular membrane vesicles. *J Biol Chem* 268: 10836-10841.
12. Fernández-Checa JC, Takikawa H, Ookhtens M, Ohrie H y Kaplowitz N (1992), Canalicular transport of GSH in normal and mutant EHBR rats. *J Biol Chem* 267: 1667-1673.
13. Fernández-Checa JC, Ren C, Aw TY, Ookhtens M y Kaplowitz N (1988), Effect of membrane potential and cellular ATP on GSH efflux from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 256: G403-G408.
14. García-Ruiz C, Fernández-Checa JC y Kaplowitz N (1992), Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced GSH in hepatocytes and membrane vesicles. *J Biol Chem* 267: 22256-22264.
15. Ishikawa T, Muller M, Klunemann C, Schaub T y Keppler D (1990), ATP-dependent active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. *J Biol Chem* 265: 19279-19286.
16. Ookhtens M, Lyon I, Fernández-Checa JC y Kaplowitz N (1988), Inhibition of GSH efflux in the perfused rat liver and isolated hepatocytes by organic anions and bilirubin: kinetics, sidedness and molecular forms. *J Clin Invest* 82: 608-616.
17. Aw TY, Ookhtens M y Kaplowitz N (1984), Inhibition of GSH efflux from isolated hepatocytes by methionine. *J Biol Chem* 259: 9355-9358.
18. Fernández-Checa JC, Ookhtens M y Kaplowitz N (1990), Effect of GSH synthesis on the inhibition of GSH efflux by methionine: studies in isolated hepatocytes and perfused rat liver. *Am J Physiol* 258: G967-G973.
19. Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Yi Jr y Kaplowitz N (1996), Inhibition of rat sinusoidal GSH transporter by thioethers: specificity, sidedness and kinetics. *Am J Physiol* 270: G859-G865, 1996.
20. Fernández-Checa JC, Yi Jr, García-Ruiz C, Knezic Z, Tahara S y Kaplowitz N (1993),

- Expression of rat liver GSH transport in *Xenopus Laevis* oocytes. *J Biol Chem* 268: 2324-2328.
21. Yi JR, Lu S, Fernández-Checa JC y Kaplowitz N (1994), Expression cloning of a rat hepatic reduced glutathione transporter with canalicular characteristics. *J Clin Invest* 93: 1841-1845.
  22. Yi JR, Lu S, Fernández-Checa JC y Kaplowitz N (1995), Expression cloning of the cDNA for a polypeptide associated with rat hepatic sinusoidal reduced glutathione transport: characteristics and comparison with the canalicular transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 1495-1499.
  23. Jaeske H (1992), Enhanced sinusoidal GSH efflux during endotoxin-induced oxidant stress in vivo. *Am J Physiol* 263: G60-G68.
  24. Cantin AM, North SL, Hubbard R y Crystal RG (1987), Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 63: 152-157.
  25. Yudkoff MD, Pleasure D, Gregar L, Lin ZP, Nissim I y Stern J (1991), Glutathione turnover in cultured astrocytes. *J Neurochem* 55: 137-145.
  26. Edwards S y Westerfeld WW (1952), Blood and liver glutathione during protein deprivation. *Proc Soc Exp Biol Med* 79:57-59.
  27. Vignais PM y Vignais PV (1974), Fusicin, an inhibitor of mitochondrial SH-dependent transport-linked functions. *Biochem Biophys Acta* 325:357-374.
  28. Jocelyn P.C. (1975), Some properties of mitochondrial glutathione. *Biochim Biophys Acta* 369: 427-436.
  29. Fernández-Checa JC, Hirano T, Tsukamoto H y Kaplowitz N (1993), Mitochondrial GSH depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 10: 469-475.
  30. Bellomo G y Orrenius S (1985), Altered thiol and calcium homeostasis oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5: 876-882.
  31. DiMonte D, Bellomo G, Thor H, Nicotera P y Orrenius S (1984), Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein-thiol oxidation and alterations in intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235: 343-350.
  32. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P y Orrenius S (1985), The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic  $Ca^{2+}$ . *J Biol Chem* 260: 13035-13040.
  33. Beatrice MC, Stiers DL y Pfeiffer BR (1984), The role of glutathione in the retention of  $Ca^{2+}$  by liver mitochondria. *J Biol Chem* 259: 1279-1287.
  34. Masini A, Botti B, Ceccarelli D, Muscatello U y Vannini V (1986), Induction of calcium efflux from isolated rat-liver mitochondria by 1,2-dibromoethane. *Biochim Biophys Acta* 852: 19-24.
  35. Martensson J y Meister A (1989), Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of GSH and is prevented by giving GSH-ester. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 471-475.
  36. Martensson J, Jain A, Frayer W y Meister A (1989), Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis lead to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5296-5300.
  37. Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Ookhtens M y Kaplowitz N (1991), Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *J Clin Invest* 87,397-405.
  38. Meredith M y Reed D J (1988), Depletion in vitro of mitochondrial GSH in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and BCNU. *Biochem Pharmacol* 32, 1383-1388.
  39. García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC (1994), Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes *J Clin Invest* 94, 193-201.
  40. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC (1995), Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 21: 207-214.

41. Griffith OW y Meister A (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4668-4672.
42. Martensson J, Lai CK y Meister A (1990). High affinity transport of GSH is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7185-7189.
43. Kurosawa K, Hayashi N, Sato N, Kamada T y Tagawa N (1991), *Biochem Biophys Res Commun* 167, 367-372.
44. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Rodes J, Yi JR, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC (1995), Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione: expression studies in *Xenopus Laevis* oocytes. *J Biol Chem* 270: 15946-15949.
45. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N. y Fernández-Checa JC (1995), Role of oxidative stress generated from mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. Studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 48: 825-834.
46. Takeshi H, Kaplowitz N, Kamimura T y Fernández-Checa JC (1992). Hepatic mitochondrial GSH depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology*. 16: 1423-1428
47. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA y Fiers W (1992), Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage to mitochondrial function. *J Biol Chem* 267:5317-5323.
48. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G y Fiers W (1993), Depletion of the electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects. *EMBO J* 12: 3095-3104.
49. García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A y Fernández-Checa JC (1997), Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272: 11369-11377.
50. Goosens V, Grooten J, DeVos K y Fiers W (1995), Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8115-8119.

# GLUTATION, ANTIOXIDANTES Y ENVEJECIMIENTO

JOSE VIÑA, JUAN SASTRE, FEDERICO V. PALLARDO  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina de Valencia.  
Av. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia.

## SUMARIO

---

1. INTRODUCCION
2. LA TEORIA DEL ENVEJECIMIENTO ASOCIADA A LOS RADICALES LIBRES
3. EL PAPEL DE LAS MITOCONDRIAS EN EL ENVEJECIMIENTO CELULAR
4. LOS RADICALES LIBRES CAUSAN DAÑO A COMPONENTES CELULARES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO
5. USO DE ANTIOXIDANTES EN ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO: BENEFICIOS Y RIESGOS
6. MUERTE CELULAR: PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA APOPTOSIS
7. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL ESTRES OXIDATIVO Y PROTECCION POR EL GLUTATION Y OTROS ANTIOXIDANTES
8. CONCLUSION
9. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

El glutatión es el tiol no proteico más abundante de la célula. Se ha revisado en numerosas ocasiones su importancia en el metabolismo celular (1). La importancia del glutatión en el envejecimiento fue objeto de estudio inicialmente por Pinto y Dartley (2) y por Lang y sus colaboradores (3).

Harman (3) sugirió en 1956 que el envejecimiento se debía a la acción oxidante de los radicales libres. De ello, se deduce que los antioxidantes pueden ser administrados para disminuir los efectos indeseables del envejecimiento en el organismo.

Es muy importante señalar que los antioxidantes están compartimentalizados. Por ejemplo, el glutatión es importante porque se encuentra en alta concentración en las mitocondrias donde se generan gran cantidad de radicales libres. De hecho, alrededor del 2% de todo el oxígeno que utilizan las células no se convierte en agua sino en especies reactivas de oxígeno. La mayoría de estas especies se generan en la mitocondria. Jaime Miquel y sus colaboradores señalaron la importancia de la mitocondria y especialmente del DNA mitocondrial para entender el envejecimiento (4).

Estos hechos sugieren que una aproximación interesante para minimizar el efecto dañino del envejecimiento en la función celular es la administración de antioxidantes, los cuales pueden contrarrestar en parte el efecto dañino de los radicales libres en fisiología celular. De hecho, el papel protector de los antioxidantes, especialmente de las vitaminas antioxidantes, contra el envejecimiento ha sido objeto de muchos estudios y está en la actualidad probado. Nosotros observamos hace unos años que aquellos antioxidantes que protegen contra la oxidación del glutatión son efectivos para evitar la pérdida de las funciones fisiológicas que se observan en el envejecimiento *in vivo* (5).

## 2. LA TEORIA DEL ENVEJECIMIENTO ASOCIADA A LOS RADICALES LIBRES

El envejecimiento es un proceso multifactorial; se han propuesto muchas teorías para explicarlo. Medvedev, en 1990, recogió más de cien teorías que pretendían explicar el envejecimiento (6). Es importante señalar que muchas de estas teorías

no son excluyentes mutuamente. Una de las teorías más importantes es la de los radicales libres, propuesta por Harman en 1956 (7). De acuerdo con esta teoría, los radicales libres producidos durante el metabolismo del oxígeno causan daño a las células, lo cual conduce a alteraciones en el metabolismo y función celulares que se reflejan en alteraciones en las funciones fisiológicas del organismo. Además, el conocimiento de las reacciones producidas por los radicales libres y su papel en la función normal de los sistemas biológicos ha aumentado grandemente en las últimas tres décadas (8, 9). Se engloba en el término especies reactivas de oxígeno a los radicales libres, a los peróxidos y al oxígeno singlete. Estas especies se generan continuamente en las células aeróbicas a través de múltiples mecanismos: entre ellos se cuenta la cadena respiratoria, el citocromo P-450, la fagocitosis, la síntesis de prostaglandinas, las radiaciones ionizantes y la actividad de enzimas tales como las oxidasas, entre las cuales ocupa un papel prominente la xantina oxidasa.

Las células tienen mecanismos para detoxificar las especies reactivas de oxígeno. Algunos de estos mecanismos son enzimáticos y otros son no enzimáticos. Entre las enzimas implicadas en la defensa celular contra los radicales libres se cuenta la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, la superóxido-dismutasa y la catalasa. Entre los antioxidantes no enzimáticos encontramos el glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides, etc.

La idea general que propone la teoría de los radicales libres de Harman (7) es que los antioxidantes celulares no son capaces de detoxificar las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente en la vida. Así, el envejecimiento celular está asociado con un estrés oxidativo crónico. Sies (10) definió al estrés oxidativo como una alteración en el equilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros.

Existe una gran cantidad de evidencia experimental que apoya la teoría de los radicales libres (9, 11). Entre esta evidencia tenemos: 1) La relación inversa entre la expectativa de vida de los mamíferos y su metabolismo basal. 2) El aumento en la vida media de animales transgénicos que expresan grandes cantidades de antioxidantes enzimáticos. 3) El daño asociado a radicales libres que se observa en células envejecidas. 4) El hecho de que la vida media de muchas especies aumenta cuando la dieta se suplementa con antioxidantes. 5) La evidencia del papel de los radicales libres en enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento.

La relación inversa entre la longevidad y la cantidad de energía que se necesita para el crecimiento se conoce desde principios de siglo. En general, las especies que tienen un consumo de oxígeno alto tienen una longevidad baja. Existen excepciones a esta teoría, entre ellas se cuentan los pájaros y los primates (12). Sin embargo, estas excepciones pueden explicarse por el hecho de que las mitocondrias de las células de estos animales producen menos radicales libres que las mitocondrias de otros animales como la rata (12). Así pues, las excepciones a la «teoría de la velocidad de la vida» que, como hemos apuntado, se conoce desde principios de

siglo, no están en contradicción con la teoría de los radicales libres: las especies más longevas producen menos radicales libres que las especies menos longevas.

Recientemente, se ha obtenido evidencia clara a favor de la teoría de los radicales libres del envejecimiento. En efecto, Orr y Sohal (13) observaron que las drosóphilas tienen la vida media y la vida máxima aumentada cuando sobreexpresan superóxido-dismutasa y catalasa. Además, Barja y sus colaboradores mediante experimentos de inducción enzimática observaron que inhibiendo la actividad catalasa en ranas se induce la superóxido-dismutasa, la glutatión reductasa y la síntesis de glutatión y de ácido ascórbico. Esto aumenta la vida media de las ranas (14).

Varios autores han encontrado una relación entre la oxidación de glutatión y el envejecimiento en varios modelos animales. Esta oxidación puede deberse a un aumento en la producción de radicales libres o a una disminución en la capacidad de detoxificación de los mismos. En términos generales, el envejecimiento se asocia con una disminución de las enzimas que catalizan reacciones que tienden a reducir el glutatión, tales como la glutatión reductasa o la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y, en menor lugar, a un aumento de la actividad de las enzimas que tienden a favorecer la oxidación del glutatión, por ejemplo, la glutatión peroxidasa o la transferasa (15). Cuando el glutatión se oxida, el GSSG tiende a liberarse de las células (16). Así, la oxidación del glutatión en el envejecimiento puede explicar el aumento de la liberación del glutatión desde las células. De hecho, nosotros hemos demostrado que existe un aumento en el GSSG en la sangre de animales viejos (17). La compartimentalización del glutatión durante el envejecimiento no ha sido estudiada con suficiente detalle. Nosotros observamos que la oxidación del glutatión en mitocondrias procedentes de varios órganos de ratas viejas es mucho más significativa que la oxidación del glutatión en compartimentos extramitocondriales (17). Esto apoya la idea de que las mitocondrias tienen un papel fundamental como orgánulos diana asociados al envejecimiento (4). Además, en varios estudios se ha podido demostrar que la síntesis de los antioxidantes está disminuida en el envejecimiento; así, nosotros observamos que existe una práctica ausencia de la actividad de la enzima cistationasa en el cristalino de animales viejos (18). Esto hace imposible la síntesis de glutatión a partir de metionina, un importante precursor de cisteína que es necesaria para la síntesis del glutatión. Esto tiene relevancia ya que desde los estudios de Ritchie y sus colaboradores se sabe que existe una correlación entre la deficiencia en glutatión y la longevidad.

### 3. EL PAPEL DE LAS MITOCONDRIAS EN EL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Las mitocondrias generan grandes cantidades de radicales libres: de hecho, el 2% de todo el oxígeno que utilizan los mamíferos no se emplea para formar agua sino que se deriva hacia la formación de radicales libres (20). La tasa de formación

de ión superóxido y de agua oxigenada aumenta con el envejecimiento. Se sabe que las células postmitóticas acumulan varios pigmentos asociados al envejecimiento, tales como la lipofucsina. Mucha de esta lipofucsina deriva de las mitocondrias dañadas (21). Todo esto, como hemos indicado antes, condujo a Jaime Miquel y a sus colaboradores a proponer la llamada teoría mitocondrial del envejecimiento celular (4). Esta teoría propone que la senescencia se debe a la acción de los radicales libres sobre el genoma mitocondrial de las células postmitóticas. Esto es importante ya que las células diferenciadas, postmitóticas, contienen mitocondrias que usan grandes cantidades de oxígeno. Muchos estudios han mostrado que existe un daño oxidativo al DNA mitocondrial, a las proteínas y a los lípidos. Además, se han visto cambios en la función y en la morfología mitocondrial asociada al envejecimiento (para una buena revisión léase 22).

Existen lesiones oxidativas en el DNA mitocondrial que se acumulan con el envejecimiento en tejidos humanos y de roedores (17). Estas lesiones oxidativas en el DNA mitocondrial afectan a los genes mitocondriales. De hecho, Gadaleta y sus colaboradores (23) han observado que la delección de genes mitocondriales en *Drosophila* está disminuida (23, 24). Estas alteraciones oxidativas al DNA mitocondrial causan un aumento en las delecciones y mutaciones puntuales en el mismo, lo cual puede contribuir a la aparición de enfermedades neurodegenerativas (25, 26).

Muchos investigadores han estudiado el papel del envejecimiento en enzimas fundamentales asociadas con la cadena de transporte electrónico. Así, se ha podido observar una disminución en la actividad de los complejos 1, 2 y 4 de la cadena respiratoria mitocondrial. Más aún, la actividad respiratoria global de las mitocondrias aisladas disminuye con la edad en el hígado, músculo esquelético y cerebro. Nosotros hemos observado cambios en el potencial de membrana mitocondrial y en otras actividades relacionadas con el transporte de metabolitos, por ejemplo de malato en mitocondrias de células viejas (26). Las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (26, 27). Más aún, la tasa de producción de agua oxigenada por mitocondrias presenta una correlación inversa con las variaciones en la longevidad entre especies (28). Estos resultados apoyan la idea de que la generación de prooxidantes es un factor crítico en la velocidad del envejecimiento (28).

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que el daño mitocondrial es esencial en el envejecimiento. Nosotros hemos estudiado la función de las mitocondrias en células intactas. La idea era que aislar mitocondrias provenientes de órganos de animales viejos podría conducir a aislar sólo las mitocondrias que son viables. Nuestros estudios en hepatocitos aislados nos llevaron a concluir que las vías metabólicas que implican a las mitocondrias se afectan durante el envejecimiento, mientras que aquéllas que no las afectan permanecen inalteradas. Algunos de los cambios en vías metabólicas importantes como la gluconeogénesis pueden atribuirse a alteraciones en la expresión génica, y especialmente en las modificaciones post-traduccionales de genes como el del transportador de malato. Estos y otros

experimentos nos permitieron concluir que las mitocondrias tienen un papel esencial en el envejecimiento celular.

#### 4. LOS RADICALES LIBRES CAUSAN DAÑO A COMPONENTES CELULARES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Sabemos en la actualidad que con la edad se acumula daño a lípidos, proteínas y DNA (ver 9). Ya hemos expuesto las lesiones asociadas a la alteración mitocondrial. Sin embargo, éstas no son las únicas que pueden notarse en células envejecidas.

La peroxidación lipídica se considera como un factor esencial en el envejecimiento de células aeróbicas (29). Sin embargo, se sabe que la peroxidación lipídica también forma parte de la constelación de factores etiológicos y patogénicos de enfermedades asociadas al envejecimiento (30). Se necesita la formación de radicales de oxígeno en las membranas para que se inicie la peroxidación lipídica (30). La peroxidación lipídica conduce a la acumulación de «pigmentos de envejecimiento». Estos son depósitos poliméricos complejos de lípidos oxidados, metales en transición y proteínas que producen una fluorescencia característica (30). El hecho de que se encuentren altas concentraciones de hierro y cobre en estos pigmentos sugiere que los metales pesados tienen un papel fundamental en su formación (31). El daño oxidativo a los lípidos de membrana es muy probable que constituya un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas que se observa en el envejecimiento (32). Los peróxidos lipídicos se pueden romper y dar lugar a aldehídos, los cuales son un importante marcador de envejecimiento. De hecho, la medida de los peróxidos lipídicos mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico ha dado lugar a resultados discrepantes. Muchas de estas discrepancias se deben a que los valores de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico no están relacionadas con productos de la peroxidación lipídica. Es importante determinar directamente productos tales como el malondialdehído separándolos previamente por cromatografía líquida de alta resolución. En ese caso, los productos resultantes de la peroxidación lipídica se asocian con fenómenos propios del envejecimiento.

Por otro lado, también se han descrito daños a las proteínas que pueden atribuirse a radicales libres. Stadtman, en 1992 (33) observó que el daño a las proteínas no había recibido mucha atención hasta entonces. De hecho, se habían observado daños asociados a proteínas específicas en enzimas que se inactivan durante el envejecimiento (34). Las modificaciones post-traduccionales parecen acumularse en proteínas y en células procedentes de animales viejos (35). Muchas de estas modificaciones se deben a la acción de los radicales libres (33). En este proceso, aminoácidos tales como la prolina, la arginina y la lisina se oxidan para dar derivados carbonilados, es decir, aldehídos. Podemos medir el contenido en carbonilos de las proteínas, y esto puede usarse como una indicación de la oxidación de las mismas.

Diversos autores han observado un aumento moderado, pero significativo con el envejecimiento del contenido de carbonilos en eritrocitos y fibroblastos humanos (36), en cristalino de seres humanos (37), en el lóbulo occipital de cerebro humano (38) y en hepatocitos de rata (39). Asimismo, el contenido en carbonilos de fibroblastos procedentes de pacientes con enfermedades que cursan con un envejecimiento prematuro, como la progeria o Síndrome de Werner es mucho más alto que en individuos sanos de la misma edad (36). Si bien muchos de los estudios realizados muestran un aumento de tres o cuatro veces en el contenido de carbonilos con el envejecimiento, esta oxidación afectaría a un 20-30% del total de proteínas celulares (33). Es más, este porcentaje está posiblemente subestimado, dado que los grupos carbonilos no se forman por oxidación de algunos aminoácidos como la histidina, la cisteína o la metionina (33).

La acumulación de proteínas dañadas podría deberse a un aumento relacionado con el envejecimiento en la velocidad de oxidación de las proteínas y daría lugar paralelamente a una disminución en la capacidad de degradar proteínas oxidadas (33). Por ejemplo se sabe (40) que, durante el envejecimiento, se produce un descenso en la actividad de la proteasa alcalina neutra, la cual degrada proteínas oxidadas. La acumulación de proteínas dañadas por oxidación parece estar relacionada con el deterioro de la función fisiológica asociada al envejecimiento. Esto explicaría la mejora en la memoria espacial y temporal observada en monos viejos cuando se administra una sustancia que capta radicales libres (tert-butil-a-fenilnitrona). Este producto disminuye la acumulación de proteínas oxidadas en el cerebro (40). Estos hallazgos denotan la importancia de los antioxidantes en la prevención del envejecimiento.

El grupo de Ames ha calculado que los radicales libres del oxígeno modifican cada día aproximadamente diez mil bases de DNA por célula (9). Los enzimas reparadores del DNA son capaces eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. Por tanto, las lesiones no reparadas del DNA como la 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina se acumulan con la edad. Como ya hemos dicho, la mayoría de estas lesiones se origina en el DNA mitocondrial, no en el DNA nuclear (41). Nosotros hemos demostrado recientemente que la oxidación del DNA mitocondrial se asocia con la oxidación del glutatión mitocondrial (17). Estos resultados destacan la importancia del mantenimiento del estatus de glutatión reducido para proteger a las células contra el daño oxidativo de moléculas de gran importancia biológica, como el DNA. El daño oxidativo del DNA representaría otro índice de estrés oxidativo, y confirmaría el papel del daño inducido por radicales libres en el envejecimiento.

El daño oxidativo producido en proteínas y en DNA no puede considerarse de forma independiente, dado que pueden potenciarse mutuamente. Así, la acumulación de formas inactivas de enzimas reparadores del DNA podría aumentar la acumulación de lesiones oxidativas en el DNA. De la misma forma, una pérdida de enzimas reparadores dará lugar a un aumento en el número de mutaciones cuando

hay presentes lesiones oxidativas en los residuos de guanina. Por tanto, las lesiones oxidativas en el DNA dan lugar a un potencial mutagénico. En este mismo contexto, las lesiones oxidativas del DNA también parecen estar relacionadas con la patogénesis de enfermedades asociadas al envejecimiento como el cáncer.

El sistema del glutatión protege contra el daño oxidativo de lípidos, proteínas y DNA. La presencia de lesiones oxidativas en estos componentes celulares demuestra que la protección antioxidante del GSH y enzimas relacionados no es suficiente en el envejecimiento. Por ello es de la mayor importancia encontrar formas para incrementar la acción del sistema del glutatión, mediante el aumento de la concentración de GSH y/o aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa y reductasa.

##### 5. USO DE ANTIOXIDANTES EN ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO: BENEFICIOS Y RIESGOS

La teoría de los radicales libres es particularmente atractiva dado que permite una estrategia de intervención ante el fenómeno del envejecimiento. Es decir, hace posible la utilización de antioxidantes, como la vitamina C o E. Estas sustancias retardarían el declinar en la función celular y orgánica asociada al envejecimiento. La teoría de los radicales libres dice que la administración de antioxidantes protegería contra el declinar en la actividad asociado al envejecimiento. La administración de antioxidantes ha sido usada con éxito en algunos casos, bien para proteger contra el deterioro fisiológico asociado a la edad o para aumentar la vida media de algunas especies (42, 43).

En estudios previos nosotros y otros grupos hemos observado que algunos antioxidantes protegían parcialmente contra la oxidación del glutatión en tejidos de roedores, y en *Drosophila* (15,43,9). Además, nosotros hemos observado que los antioxidantes protegen contra la disminución en la actividad física asociada al envejecimiento (15). El grupo de Richie demostró que la restricción de metionina aumenta la longevidad en ratas lo cual es debido, probablemente, a un aumento en los niveles sanguíneos de glutatión (44). Recientemente publicamos que antioxidantes derivados del tiazolidín carboxilato o la vitamina C o E protegen contra la oxidación del glutatión y el DNA mitocondrial que se produce en el envejecimiento (17). El grupo de Meydani ha observado un efecto protector de la vitamina E en el daño oxidativo inducido por el ejercicio físico, tanto en individuos jóvenes como viejos (45).

Pese a los efectos beneficiosos indicados, la administración de antioxidantes no está exenta de riesgos. Por ejemplo, el efecto prooxidante de algunos antioxidantes esta ampliamente documentado. Hace años demostramos que la cisteína puede tener un efecto prooxidante (46) dado que genera durante su oxidación radicales libres (47). Asimismo, la administración de  $\beta$ -caroteno a fumadores aumenta la incidencia de cáncer de pulmón (48). De la misma forma, la administración de vita-

mina E disminuye la respuesta aguda de los neutrófilos durante el ejercicio físico en el envejecimiento (49). Por tanto, la administración de dosis elevadas de antioxidantes debe realizarse con precaución.

## 6. MUERTE CELULAR: PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA APOPTOSIS

El mantenimiento de la homeostasis tisular supone una eliminación constante de células supérfluas o dañadas. Cuando esta función no se realiza adecuadamente se induce la aparición de malformaciones durante el desarrollo o bien procesos neoplásicos en el organismo adulto. Este proceso se conoce como muerte celular programada dado que se cree que las células activan un proceso pre-programado para suicidarse. También se llama "apoptosis". Este término se relacionó inicialmente con la descripción morfológica de este mecanismo. en la actualidad ambos términos se consideran sinónimos.

La apoptosis se diferencia de la necrosis (para una revisión ver 50) en que en esta última la muerte se induce por daño de tipo osmótico, químico o físico. Estos agentes originan una rotura temprana de las membranas tanto externas como internas, liberando proteínas desnaturalizadas al espacio extracelular, induciendo una respuesta inflamatoria alrededor de la célula lisada. En cambio en la apoptosis, los cambios más importantes son, la condensación nuclear y la disminución del diámetro celular. Se produce una "fragmentación en escalera" del DNA nuclear. Sin embargo, estudios recientes indican que las alteraciones nucleares pueden no ocurrir en la apoptosis (51). El grupo de Kroemmer (51) ha demostrado que los cambios en la actividad mitocondrial es otra característica común de la apoptosis. Las evidencias más recientes indican que existen al menos dos vías que pueden inducir desintegración nuclear. Una que implica la acción directa de proteasas específicas y otra requiere la presencia de mitocondrias. En cualquier caso los resultados publicados son muchas veces contradictorios. Los estudios de Hockenberry *et al.* y Ratan *et al.* (52, 53) muestran que los radicales libres tiene una acción fundamental en la apoptosis. Nosotros hemos observado que en la apoptosis aumenta la oxidación del glutatión celular y que esta oxidación se correlaciona con un aumento del daño oxidativo del DNA mitocondrial. La administración de éster de glutatión disminuye la apoptosis en fibroblastos en cultivo (54).

De la misma forma la inhibición de vías antioxidantes como la síntesis de GSH con butionina sulfoximina provoca apoptosis en distintas líneas celulares. Algunos autores argumentan que el proto-oncogén Bcl-2 ejerce su acción anti-apoptótica actuando como antioxidante sobre todo a nivel mitocondrial. Como sabemos las mitocondrias son una importante fuente de radicales libres. Trabajos recientes (51) indican que durante la apoptosis aumenta la permeabilidad mitocondrial de los poros o canales llamados PT ("permeability transition"). Estos poros PT son una especie de megacanales que estan localizados en la membrana interna mitocondrial.

El grupo de Kroemer ha demostrado en un bonito experimento (55) como mitocondrias aisladas pueden inducir la digestión del DNA nuclear en un sistema libre de células cuando los canales PT están activados. De la misma forma la inhibición de los canales PT bloquea la apoptosis. Hay muy pocos trabajos sobre el efecto del envejecimiento sobre la apoptosis pero se ha propuesto que la eficiencia de la apoptosis estaría correlacionada con la velocidad del envejecimiento. Algunos estudios en ratas sugieren que la apoptosis es un mecanismo protector, ya que al eliminar las células con DNA dañado o células enfermas se disminuiría la posibilidad de contraer procesos neoplásicos.

Los hígados procedentes de ratas viejas mostraron un mayor índice de apoptosis (*in situ*) que las ratas jóvenes. Usando el modelo de restricción dietética, que retarda la aparición del envejecimiento, Muskhelishvili *et al.* (57) han observado que la incidencia de tumores disminuía en el hígado de las ratas viejas sometidas a restricción dietética y paralelamente aumentaba el índice de apoptosis en estos mismos animales.

## 7. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL ESTRES OXIDATIVO Y PROTECCION POR EL GLUTATION Y OTROS ANTIOXIDANTES

Entre las enfermedades asociadas al envejecimiento más frecuentes se incluyen el cancer, enfermedades cardiovasculares, inmunodepresión, enfermedades neurodegenerativas y cataratas. La degeneración de células postmitóticas parece ser una de las causas fundamentales de este importante grupo de enfermedades. Es bien conocido que la incidencia de cáncer aumenta con la edad. Por ello, las especies que viven más años tienen una mayor frecuencia de procesos neoplásicos.

Las especies reactivas del oxígeno parecen estar directamente asociadas con la enfermedad de Parkinson. Gotz *et al.* (58) han propuesto que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis del Parkinson. Ikebe *et al.* (59) vieron como el número de deleciones en el DNA mitocondrial aumenta en el *striatum* en la enfermedad de Parkinson y que es debido a los radicales libres derivados del oxígeno. Estos autores encontraron resultados similares en la senescencia.

La exposición de neuronas corticales fetales de rata a elevadas concentraciones de glutamato extracelular u homocisteato produce una degeneración por apoptosis de las neuronas en 24 horas. La apoptosis se produce por depleción de GSH. La disminución de la captación de cistina da lugar a un descenso en el nivel de glutatión debido a la depleción del aminoácido cisteína, limitante de la síntesis de GSH.

Existen muchos trabajos que demuestran la acción del estres oxidativo en la enfermedad de Parkinson; para una revisión ver (60). Estos hallazgos se pueden resumir en un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno y hierro, junto con

un descenso de los niveles de GSH y ferritina. La peroxidación lipídica también aumenta.

El descenso en la actividad del sistema inmune con la edad en ratones puede ser mejorado mediante la administración de glutatión en la dieta. Además, el papel del sistema inmune en la patogénesis de distintas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson ha ganado apoyo tras los trabajos de Kalra *et al.* (61).

Como ya destacó Coyle y sus colaboradores (62) el papel de los radicales libres en las enfermedades neurodegenerativas es de gran importancia y se destaca como un campo de grandes avances de importancia clínica.

La aparición de cancer es muy baja en las células que no se dividen. Los oxidantes forman un grupo muy importante de agentes que estimulan la división celular. Por tanto, los antioxidantes pueden disminuir la mutagénesis y por tanto la carcinogénesis mediante la disminución del DNA dañado por oxidación y/o por disminución de la división celular. Por otro lado, la depleción selectiva del GSH por la administración de ATP extracelular disminuye la velocidad de proliferación celular en el tumor ascítico de Ehrlich (63).

Es bien conocido que las cataratas tiene una etiología oxidativa. Aquellos individuos que toman tocoferol tienen un menor riesgo de desarrollar cataratas (64). Los ratones hembra preñados con glutatión previamente disminuido tienen cataratas desde el nacimiento (65).

## 8. CONCLUSION

Una gran cantidad de experimentos apoyan la teoría del papel de los radicales libres en los fenómenos asociados al envejecimiento. Por tanto, los antioxidantes juegan un papel clave en la protección de las células contra los radicales libres. El glutatión es un antioxidante endógeno fundamental. El envejecimiento está asociado con un descenso en el glutatión reducido y un aumento del glutatión oxidado. Por tanto, el par redox del glutatión tiende a oxidarse con la edad. La compartimentalización del glutatión en la célula juega un papel de la mayor importancia. En efecto, el glutatión mitocondrial es crítico y se oxida en mayor medida que el citosólico. Es más la oxidación del glutatión se correlaciona con la oxidación del DNA mitocondrial.

Los niveles bajos de GSH están asociados con la apoptosis. Es más, el incremento de los niveles de glutatión citosólico disminuyen o retardan la apoptosis.

La administración de antioxidantes (que previene parcialmente la oxidación del GSH) o de los precursores del glutatión (que aumentan la velocidad de síntesis de GSH), es de capital importancia para prevenir, al menos parcialmente, el deterioro de las funciones celulares asociadas con el envejecimiento y la muerte celular.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Viña, J (Editor) (1990), Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Pres, Boston, 1990.
2. Pinto RE y Bartley WA (1969), Negative correlation between oxygen uptake and glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J*, 114: 5-9.
3. Hazelton GA y Lang CA (1980), Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem J* 188: 25-30.
4. Miquel J, Economos AC, Fleming J y Johnson JE Jr (1980), Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15: 579-91.
5. Viña J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A y Asensi M (1992), Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. In Free Radicals and Aging. Emerit, I. and Chance, B eds. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 136-144.
6. Medvedev Z (1990), An Attempt at a Rational Classification of Theories of Aging. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65: 375-398.
7. Harman, D (1956), Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
8. Pryor W (1986), Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol* 48: 657-667.
9. Ames BN, Shigenaga M y Hagen TM (1993), Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
10. Sies H (1986), Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* 25: 1058-1071.
11. Harman (1991), The aging process - Major risk factor for disease and death. *Proc Nat Acad Sci USA* 88: 5360-5363.
12. Barja G, Pérez-Campo R, López-Torres L, Cadenas S y Rojas C (1997). Low mitochondrial free radical production as a longevity determinat in species following or not the rate of living theory. *Mech Aging Dev* (en prensa).
13. Orr WC y Sohal RS (1994), Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-30.
14. López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S y Barja G (1993), Maximum life span in vertebrates: correlation with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate,urate sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and basal and, maximum aerobic capacity. *Mech Aging and Dev* 70: 177-99.
15. J. Viña, J. Sastre, F.V. Pallardó, R. Plá, J.M. Estrela y J. Miquel. (1993) The mitochondrial theory of aging: recent developments. *Bulletin of Molecular Biology and Medicine* 18: 81-87.
16. Sies H, Bartoli GM, Burk RF y Waydhas C (1978), Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency. *Eur J Biochem* 89: 113-118.
17. García de la Asunción J, Millán A, Plá R, Bruseghini L, Esteras A Pallardó FV, Sastre J y Viña J (1996), Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10: 333-338.
18. Ferrer JV, Gascó E, Sastre J, Pallardó FV, Asensi M y Viña J (1990), Age-related changes in glutathione synthesis in the eye lens. *Biochem J* 269: 531-534.
19. Richie JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N y Zimmerman JA (1994), Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 8: 1302-1307.
20. Chance B, Sies H y Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Rev* 59: 527-604.
21. Miquel J, Lundgren PR y Johnson JE (1978), Spectrophotofluorometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice, *J Gerontol* 33: 5-19.
22. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN (1994), Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-8.

23. Gadaleta MN, Petruzzella V, Renis M, Fracasso F y Cantatore P (1990), Reduced transcription of mitochondrial DNA in the senescent rat. Tissue dependence and effect of L-carnitine. *Eur J Biochem* 187: 501-506.
24. Calleja M, Peña P, Ugalde C, Ferreiro C, Marco R y Garesse R (1993), Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced. *J Biol Chem* 268: 18891-18897.
25. Richter C, Park JW y Ames B (1988), Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467.
26. Linnane A, Marzuki S, Ozawa T y Tanaka M (1989), Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* 642-645.
27. Sohal RS, Arnold LA y Sohal BH (1990), Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad Biol Med* 9: 495-500.
28. Sohal RS (1991), Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech Age Dev* 60: 189-198.
29. Lippman RD (1985), Rapid «in vivo» quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp Gerontol* 20: 1-5.
30. Vladimirov YA (1986), Free radical lipid peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation, and biological consequences. In: Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases, eds., JE Johnson Jr, R Walford, D Harman, J Miquel. Alan R Liss, pp. 141-195.
31. Gutteridge JMC (1984), Copper-phenanthroline induced site specific oxygen radical damage to DNA. Detection of loosely bound trace copper in biological fluids. *Biochem J* 218: 983-985.
32. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames, BN (1994), Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-8.
33. Stadtman ER (1992), Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220- 1224.
34. Vitorica J, Machado A y Satrustegui J (1984), Age - dependent variations in peroxide utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm. *J Neurochem* 42: 351- 356.
35. Gordillo E, Ayala A, Lobato M, Bautista J y Machado A (1988), Possible involvement of histidine residues in the loss of enzymatic activity of rat liver malic enzyme during aging. *J Biol Chem* 263: 8053-8056.
36. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S y Stadtman ER (1987), Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 262: 5488-5491.
37. Garland D, Russell P y Zigler JS Jr (1988), The oxidative modification of lens proteins. *Basic Life Sci* 49: 347-52.
38. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA y Markesbery WR (1991), Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10540-10543.
39. Starke-Reed PE y Oliver CN (1989), Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 275: 559-567.
40. Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF y Floyd RA (1991), Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-a-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3633-3636.
41. Richter C, Park JW y Ames B (1988), Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467.
42. Furukawa T, Meydani SN y Blumberg JB (1987), Reversal of age-associated decline in immune responsiveness by dietary glutathione supplementation in mice. *Mech Aging Dev* 38: 107-117.
43. Cutler RG (1991), Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 53: S373-S379.
44. Richie JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA (1994), Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 8: 1302-1307.
45. Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, Burrill J,

- Fiatarone MA, Blumberg JB y Cannon JG (1993), Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol* 33:R992-R998.
46. Viña J, Hems R y Krebs HA (1978). Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochem J* 170: 627-630.
  47. Sáez G, Thornalley PJ, Hill HAO, Hems R y Bannister JV (1982). The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 719: 24-31.
  48. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR y Glass A (1996). Effect of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1150-5.
  49. Cannon JG, Orencole SF, Fielding RA, Meydani M, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB y Evans WJ (1990). Acute phase response in exercise-interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. *Am J Physiol* 259.
  50. Buja LM, Eigenbrodt ML y Eigenbrodt EH (1993), Apoptosis and Necrosis. Basic Types and Mechanisms of Cell Death. *Arch Pathol Lab Med* 117: 1208-1214.
  51. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vaysiere JL y Mignotte B (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9:1277-1287.
  52. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
  53. Ratan RR, Murphy TH y Baraban JM (1994). Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem* 62: 376-379.
  54. Pallardó FV, Mompó J, Esteve JM, Sastre, Asensi MA, Viña J (1996). Glutathione oxidation increases in apoptotic fibroblasts. Role of apoptosis in aging. VIII Biennial Meeting. International Society for Free Radical Research. Barcelona 1-5 October.
  55. Zamzami NP, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Castedo M y Kroemer G (1996b). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183: 1533-1544.
  56. Monti D, Troiano L, Tropea F, Grassilli E, Cossarizza A, Barozzi D, Pelloni MC, Tamassia MG, Bellomo G y Franceschi C (1992). Apoptosis - programmed cell death: a role in the aging process? *Am J Clin Nutr* 55: 1208S-14S.
  57. Muskhelishvili L, Hart RW, Turturro A y James SJ (1995). Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and ad libitum-fed B6C3F1 mice. *Am J Pathol* 147: 20-24.
  58. Gotz ME, Freyberger A y Riederer P (1990). Oxidative Stress - A Role in the Pathogenesis of Parkinsons Disease. *J Neur Transmission* 29: 241-249.
  59. Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y y Ozawa T (1990). Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinsons Disease and senescence. *Biochem. Biophys. Res Commun* 170: 1044-1048.
  60. Jankovic, BD (1994), Neuromodulation. From phenomenology to molecular evidence. *Ann NY Acad Sci* 741: 1-38.
  61. Kalra J, Rajput AH, Mantha SV, Chaudhary AK, Prasad K (1992), Oxygen free radical producing activity of polymorphonuclear leukocytes in patients with Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 112, 181-6.
  62. Coyle J, Puttfaarcken P (1993), Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689- 694.
  63. Estrela JM, Obrador E, Navarro J, Lasso de la Vega MC y Pellicer J (1995). Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nature Med* 1: 84-88.
  64. Leske MC, Chylack LT Jr, Wu SY (1991). The lens opacities case-control study. Risk factors for cataract. *Arch Ophthalmol* 109: 244-251.
  65. Martensson J, Steinherz R, Jain A y Meister A (1989), Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 8727-8731.

# HEPATOTOXICIDAD Y SENESCENCIA

NURIA SANZ Y MARIA CASCALES

Instituto de Bioquímica (CSIC - UCM). Facultad de Farmacia.  
Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid.

## SUMARIO

---

1. INTRODUCCION
2. SENESCENCIA Y RADICALES LIBRES
3. MECANISMOS HEPATOCELULARES FRENTE A LA AGRESION TOXICA A LO LARGO DE LA EDAD
  - 3.1. Sistemas microsómicos de detoxificación
  - 3.2. Sistemas antioxidantes endógenos: ciclo redox del glutatión
4. REGENERACION HEPATICA POST-NECRÓTICA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO
  - 4.1. Ciclo de división celular; análisis de la ploidía y distribución de DNA
  - 4.2. Factores y mecanismos que controlan la proliferación celular en hígado
5. CONCLUSIONES FINALES
6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Los organismos, a lo largo de la vida, sufren multitud de cambios metabólicos y funcionales que van a influir en su respuesta ante distintos estímulos. La capacidad de respuesta frente a la agresión tóxica es mayor en el hígado que en cualquier otro órgano debido a su misión clave como vía primaria de destoxicación. Esta misión del hígado puede ser la causa de su propia lesión, ya que en la biotransformación de sustancias tóxicas pueden generarse metabolitos, en ocasiones más tóxicos que la sustancia de partida (1, 2). Las modificaciones que ocurren durante el desarrollo y el envejecimiento, en los mecanismos hepáticos de biotransformación y eliminación de agentes tóxicos y en los relativos a la lesión hepatocelular y posterior reparación, influyen de manera notable en la toxicidad de dichos agentes. En este capítulo se va a desarrollar la influencia del envejecimiento sobre la lesión hepática inducida por agentes tóxicos y los procesos de regeneración hepatocelular post-necrótica y restauración de la funcionalidad.

El efecto del envejecimiento, sobre los sistemas involucrados en la defensa hepatocelular frente al estrés oxidativo originado por la acción hepatotóxica de drogas o fármacos, presenta en la actualidad un gran interés farmacológico y clínico, ya que la población senescente se encuentra en progresivo incremento en nuestra sociedad y requiere cada vez mayor atención debido a que exhibe una elevada incidencia de reacciones adversas por efecto de los fármacos. En la mayoría de los casos estas reacciones son inesperadas por el desconocimiento que aún existe acerca de la influencia de la edad sobre los mecanismos hepáticos de biotransformación que pueden afectar la vida media de los medicamentos y como consecuencia su toxicidad y su acción farmacológica. Por todo ello, el profundizar en las variaciones de estos mecanismos a medida que transcurre la edad, ha de proporcionar un mayor conocimiento que permita en el futuro, diseñar pautas terapéuticas específicas más racionales que las utilizadas hasta el momento.

## 2. SENESCENCIA Y RADICALES LIBRES

La senescencia es un proceso complejo a nivel morfológico, bioquímico y funcional, detectable tanto en células aisladas como en órgano entero. Las teorías sobre el envejecimiento tienen su origen en el estudio de los cambios que se suceden a

lo largo de la vida o de los cambios que se acumulan a medida que transcurre la edad. Estas teorías incluyen fenómenos que influyen en la funcionalidad del órgano. La teoría que ha alcanzado más popularidad por haber sido ampliamente comprobada, propuesta por vez primera por Harman en 1956 (3), es la que responsabiliza a los radicales libres de oxígeno de las alteraciones oxidativas típicas de la edad avanzada. Posteriormente esta teoría de los radicales libres se dirigió hacia la generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria (4).

El principal productor de radicales de oxígeno en los organismos aerobios es la mitocondria, el orgánulo celular que, en condiciones normales, utiliza aproximadamente el 98% del  $O_2$  que ingresa en la célula reduciéndolo a agua a nivel del citocromo  $a_3$ , citocromo del estado 4 de la cadena de transporte de electrones de la respiración mitocondrial (5). Como se muestra en la Figura 1 una pequeña parte del  $O_2$  incorporado por la mitocondria, entre el 1 y el 4%, sufre una reducción monovalente y genera especies reactivas de oxígeno tales como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), llegando a una producción diaria de

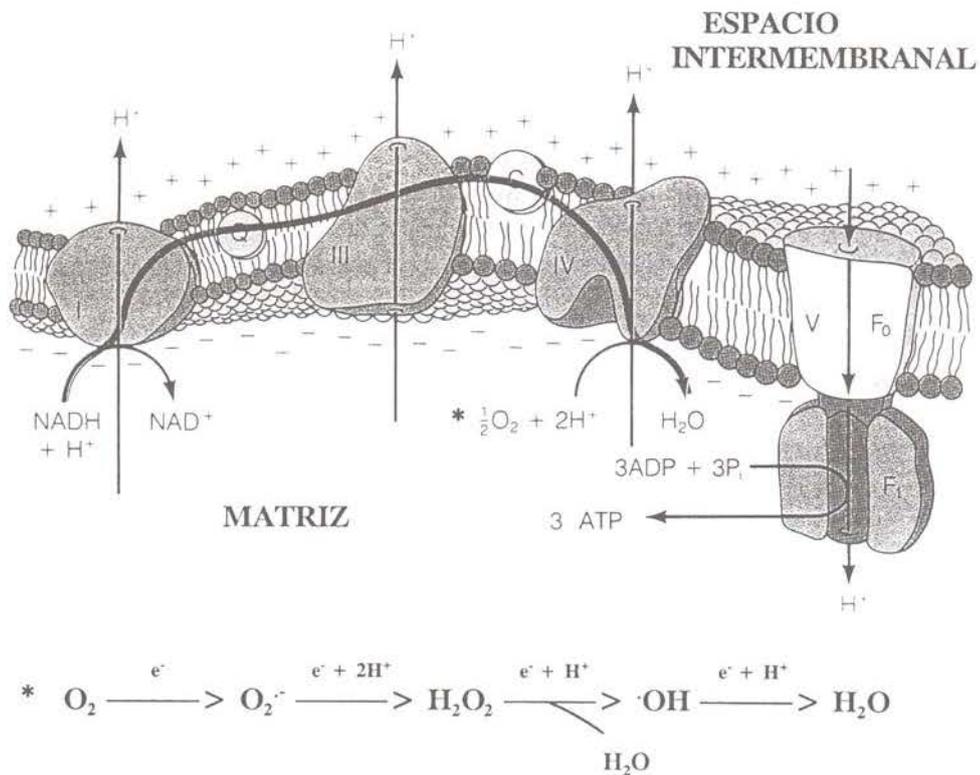


Figura 1. Producción de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

$3 \times 10^7 \text{ O}_2^-/\text{mitocondria/día}$  (6). Por tanto, al ser las mitocondrias la fuente intracelular más importante de especies reactivas de oxígeno, es obvio que el DNA mitocondrial se encuentra más expuesto que el DNA nuclear a sufrir lesiones oxidativas severas, que pueden conducir a deleciones en su propia cadena.

Las deleciones en el DNA mitocondrial son hoy el punto de mira de los gerontólogos, ya que el hecho de que éstas se acumulen con la edad (7), hace pensar que las mitocondrias juegan un importante papel en las alteraciones propias del envejecimiento. Si las mitocondrias poseen un genoma lesionado ello puede influir sobre los componentes de la cadena de transporte electrónico, reduciendo su eficacia en el proceso de reducción del oxígeno molecular y en la producción de ATP. Por un lado, la depleción de energía afectaría la función celular, y por otro, la alteración en la cadena de transporte electrónico elevaría la velocidad de generación de las especies reactivas de oxígeno. En este caso, la alteración localizada se agravaría al ocasionar la posterior lesión del DNA mitocondrial. La susceptibilidad del DNA mitocondrial a la agresión oxidativa es mayor que la del DNA nuclear, por encontrarse más desprotegido al ser más compacto y carecer de histonas. La hipersensibilidad se asocia con la inestabilidad cromosómica que se observa en un número de enfermedades neurodegenerativas. La velocidad de mutación del DNA mitocondrial se ha estimado mucho mayor que la del núcleo (8).

En la actualidad se responsabiliza al acortamiento de los telómeros de la inestabilidad cromosómica de la senescencia (9). Los telómeros son secuencias hexaméricas repetidas de DNA que aparecen en los extremos de los cromosomas lineales, las cuales son esenciales para el mantenimiento de dicha estabilidad. La telomerasa es una ribonucleoproteína denominada transferasa telómero-terminal, requerida para la síntesis de la repetición telomérica y cuya porción RNA se utiliza como «molde» para añadir, mediante un mecanismo de retrotranscripción, secuencias teloméricas *de novo* a los extremos teloméricos. La telomerasa se sabe que se expresa sólo en células germinales y en células transformadas. La pérdida progresiva de los extremos teloméricos de los cromosomas durante el envejecimiento, parece que se debe a una replicación incompleta y puede inducir señales antiproliferativas que conduzcan a un estado de senescencia celular (9).

Aunque es la mitocondria la principal responsable de la generación de las especies reactivas de oxígeno, éstas también se producen en otros orgánulos celulares, como los peroxisomas, donde la aminoácido oxidasa, la acil-CoA oxidasa y la urato oxidasa generan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o los microsomas, donde el citocromo P-450 cataliza reacciones de monooxigenación con producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno por mecanismos dependientes de NADPH. Tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno no poseen una elevada reactividad frente a las macromoléculas, sin embargo, en presencia de ciertos complejos de metales de transición, como el hierro o el cobre pueden reaccionar entre sí (reacción de Fenton o Harber-Weiss) y dar lugar al radical hidroxilo (OH) que posee una elevada reactividad (10, 11).

La generación de estas sustancias prooxidantes se encuentra controlada mediante mecanismos celulares de defensa antioxidantes, reductores o sequestrantes que aparecen compartimentalizados de forma estratégica en los diferentes orgánulos subcelulares. En el caso de que estos mecanismos lleguen a ser insuficientes para contrarrestar la excesiva producción de especies reactivas, se originan alteraciones celulares que van a conducir a una situación de estrés oxidativo, la cual puede llegar a afectar de manera irreversible la viabilidad celular y la funcionalidad del órgano (12). Bien conocida es la lesión oxidativa producida sobre el DNA, no por el  $O_2^-$  o el  $H_2O_2$ , sino por el  $OH$  (13). Del mismo modo, se originan lesiones a nivel de los lípidos de membrana, que alteran su fluidez, estructura y función (14). Menos conocidos son los efectos y consecuencias de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, las cuales dan lugar a peróxidos proteicos que consumen antioxidantes y moléculas de unión a proteínas que reducen metales de transición (15). Además, con la edad se producen cambios en la estructura molecular de los enzimas debido a errores en la traducción y en la conformación de su molécula a nivel de racemización de aminoácidos, desaminación, glicosilación, oxidación, etc. (16).

Si la producción de radicales libres es el factor clave que relaciona el daño oxidativo con el envejecimiento, es de esperar que esto se refleje directamente y en primera instancia a nivel de las propias mitocondrias. Existen varias características de las mismas que nos inducen a pensar en su contribución al envejecimiento ya que, en ellas no sólo se consume el 98% del oxígeno sino que también el DNA mitocondrial se encuentra tan empaquetado que todo él codifica y al carecer de histonas y poliaminas que puedan protegerlo, su capacidad de reparación es mínima si se compara con la del DNA nuclear. Además, las membranas mitocondriales al ser ricas en ácidos grasos altamente insaturados son muy susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (17). De hecho, en las especies más longevas como algunos pájaros o incluso el hombre se ha demostrado que poseen una proporción menor de ácidos grasos insaturados de 4 o más dobles enlaces por sustitución del araquidónico por el linoleico, lo cual influye en la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones y con ello en la disminución de la producción de radicales libres (18). A medida que transcurre la edad se incrementan los niveles del mutágeno 8-desoxiguanidina, disminuyen los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, se producen transcripciones anómalas, descienden los complejos I y IV de la cadena de transporte electrónico (únicos complejos codificados por el DNA mitocondrial a diferencia de los II y III codificados por el DNA nuclear) y se produce una pérdida de la producción energética con el consiguiente incremento en los niveles de oxidantes al reaccionar los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas con grupos amino libres (19).

### 3. MECANISMOS HEPATOCELULARES FRENTE A LA AGRESION TOXICA A LO LARGO DE LA EDAD

El tema más estudiado en relación al hígado y a la senescencia ha sido el referente a las alteraciones del metabolismo de fármacos con la edad, ya que este

tema presenta unas inmediatas aplicaciones en la farmacoterapia de los ancianos. Debido a que las personas de edad presentan una incidencia más elevada en enfermedades y una mayor utilización de medicamentos, la menor velocidad de aclaramiento por el hígado es la causa de las alteraciones en la respuesta a los fármacos, como también de la frecuencia de reacciones adversas. El primer estudio sobre hepatotoxicidad y envejecimiento en ratas se debe a Kato y colaboradores (20) quienes describieron una disminución, dependiente de la edad, en el metabolismo de diversos fármacos como el hexobarbital y la estircina.

La senescencia hepática se caracteriza por una serie de modificaciones en la capacidad funcional de sus células que pueden conllevar reacciones adversas producidas por efecto de los fármacos. A las especies reactivas de oxígeno que se forman espontáneamente en la respiración mitocondrial y que se acumulan en edades avanzadas, se unen los metabolitos tóxicos generados por el xenobiótico y las especies reactivas de oxígeno producidas durante los procesos de la biotransformación de xenobióticos por el sistema microsómico monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450. En este sistema monooxigenasa se generan, por una parte intermediarios reactivos derivados del xenobiótico, y por otra, especies activas de oxígeno,  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  derivadas como subproductos de la monooxigenación del sustrato.

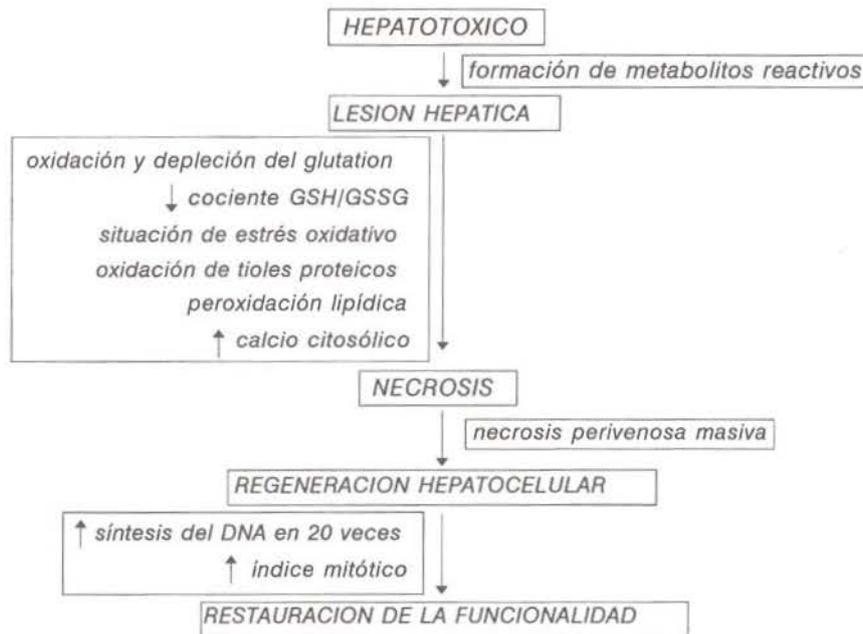


Figura 2. Secuencia de eventos en la intoxicación aguda inducida por hepatotóxicos.

Los organismos pueden estar expuestos a dosis continuadas de hepatotóxicos o a dosis agudas de los mismos, en el primer caso se pueden alcanzar lesiones hepatocelulares tales como nódulos hiperplásicos, cirrosis y en última instancia el cáncer (21-24). Para el toxicólogo experimental adquiere mayor importancia la administración subletal de un xenobiótico para así estudiar la respuesta frente a un ataque por sorpresa de la sustancia hepatotóxica. Como muestra la Figura 2, en circunstancias extremas, la agresión oxidativa inducida por xenobióticos puede llegar a ocasionar la muerte celular (25), que va precedida por una pérdida de equivalentes de glutathion (26), una marcada oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas (27), peroxidación de los lípidos de la membrana (28) y elevación del calcio citoplasmático (29). Esta situación se denomina *estrés oxidativo* (30).

La localización de la necrosis inducida por los hepatotóxicos depende de numerosos factores entre los que cabe destacar la heterogeneidad acinar y el que el agente hepatotóxico sea el compuesto mismo o un metabolito derivado de su biotransformación. Estos factores son los que determinan que la lesión se ubique en la región perivenosa o en la periportal. Los hepatocitos perivenosos muestran una mayor susceptibilidad a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos, ya que en esta zona del acino existe un desequilibrio entre los enzimas responsables de la activación metabólica y los enzimas encargados de la destoxicación de las sustancias activadas. Estos hepatocitos muestran una mayor velocidad de producción de metabolitos reactivos debido a la mayor cantidad de monooxigenasas microsómicas de función mixta, mientras que presentan un menor contenido en GSH (31).

La necrosis hepatocelular masiva inducida por tioacetamida en ratas se caracteriza por hemorragias e infiltrados inflamatorios con leucocitos polimorfonucleares, mientras que durante la regeneración hepática post-necrótica el infiltrado inflamatorio se hace de tipo mixto con leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y monocitos característicos de inflamación crónica con abundantes mitosis. Los sistemas utilizados para la detección de la necrosis son las aminotransferasas séricas que alcanzan valores muy elevados durante la necrosis para luego descender durante el proceso regenerativo. Las diferencias observadas por efecto del envejecimiento muestran una menor extensión de la zona lesionada detectada a nivel morfológico y por una menor elevación de las aminotransferasas séricas (32). La regeneración post-necrótica muestra valores muy disminuidos en el número de células en mitosis (índice mitótico), en la población en fase de síntesis del DNA y en la liberación al suero del TNF $\alpha$ . Esto indica que el hígado senescente presenta una menor respuesta a la agresión tóxica (capacidad metabólica) dando lugar a una lesión menos severa, pero con menor capacidad de recuperación (respuesta al estrés) (32, 33) (Tabla I).

Existe un interés cada vez mayor, por el estudio de la toxicidad de los xenobióticos frente a la senescencia, ya que la frecuencia de estas lesiones hepáticas puede variar considerablemente a medida que transcurre el tiempo. De hecho, parece ser que el envejecimiento incrementa la sensibilidad al efecto hepatotóxico de los xe-

Tabla I. **Diferencias en la lesión y reparación inducida por tioacetamida a lo largo de la edad en ratas.**

Edad	Máximo lesión (hr)	Intensidad lesión	Regeneración (hr)	Recuperación a las 96 hr
Jóvenes	24	++	48	total
Adultos	48	+++	72	media
Senescentes	48	+	72	escasa

nobióticos (34). Son muchos los parámetros hepáticos que sufren fluctuaciones por efecto de la edad, y especialmente interesantes son aquellos relacionados con el metabolismo de agentes hepatotóxicos.

### 3.1. Sistemas microsómicos de detoxificación

La biotransformación de las sustancias tóxicas en el organismo se verifica en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos, donde existen dos tipos de monooxigenasas que difieren en su composición y mecanismo, y que se conocen en función de su grupo prostético como monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 y monooxigenasas dependientes de flavina (35). Se sabe que la edad afecta a estos enzimas microsómicos, pero mientras unos autores describen que este sistema oxidasa de función mixta disminuye por efecto de la edad, otros describen el efecto contrario. Resultados de nuestro grupo han puesto de manifiesto en ratas, que los sistemas microsómicos se incrementan progresivamente durante el desarrollo, y disminuyen a medida que transcurre la edad a partir del estado adulto (32). Concretamente en el caso de los sistemas dependientes del citocromo P-450 se ha demostrado que estos descensos son selectivos de los citocromos P-450 constitutivos y no de los inducibles, los cuales permanecen inalterados (36).

### 3.2. Sistemas antioxidantes endógenos: ciclo redox del glutatión

El mecanismo de defensa antioxidante endógeno está constituido por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Entre los enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa y entre los no enzimáticos el glutatión, el ácido ascórbico, y el ácido úrico como compuestos hidrosolubles y la vitamina E, los carotenos y la melatonina como liposolubles (37).

Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos, la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol reacciona con los radicales libres de oxígeno y facilita, conjuntamente con la glutatión peroxidasa, el bloqueo de la peroxidación lipídica (38). La melatonina es una hormona producida principalmente en la glándula pineal cuyas actividades son muy

diversas. No solo influye en el control y regulación de la madurez sexual, de la respuesta inmune y de la temperatura corporal, sino que también presenta una acción antioxidante liposoluble frente al radical hidroxilo, con más eficacia que la propia vitamina E. La melatonina actúa como moduladora de los enzimas generadores de radicales libres dependientes del citocromo P-450, de la óxido nítrico sintasa y como estimuladora de la actividad de la glutatión peroxidasa (39). Sin embargo, el glutatión reducido (GSH) es el sistema antioxidante más importante, ya que es el tiol de bajo peso molecular más abundante, capaz de reaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno y productos de la peroxidación o bien conjugarse con los metabolitos reactivos (26). Para mantener la integridad celular, los sistemas de defensa actúan concertadamente con los mecanismos responsables de la reparación del proceso oxidativo de las macromoléculas. La concentración de GSH, el estado redox GSH/GSSG y los niveles de grupos tiólicos proteicos, influyen en el DNA bien modulando su síntesis (40) o bien protegiéndole del daño oxidativo (41). Se ha observado que existe una relación entre la división celular y el contenido en grupos tiólicos de origen proteico y no proteico (42).

Los radicales libres en forma de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) generan  $H_2O_2$  mediante la superóxido dismutasa. Este enzima existe en el organismo en dos formas moleculares: la SOD Cu-Zn abundante en el citoplasma y sensible a cianuro, dimérica y con un peso molecular bajo y la SOD Fe-Mn localizada en mitocondria, tetramérica e insensible a cianuro. El  $H_2O_2$  generado por la acción de la superóxido dismutasa puede ser sustrato de dos enzimas: la catalasa y la glutatión peroxidasa. El segundo parece ser el enzima más importante, ya que por su localización a nivel citoplasmático y mitocondrial es más accesible que la catalasa que se ubica en fracción soluble y peroxisomas. La glutatión peroxidasa posee, además, la capacidad de eliminar peróxidos no sólo inorgánicos sino también orgánicos, como los que se generan en el proceso de la peroxidación lipídica. El GSSG formado tiene que ser eliminado bien directamente vía biliar o puede reducirse a GSH mediante la glutatión reductasa, presente de igual modo en citosol y mitocondrias, precisando para ello el NADPH generado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (43). Este enzima además es fundamental debido a que participa activamente en la síntesis del DNA por ser el proveedor de la ribosa-5-fosfato necesaria para la misma (44).

En la Figura 3 se muestra la acción coordinada del glutatión como antioxidante endógeno con los sistemas enzimáticos citados anteriormente.

Existen enormes diferencias en las modificaciones sufridas en el ciclo redox del glutatión y los enzimas relacionados entre las distintas especies e incluso dentro de la misma especie entre los distintos sexos a lo largo de la edad (45). En el caso de ratas macho de la raza Wistar, se aprecian enormes diferencias durante el envejecimiento (46), de tal modo que por un lado se incrementan los radicales libres de oxígeno generados espontáneamente en la respiración mitocondrial y por otro se produce un descenso en los niveles de GSH, lo cual va a conducir a una alteración

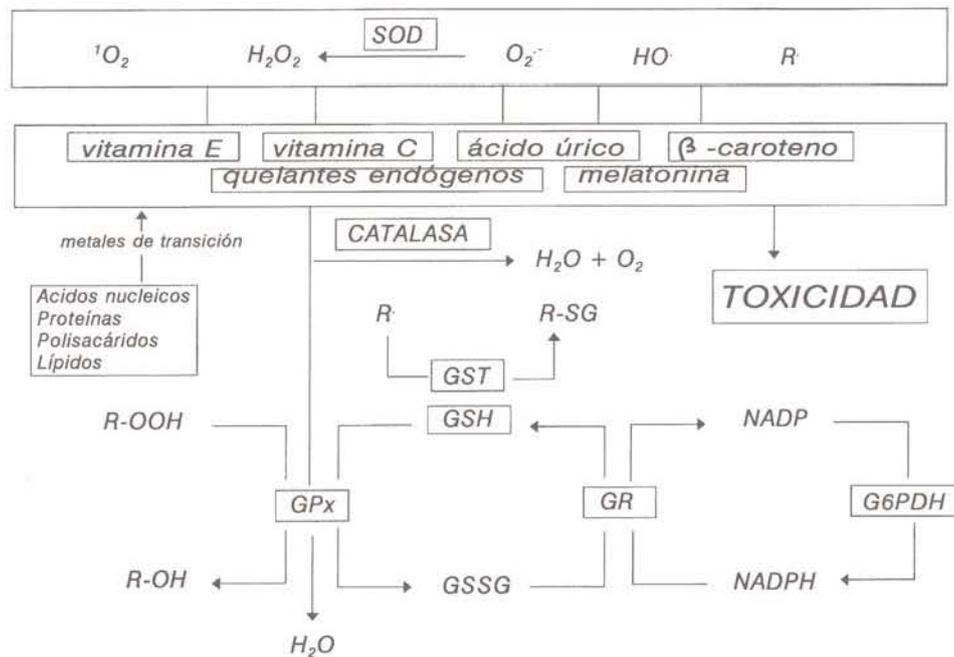


Figura 3. Sistema antioxidante endógeno: ciclo redox del glutatión.

del estado de oxidoreducción celular que va a conllevar una mayor susceptibilidad de los tejidos a sufrir cualquier lesión (47-51).

La mayor parte de las sustancias que son tóxicas a través de su biotransformación en intermediarios reactivos, afectan la concentración celular del glutatión, que disminuye significativamente durante la necrosis. Esta disminución del glutatión trae consigo la situación de estrés oxidativo que ocasiona la pérdida de los grupos tiólicos de las proteínas y la peroxidación lipídica (52). A medida que transcurre la edad la lesión se sostiene durante más tiempo debido a la menor operatividad de los sistemas antioxidantes (32).

Enzimas marcadores de la lesión hepática, como la  $\gamma$ -glutamyl transferasa plasmática y la glutatión S-transferasa, alcanzan su actividad más elevada en los momentos de la necrosis hepatocelular, hecho que puede influir en la depleción transitoria del glutatión durante la hepatotoxicidad aguda. En edades avanzadas se ha observado que la elevación de estas actividades es menor, y esto podría explicar el retraso en la eliminación del tóxico y en la restauración de la funcionalidad hepática (32).

Respecto a los sistemas enzimáticos antioxidantes, se ha descrito que la expresión génica de la superóxido dismutasa y la catalasa, los enzimas directamente

encargados de eliminar el radical superóxido y el  $H_2O_2$ , va siendo menor a medida que transcurre la edad, mientras que la expresión de la glutatión peroxidasa tiende a incrementarse (53). En nuestros experimentos de hepatotoxicidad y senescencia, todos estos sistemas antioxidantes elevaron su expresión génica y su actividad con el transcurso de la edad, sin embargo, este incremento no fue suficiente para contrarrestar la situación de estrés oxidativo de las células hepáticas en edades avanzadas (32).

#### 4. REGENERACION HEPATICA POST-NECROTICA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Cualquier agresión que origine la pérdida de las células hepáticas induce inmediatamente una proliferación celular compensatoria. Este proceso, considerado como la respuesta más importante frente a la agresión, supone la regeneración hepatocelular y la restauración de la funcionalidad hepática. La caracterización de los parámetros relacionados con esta proliferación celular post-necrótica presenta un gran interés clínico y fisiopatológico (54), ya que supone la manifestación hepática más patente y efectiva de respuesta a la agresión. De esta manera, el hígado lesionado es capaz de recuperar tanto la masa como el número de células iniciales y con ello su funcionalidad normal.

Aunque los hepatocitos son células muy diferenciadas y quiescentes, conservan la capacidad de dividirse para reemplazar a las células que se han lesionado. En condiciones normales la capacidad proliferativa del hígado es muy baja y el hepatocito se encuentra en la fase  $G_0/G_1$  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 de los hepatocitos (< 1%) se encuentra en la fase replicación del DNA (55). La regeneración hepática parece presentar una respuesta bifásica; durante la primera ronda de división, son los hepatocitos las únicas células hepáticas que se encuentran involucradas en la síntesis del DNA y en la actividad mitótica. La segunda ronda mitótica ocurre 24 horas más tarde, está menos sincronizada y en ella participan todas las células hepáticas, parenquimales y no parenquimales (56, 57). Durante las transiciones proliferativas se verifica la desdiferenciación celular, proceso que implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo.

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, cuando el hígado sufre una lesión hepatocelular (necrosis), debida al mecanismo de bioactivación de la toxina, el hígado responde estimulando la división y con ello la regeneración hepatocelular. A dosis débiles del hepatotóxico, la necrosis afecta 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 aparezca con posterioridad alguna muestra de lesión remanente y tenga lugar una segunda fase

de división celular (54). El proceso de regeneración hepática va unido a otro 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 (58). La aparición del *fenotipo resistente* en los hepatocitos es una respuesta adaptativa del hígado frente a una amplia variedad de xenobióticos. Esta resistencia supone un mecanismo de adaptación clonal (gen *mdr1*) para sobrevivir en un ambiente hostil (59).

Recientemente se ha descubierto un método de gran valor como diagnóstico de rutina para detectar las células proliferantes, que ha permitido evaluar la regeneración hepática en muestras humanas. Este método utiliza anticuerpos monoclonales frente a un *antígeno nuclear de células proliferantes* (PCNA), factor auxiliar de la DNA polimerasa  $\delta$  (60). La detección inmunohistoquímica de este antígeno no depende de la incorporación de marcadores externos, como la bromodeoxiuridina o la timidina tritiada y se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-PCNA pueden aplicarse con éxito a tejidos fijados con formol e incluidos en parafina (61).

Otro medio que permite la estimación cuantitativa del número de células que participan en la división celular en hígado post-necrótico es el cálculo del *índice mitótico*. Este índice se define como la relación entre el número de mitosis y el número de células y se calcula por visualización al microscopio óptico de cortes semifinos de hígado, aplicando el método de Simpson *et al.* (15). En nuestros experimentos con tioacetamida, se analizaron las zonas más cercanas a la zona necrosada en preparaciones histológicas de hígado de rata (32). En los controles de todas las edades el índice mitótico fue nulo, ya que no pudo detectarse ninguna célula en mitosis, debido al estado quiescente de los hepatocitos normales. Sin embargo, a las 48 horas de la intoxicación (en ratas jóvenes) y a las 72 horas de la intoxicación (en ratas adultas y viejas), la regeneración hepatocelular pudo ser detectada por observación directa de células en mitosis. El índice mitótico se ha observado que desciende notablemente a medida que transcurre la edad, registrándose a los 30 meses, valores sólo de un 30% cuando se compararon con los de ratas adultas de 6 y 12 meses.

Se ha discutido mucho acerca de la zona del acino que contribuye más a la regeneración hepática y diversos autores han apuntado que son los hepatocitos de la zona periportal los que se dividen, especialmente en el caso de regeneración posterior a un proceso necrótico perivenoso (31). Experimentos de nuestro grupo han podido demostrar que todas las regiones del acino contribuyen de la misma manera a la regeneración. En un modelo de hepatotoxicidad con cocaína se indujo necrosis perivenosa o periportal previo tratamiento o sin tratamiento con fenobarbital, respectivamente. En ambos casos se evaluó el índice mitótico en las diferentes

zonas del acino y pudo comprobarse que los valores más elevados aparecieron en los aledaños de la zona necrosada, fuera ésta la periportal o la perivenosa (62).

#### 4.1. Ciclo de división celular; análisis de la ploidía y distribución de DNA

Para conseguir la multiplicación por división, las células de cualquier tejido abandonan el estado quiescente ( $G_0$ ) para entrar y proceder a través del *ciclo celular*. Esto supone una serie de pasos consecutivos que culminan en la división mitótica (63). En un momento dado de muestreo de una población celular, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2C de la fase  $G_0/G_1$  hasta dos veces este contenido (4C) de la fase  $G_2/M$ . Los hepatocitos y células de Kupffer, se encuentran en el estadio  $G_0$ , es decir, normalmente no se dividen, si no es tras una hepatectomía parcial o tras la necrosis inducida con sustancias químicas hepatotóxicas.

La inestabilidad cromosómica inducida a lo largo de la edad y su efecto sobre la capacidad proliferativa, nos ha llevado a estudiar la ploidía y la distribución del DNA en las fases del ciclo celular en hepatocitos de rata (32). En hígado de rata durante el desarrollo normal se caracteriza por una progresiva poliploidización, que va unida a una disminución de la fracción de hepatocitos diploides (2C) (64, 65). Los hepatocitos fetales de rata y los obtenidos durante las 3 primeras semanas de vida son en su mayor parte mononucleares diploides y se mantienen así durante los 3 primeros meses de vida; a partir de este punto, comienza el proceso de poliploidización con la aparición sucesiva de células tetraploides y octoploides (66) (Tabla II). Poco se sabe aún acerca de la significación fisiológica de la dependencia entre ploidía y edad, aunque se cree que la poliploidía refleja una mayor diferenciación y una necesidad de cantidades más elevadas de genes para satisfacer el papel multifuncional metabólico de los hepatocitos. En el período adulto se inicia la aparición de células en fase aneuploide que, si bien tan sólo constituye una pequeña proporción del total, se incrementa progresivamente a lo largo del envejecimiento (32). Este fenómeno de apoptosis en edades avanzadas se produce como consecuencia de un proceso fisiológico de renovación tisular evitando así la hiperplasia que conllevaría lesiones tisulares del órgano (67).

El hecho de que al menos una parte de los hepatocitos diploides pueda considerarse como población de células precursoras a partir de las cuales se desarrollan hepatocitos poliploides más diferenciados, indica el interés en la distribución del DNA en las poblaciones que surgen durante los estadios de regeneración hepática y hepatocarcinogénesis. Cualquier tratamiento que prevenga o disminuya la poliploidización (o diferenciación) y cause una expansión de la población de hepatocitos diploides, que es lo que ocurre en la proliferación hepatocelular post-necrótica, puede considerarse que eleva el riesgo de cáncer. Este riesgo sobreviene porque las células 2C se encuentran menos protegidas que las 4C y 8C frente a las posibles consecuencias oncogénicas de las lesiones hepáticas.

Tabla II. Determinación cuantitativa de la ploidia del DNA en ratas a lo largo de la edad.

Edad (meses)	Hipodiploide (<2C)	Diploide (2C)	Síntesis S <sub>1</sub> (2C -> 4C)	Tetraploide (4C)	Síntesis S <sub>2</sub> (4C -> 8C)	Octoploide (8C)
2	—	72,6	1,4	23,3	0,2	2,5
6	—	54,4	1,4	33,9	4,0	6,3
12	0,9	48,9	1,4	36,8	4,2	7,8
18	1,2	38,7	1,2	40,8	5,0	13,1
30	3,4	34,3	0,9	40,1	5,2	16,1

La fracción en crecimiento, o fracción de células, que participa en el ciclo celular, supone un concepto importante en el análisis de la reparación tisular tras la lesión celular ya que esta población sufre un rápido incremento al iniciarse la regeneración y disminuye abruptamente cuando finaliza. En animales jóvenes, el porcentaje de células hepáticas en fase de síntesis del DNA, comienza a elevarse a las 24 horas de la administración de tioacetamida y alcanza su punto máximo entre las 36 y 48 horas con cotas tan elevadas como 20 veces el valor control. En momentos previos a esta elevación se detecta la desaparición casi total de la población tetraploide (4C). Considerando que la caída de la población G<sub>2</sub>/M precede en varias horas a la elevación de la síntesis del DNA, se deduce, por un lado, que una mitosis temprana afecta selectivamente a esta población, y por otro, que la necrosis afecta mayoritariamente a las células en G<sub>2</sub>/M. El hecho de que la población en fase G<sub>1</sub> (diploide) se eleve coincidiendo con la desaparición de las células tetraploides, hace pensar en un desencadenamiento de la mitosis de la población G<sub>2</sub>/M previo a la replicación del DNA. Este cambio en la distribución del DNA durante la regeneración hepatocelular conduce a un perfil similar al que aparece en hepatocitos fetales y se verifica en un período de seis horas, desde las 18 a las 24 horas de la intoxicación (52, 62).

Respecto al envejecimiento, hemos de indicar que si bien este cambio hacia el perfil fetal en la distribución del DNA se produce en todas las edades estudiadas, en el caso de animales senescentes la regeneración se retrasa notablemente. El retraso se debe a que al ser menor la fracción de hepatocitos implicada en fase de síntesis del DNA, la duración del proceso regenerativo es mayor, siendo superior el tiempo que necesita el hígado para restaurar su funcionalidad normal. Por tanto, a medida que transcurre la edad disminuye la capacidad proliferativa de las células (32), lo cual puede ser debido a que las células poliploides se dividen más lentamente que las diploides (68). Se ha propuesto que la menor capacidad proliferativa debida al envejecimiento es consecuencia de la activación de un inhibidor específico de la síntesis del DNA denominado Sdi1 (69). Este producto génico, también conocido como p21, WAF1, CIP1 y Cap20 (70), es un factor peptídico que inhibe

la actividad de los complejos ciclina/quinasa-dependiente de ciclina (CDK) responsables de la progresión del ciclo celular en su fase  $G_1/S$  (71, 72). Esta inhibición se manifiesta por una parada de las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular, y se debe, a que los complejos ciclina/CDK necesarios para la fosforilación de la proteína Rb, producto del gen supresor de retinoblastoma, tienen bloqueada la capacidad de fosforilación de Rb en respuesta a estímulos normales de crecimiento (73).

La disminución de la capacidad proliferativa en células senescentes puede ser una de las posibles consecuencias de la lesión que sufre el DNA en edades avanzadas. Estas lesiones acumuladas y no reparadas, generan una situación de inestabilidad genómica caracterizada por mutaciones somáticas tales como sustitución, inserción, translocación, delección, recombinación y cambios en el número de cromosomas, que desembocan en una alteración de las funciones celulares (74). También, la menor capacidad proliferativa puede interpretarse como un mecanismo de defensa frente a la propagación de lesiones del DNA.

#### 4.2. Factores del crecimiento y mecanismos que controlan la proliferación celular en hígado

En la regeneración hepática se producen dos fenómenos fundamentales: por un lado la activación de genes tempranos inmediatos, debido al incremento de los factores de crecimiento circulantes, y por otro, la rápida adaptación metabólica de los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento extra e intrahepáticos que activan numerosos genes (Figura 4). Tras la lesión inducida por un hepatotóxico tienen lugar acontecimientos muy rápidos que preparan a los hepatocitos para ser competentes y responder a los factores del crecimiento, permitiendo así su progresión hacia el ciclo celular (75). La activación de los *factores de transcripción* puede ser uno de los principales componentes de esta fase inicial. Los genes que se inducen en la transición del estado normal quiescente del hígado ( $G_0$ ) a la fase de crecimiento ( $G_1$ ) se denominan genes tempranos inmediatos. Entre ellos se incluyen NF- $\kappa$ B, AP-1 (76) y STAT-3 (77), y muchos de los protooncogenes implicados en el crecimiento canceroso, tales como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* (78). Puesto que muchos de los productos de los genes de respuesta temprana inmediata, son por sí mismos factores de transcripción, la respuesta génica inicial producida tras la pérdida de células hepáticas se amplifica. También son importantes los genes tempranos diferidos que se expresan tras la transición  $G_0/G_1$  y que son responsables de la progresión de las fases del ciclo celular hasta inducir la síntesis del DNA. Este es el caso de p53 y *ras* y de varias ciclinas y quinasas asociadas, que codifican proteínas con funciones metabólicas esenciales (79). Sin embargo, todavía existen ciertas dudas respecto a las causas que inducen las modificaciones post-traduccionales de los genes inmediatos que codifican los factores de transcripción. Los estudios más avanzados han identificado diversas citoquinas y factores de crecimiento, la IL-1 y el TNF $\alpha$  en el caso del PHF/NF $\kappa$ B y la IL-6 y el EGF para el STAT-3, como los responsables de la cascada de señales responsables de su activación nuclear (80).

Entre los *agentes reguladores de la proliferación celular*, que desempeñan una misión destacada o son esenciales para la entrada de las células en la fase de replicación del DNA, cabe citar las hormonas, los factores de crecimiento, las citoquinas, así como otras sustancias como el piruvato, el calcio, los aminoácidos y las poliaminas (81). Las señales resultantes se producen por combinación de interacciones entre estas moléculas, nutrientes y metabolitos, pero el problema se complica cuando un mismo factor de crecimiento puede actuar positiva o negativamente, caso del factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y el factor de crecimiento hepático (HGF) (82). No obstante, está perfectamente establecido que los EGF, TGF $\alpha$ , FGF y HGF funcionan como inductores fisiológicos de la síntesis del DNA en hepatocitos durante la regeneración hepática a través de mecanismos autocrinos y paracrinos (83, 84), mientras que la activación del crecimiento hepático por el EGF y el TGF $\alpha$  se modula por el TGF $\beta$ , el cual se induce un poco después que el TGF $\alpha$ , previniendo así una proliferación celular incontrolada. También las citoquinas tales como las IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , producidas en células no parenquimales activadas, participan positivamente en el proceso regenerativo, y concretamente a nivel prereplicativo; mientras que la IL-1 $\alpha$  inhibe la proliferación de hepatocitos en cultivo (85).

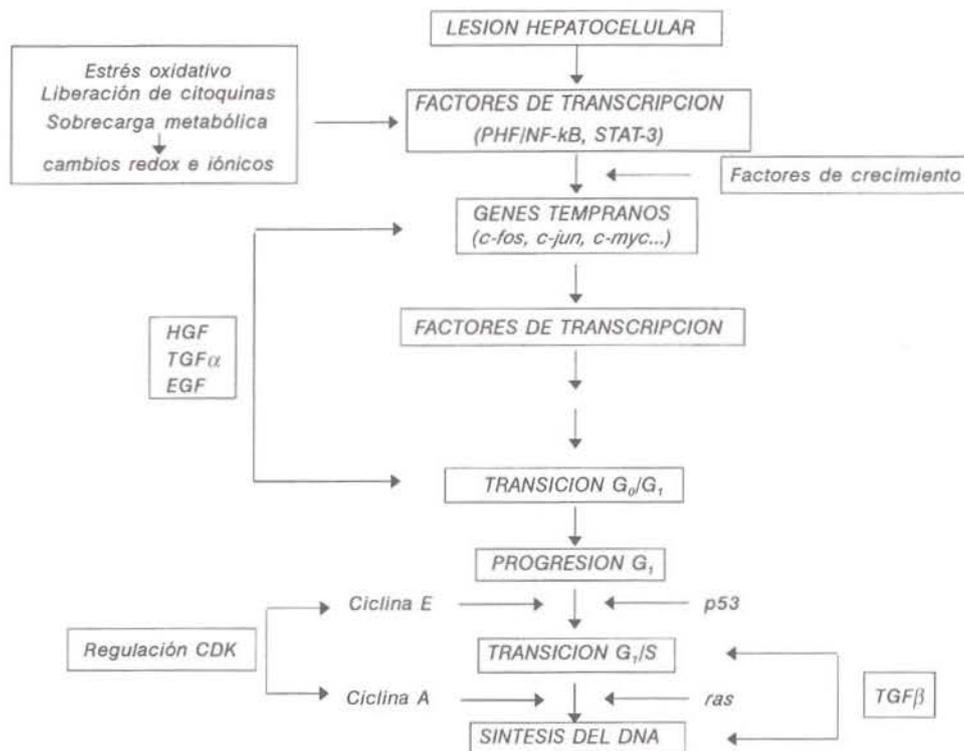


Figura 4. Mecanismo de regulación de la regeneración hepática.

Con el envejecimiento los niveles séricos de estos factores varían considerablemente y se ha demostrado que la disminución de la capacidad proliferativa es paralela a una menor liberación de factores de crecimiento al suero (32). Por ello, se considera que otra de las causas responsables del retraso de la regeneración hepática post-necrótica en la senescencia, es la menor expresión de los factores implicados en la activación de la cascada de señales que activan la entrada de las células en el ciclo celular.

Uno de los factores que intervienen directamente en la regeneración hepática es el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TNF $\alpha$ . La concentración de este factor en suero fue determinada en trabajos de experimentación de nuestro grupo dentro del tema hepatotoxicidad y senescencia. No existen niveles basales detectables de TNF $\alpha$  en suero de ratas control de las diferentes edades, pero en el suero de ratas intoxicadas con tioacetamida este factor surge en el momento de la necrosis y se eleva notablemente durante la regeneración. Los valores más elevados se registraron a las 72 horas de la intoxicación en ratas de 12 meses (347 pg ml<sup>-1</sup>). En ratas de edades más avanzadas la elevación de la concentración sérica del TNF $\alpha$  fue mucho menor, registrándose a los 30 meses valores casi 100 veces menores que en adultos de 12 meses (32). Esto indica que la senescencia frente a la hepatotoxicidad se manifiesta por una disminución de los factores del crecimiento implicados en el proceso proliferativo post-necrótico.

## 5. CONCLUSIONES FINALES

Los problemas más importantes de la senescencia frente a la hepatotoxicidad que se deducen del presente capítulo son: una menor capacidad en la biotransformación y eliminación de los xenobióticos y un retraso en la regeneración hepatocelular y la restauración de la funcionalidad hepática.

La solución ideal para evitar las consecuencias del envejecimiento todavía no se ha encontrado, aunque está bien establecido que son muchos los factores que pueden ayudar a evitar situaciones que conducen al estrés oxidativo y con ello a la enfermedad. La restricción calórica de la ingesta se ha comprobado que aumenta en un 43% la longevidad de los animales al conseguir un mantenimiento de la protección antioxidante y prevenir así el daño celular degenerativo. La protección antioxidante implica la elevación de las actividades de la catalasa, glutatión S-transferasas y glutatión reductasa con una disminución paralela de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del estado 4 de la respiración mitocondrial. También se ha abierto una nueva vía de estudio con el descubrimiento de la capacidad antioxidante de la melatonina, ya que con ella existe una posibilidad de regulación hormonal del estrés oxidativo.

Por ello, la conclusión a nivel clínico y farmacológico es que las dosis de fármacos administradas a pacientes de avanzada edad han de ser cuidadosamente controladas por presentar estos una mayor susceptibilidad a situaciones de estrés

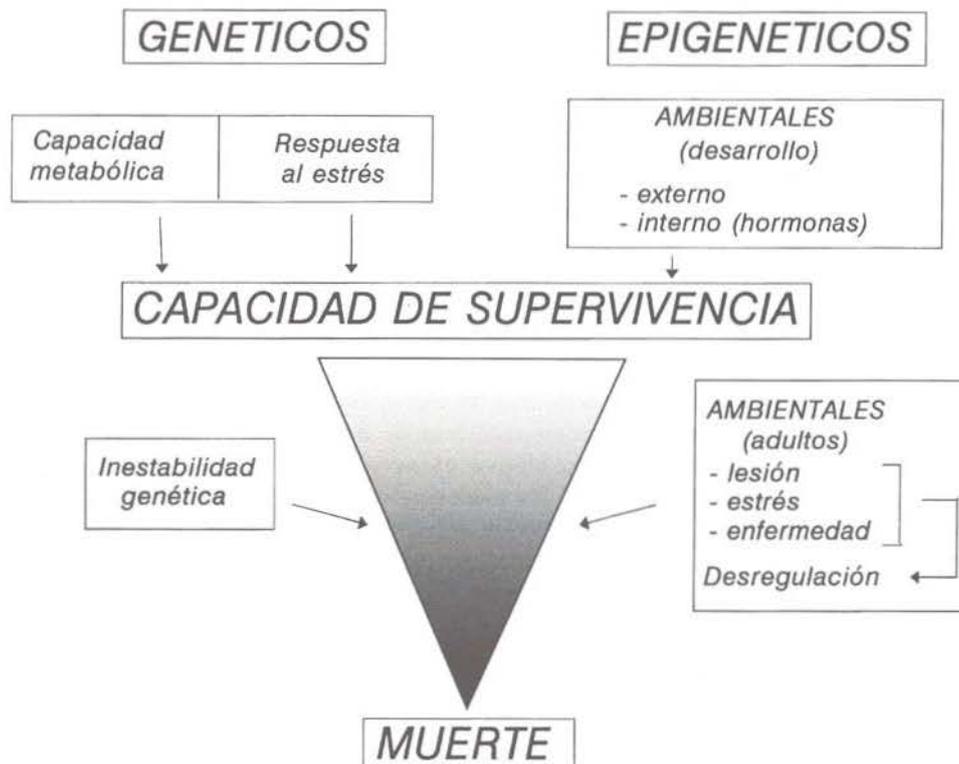


Figura 5. Determinantes del envejecimiento.

oxidativo. Muchas teorías que proponen que las actividades de los sistemas detoxificadores declinan con la edad, requieren una seria reconsideración. En humanos, el envejecimiento trae consigo una mayor incidencia de enfermedades y de tratamientos médicos continuados que van a provocar una disminución de la funcionalidad hepática. Este descenso de la función hepática se detecta no sólo frente a individuos de menor edad, sino también frente a ancianos sanos. Una nueva teoría sobre el mecanismo celular en el envejecimiento ha de estar fundamentada en los mecanismos de respuesta a la lesión que conducen a la recuperación de la función del hígado.

La capacidad de supervivencia es un potencial genéticamente determinado que permite al organismo sobrevivir más allá de su madurez reproductora. Existen dos factores fisiológicos que permiten mantener esta reserva de supervivencia: la capacidad metabólica y la respuesta al estrés. La expansión de la capacidad metabólica da como resultado la generación de oxidantes, la cual demanda la elaboración de la respuesta al estrés oxidativo. El genoma mitocondrial es especialmente vulnerable a la lesión oxidativa y sufre deleciones a lo largo de la edad (6). Los

factores que afectan el envejecimiento son de naturaleza genética y epigenética y los factores limitantes de la supervivencia son, por un lado la capacidad metabólica y la eficiencia de la respuesta a situaciones de estrés y por otro, la desregulación genética. Las situaciones de estrés acentúan los procesos de desregulación genética y existe una relación recíproca entre la agresión ambiental y dicha desregulación. Una elevación en la respuesta al estrés en función de la edad y en ausencia de agresión que justifique dicho incremento, puede reflejar también una desregulación genética. Por ejemplo, una elevación, dependiente de la edad, en la producción de IL-6, puede ser la causa de una elevación crónica de la respuesta inflamatoria. Los fenómenos epigenéticos, unidos a la inestabilidad genética son la primera causa de la degeneración celular característica del envejecimiento (Figura 5).

En condiciones fisiológicas normales, el uso del oxígeno por las células de los organismos aerobios genera especies reactivas de oxígeno potencialmente agresivas. El estado crónico de estrés oxidativo existe en condiciones de desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes. La evidencia de que las lesiones oxidativas se acumulan a lo largo de la vida e influyen sobre el envejecimiento se basa en que: (i) la superexpresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes retrasa la aparición de lesiones oxidativas y amplía el periodo vital; (ii) la velocidad de generación mitocondrial del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno se relaciona inversamente con la longevidad entre las diferentes especies; (iii) la restricción en el contenido calórico de la ingesta aminora las lesiones causadas por el estrés oxidativo, retrasa las alteraciones debidas a la edad y amplía el período de vida de los mamíferos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Berry MN, Halls HJ y Grivell MB (1992), Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocytes suspensions. *Life Sci* 51: 1-16.
2. Boelsterli UA (1993), Specific targets of covalent drug-protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 25: 395-451.
3. Harman D (1956), Role of free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
4. Harman D (1992), Free radical theory of aging. *Mutat Res* 257: 257-266.
5. Lezza AMS, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P y Gadaleta MN (1994), Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Com* 205: 772-779.
6. Richter C (1995), Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relation to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27: 647-653.
7. Wallace DC (1992), Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 61: 1175-1212.
8. Sohal RS, Ku H-H, Agarwal S, Forster M y Lal H (1994), Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanism of Ageing and Development* 74: 121-133.
9. Shay JW (1995), Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection?. *Molecular Medicine Today* 1: 378-384.
10. Zimmerman BJ, Grisham MB y Granger DN (1990), Role of oxidant in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 258: G185-G190.

11. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalynaraman B y Mason RP (1993), Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 120: 168-178.
12. Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN (1994), Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-10778.
13. Breen AP y Murphy JA (1995), Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol Med* 18: 1033-1077.
14. Slater TF (1984), Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
15. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki M y Dean RT (1992), Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem J* 282: 621-624.
16. Stadtman ER (1992), Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224.
17. Barja G (1996), Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad de crecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 31: 153-161.
18. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M y Barja G (1996), Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanism Ageing Develop* 86: 53-66.
19. De la Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J y Viña J (1996), Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10: 333-338.
20. Kato R, Vassanelli P, Frontino G y Chiesara E (1964), Variation in the activity of liver microsomal drug metabolizing enzymes in rats in relation to the age. *Biochem Pharmacol* 13: 1037-1051.
21. Cascales M, Martín-Sanz P y Cascales C (1990), Liver functionality and enzymes related to peroxidation in experimental hyperplastic noduligenesis. *3 Hepatologische Symp. Friedrich-Schiller Univ. Jena.* pp 185-196.
22. Cascales M, Martín-Sanz P, Craciunescu DG, Mayo I, Aguilar A, Robles-Chillida EM y Cascales C (1991), Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis* 12: 233-240.
23. Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M (1995), Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* 16: 1585-1593.
24. Sanz N, Díez-Fernández C, Valverde AM, Lorenzo M, Benito M y Cascales M (1997), Malic enzyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase gene expression increases in rat liver cirrhogenesis. *British J Cancer* 75: 487-492.
25. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S (1992), Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 82: 449-470.
26. Redd DJ (1990), Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem Res Toxicol* 3: 495-502.
27. Kyle ME, Nakae D, Sakaida I, Serroni A y Farber JL (1989), Protein thiol depletion and the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 38: 3797-3805.
28. Minotti G y Aust SD (1992), Redox Cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 27: 219-226.
29. Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M (1996), Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca<sup>2+</sup> dependent enzymes. *J Hepatol* 24: 460-467.
30. Mochida S, Masaki N, Ohta Y, Itsuro M, Ogata I y Fujwara K (1992), In situ detection of oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pathol* 167: 83-89.
31. Katz N y Jungermann K (1993), Metabolic heterogeneity of the liver. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology.* (eds N Tavoloni y PD Berk). pp 55-70. Raven Press, New York.
32. Sanz N (1996), Hepatotoxicidad y senescencia. Parámetros estructurales y funcionales relacionados con el estrés oxidativo en hepatocitos de rata. *Tesis Doctoral.* UCM.
33. Beyer HS, Sherman R y Zieve L (1991), Aging is associated with reduced liver regenera-

- tion and diminished thymidine kinase mRNA content and enzyme activity in the rat. *J Lab Clin Med* 117: 101-108.
34. Schmucker DL (1985), Aging and drug disposition. En: *Review of biological research in aging*. (ed M Rothstein). Vol II. pp 465-501, Alan L Liss, New York.
  35. Jakoby WB y Ziegler DM (1990) The enzymes of detoxification. *J Biol Chem* 2: 321-324.
  36. Horbach GJM, Van Asten JG, Reijtens IMCM, Kremers P y Van Bezooijer CFA (1992), The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P-450. *Xenobiotica* 22: 515-522.
  37. Groot M (1994), Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterol* 41: 328-332.
  38. Amimoto T, Matsura T, Koyoma SY, Nakanishi T, Yamada K y Kajiyama G (1995), Acetaminophen-induced hepatic injury in mice: the role of lipid peroxidation and effects of pretreatment with coenzyme Q<sub>10</sub> and alpha-tocopherol. *Free Radical Biol Med* 19: 169-176.
  39. Reiter RJ (1995), Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 16: 383-415.
  40. Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK y Meister A (1990), Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3343-3347.
  41. Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P y Orrenius S (1992), Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4412-4416.
  42. Principe P, Wilson GD, Riley PA y Slater TF (1989), Flow cytometric analysis of protein thiol groups in relation to the cell cycle and the intracellular content of glutathione in rat hepatocytes. *Cytometry* 10: 750-761.
  43. Yu BP (1994), Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
  44. Díez-Fernández C, Sanz N y Cascales M (1996), Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 51: 1159-1163.
  45. Kitani K (1992), Liver and aging. *Gastroenterología Japónica*. 27: 276-285.
  46. Sanz N, Díez-Fernández C y Cascales M (1996), Variations of hepatic antioxidant systems and DNA ploidy in rats aged 2 to 8 months. *Biochim Biophys Acta* 1315: 123-130.
  47. Agarwal S y Sohal RS (1993), Relationship between aging and susceptibility to protein oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1203-1206.
  48. Sohal RS, Agarwal S y Sohal BH (1995), Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mech Ageing Develop* 81: 15-25.
  49. De AK y Darad R (1991), Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats. *Mech Ageing Dev* 59: 123-128.
  50. Bolzan AD, Brown AO, Goya RG y Bianchi MS (1995), Hormonal modulation of antioxidant enzyme activities in young and old rats. *Exp Gerontol* 30: 169-175.
  51. Christon R, Halovi RB y Durand G (1995), Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver. *J Nutr* 125: 3062-3070.
  52. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M (1993), Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 18: 912-918.
  53. Liu J y Mori A (1993), Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM); a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Develop* 71: 23-30.
  54. Mehendale HM (1991), Role of hepatocellular regeneration and hepatobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem Pharmacol* 42: 1155-1162.
  55. Cascales M y Martín-Sanz P (1990), Regeneración Hepática. En: *Hepatología. Nuevas Tendencias* Vol. 13, pp 129-146, CSIC. Madrid.
  56. Michalopoulos GK (1990), Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J* 4: 176-187.

57. Fausto N (1992), Liver regeneration: models and mechanisms. En: *Liver regeneration*. (eds D Bernuau y G Feldmann), pp 1-6. John Libbey. Eurotext, Paris.
58. Mangipudy RS, Chanda S y Mehendale HM (1995), Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Persp* 103: 260-267.
59. Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arci RJ, Kramer R, Guidotti G y Cantrello HF (1993), The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 312-316.
60. Fairman MP (1990), DNA polymerase  $\delta$ /PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci* 95: 1-4.
61. Kayano K, Mitsuru Y, Kubota M, Takenaka K, Mori K, Yamashita A, Kubo Y, Sakaida I, Okita K y Sanuki K (1992), Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. *Liver* 12: 132-136.
62. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L (1994), Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* 20: 992-1001.
63. Sandberg AA (1992), The chromosomes and the cell cycle. En: *Diagnostic Cytology*. LG Koss, JB Lippincott. 4<sup>th</sup> ed. Vol I. pp 154-179. Company, Philadelphia.
64. Gerlynk P, Abyholm A, Grotmol T, Erikstein B, Huitfeldt HS, Stokke T y Seglen PO (1993), Binucleation and polyploidization pattern in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Proliferat* 26: 557-565.
65. Mossin L, Blankson H, Huitfeldt H y Seglen PO (1994), Ploidy-dependent growth and binucleation in cultured rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 214: 551-560.
66. Tamura J, Tanaka J, Fujita KI, Yoshida M, Kasamatsu T, Arai S y Tobe T (1992), Cell kinetics of regenerating liver after 70% hepatectomy in rats. 2-color flow cytometric analysis. *HPB Surg* 5: 103-114.
67. Bursch W, Oberhammer F y Schulte-Hermann (1992), Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *TIPS* 13: 245-251.
68. Gerlung P, Grotmol T, Erikstein B, Stokke T y Seglen PO (1992), Reduced proliferative activity of polyploid cells in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 13: 1795-1801.
69. Norwood TH y Gray M (1996), The role of DNA damage in cellular aging: is it time for a reassessment?. *Exp Gerontol* 31: 61-68.
70. Li R, Wage S, Hannon CJ, Beach D y Stillmann B (1994), Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371: 534-537.
71. Ohtsubo M y Roberts JM (1993), Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259: 1908-1912.
72. Peter M y Herskowitz I (1994), Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79: 181-184.
73. Stein GH, Beeson M y Gordon L (1990), Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 249: 666-668.
74. Bohr VA y Anson RM (1995), Mutation Research DNAging genetic instability and aging. *Mutat Res* 338: 25-34.
75. Fausto N y Webber E (1994), Liver regeneration. En: *The liver biology and pathology*. pp 1059-1084. Raven press Ltd, New York.
76. Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL y Brenner DA (1995), Elevation of jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest* 95: 803-810.
77. Cressman DY, Diamond RH y Taub R (1995), Rapid activation of Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 21: 1443-1449.
78. LaBrecque D (1994), Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol* 89: S86-S96.
79. Lanahan A, Williams JB, Sanders LK y Nathan D (1992), Growth factor-induced delayed early responses genes. *Mol Cell Biol* 12: 3919-3929.
80. Taub R (1996), Transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* 10: 413-427.
81. Andus T, Bauer J y Gerok W (1991), Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 13: 364-375.

82. Sporn MB y Roberts AB (1990), TGF $\alpha$ : problems and prospects. *Cell Regul* 1: 875-882.
83. Jirtle RL, Carr BI y Scott CD (1991), Modulation of insuline-like growth factor 2/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor- $\alpha$ 1 during liver regeneration. *J Biol Chem* 266: 22444-22450.
84. Michalopoulos GK (1992), Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 15: 149-155.
85. Cornell RP (1990), Acute phase responses after acute liver injury by partial hepatectomy in rats as indicators of cytokine release. *Hepatology* 11: 923-931.

# **RADICALES LIBRES Y MODIFICACION OXIDATIVA DEL DNA. IMPLICACIONES EN LA CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL Y HUMANA**

MARIA ROSARIO OLIVA<sup>a</sup>,  
PILAR MUÑIZ<sup>b</sup>, VICTORIA VALLS<sup>b</sup>,  
ANTONIO IRADI<sup>c</sup>, MARIA DOLORES CATALA<sup>c</sup>,  
CARLOS CAÑETE-NICOLAS<sup>c</sup>;  
ERACI DREHMER<sup>d</sup>, GUILLERMO T. SAEZ<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Análisis Clínicos. Sección de Genética Molecular.  
Hospital Virgen de las Nieves, Granada.

<sup>b</sup> Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Ciencias  
y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Burgos.

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología y

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia

## **SUMARIO**

---

1. INTRODUCCION
2. PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS INDUCTORAS DE ESTRES OXIDATIVO
3. EL MATERIAL GENOMICO COMO DIANA DE LESIONES OXIDATIVAS
4. DAÑO OXIDATIVO DEL DNA. MECANISMOS Y PRODUCTOS
5. TECNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE BASES MODIFICADAS
6. IMPLICACIONES SOBRE LA INESTABILIDAD Y EXPRESION GENICA. EFECTO MUTACIONAL Y CANCER
7. ESTRATEGIA ANTIOXIDANTE Y SISTEMAS DE REPARACION
8. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Por su importancia fisiológica y fisiopatológica, la interacción entre los radicales libres y el material genético representa, desde hace aproximadamente dos décadas, uno de los aspectos de mayor interés dentro de las distintas facetas de la investigación biomédica. La razón de este hecho es obvia si tenemos en cuenta las consecuencias que de dicha interacción se derivan. En la actualidad, y en base a numerosos estudios experimentales, se sabe que los radicales libres y/o especies oxidantes participan y desencadenan numerosos mecanismos reaccionales que conducen al establecimiento del fenotipo transformante de las células vivas. Estas especies altamente reactivas actúan sobre los mecanismos de control del ciclo celular a través de la modulación de factores transcripcionales y por lo tanto de la expresión genética e intervienen tanto en la iniciación como en la promoción y expansión clonal de células tumorales.

Como consecuencia del ataque de las especies reactivas sobre el material genético se producen una serie de modificaciones oxidativas capaces de inducir roturas de cadenas, alteraciones cromosómicas así como de mutaciones más o menos específicas. Todo ello conduce con cierto grado de probabilidad a la instauración de mutaciones, alguna de las cuales puede ser de vital trascendencia para el normal funcionamiento de la células aeróbicas.

Efectivamente son las células consumidoras de oxígeno las mejores candidatas en este sentido, ya que el consumo de este gas lleva consigo la formación, en condiciones normales, de especies altamente reactivas y pro-oxidantes, afortunadamente controladas y contrarrestadas por los sistemas antioxidantes inducidos por una maquinaria de expresión genética excelente que en su momento evolutivo permitió el crecimiento y desarrollo de las distintas especies procedentes del mundo marino, sobre una superficie progresivamente más oxigenada como la corteza terrestre.

De hecho hoy sabemos que la formación de especies reactivas derivadas del oxígeno molecular desempeña funciones de regulación tanto de índole metabólica como de expresión genética, lo cual no es óbice para sospechar que esta formación pueda poner en peligro, y de forma continuada, la estructura y función biológica de macromoléculas importantes para el mantenimiento de la homeostásis, entre las que se encuentran, los ácidos grasos, las proteínas y los ácidos nucleicos, DNA y RNA (Figura 1).

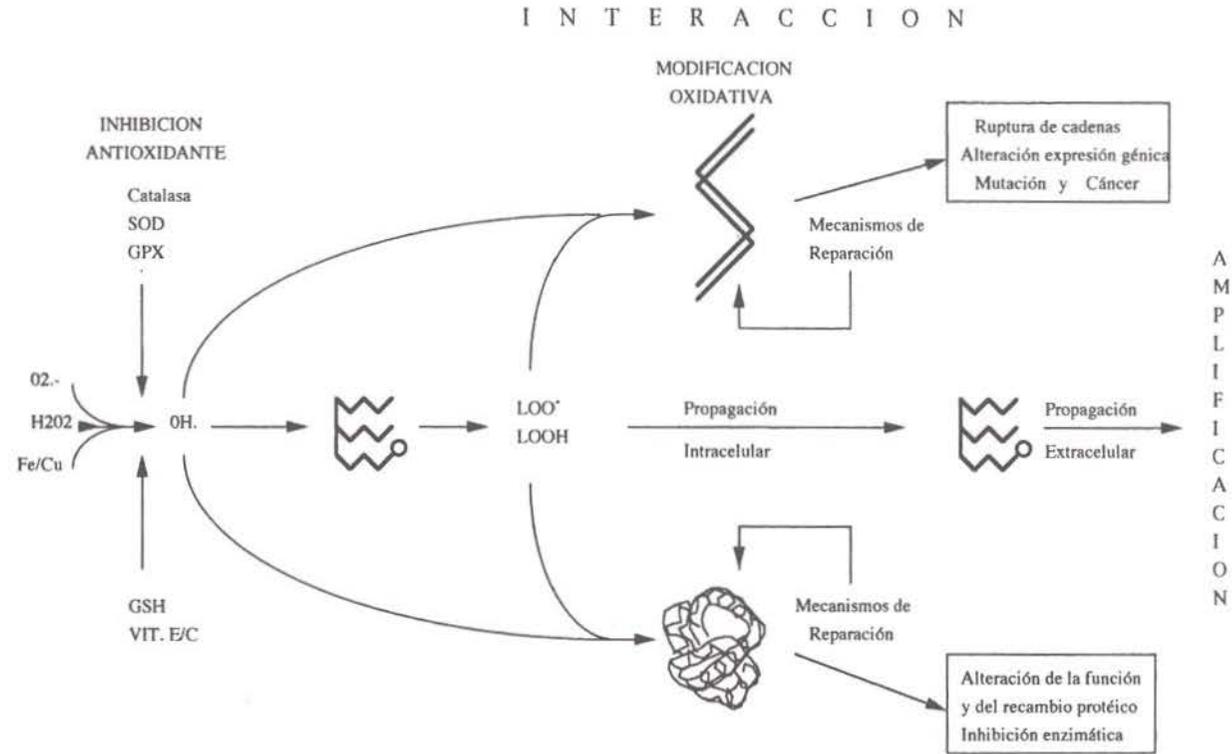


Figura 1. Interacciones moleculares y consecuencias del estrés oxidativo.

En esta revisión nos centraremos especialmente en el daño oxidativo que estas especies reactivas inducen sobre el material genómico como almacén y dogma universal de la transmisión genética. Se especificarán, los mecanismos, los productos y las consecuencias mutagénicas de este efecto inducido por los radicales libres tanto oxigénicos como de otra naturaleza y se incluirán algunas de las observaciones más recientes sobre el papel de los radicales oxigénicos en la regulación de la expresión genética de proto-oncogenes y genes supresores de tumores.

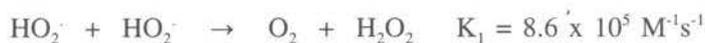
## 2. PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS INDUCTORAS DE ESTRES OXIDATIVO.

Constituyen un grupo de moléculas tan variado y variopinto como numeroso. Muchas o la mayoría de éstas derivan de otras más conocidas y abundantes como son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH$ ) a la sazón máximas responsables de dicho proceso oxidativo (1). Estas especies son el resultado de la reducción monovalente del oxígeno que puede llevarse a cabo a través de numerosos procesos reactivos que tienen lugar en los sistemas biológicos (2,3). La autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles, tetrahidropterinas, hemoproteínas y ferredoxinas puede producir la reducción del oxígeno y generar radicales superóxido. Esta especie también se genera por parte de algunos organulos subcelulares como cloroplastos y mitocondrias. A la formación de especies oxigénicas contribuyen un número extenso de reacciones del metabolismo oxidativo donde éstas se generan ya sea como intermediarios de la reacción o como producto de la misma. Un ejemplo característico, representativo e importante desde el punto de vista conceptual lo encontramos en la formación del radical superóxido y otras especies relacionadas tras la activación de neutrófilos y macrófagos que constituye además la base molecular de sus efectos biocidas (3-5). El conocimiento de este mecanismo de acción permitió entender mejor tanto la función defensiva de estas células como la sintomatología del cuadro inflamatorio al mismo tiempo que explica su estimulación por diversos alérgenos y promotores tumorales (6).

La dismutación del radical  $O_2^{\cdot-}$  da lugar a la especie no paramagnética peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, cuyo poder oxidante y destructor la convierte en un antiséptico potente.



El ácido conjugado, el radical hidroperóxido, es responsable de la dismutación espontánea de iones superóxido a través de las reacciones:



La velocidad de dismutación de la concentración total de radicales ( $\text{HO}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot$ ) a pH determinado viene establecido por la ecuación:

$$K_3 = (k_1 + K_2X)(1 + X)^2$$

donde  $X = K_{\text{HO}_2^\cdot/\text{H}^+}$ . Siendo la pKa de  $\text{HO}_2^\cdot$  igual a 4.69 es decir  $K_{\text{HO}_2^\cdot} = 2.04 \times 10^{-5}$ , por lo que  $K_3$  es aproximadamente  $1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4

El radical superóxido puede actuar tanto como agente reductor como oxidante. Se comporta como un buen agente mono-reductor con un potencial standard,  $E^0 = -0.33 \text{ V}$  para la reacción parcial  $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^\cdot$  y también es un oxidante potente desde el punto de vista termodinámico,  $E^0 = +0.87 \text{ V}$ , si bien este proceso es más lento.

La reactividad del radical superóxido para generar radicales  $\cdot\text{OH}$  tiene importantes connotaciones en relación con su formación y consecuencias en los sistemas biológicos. El radical hidroxilo es mucho más reactivo que el radical superóxido. La formación de estos radicales transcurre a través de la reacción de Fenton:



y la oxido-reducción cíclica del metal por parte del superóxido:



siendo la suma de ambas reacciones



conocida como la reacción de Haber-Weiss como así la bautizaron Beauchamp y Fridowich en la década de los setenta, ya que ésta ocurría en el esquema reaccional de Haber y Weiss y formula la descomposición catalítica del agua oxigenada en presencia de sales metálicas (1-6).

Las moléculas afectadas por las especies oxigénicas son igualmente variadas aunque por su disponibilidad, localización y concentración destacan las estructuras fosfolípídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos. Tres macromoléculas cuya alteración incluso individual conllevará a una distorsión global del metabolismo celular, ya que de la cooperación conjunta y sincronizada de las tres resulta la función metabólica de la células y su regulación.

Los fosfolípidos de las membranas celulares son esenciales para el mantenimiento de la viabilidad celular. Las proteínas son moléculas ejecutoras de una infinidad de funciones celulares, y entre ellas, la regulación de la expresión génica. Los ácidos nucleicos son portadores de la información de todas estas funciones. Se

entiende por lo tanto que de forma colectiva o individual una alteración de la función de cualquiera de estas estructuras sea suficiente para inducir trastornos importantes en la viabilidad y función de los sistemas biológicos (1-3).

Incluso ante la presencia de sistemas antioxidantes efectivos, se sabe en la actualidad que los radicales oxigénicos consiguen escapar al control de dichos sistemas e inducir, bajo condiciones fisiológicas, la alteración de distintas macromoléculas celulares de forma subliminal pero acarreado un acúmulo de distorsiones de diverso calibre e importancia clínica (1).

Una de estas consecuencias es el mecanismo de transformación maligna celular y la progresión tumoral como consecuencia de modificaciones oxidativas y mutaciones secundarias en el material genómico (7).

### 3. EL MATERIAL GENOMICO COMO DIANA DE LESIONES OXIDATIVAS

Es cierto que a pesar de las ventajas evolutivas que permitieron al DNA convertirse en la molécula especializada en el almacenamiento de la información genética, ésta no está exenta de perturbaciones de su estructura y por lo tanto de su función. La molécula de DNA es más estable que la de RNA ya que, al carecer de un grupo hidroxilo en el carbono 2' de la desoxirribosa, le confiere mayor estabilidad y menor susceptibilidad para su hidrólisis. Por otra parte, su estructura de doble hélice, le otorga la fiabilidad en la replicación así como la de reparación de su mensaje, asegurado por la otra cadena conservante de la información intacta que actúa como molde. A estas ventajas debemos añadir una protección adicional que se desprende de la localización nuclear de esta molécula y de su empaquetamiento de forma organizada gracias a un tipo de proteínas específicas como son las histonas (8, 9).

Hoy sabemos que la producción excesiva de radicales libres, en condiciones de estrés oxidativo, puede lesionar de forma irreversible moléculas como el DNA y otras estructuras moleculares como fosfolípidos, y producir la muerte celular. El papel de la destrucción oxidativa de fosfolípidos y estructuras relacionadas merece una mención aparte ya que, además de constituir un sustrato excelente para la propagación del proceso oxidativo a estructuras membranosas vecinas, sus productos peroxidados resultan igualmente nocivos para otras macromoléculas como el DNA mitocondrial o nuclear. La mayor parte de estos productos son mutagénicos y cancerígenos (10-12). Hay que resaltar, por otra parte, que mientras el radical hidroxilo (OH) tiene una vida media de nanosegundos, peróxidos e hidroperóxidos lipídicos presentan mayor estabilidad y por lo tanto su acción citotóxica es más prolongada (4).

En condiciones normales la producción basal de especies oxigénicas reactivas es responsable de la modificación oxidativa del DNA que se mantiene, de forma continua y no siempre constante, a lo largo del desarrollo de los seres aeróbicos

(11,12). Estos impactos oxidativos han sido estimados recientemente para distintas especies animales y relacionados tanto con su longevidad, como con su velocidad metabólica específica y otros factores moduladores como la cantidad de la ingesta calórica y la calidad de la dieta. Se sabe que la media de lesiones oxidativas por célula y por día en la especie humana es de 10.000 y en la rata de 100.000 (10). También se ha demostrado que la variabilidad en el número de impactos entre las distintas especies estudiadas es directamente proporcional a la velocidad metabólica específica, es decir al consumo de oxígeno por unidad de peso y tiempo. Así por ejemplo, el mayor grado de oxidaciones en el DNA del ratón con respecto al del hombre se corresponde con un mayor metabolismo oxidativo en el primero con respecto al segundo. En este sentido cabe destacar el estudio realizado por Bruce Ames hace unos años cuando relacionó el número de nucleótidos de pirimidina, modificados por oxidación y eliminados por la orina de 24 horas, con la longevidad de distintas especies animales y sus respectivas actividades metabólicas. Efectivamente, a lo largo de las distintas especies animales estudiadas, ratón, rata, mono y hombre, se cumple que a mayor longevidad de la especie, el metabolismo oxigénico es menor y esto se corresponde también con una eliminación menor de Timidina glicol, Timina-glicol y 8-OHdG. Se ha propuesto que estas modificaciones oxidativas, que se acumulan con la edad en las células no proliferativas, pueden llegar a interferir con el mecanismo transcripcional de genes vitales (11,12). Esta hipótesis, mediante la cual se trata de explicar el papel del daño oxidativo del DNA en la patogenia del envejecimiento, es todavía discutida aunque difícil de rebatir.

#### 4. DAÑO OXIDATIVO DEL DNA. MECANISMOS Y PRODUCTOS

Los mecanismos inductores de oxidaciones en el DNA y RNA son múltiples. La modificación oxidativa de estos polímeros es consecuencia de la interacción con especies reactivas oxidantes. Entre ellas destacan el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete, el radical hidroxilo y su forma protonada, el radical hidroperoxilo. Estas especies se generan a partir de múltiples mecanismos tanto intracelulares como de origen extracelular (1,13).

En general, todos aquellos fenómenos o sistemas reaccionales productores de especies reactivas oxigénicas y no oxigénicas son candidatos potenciales a la modificación oxidativa del DNA. Dependiendo de la intensidad con que éstos se produzcan, las alteraciones inducidas serán de mayor o menor grado.

Estas alteraciones van desde modificaciones oxidativas conducentes a mutaciones puntuales (14) y delección de fragmentos polinucleotídicos, hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida parcial o total de determinados cromosomas (6,7,15).

Este tipo de distorsiones genéticas se han observado por la acción de diversos agentes tanto físicos como químicos. Así, se sabe que las distintas modalidades de

radiaciones ionizantes ( $\gamma$ , rayos X y luz ultravioleta) y de alta energía como la radiación de neutrones, producen a través de la radiólisis del agua, una cantidad importante de especies reactivas y secundariamente la alteración de la estructura del DNA con lo que se explica el mecanismo molecular de su acción carcinogénica (6, 13, 14, 15).

Diversos agentes promotores tumorales, como ésteres forbólicos o agentes metálicos, también inducen modificaciones oxidativas del material genómico. Este efecto se consigue tanto por su biotransformación a especies reactivas como por la activación de células polimorfonucleares (6).

El estudio del daño oxidativo del DNA se puede plantear desde distintas perspectivas experimentales. Estas van desde la disminución de la concentración de este polímero medida por su absorbancia a 260 nm, pasando por la determinación de los productos de degradación oxidativa y reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico y alteraciones del patrón electroforético hasta la identificación de las bases nucleotídicas modificadas. Utilizando drogas de estructura quinónica o bien mezclas de xenobióticos y otros compuestos orgánicos con metales de transición se ha podido demostrar la estrecha relación existente entre la formación de especies reactivas y la ruptura del material genómico en distintos modelos experimentales. La formación de productos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en presencia de desoxirribosa es una prueba de la degradación oxidativa de esta molécula, además de representar un parámetro fiel de la formación de radicales hidroxilo como responsables del proceso oxidativo (3).

Más recientemente se han estudiado otros derivados de esta interacción mediante técnicas analíticas algo más sofisticadas pero fáciles de reproducir. Este es el caso de las bases modificadas oxidativamente del DNA.

Las radiaciones ionizantes son un ejemplo excelente de ambos, la formación de radicales oxigénicos y de la modificación oxidativa del DNA. Como ya hemos mencionado las radiaciones ionizantes generan, a través de la radiólisis del agua, especies oxigénicas, siendo la más predominante el radical hidroxilo (OH). Los efectos de este mecanismo fisico-químico sobre el DNA han sido muy estudiados (16) y revisados (6). Se ha establecido que la estructura timidínica del DNA es la más susceptible a la modificación por radiaciones ionizantes, y de hecho se han aislado un número importante de productos oxidativos a partir de esta base nucleotídica. Distintos hidroperóxidos se forman como consecuencia de la radiación ionizante sobre los sistemas biológicos así como de otros agentes oxidantes de origen endógeno. Este último mecanismo suele ser mucho más frecuente y continuado dentro del ambiente aeróbico celular. El  $H_2O_2$  endógenamente formado reacciona con los metales de transición ligados al DNA (hierro o cobre) de una forma mecanísticamente similar a como ocurre en la reacción de Fenton (17).



Una diferencia importante con respecto a la reacción de Fenton es la proximidad de los radicales  $\cdot\text{OH}$  formados en la cadena de DNA y por lo tanto las consecuencias inmediatas que de esta característica se derivan.

La reactividad de las cinco bases nucleotídicas con el radical  $\cdot\text{OH}$  es extremadamente alta, con constantes de difusión  $K = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , mientras que para la desoxirribosa esta reactividad es cinco veces menor. La distribución del ataque oxidativo inducido estará influido y dependerá de la abundancia relativa de los componentes del DNA. Así, por ejemplo la modificación de la 5-metilcitosina (3% de todas las bases) será proporcionalmente inferior a la oxidación de la desoxirribosa, mucho más predominante en la estructura molecular del DNA, aún a pesar de la mayor reactividad de la base. Cada componente representa más de un punto susceptible de ataque oxidativo. El radical hidroxilo puede adicionar hidrógenos en los dobles enlaces de la timina a nivel de los carbonos C-5 (56%) y C-6 (35%) o bien sustraerlos del grupo metilo. Ello dará lugar a una serie de productos activados, oxidantes los primeros y reductores los segundos, de mayor o menor estabilidad. De la misma forma el radical  $\cdot\text{OH}$  interacciona con la guanina para dar lugar a un producto bastante caracterizado y conocido como 8-OH-2'-desoxi(oxo)Guanina (8-OH-oxo-G) (6, 18,19).

La especie hidropoxidada generada de forma más abundante a partir de la timina es la cis-5(6)hidroxi-6(5)hidroperóxido-5,6-dihidrotimina. Aunque relativamente estable, este hidroperóxido se descompone gradualmente a otro derivado más estable, el cis-vicinal-dihidrodiol, comúnmente conocida como cis-timina glicol (TG) y su 2'-desoxinucleosido cis-timidina glicol (dTG). Existen dos estereoisómeros cis-TdG (+) y (-), que están en equilibrio con sus epímeros trans. Este tipo de oxidaciones provoca alteraciones significativas en la conformación de la TG y consecuentemente cambios en la estructura planar de la timina. Otro derivado hidropoxidado, el 5-hidroperoximetil-2'-desoxiuridina (HPMdU) es un derivado del grupo metilo de la timina. Este compuesto es bastante estable en medio acuoso. Sin embargo, en presencia de metales de transición y de quelantes respectivos, como metaloproteínas y peroxidasa de rábano, se descompone a dos productos mayoritarios como son 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (HMdU) y 5-formil-2'-desoxiuridina (FdU). Estos derivados conservan la estructura planar de la timidina pero sus grupos metilo son oxidados a alcoholes (HMdU) o aldehidos (FdU). Ambos son bastante estables en presencia de iones metálicos o de peroxidasas. La estructura dTG es, sin embargo, fácilmente alterable en ambientes oxidativos como los que se producen por radiaciones ionizantes o por el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de quelantes ferrosos (6,17).

La descomposición gradual de dTG, mediante la apertura del anillo de TG da lugar a la formación de N'-formil-N-piruvilurea (FPU) que se puede convertir en 5-hidroxi-5-metilhidantoina (HMH) o bien ser degradado posteriormente a residuos como el N'-formil-N-urea. Por lo tanto, existe un número variado de productos de degradación derivados de dTG en el DNA sometido a radiación ionizante.

Además de la oxidación de la timina, hay otras bases susceptibles de oxidación por radiaciones ionizantes. Por ejemplo, la oxidación de la citosina da lugar a la formación de una serie de productos análogos a los de la timina. Su oxidación en posición cinco produce 5-OH-Citosina (20). Las bases púricas se pueden oxidar en distintos lugares, aunque aquellas producidas en el carbono C-8 han sido las más estudiadas. Este es el caso de la 8-oxo-desoxiguanosina, también referida como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. (8-OHdG). La sustitución con grupos -OH(oxo) en posición C-8 de las purinas origina la apertura del anillo imidazólico, similar a la que se produce sobre el carbono C-7 con un grupo alcalino. Estos derivados se conocen como Fapy-G o Fapy-A, siendo el término Fapy referido a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina o 5-formamido-4,6-diaminopirimidina respectivamente. Estos derivados de la apertura del anillo correspondiente se encuentran en el DNA irradiado junto con los productos de oxidación de las purinas (Figuras 2A, B y C).

Con agentes químicos, alguno de los cuales presentan propiedades carcinogénicas, se ha observado también la modificación oxidativa del material genómico. A pesar de que una revisión exhaustiva de estos agentes escapa al propósito de este capítulo, éstos se podrían agrupar en función de su mecanismo de acción, del tipo de células o de los sistemas enzimáticos implicados (6).

Existe un tipo de carcinogénesis química cuyo mecanismo de acción requiere la transformación previa a intermediarios electrofílicos antes de que puedan unirse y formar aductos con las bases nucleotídicas del DNA. Los hidrocarburos aromáticos son un ejemplo de este grupo de carcinógenos. Para la excreción de estos xenobióticos es necesaria la hidroxilación enzimática de los mismos para conseguir así la formación de conjugados solubles. Sin embargo durante esta detoxificación se generan metabolitos carcinogénicos potentes cuyo efecto tumoral se ha visto reducido en presencia de antioxidantes.

Los sistemas enzimáticos catalizadores de esta activación son los conocidos sistemas microsomales de oxidación mixta, entre los que se encuentran hidrocarburo hidroxilasa, citocromo P450 oxidasa, NADPH-citocromo P450 reductasa y NADH-citocromo b5 reductasa. Como productos de estas reacciones se generan diversas moléculas paramagnéticas incluyendo radicales oxigénicos así como quinónicos, epóxidos y derivados (6).

Durante la metabolización de agentes como el benzo(a)pireno, 7,12-dimaetilbenzo(a)antraceno y metilcolantreno por parte de los microsomas hepáticos se genera una cantidad sustancial de radicales superóxido y de agua oxigenada además de otros metabolitos reactivos. El DNA expuesto a microsomas tratados con estos agentes presenta estructuras oxidadas de sus bases nucleotídicas. Ambos agentes presentan un potencial carcinogénico muy importante.

Dentro del grupo de xenobióticos se encuentran también algunos contaminantes dietéticos como la toxina del moho *Aspergillus Flavus Oryzae* (aflatoxina B1) como

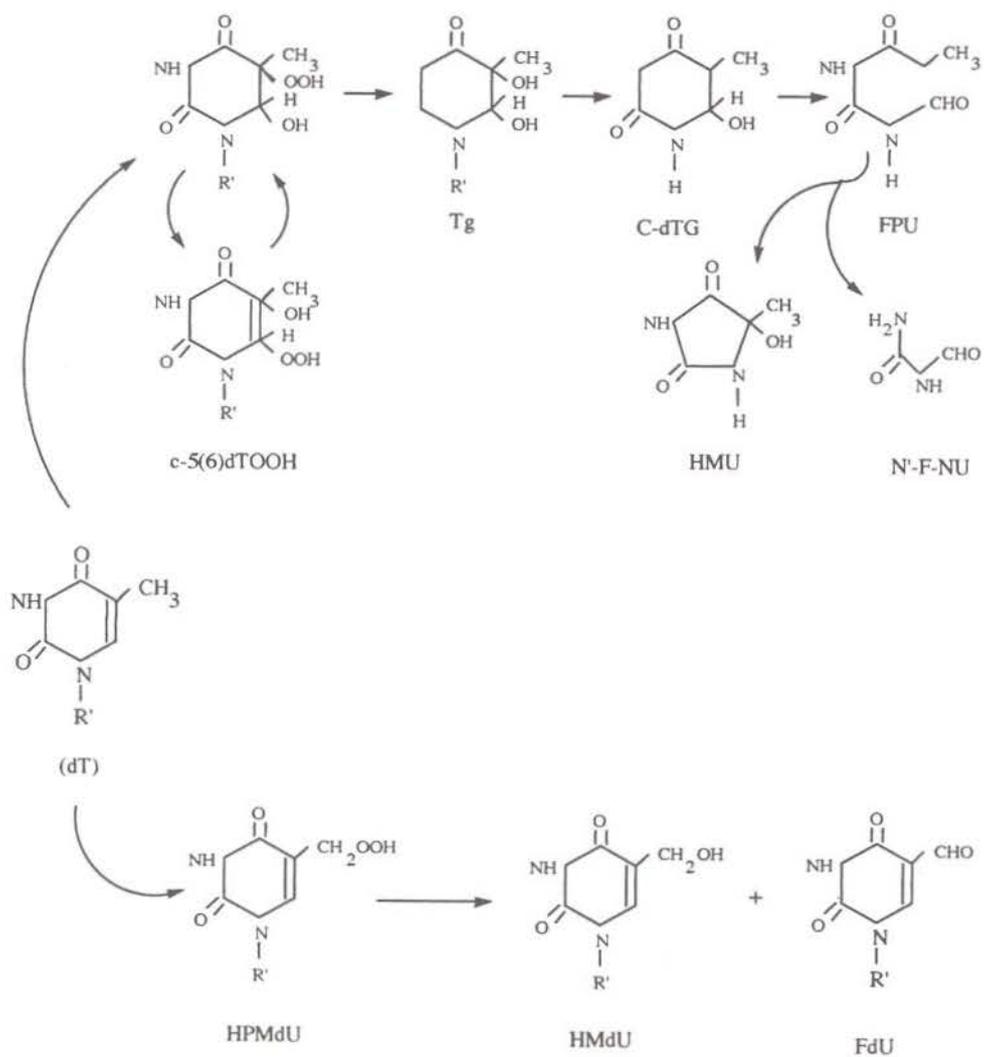


Figura 2A. Estructura de algunos productos de oxidación de la Timidina por radiación  $\gamma$ . R', desoxirribosa C-5(6)dTOOH, cis-5(6)-hidroxi-5(6)-hidroperoxi-5,6-dihidrotimidina; Tg, Timidina glicol; C-dTg, cis-timidina glicol; FPU, N'-Formil-N-piruvilurea; HMU, 5-hidroxi-5-metil-hidantoina; N'-F-NU, N'-formil-N-urea; HPMdU, 5-hidroperoximetil-2'-desoxiuridina; HMdU, 5-hidroxi-5-metil-2'-desoxiuridina; FdU, 5-formil-2'-desoxiuridina.

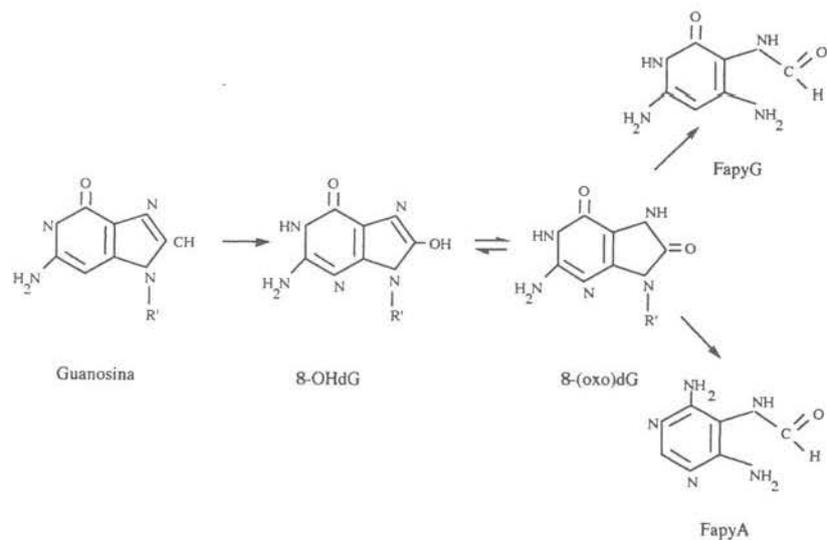


Figura 2B. Productos de la oxidación de la Guanosina generados por distintos mecanismos de estrés oxidativo. *R'*, desoxirribosa; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; 8-(oxo)dG, 8-oxo-2'-desoxiguanosina; FapyG, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamido-pirimidina, FapyA, 5-formamido-4,6-diamino-pirimidina.

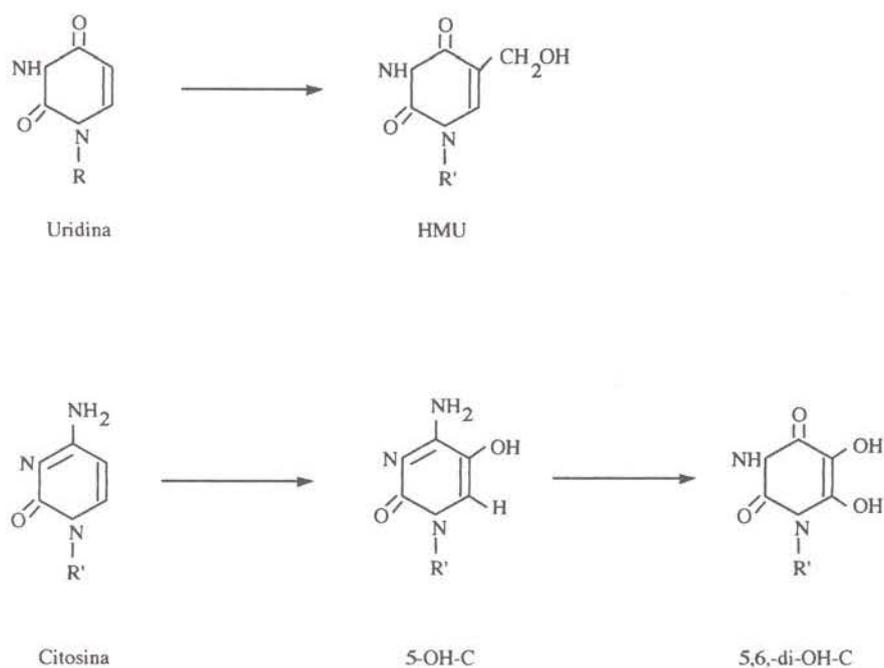


Figura 2C. Oxidación de Uridina y Citosina. HMU, 5-hidroxi-metil-uridina; 5-OH-C, 5-hidroxicitosina 5,6-di-OH-C, 5,6-dihidroxi-citosina. *R*, ribosa; *R'*, desoxirribosa.

más representativo de este grupo (21) o bien agentes farmacológicos como los antibióticos de estructura quinónica (22-24). Estos compuestos, no tóxicos por sí mismos, sufren oxidaciones intracelulares catalizadas por oxidasas diversas convirtiéndose en metabolitos activados y cancerígenos, previa modificación oxidativa del DNA. A través de oxidasas dependientes de citocromo P450, la aflatoxina B1, presente en los granos de semillas almacenadas en condiciones de humedad ambiental, se oxida a aflatoxina 2,3-epóxido responsable de la interacción con residuos de guanina y su posterior modificación oxidativa. La aflatoxina B1 ha sido relacionada con la incidencia alta de tumores hepáticos en países asiáticos como China y Taiwan, donde este contaminante dietético es relativamente frecuente (25).

Otros compuestos como la bleomicina, 1-10-fenantrolina (19), mitomicina, adriamicina (22) y rifamicina SV (24,25) generan, tras su biotransformación u oxidación espontánea en presencia de metales de transición, cantidades importantes de especies reactivas a las que se atribuye no sólo su poder antitumoral sino también los efectos secundarios, no deseables, que se derivan de su consumo (21). Un ejemplo de lo dicho es la citotoxicidad inducida por los antibióticos antitumorales (cardiotoxicidad de la adriamicina o citotoxicidad de la rifamicina SV). Con cada uno de estas moléculas se ha demostrado la formación de especies reactivas así como la degradación oxidativa del DNA. Estudios realizados utilizando resonancia paramagnética de electrones han establecido la formación de dichas especies. La degradación oxidativa del DNA inducido por estos xenobióticos se previene de forma significativa con diversos antioxidantes naturales (22-24).

Además de los carcinógenos orgánicos, también existen otros de origen inorgánico entre los que destacan los derivados metálicos. Aunque algunos de estos metales pueden unirse al DNA otros no lo hacen, por lo que se deduce que su acción carcinogénica se lleva a cabo por mecanismos indirectos. La evidencia experimental apunta hacia la inducción de mecanismos oxidativos. Este es el caso del cromo, el níquel y por supuesto el hierro y el cobre. Estos metales de transición son mutagénicos y su acción se inhibe en presencia de antioxidantes como la catalasa y agentes estabilizantes de radicales OH (6).

El efecto co-carcinogénico inducido por algunos procesos de inflamación crónica se conoce desde hace bastante tiempo. Sin embargo, el mecanismo por el que la inflamación contribuye en la patogenia del cáncer es todavía poco conocido. La idea más aceptada al respecto se apoya en la formación de radicales oxigénicos producidos durante la activación de fagocitos y la alteración consecuente de células vecinas. Este efecto ha sido demostrado por parte de agentes exógenos capaces de la activación fagocitaria en ausencia de estímulos naturales (destrucción de bacterias y crecimiento tumoral). Todo parece indicar que entre los efectos más destacados de los promotores tumorales está su habilidad para la activación oxidativa de células polimorfonucleares. En este aspecto, uno de los más representativos es el tetradecanoil-forbol-acético (acetato forbólico) (TPA), uno de los promotores tumorales más potentes conocido en la actualidad. Su mecanismo de acción oxidativa no

sólo se ha observado durante la activación de líneas polimorfocelulares sino también sobre otro tipo de células tanto de origen humano como animal. Como resultado de esta activación se produce una cantidad considerable de  $H_2O_2$  que puede interactuar con el DNA directamente o bien, y mucho más probable, generar en presencia de metales de transición la otra especie oxigénica de mayor reactividad y poder citotóxico como es el radical OH. Parece ser que el mecanismo de acción implicado está relacionado con la estimulación de la proteína quinasa C, previa a la transformación de la NADPH oxidasa a su forma activa. Otros promotores tumorales distintos al TPA, presentan un mecanismo de acción diferente al actuar inhibiendo la actividad de fosfatasa unidas a la membrana celular, siendo el resultado final similar al ejecutado por la activación de la proteína quinasa (6).

Independientemente del agente en cuestión o de la línea celular utilizada, la oxidación de las bases nucleotídicas del DNA es un hecho bastante demostrado. Los productos de oxidación más frecuentes son la timidina glicol (5,6-dihidroxitimina) (TG); timidina glicol (5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimidina (dTG); 5-hidroximetil uracilo (HMU), 5-hidroxi-2'-desoxiuridina (HMdU), 8-hidroxi(oxo)guanina (8OHG) y 8-hidroxi(oxo)-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), cuyas estructuras químicas vienen representadas en la Figura 2.

El estudio de las técnicas experimentales necesarias y su cuantificación representa en la actualidad uno de los tópicos más importantes del estrés oxidativo. Sin olvidar la necesidad que se vislumbra por encontrar parámetros adecuados como marcadores de este fenómeno oxidativo, el valor reconocido de las bases oxidadas del DNA hace de esta técnica analítica una de las más idóneas (26). Su aplicación no sólo es válida en el caso del cáncer sino también de otras muchas enfermedades degenerativas como son, citando sólo algunas, el envejecimiento, las enfermedades cardiovasculares, y múltiples procesos inflamatorios (10-12,26).

## 5. TECNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE BASES MODIFICADAS

Nos referiremos sólo a las más utilizadas y cuya puesta a punto en el laboratorio resulta sencilla y reproducible. La identificación de anillos imidazólicos abiertos como Fapy-Gua, de 8-OHGu y Fapy-Ade así como citosina-glicol se puede conseguir utilizando cromatografía de gases con absorción atómica y monitorización iónica selectiva. Esta técnica es bastante utilizada y precisa a la hora de una reproducción fiel de resultados (27,28).

La resonancia nuclear magnética también ha resultado ser útil a la hora, sobre todo, de estudiar cambios conformacionales inducidos por las bases oxidadas del DNA, si bien su accesibilidad no siempre resulta fácil quedando así restringida a laboratorios de infraestructura especializada en este sentido. Los resultados e interpretaciones desde el punto de vista de la química inorgánica han sido sin

embargo de gran ayuda para entender y corroborar su mecanismo de acción mutagénica (29, 30).

Sin embargo, con mayor frecuencia se emplea en la actualidad la separación de bases oxidadas como la 8-OHdG por HPLC y detección electroquímica. En este caso, se hace uso de un detector ultravioleta conectado en serie con el anterior, con el fin de facilitar la cuantificación de la base modificada referida al total de la base respectiva no modificada. En otras ocasiones las unidades se expresan por contenido de DNA digerido. La digestión enzimática y total del DNA previo análisis cromatográfico es necesaria para la perfecta identificación de productos y reproducibilidad de resultados. Esto se consigue con la combinación de nucleasas y fosfatasa alcalinas y es mucho más eficaz que la hidrólisis química del polímero. Esta característica es válida para los dos sistemas de análisis comentados. Así, Dizdaroğlu observó una buena separación de bases dTG y HMdU utilizando cromatografía de gases y practicando la hidrólisis química del DNA en presencia de ácido fórmico, sin embargo la resolución de HMU no fué del todo satisfactoria. Este problema se resolvió hidrolizando el DNA completamente a sus nucleósidos constituyentes por mecanismo enzimático (6,27,28). Otras mejoras experimentales en este sentido fueron aportadas recientemente por los trabajos de Ames al utilizar anticuerpos monoclonales como fase estacionaria de cromatografía de inmunoafinidad previa a la separación y detección por HPLC-EC. Esta técnica se ha utilizado para la identificación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina en orina, sangre y otros medios biológicos. Recientemente, utilizando esta misma tecnología se ha aislado e identificado en la orina de neonatos un nuevo derivado caracterizado como N2-metil-8-oxo-guanina. Este metabolito que se excreta en grandes cantidades por la orina de niños enfermos y en fase de desarrollo, también se encuentra en la orina de animales y humanos adultos y se ha demostrado que en el hombre se forma a partir de la base modificada N2-metil-guanina del t-RNA (31).

## 6. IMPLICACIONES SOBRE LA INESTABILIDAD GENOMICA. MUTACIONES Y CANCER

Durante las dos últimas décadas, se ha demostrado de forma clara y evidente el papel de los radicales y especies oxigénicas como mediadores en el mecanismo de la transformación maligna celular. Estas especies reactivas actúan en los distintos estadios del proceso cancerígeno, como iniciadores, promotores y responsables también de la expansión tumoral (6,29) (Figura 3).

Las especies reactivas derivadas del oxígeno molecular se vieron involucradas en la mutagenicidad de bacterias, así como de células de mamífero al mismo tiempo que inducían otra serie de alteraciones genéticas como aberraciones cromosómicas, entrecruzamiento de cromátides, ruptura de cadenas de DNA y modificaciones oxidativas (17). El hecho de que los radicales oxigénicos sean los responsables de la transformación celular lo demostraron Mondal y Heidelberger (32) en 1976,

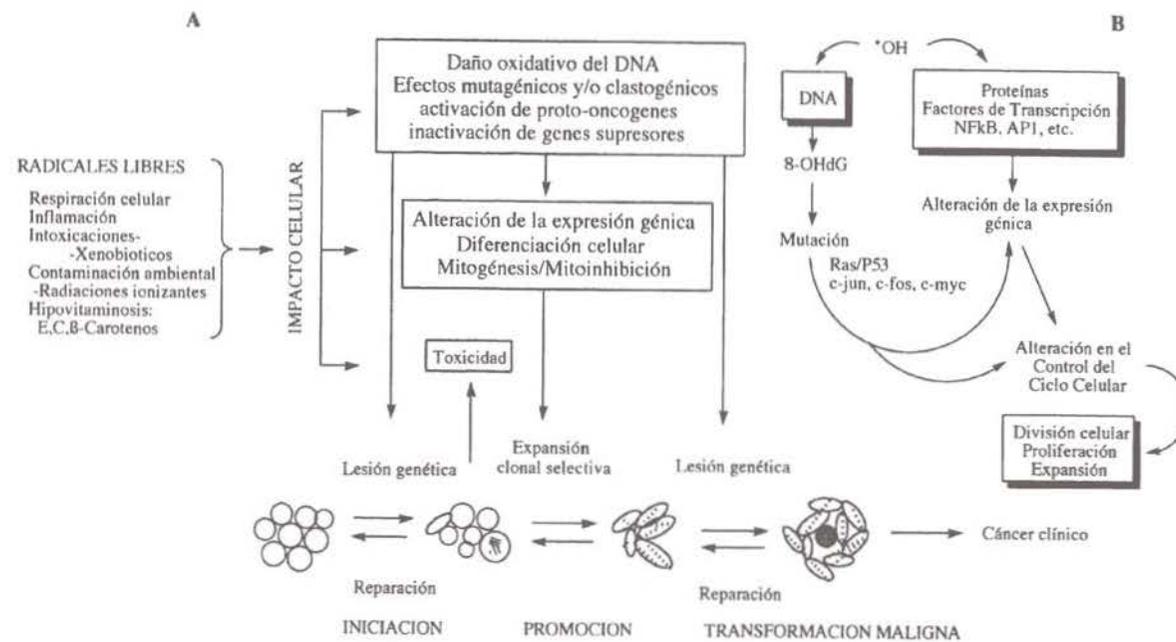


Figura 3. A. Papel del Estrés Oxidativo en la Carcinogénesis (adaptado de Guyton y Kensler, ref. 29). B. Interacciones de los radicales hidroxilo y efectos sobre genes y proteínas transcripcionales reguladoras del ciclo celular.

utilizando fibroblastos de embriones de ratón C3H/10T1/2 CL8 con luz ultravioleta y años más tarde por Borek y Troll (33) con radiación  $\gamma$ . Un año más tarde, el grupo de Cerutti, utilizando esta misma línea celular, demostró que en presencia de xantina más xantina oxidasa, como fuente de radicales superóxido, también se induce la transformación de estos fibroblastos mediante el análisis de formación de focos (34).

Diversos estudios experimentales han tratado de dilucidar el mecanismo de acción implicado en la transformación maligna celular inducida por los radicales libres, si bien la oxidación del DNA nuclear parece ser el evento esencial del mismo. Kuchino, Nishimura (35) y el grupo de Grollman (36) fueron pioneros en este tipo de estudios. Ellos demostraron que la oxidación de la guanina a 8-OHdG induce errores en la replicación del DNA por parte de la polimerasa DNA-dependiente. Cambios conformacionales inducidos por la base oxidada parecen ser los responsables del apareamiento de bases no complementarias. El cambio conformacional se establece, sobre todo, por parte del isómero 8-oxodG cuya disposición planar permite el establecimiento de puentes de hidrógeno con adeninas y timinas en lugar de citosinas. Esta base oxidada es además en términos cuantitativos, la lesión oxidativa más frecuentemente encontrada en el DNA bajo condiciones fisiológicas y es uno de los parámetros más representativos del estrés oxidativo *in vivo*. Como hemos referido anteriormente, numerosas investigaciones en este sentido han demostrado la formación de 8-OHdG tras la aplicación de distintos protocolos carcinogénicos. Estudios llevados a cabo a continuación de las observaciones iniciales de Kushino sobre la acción mutagénica de 8-OHdG, señalaron que la DNA polimerasa incorpora selectivamente citosinas (C) y adeninas (A) opuestas a una 8-oxo-guanina de acuerdo con las propiedades de complementariedad de ésta (30).

La introducción de un átomo de oxígeno en posición 8 de la guanina induce cambios en las propiedades electrónicas de esta base nucleotídica. Estudios realizados con R.M.N. señalan que a pH fisiológico el tautomerismo de la 8-OHdG en el oxígeno en posición 8 adopta con mayor probabilidad la forma cetónica. Por otra parte, la forma oxidada de la guanina adopta la configuración "syn". Estas dos consideraciones estructurales distorsionan la unión normal de la base oxidada. Con este tipo de análisis espectroscópico se ha demostrado que la 8-oxo-G(syn) forma apareamiento estable con la A en el interior del duplex de DNA sin perturbar a las bases flanqueantes. También se ha observado que la combinación 8-oxo-G(syn)-A transcurre con mayor eficiencia que la combinación 8-oxo-G(syn)-C, lo que sugiere que una vez producida la incorporación errónea, la estabilidad de ésta le permite escapar al reconocimiento de los mecanismos de lectura y reparación y persistir así como mutación estable (31). El resultado de este cambio será por lo tanto una transversión G a T tal y como ha sido demostrado a través de distintos estudios experimentales (30,31). Posiblemente la transición mutacional G-C a A-T sea la lesión más frecuente en términos oxidativos. Estas alteraciones que persisten a pesar de los mecanismos de reparación se producen tanto de forma espontánea como por agentes oxidantes y otros cuyo efecto lesivo sobre el DNA también se

creo que transcurre a través de la formación de especies oxigénicas. Este es el caso de la substitución en pares de bases G-C que se produce en el locus "aprt" de hamster por radiación de neutrones e incluso de forma espontánea (19,37). La estabilidad de este apareamiento genéticamente erróneo, junto con el hecho de que esta lesión induce de forma específica a una transversión G - T resalta la importancia de estas modificaciones oxidativas en la carcinogénesis inducida por agentes oxidantes (6,29).

Sin embargo, la prevalencia de mutaciones en G-C no se observa de forma uniforme en todos los sistemas experimentales. Existe otro tipo de modificaciones oxidativas además de la guanina. El resto de las bases nucleotídicas también son susceptibles de oxidación si bien su potencial mutagénico se conoce menos al no haber sido extensamente estudiado. Patrones de oxidación distintos a la 8-OHdG se producen sobre todo por la acción de distintos metales de transición, fundamentalmente el hierro y el cobre (6,29). En presencia de hierro, Moraes y colaboradores encontraron alteraciones oxidativas localizadas en A y T en el DNA de células CV-1, si bien, en condiciones espontáneas la alteración más frecuente seguía estando localizada en G y C. Efectivamente, algunos investigadores coinciden en la asunción de que el espectro variable de bases modificadas depende del sistema generador de especies reactivas utilizado y especialmente del metal de transición presente como catalizador de radicales hidroxilo. Existe, por lo tanto una metalo-dependencia manifiesta. Comparando con el efecto del hierro, la adición de cobre a preparaciones de DNA *in vitro* aumenta significativamente el número de mutaciones inducidas, al mismo tiempo que se detecta mayor daño oxidativo en presencia de agentes oxidantes (Rifamicina y cobre) (23,24). La afinidad del DNA por el cobre es muy alta comparada con otros iones metálicos. La unión cobre-DNA se cree que representa y sirve también como mecanismo fisiológico al contribuir a la estabilidad de la estructura del DNA cuando las histonas se han disociado, durante la activación transcripcional de genes y la síntesis de DNA en la metafase. El cobre facilita también la renaturalización del DNA a partir de cadenas individuales *in vitro*. La unión con el cobre facilita además una serie de reacciones oxidativas como señal redox para la estabilidad del DNA. Un cambio en la valencia de cobre(I) a cobre(II) puede mediar en la conversión conformacional de la forma B a Z del DNA (29).

Al igual que ocurre con la G, la C también supone una diana para el ataque oxidativo, por lo visto, debido a su afinidad para la unión con el cobre, ávido catalizador de radicales OH en medios acuosos. La interacción con esta especie da lugar a productos oxidados de citosina descritos tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (6,10,11). En algunos casos incluso se ha observado un mayor rendimiento de 5-OH-Citosina que de 8-OHdG. La prevalencia de la oxidación de la C sobre la G se ha descrito con DNA aislado en presencia de agentes oxidantes y en muestras biológicas de distintos tejidos y especies animales (6,10,11,29). Sin embargo, como ya hemos adelantado, el potencial mutagénico de la 5-OH-Citosina no ha sido apenas estudiado. Es posible que la oxidación de la citosina de lugar a alteraciones de apareamiento similares a las producidas por la 8-OHdG, o bien intervenir en un

proceso mutagénico diferente, como la distorsión de la maquinaria de replicación del DNA.

La función fisiopatológica de otras bases modificadas oxidativamente fue revisada por Breimer (20). La timina glicol no es escindida del DNA por la glicosilasa previa a la replicación. La ruptura del anillo, que da lugar a FapyG, representa un mecanismo de toxicidad al interferir con la replicación normal del DNA. La ruptura de esta estructura oxidativa no mutagénica puede, sin embargo, generar regiones abásicas que a su vez pueden inducir a mutagénesis. Por lo tanto el potencial mutagénico de cualquiera de estas bases modificadas no debe ser ignorado (26,29).

El papel de las bases nucleotídicas oxidadas en la carcinogénesis se ve consolidada por el hecho de que diversos agentes con especificidad oncogénica tisular inducen la oxidación del DNA en aquellos tejidos donde tiene lugar el desarrollo tumoral y no en otros. Análogos químicos de estos agentes que no inducen a la tumorigénesis tampoco provocan la oxidación del material genético (26) (Tabla I).

Desde hace bastantes años, se sabe que los factores ambientales contribuyen al desarrollo de tumores humanos, entre ellos la dieta con o sin contaminantes (aflatoxina), el humo del tabaco y la exposición a radiaciones ionzantes son los más reconocidos. La alta incidencia en tumores de piel como consecuencia de una exposición excesiva a la radiación solar, u otro tipo de radiaciones de capacidad tumorigénica conocida ( $\gamma$  de neutrones) concomitante con un aumento de las oxidaciones del DNA, avalan el papel del estrés oxidativo como mecanismo patogénico (6,19,26).

En mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de pecho se encontraron niveles altos de HMU en el DNA de células sanguíneas (38). Sin embargo, la disminución de la ingesta de grasa disminuía significativamente el daño oxidativo del DNA comparado con el grupo alimentado con una dieta rica en grasas. Es presumible que la disminución de grasas en la dieta en estas mujeres fuera compensado con un aumento de su contenido en vegetales, cereales y fruta, ricos en antioxidantes y por lo tanto potencialmente efectivos en la inhibición del daño oxidativo del DNA (6, 38). Aunque su efecto preventivo contra la aparición de carcinoma mamario es poco conocido, existen estudios animales que apoyan esta hipótesis. Recientemente, se publicó un estudio en el que se demostraba que el DNA de mujeres afectas de carcinoma ductal invasivo presentaba cerca de un orden de magnitud mayor en bases modificadas comparado con el DNA de mujeres controles (39). En este aspecto conviene señalar que las células tumorales presentan un metabolismo oxidativo diferente al de las células sanas. Entre los cambios observados ya en tiempos de Otto Warburg y recientemente constatado por Szatrowski y Nathan, destaca el aumento en la producción de agua oxigenada (40) que, a través de la génesis secundaria de radicales OH, puede potenciar el daño oxidativo del DNA y contribuir así a la inestabilidad genética. Se sabe que el tratamiento de células de mamífero con  $H_2O_2$ , induce la formación de lesiones en el DNA atribuidas sobre todo a un ataque por radicales

Tabla I. Papel de la 8-OH-2'-dG en la carcinogénesis experimental y humana (revisado en ref. 17).

**Papel de la 8-OH-2'-dG en la Carcinogénesis**

Agente Inductor	8-OH-2'-dG	Tipo o Linea Tumoral
Radiación Ionizante	+++	Linfoma, hepatocarcinoma
Asbestos o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	++	Carcinoma pulmonar
BrO <sub>3</sub> K	+++	Carcinoma renal
ClONa/ClO <sub>2</sub> Na	—	—
Nitroacetato Férrico	++	Carcinoma renal
“ Sódico	—	—
Nitropropano	++	Hepatocarcinoma
Sustrato análogo	—	—
Oxido de Nitroquinoleina	++	Tumor ascítico

**Incrementos de 8-OH-2'-dG en tumores humanos**

	Tejido Normal	Tejido tumoral
Pulmón	7.3	23
Estómago	0.94	5.1
Ovario	3.1	9.2
Carcinoma ductal invasivo	2.4	5.3
Carcinoma colorectal	2.7	4.4

hidroxilo (6). También existe evidencia suficiente sobre el contenido anómalo de enzimas antioxidantes en las células cancerosas con respecto a las células normales (41). La disminución de enzimas como la superóxido dismutasa o la catalasa en las células tumorales puede ser la causa de un acúmulo de radicales superóxido y de  $H_2O_2$  como precursores en la formación de radicales  $OH$ . Recientemente hemos contribuido al apoyo de esta hipótesis utilizando como sistema experimental el carcinoma colorectal humano. El tejido tumoral de los pacientes estudiados presenta un aumento significativo de 8-OHdG con respecto a la mucosa sana. En estos sujetos el 70% de las muestras analizadas presentaban una o más alteraciones genéticas por la estimación de pérdidas alélicas localizadas en regiones cromosómicas que codifican para genes supresores de tumores como el 5q (APC y MCC), 17p (p53), 18q (DCC) y 22q (no identificado). En un 71% de los casos la alteración genética se localiza en el gen p53, mutado en la mayoría de los tumores humanos (42). Pero existen además otros tumores en los que también se ha observado un aumento de 8-OHdG con respecto al tejido normal, como son los carcinomas de pulmón, estómago, ovario, próstata y mama. Estos incrementos suelen ser bastante significativos siendo en la mayoría de los casos de un orden de magnitud superior (43).

Otro tipo de proceso cancerígeno donde se observa una estrecha relación entre la modificación oxidativa del DNA y la prevalencia del proceso tumoral es el cáncer de pulmón. La relación es todavía más contundente si los sujetos afectados son o han sido fumadores. Como se sabe el humo del tabaco es una fuente importante de radicales libres y en contacto con las células de nuestro organismo desencadena la formación de moléculas bioactivas de importante reactividad y citotoxicidad. No hace más de cuatro años se publicó en una revista de importante reputación científica, un aumento en el contenido plasmático de productos de peroxidación en un grupo amplio de fumadores (44). El proceso de peroxidación es proporcional a la frecuencia en el consumo de tabaco. No sólo en la sangre sino también en el pulmón de sujetos fumadores también se detecta un daño oxidativo del DNA muy significativo con respecto a los sujetos no fumadores o fumadores no habituales (43).

De todos los tumores estudiados en los que se observa un aumento de bases oxidadas con respecto al tejido implicado sano, el pulmón es el que presenta la mayor diferencia estadística y el colon el que mantiene un cambio menor aunque significativo. El mayor o menor grado en la oxidación del DNA varía de un tejido a otro y posiblemente esté relacionado con la intensidad de las alteraciones de los sistemas antioxidantes en estos tejidos.

Independientemente del mecanismo o intensidad de la modificación oxidativa del material genómico, un aumento en la presencia de bases oxidadas pueden contribuir a la inestabilidad genética de las células tumorales y de esta forma aumentar su potencial metastásico (28,45,46). En relación con estas observaciones podemos añadir que utilizando distintos sistemas experimentales se ha comprobado que los radicales oxigénicos son origen de mutaciones puntuales en regiones de alta incidencia ("hot spots") localizados en los codones 11, 12 y 61 de oncogen c-Ha-ras-

1 (47) junto con los codones 248 y 249 del gen supresor p53 (48). La inactivación de este gen supresor conlleva la alteración del ciclo celular ya que su función fisiológica consiste en la inhibición de la replicación del DNA lo que permite, en condiciones normales, dar tiempo suficiente para la reparación de las lesiones inducidas en el material genético antes de que éstas puedan ser transmitidas a las células hijas (49). De hecho la expresión de la proteína codificada aumenta bajo los efectos de distintos agentes lesivos del DNA incluidos los radicales libres (50).

En base a estos hechos y otros muchos más se asume, como ya se ha comentado, que la participación de los radicales libres en el proceso cancerígeno se localiza tanto en la iniciación como en la promoción y expansión tumoral. No debemos olvidar, como ya hemos apuntado, que aunque el mecanismo mutacional parece ser la alteración genética más estudiada, los radicales y/o especies oxigénicas también inducen otro tipo de aberraciones estructurales entre las que se encuentran deleciones, ruptura de dobles cadenas, lesiones cromosómicas, formación de núcleos microcíticos, daño a proteínas histónicas y distorsión de señales de traducción, todos ellos implicados en la aparición, desarrollo y expansión tumoral (17).

## 7. ESTRATEGIAS ANTIOXIDANTES Y SISTEMAS DE REPARACION

Por su importancia el material genético es una de las estructuras más cruciales y por lo tanto mejor protegidas del ambiente celular. Esta protección incluye a mecanismos de prevención contra el ataque oxidativo y los sistemas enzimáticos de reparación. Ambos grupos contienen no uno sino diversos sistemas más o menos complejos desde el punto de vista mecanístico que en última instancia aseguran, en la medida de lo posible, la integridad del mensaje genético (51).

Durante el curso de la evolución de las especies, el núcleo celular ha desarrollado estrategias para prevenir y hacer menos accesible el ataque del DNA por parte de agentes nocivos. Se trata de los mecanismos de adaptación genética. El núcleo es un compartimento poco oxigenado, carece de sistemas de oxido-reducción como por ejemplo la cadena de transporte electrónico generadora de radicales oxigénicos (52). Con ello se disminuye, en parte, la probabilidad de alteraciones oxidativas del DNA nuclear cosa que no se consigue en la mitocondria, orgánulo por excelencia productor de especies reactivas oxigénicas. Recordemos que el número de impactos oxidativos que acontecen en el DNA mitocondrial es diez veces superior comparado con el polímero nuclear (53,54). Además el DNA nuclear está protegido por moléculas de naturaleza básica como poliaminas, protaminas e histonas. Las dos primeras se especializan en el mantenimiento de la estructura compacta o empaquetamiento y protección del DNA nuclear (52,55,56). Por su parte, las histonas interactúan con el DNA a través de regiones básicas ricas en lisina, componentes de los nucleosomas e importantes en los mecanismos de la transcripción. Es conveniente señalar que una porción muy importante del DNA nuclear (90%) no es codificador ni para proteínas ni para RNAs esenciales, si bien, este valor podrá verse modifi-

cado el día que el genoma humano esté totalmente caracterizado. En principio cabe asumir que este porcentaje de material genómico no codificador sirva como estrategia para esparcir su daño oxidativo y disminuir así la posibilidad de alteraciones genéticas en regiones que impliquen distorsiones importantes para las células. Al separar espacialmente la ubicación de los genes a lo largo de la cadena polinucleotídica se consigue disminuir la probabilidad de su alteración, si bien en principio todo gen está expuesto a mutaciones al azar. Por otra parte la existencia de una doble copia para cada gen en los organismos diploides contribuye, en algunos casos, a la preservación del material genético.

La estrategia antioxidante corre a cargo de mecanismos enzimáticos y de estructuras moleculares capaces de metabolizar a las especies reactivas oxigénicas a estructuras más estables o interaccionar con éstas para su neutralización respectivamente. La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (Gpx) dan cuenta del primer grupo. Las vitaminas antioxidantes como la E o la C, los β-carotenos, otras proteínas plasmáticas y el glutatión reducido son representantes de los sistemas no enzimáticos (1-5). Analizados globalmente, se deduce fácilmente que el objetivo de la estrategia antioxidante es evitar la formación del radical  $\cdot\text{OH}$ , desencadenante de otras especies reactivas y alteraciones oxidativas de macromoléculas celulares. Para contrarrestar su reactividad existen antioxidantes no enzimáticos. Cabe destacar en este aspecto el papel del glutatión reducido (GSH). Este tripéptido dotado de importantes funciones de regulación metabólica y defensivas para la célula es el tiol no proteico más abundante y extensamente distribuido tanto en el mundo animal como vegetal (5,13,57). El contenido de GSH en el núcleo de la célula es dos veces superior al del citoplasma (58), lo que apoya su función e importancia a la hora de proteger al DNA contra las modificaciones oxidativas. El grupo tiol reducido de la cisteína da cuenta de sus múltiples funciones fisiológicas. El glutatión es capaz de interaccionar y estabilizar radicales  $\text{HO}_2\cdot$  y  $\text{O}_2\cdot^-$  (5). En presencia de este antioxidante se preserva el patrón electroforético alterado por radicales quinónicos y otras especies reactivas y se inhibe la formación de 8-OHdG (23, 24).

Por su parte, la vitamina C presenta concentraciones relativamente altas en el líquido seminal desempeñando de esta forma una función antioxidante y protectora del DNA durante su conservación en los espermatozoides previa transmisión hereditaria. (58). Este contenido vitamínico varía además con el estado nutricional lo que apoya la importancia de la dieta como factor protector de la estructura genómica. Conviene recordar que algunos estados deficientes de diversos sistemas antioxidantes cursan con alteraciones neoplásicas importantes. En el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi o en la ataxia-telangiectasia consideradas como enfermedades con una alta incidencia de tumores, se observan alteraciones de los sistemas antioxidantes en sangre y tejidos de los sujetos afectados. De la misma forma pero en sentido contrario distintos estudios epidemiológicos apuntan hacia una reducción de la incidencia tumoral en sujetos alimentados con verduras o frutas ricas en vitaminas antioxidantes (59).

A pesar de ello, todo parece indicar que las especies oxigénicas se generan y esto ocurre sobre todo en ambientes donde estos sistemas defensivos no son capaces de actuar posiblemente por su inaccesibilidad de lo que se desprende que en condiciones fisiológicas incluso escapan a la acción de los mecanismos antioxidantes. En estas circunstancias se espera que los sistemas de reparación consigan rectificar las alteraciones oxidativas inducidas con el fin de mantener el orden de la cibernética molecular.

Los mecanismos de reparación del DNA representan un grupo de sistemas regulados a nivel genético y cuya actuación es independiente del agente o daño inducido en esta molécula. La evolución y desarrollo de éstos mecanismos son, como los anteriores, piezas esenciales para la preservación de la herencia y da cuenta de la existencia de alteraciones y errores aún a pesar de los sistemas antioxidantes. Los sistemas de reparación son complejos y sujetos a factores variables relacionados con el estado de diferenciación celular, las características del órgano diana o el tipo de lesión inducida. Intervienen en ellos varios tipos enzimáticos cuyas misiones principales son: a) la eliminación de los grupos de bases introducidas erróneamente, por parte de las endonucleasas y exonucleasas; b) la reconstrucción de huecos producidos como resultado de lesiones determinadas o por la actividad de endo y exonucleasas que llevan a cabo las glicosilasas y polimerasas y c) la unión de nucleótidos a la antigua hebra de DNA para resolver así la solución de continuidad producida, función que desempeñan las ligasas (51). De la contribución conjunta de estas enzimas resulta la protección de las regiones genéticas que se transcriben (genes funcionales) más frecuentemente y que la organización celular procura mantener de forma intacta ya que su alteración o construcción errónea podría traer consecuencias graves para el normal crecimiento celular. Por ello existen acoplamientos entre los sistemas de reparación y los de transcripción que comprueban y verifican la sucesión exacta de la bases nucleotídicas antes de su transcripción al RNA mensajero y expresión protéica correspondiente (60). Por otra parte, algunas alteraciones de los sistemas de reparación se han relacionado con procesos patológicos y degenerativos como es el caso de enfermedades cancerígenas (tumor colorectal) o de aquellos que evolucionan con el desarrollo conjunto de neoplasias (61). Estos sistemas de reparación junto con otros reguladores del ciclo celular se activan o inducen ante situaciones de estrés oxidativo o como consecuencia de agentes lesivos del DNA. En este sentido adquieren su importancia aquellos genes que se activan para expresar proteínas encargadas de frenar la replicación del DNA como p53 o GADD (49,62) o bien aquellos que a través de su acción prooxidante controlan la muerte celular programada como el bcl-2 (63). Hoy se sabe que dosis subtóxicas de radicales libres actúan como señales reguladoras de la expresión de un número variado y amplio de genes entre los que se encuentran aquellos que de una u otra forma intervienen en los procesos de diferenciación y proliferación celular como el c-fos, c-jun, c-myc. Muy recientemente se ha contribuido de forma sorprendente en este aspecto. Por un lado se ha observado que los radicales oxigénicos, y más concretamente el radical superóxido, intervienen en la activación de los proto-oncogenes Ras y consecuentemente en la expresión de proteínas ras como

mecanismo regulador del crecimiento celular (64) e incluso sobre los antígenos de histocompatibilidad MHC de clase I, implicados en el reconocimiento de estructuras propias y también en el control de la proliferación de células tumorales, ya que la disminución en la expresión de estos genes, altamente polimórficos, permite a las células malignizadas escapar al sistema inmune, es decir a la acción de los linfocitos T citotóxicos (65).

Los productos de reparación son retirados de la estructura del DNA, pasan a sangre y posteriormente eliminados por la orina. En este sentido las determinaciones de metabolitos en la orina contribuyen a la estimación de la actividad del equilibrio entre los mecanismos oxidativos y los de reparación. La acumulación de daños oxidativos en el DNA es limitada y el nivel de esta acumulación depende de la velocidad de generación de radicales oxigénicos, de la actividad de los sistemas antioxidantes, o bien de la actividad metabólica específica. Se desprende que existe un equilibrio entre la velocidad del daño oxidativo del DNA y la de su reparación.

$$\text{Velocidad de lesión} = \text{Velocidad de reparación}$$

En condiciones de equilibrio, el rendimiento en orina diario de estos marcadores respresenta tan sólo el daño oxidativo relativo y no debe ser considerado más que como un resultado cualitativo de dicha lesión atribuida al estrés oxidativo. Efectivamente, existen otros factores metabólicos y mecanismos modificadores de las bases nucleotídicas, que influyen y hacen compleja la estimación del daño inducido por el estrés oxidativo *in vivo*. En un organismo vivo, ya se ha comentado, existen mecanismos para el corte y escisión de bases individuales como es el caso de la Tg por las glicosilasas. Sin embargo, no existen enzimas que corten de forma específica a la dTg, cuya eliminación transcurre por escisión de nucleótidos de un número variado de bases y la digestión de éstos en nucleósidos para su posterior eliminación.

El entendimiento de los mecanismos complejos y de la secuencia en la reactividad de las distintas bases es por lo tanto fundamental para la cuantificación del proceso oxidativo a través de marcadores urinarios.

El proceso global puede ser descrito como sigue:



P representa los productos modificados debidos a estrés oxidativo (E.O.);  $\Sigma\text{P}$  es la suma de los productos escindidos y metabolizados; N la cantidad de bases, nucleósidos y nucleótidos no modificados y eliminados y Enz. la enzima reparadora. Una complejidad adicional viene impuesta por el posible destino metabólico o reactividad química de los productos escindidos. En este caso es importante conocer si los nucleótidos implicados son posteriormente metabolizados a otros productos. En este sentido ni la Tg ni la dTg parecen verse afectados por transformaciones

metabólicas posteriores que se conozca, en condiciones fisiológicas, por lo que su rendimiento en orina sí representa un índice del grado de reparación como se desprende de la reacción anterior (revisado en 17).

De cualquier forma, también conviene resaltar que la reparación de lesiones en el DNA es un proceso ciertamente costoso que implica un gasto importante de coenzimas e intermediarios energéticos como el NADPH, el GSH y el ATP (66). El consumo, a veces importante, de estas moléculas puede condicionar otras alteraciones de la homeostasis celular conducentes al establecimiento de ambientes de degradación oxidativa y desprotección celular importantes.

Sin embargo, tal y como se ha expuesto anteriormente, la reparación de lesiones en el DNA no se consigue siempre. La oxidación de las bases nucleotídicas induce a errores en la replicación de los moldes de las cadenas polinucleotídicas y acarrea de esta forma mutaciones para la progenie celular. Parece ser, por lo tanto, que de una forma inexorable los organismos aeróbicos se encuentran sometidos a una injuria que, aparentemente al azar, regula y/o altera nuestro orden interno cuyas consecuencias dependerá de factores ambientales y genéticos y su predicción sólo será posible cuando seamos capaces de conocer con exactitud el mecanismo de acción de éstos tanto, a nivel metabólico como de expresión génica.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Fridowich I (1978), The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
2. Ames. BN, Saul RL, Schwiers E, Adelman R y Cathcart R (1985), Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: The assay of thymine glycol, thymidine glycol, and hydroxymethyluracil in human and rat urine. In: *Molecular Biology of Aging: Gene stability and gene expression* (Sohal RA, Birnbaum LS and Cutler RG eds) pp. 137-144. New York, Raven Press.
3. Halliwell B y Gutteridge JMC (1989), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.
4. Cadenas E (1989), Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 58: 79-110.
5. Sáez GT, Bannister W y Bannister JV (1990), Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity. In: *CRC handbook of physiological functions of glutathione*. (Viña J ed.) CRC Press Inc. Florida. pp 237-254.
6. Frenkel K (1992), Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac Ther* 53: 127-166.
7. Cerutti P (1985), Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-380.
8. Darnell JE, Doolittle WF (1986), Speculations on the early course of evolution. *Proc Natl Acad Sci* 83, 1271-1275.
9. Ohta T y Kimura M (1971), Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. *Nature* 233: 118-119.
10. Ames BN (1989), Mutagenesis and Carcinogenesis: Endogenous and Exogenous Factors. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 14, 6-77. 11.- Adelman, R., Saul, R.L. and Ames, B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2706-2708.
12. Ames BN (1989), Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Rad Res Comms* 7: 3-6.

13. Sies H (1986), Biochemistry of oxidative stress. *Angw Chem Int* 25: 1058-1071.
14. Sloan SR, Newcomb EW y Pellicer A (1990), Neutron radiation can activate K-ras via a point mutation in codon 146 and induces a different spectrum of ras mutations than does  $\gamma$  radiation. *Mol Cell Biol* 10: 405-408
15. Breimer LH (1988), Ionizing radiation-induced mutagenesis. *Brit. J. Cancer* 57, 5-18.
16. Scholes G (1983), Radiation effects on DNA. *Br J Radiol* 56: 221-231.
17. Simic MG (1994), DNA markers of oxidative processes in vivo: Revelance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res* 54: 1918s-1923s.
18. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmüller DH y Richard RC (1986), Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad Res Comms* 1: 163-172.
19. Kasai H y Nishimura S (1986), Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents. *Environ Health Perspect* 67: 111-116.
20. Breimer LH (1990), Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Molecular Carcinogen* 3 188-197.
21. Judah DJ, Legg RF y Neal GE (1977), Development of resistance to cytotoxicity during aflatoxin carcinogenesis. *Nature* 265: 343-345.
22. Powis G (1989), Free radical formation by antitumor quinones. *Free Rad Biol Med* 6: 63-101.
23. Sáez GT, Valls V, Muñoz P, Pérez-Broseta C, Iradi A, Oliva MR, Bannister JV y Bannister W (1993), The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin SV and copper (II) ions. *Free Rad Res Comms* 19: 81-92.
24. Muñoz P, Valls V, Pérez-Broseta C, Iradi A, Oliva MR, Climent J y Sáez GT (1995), The role of 8-OH-2'-deoxyguanosine in rifamycin SV induced DNA damage. *Free Rad Biol Med* 18: 747-755.
25. Aguilar F, Harris CC, Sun T, Holstein M y Cerutti P (1994), Geographic variations of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 264: 1317-1319.
26. Floyd RA (1990), The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11: 1447-1450.
27. Aruoma OI, Halliwell B y Dizdaroglu M (1989), Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 264: 13024-13028.
28. Olinski R, Zastawny T, Buzbon J, Skokowski J, Zegarski W y Dizdaroglu M (1992), DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* 2: 193-198.
29. Guyton KZ y Kensler TW (1993), Oxidative mechanisms in carcinogenesis. In *Free Radical in Medicine*. The British Council, pp 523-543.
30. Kouchakdjian M, Bodepudi V, Shibutani S et al (1991), NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex, 8-oxo-7H-dG(syn)-dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry* 30: 1403-1412.
31. Helbock H, Thomson J, Yeo H y Ames BN (1996), N2-methyl-8-oxoguanine: A tRNA urinary metabolite. Role of xanthine oxidase. *Free Rad Biol Med* 3: 475-481.
32. Mondal S y Heidelberger C (1976), Transforming of C3H/10T1/2 CL mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and phorbol ester. *Nature* 260: 710-711.
33. Borek, C y Troll W (1983), Modifiers of free radicals inhibit in vitro the oncogenic actions of x-rays, bleomycin, and the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1304-1307.
34. Zimmerman R y Cerutti P (1984), Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2085-2087.
35. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E y Nishimura S (1987), Misreading of DNA templates containing 8-hydroxy-deoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327: 77-79.
36. Shibutani S, Takeshita M y Grollman AP (1991), Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged bases 8-oxo-dG. *Nature* 349: 431-434.

37. García-España A, Kahn JM, Sáez G. y Pellicer A (1996), Mutagenic effects of tumorigenic neutron radiation. *Int J Cancer* 65: 677-681.
38. Malins D, Holmes EH, Pollisar NL y Gunselman SJ (1993), The ethiology of breast cancer. *Cancer* 71: 3036-3040.
39. Malins DC y Haimanot R (1991), Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res* 51: 5430-5432.
40. Sztatowski TP y Nathan CF (1991), Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51: 794-798.
41. Sun Y (1990), Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med* 8: 583-599.
42. Oliva MR, Ripoll F, Muñoz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, Drehmer E y Sáez GT (1997), Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular Carcinogen* 18: 232-243.
43. Feig DI, Reid TM y Loeb LA (1994), Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54: 1890s-1894s.
44. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA y Roberts LJ (1995), Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-Isoprostanes) in smokers. *New Engl J Med* 332: 1198-1203.
45. Cifone MA y Fidler IJ (1981), Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6949-6952.
46. Megidish T y Mazurek NA (1989), A mutant protein kinase C that can transform fibroblasts. *Nature*, 342: 807-811.
47. Du M-Q, Carmichael PL y Phillips DH (1994), Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals. *Molecular Carcinogen* 11: 170-175.
48. Hussain SP, Aguilar F, Amstad P y Cerutti P (1994), Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 9: 2277-2281
49. Lane P (1992), P53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16
50. Fritsche M, Haessler C y Brandner G (1993), Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8: 307-318.
51. Sancar A y Sancar GB (1988), DNA repair enzymes. *Ann Rev Biochem* 57: 29-67.
52. Newport JW y Forbes DJ (1987), The nucleus: Structure, function, and dynamics. *Ann Rev Biochem* 56: 535-566.
53. Richter C, Park JW y Ames BN (1988), Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467.
54. Kunkel TA y Loeb LA (1981), Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213: 765-768.
55. Pegg AE y McCann PP (1982), Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-C221.
56. Warrant RW y Kim SH (1978), a-Helix-double helix interaction shown in the structure of protamine-transfer RNA complex and nucleoprotamine model. *Nature* 271: 130-135.
57. Meister A (1983), Selective modification of glutathione. *Science* 220: 471-477.
58. Fraga, CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob R y Ames B (1991), Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11003-11006.
59. Bostick RM, Potter JD, McKenzie RR, Sellers TA, Kushi IH, Steinmetz KA y Bolsom AR (1993), Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: The Iowa Women's Health Study. *Cancer Res* 53: 4230-4237.
60. Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin, Vermeulen W, Hoeijmakers HH et al. (1993), DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260: 58-63.
61. Friedberg EC (1985), DNA repair (New York: WH Freeman and Co.) Chapter 9.
62. Vogelstein B y Kinsler K (1993) p53 function and dysfunction. *Cell* 71: 1081-1091.

63. Steinman HM (1995), The Bcl-2 Oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem* 270: 3487-3490.
64. Irani K, Xia Y, Zweier L, Sollott SJ, Der ChJ, Fearon ER, Sundaresen M, Finkel T Goldschmidt-Clermont PJ (1997), Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649-1652.
65. Oliva MR, Garrido F, Ramos M, Muñiz P, Valls V, Iradi A, Drehmer E y Sáez GT (1997), Expression of MHC class I genes by t-butyl hydroperoxide in murine fibrosarcoma cell clones. *Free Rad Biol Med* (in press).
66. Halliwell B (1988), A Radical approach to human disease. Oxygen radical and tissue injury. Proceeding of an Upjohn Symposium (Halliwell, B. Marshall, D.J., Tacker, M.M., eds) Federation of the American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland USA. pp. 139-146.

Agradecimientos: G. Sáez agradece a la Fundación Ramón Areces (Proyecto de Investigación 1997), Consejería de Educación y Cultura de la Generalitat de Valencia por la Ayuda a la Investigación 1996-98, y a Maria del Carmen Tormos por su colaboración técnica.

# PROTEINAS DEL ESTRES Y HEPATOTOXICIDAD

CARMEN DIEZ FERNANDEZ Y MARIA CASCALES

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

## SUMARIO

---

1. INTRODUCCION
2. INDUCCION DE LA RESPUESTA AL ESTRES
3. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS ANTI-ESTRES
4. ESTRES OXIDATIVO Y PROTEINAS DEL ESTRES
5. PROTEINAS DEL ESTRES Y HEPATOTOXICIDAD
6. HSP Y ENVEJECIMIENTO
7. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Ante un aumento repentino de la temperatura, tiene lugar una respuesta celular común a todos los organismos, perfectamente regulada y conservada a lo largo de la evolución. Esta respuesta, conocida con el nombre de respuesta al choque térmico (heat shock response), se caracteriza por un incremento en la síntesis de una familia de proteínas denominadas proteínas del choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP) (1, 2). Desde el descubrimiento de esta respuesta (3), numerosas investigaciones han llegado a demostrar que no sólo el calor sino muchos otros estímulos, pueden inducir la síntesis de las HSP. Se ha establecido que unas HSP son constitutivas mientras que otras se sintetizan bajo la influencia de una variedad de estímulos (4), entre los cuales se encuentran fenómenos fisiológicos normales, tales como la progresión del ciclo celular, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la estimulación hormonal (5, 6) (Figura 1). Entre los estímulos perturbadores cabe citar entre otros, los agentes que desnaturalizan las proteínas, estados fisiológicos alterados y la respuesta inmune (7). Debido a la variedad de estímulos, la respuesta a la agresión térmica se conoce también con el nombre de respuesta al estrés y las proteínas anti-estrés son, obviamente, las moléculas que participan en ella (8).

La expresión de las proteínas del estrés se regula a nivel transcripcional (1, 9, 10). El incremento de la transcripción en respuesta a la situación de estrés, requiere la unión de un factor de transcripción (el factor de transcripción heat shock, HSF), a una secuencia conservada del DNA (el elemento heat shock, HSE), que se localiza en la región promotora de todos los genes inducibles por el calor (11, 14). En la *Drosophila* y en líneas celulares de mamíferos, el HSF es un factor de transcripción que se encuentra en forma de monómero inactivo en el citoplasma de células no estresadas. Un incremento en la temperatura o un episodio de estrés, origina la activación del HSF mediante su oligomerización, que lo capacita después de su traslocación al núcleo para unirse al HSE (14).

De lo estudiado hasta la fecha se confirma que las HSP desempeñan un papel activo en la defensa celular, aunque también muchas de estas proteínas que se expresan constitutivamente en células normales no sometidas a tensión, juegan un papel fundamental en gran número de procesos biológicos. La mayoría de las HSP poseen capacidad de unirse transitoriamente a gran variedad de proteínas celulares y de actuar como carabinas (chaperones) moleculares durante la síntesis, transporte

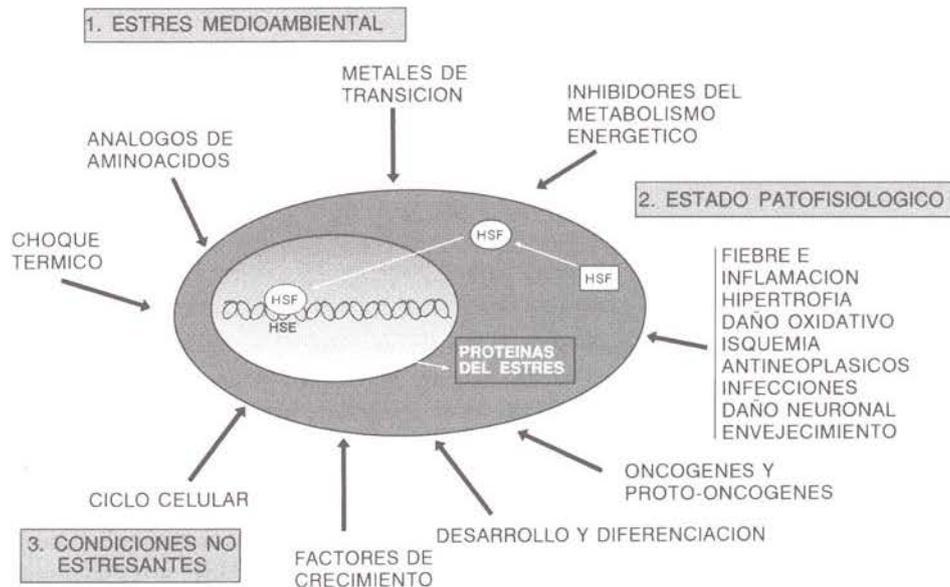


Figura 1. **Inductores de la respuesta al estrés.** HSF = Factor de transcripción HS; HSE = secuencia de DNA, elemento HS. Diferentes situaciones pueden conducir a la elevada expresión de proteínas del estrés: (1) Estrés fisiológico/ambiental, (2) Estrés patofisiológico (enfermedad) y (3) Condiciones fisiológicas no estresantes (crecimiento celular y desarrollo). En las situaciones 1 y 2, el HSF se activa y entra en el núcleo donde se une al HSE situado en la región promotora del gen HS. Esto conlleva la activación de la expresión de los genes HS y la síntesis de las HSP (14).

y degradación de las proteínas (16). Debido a su abundancia y a su capacidad de interactuar con muchas proteínas celulares, las HSP se encuentran en posición privilegiada para influir en muchos procesos celulares y de ahí su importancia y su posible uso en la patogénesis como agentes de diagnóstico y en terapéutica (17).

## 2. INDUCCION DE LA RESPUESTA AL ESTRES

La inducción de la respuesta al estrés es un fenómeno extraordinario tanto por su rapidez como por la sensibilidad de su atenuación. Muchos de los agentes o tratamientos que inducen esta respuesta comparten la característica de afectar de un modo adverso la conformación y la función de las proteínas (7). La acumulación intracelular de proteínas plegadas de forma anormal desencadena la respuesta al estrés con la participación de los factores de transcripción HSF (11). En procariontas, el activador transcripcional es el factor  $\sigma_{32}$ , presente a bajos niveles en condiciones normales, pero que frente a una situación de estrés, se eleva su concentración, bien por una mayor eficiencia en la traducción o bien, por una menor degradación (18). Es interesante resaltar que dos HSP, la Dna K y la Dna J, actúan como reguladores

negativos de este proceso, uniéndose al  $\sigma^{32}$  e inactivándolo y posiblemente contribuyendo a su rápida degradación (Figura 2). Sin embargo, el  $\sigma^{32}$  puede no ser el regulador universal de la respuesta entre los procariotas, puesto que no se ha encontrado ningún factor relacionado con él en el *Bacillus subtilis* y otras bacterias gram negativas. En lugar de ello, se ha encontrado un nuevo dominio denominado CIRCE en los operones de GroE y Dna K de *B. subtilis* (16). En eucariotas, en lugar de elevarse la concentración de un activador transcripcional, la respuesta al estrés se inicia por la activación de unos factores de transcripción específicos, los HSF (11, 13). El HSF se mantiene en un estado de no unión al DNA en células no estresadas y en respuesta al choque térmico adquiere un estado oligomérico uniéndose a los HSE, que son repeticiones invertidas de la secuencia de nucleótidos (nGAAn), localizados en el promotor de aquellos genes que codifican para las proteínas anti-estrés (19, 20).

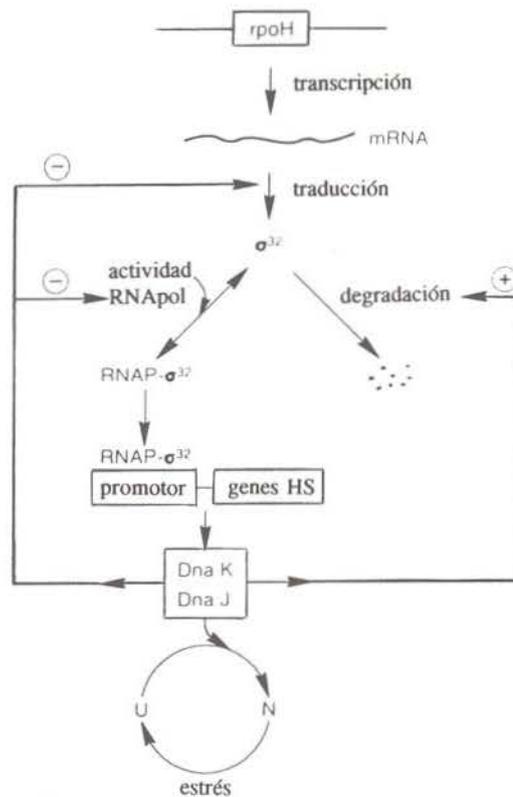


Figura 2. **Regulación de la respuesta al estrés en procariotas.** El factor  $\sigma$ , producto del gen *rpoH*, se asocia con la RNA polimerasa (RNA pol) para dirigir la transcripción de los genes HS. Las HSP, DnaK y DnaJ median la inhibición feedback de la activación  $\sigma^{32}$ , impidiendo su traslado y asociación con la RNA polimerasa y promoviendo su degradación. Los dos últimos pasos se han asociado con la unión directa de las dos HSP con el  $\sigma^{32}$ . La respuesta HS se activa durante el estrés cuando las concentraciones de DnaK y DnaJ se reducen debido a su asociación con proteínas desplegadas o mal plegadas (16).

La respuesta al choque térmico es tan rápida que la forma de HSF que se une al DNA puede detectarse unos minutos después de la elevación de la temperatura. En células de mamíferos e invertebrados, la activación de los HSF comprende una serie de pasos que incluyen oligomerización, adquisición de la capacidad de unión al DNA, traslado al núcleo e incremento de la actividad transcripcional. Además, el HSF aislado de células de levadura y células humanas que han sufrido un choque térmico, está fosforilado. Se han identificado varios HSFs en células de mamíferos. Usando anticuerpos policlonales que reconocen específicamente al HSF1 o al HSF2, se ha demostrado que el HSF1 es el activador de la transcripción génica en respuesta a temperaturas altas, metales pesados y análogos de aminoácidos, mientras que el HSF2 no parece activarse por estos inductores (14). El HSF1 manifiesta varias propiedades de acuerdo con su papel, que incluyen actividad de unión al DNA inducida por estrés, oligomerización y traslocación al núcleo, características que no se dan en el HSF2. Se sugiere que el HSF2 puede intervenir en la activación de la expresión de los genes del choque térmico en ausencia de estrés fisiológico, quizás durante la diferenciación o el desarrollo (12, 22).

Los HSF presentan dos regiones muy conservadas: un dominio NH<sub>2</sub>-terminal de unión al DNA de unos 100 aminoácidos y un dominio adyacente de trimerización de repeticiones hidrofóbicas (cremalleras de leucina), que por estudios físicos se sugiere que son capaces de formar interacciones hidrofóbicas enrolladas. Para los eucariotas superiores existe un cuarto dominio escalera, cercano al término COOH, que parece interactuar directamente con la escalera de leucina más cercana al dominio NH<sub>2</sub>-terminal, previniendo así la trimerización bajo condiciones no estresantes (Figura 3). El dominio COOH, aunque menos conservado en su secuencia, constituye el dominio de activación de la transcripción.

La activación del HSF puede también involucrar factores celulares que actúen como sensores intermediarios para regular la actividad de los HSFs. Las HSP por sí mismas parecen participar en esta regulación; así, el HSF se mantiene en un estado de no unión con el DNA en condiciones no estresantes por la interacción con HSP 70 (12, 23). Durante un choque térmico, la aparición de proteínas desnaturadas o mal plegadas crea un gran acúmulo de nuevos sustratos proteicos que pueden competir con el HSF por la asociación con la HSP 70. De esta forma, el choque térmico y otros tipos de estrés inician los acontecimientos que eliminan la influencia negativa del HSF en la actividad de unión al DNA (24).

### 3. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS ANTI-ESTRES

Las proteínas anti-estrés en los mamíferos se suelen dividir en dos grandes grupos en base a su modo de inducción: las proteínas del choque térmico (HSP) y las proteínas reguladas por glucosa (Grp) (1, 8). En general, ambos grupos se identifican y denominan en base a su tamaño molecular determinado por SDS-PAGE (Tabla I). Las HSP se clasifican en la práctica dentro de familias y aunque

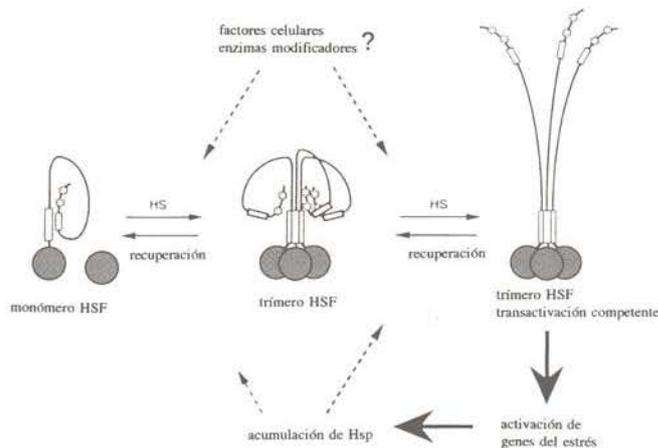


Figura 3. **Modelo de regulación del HSF.** La activación del HSF se verifica al desenmascarse el dominio de trimerización (rectángulos grandes) y el dominio de transactivación (estrellas). La supresión del dominio de trimerización implica las interacciones intramoleculares (rectángulos grandes y pequeños) debidas al enrollamiento. Las interacciones que suprimen la región transactivadora pueden ser intramoleculares, de acuerdo con la figura, o implicar otros factores. Los HSF de la levadura de gemación son constitutivamente triméricos y se regulan sólo por transactivación. El dominio terminal  $\text{NH}_2$  de unión al DNA se muestra como círculos oscuros y el dominio terminal  $\text{COOH}$  de interacción en el enrollamiento, se muestra como rectángulos pequeños (16).

los límites entre estas familias no están muy bien definidos, esta clasificación ayuda a organizar las nuevas HSP. Además, las proteínas de una familia pueden interactuar con otras proteínas, denominadas cohortes o cofactores y éstas pueden diferir sustancialmente en la masa molecular.

El conocimiento de la estructura y función de las proteínas anti-estrés ha avanzado mucho en los últimos años y en ocasiones por caminos insospechados. Así, se descubrió que muchas proteínas cuyas funciones ya se habían definido, se sintetizaban a los más altos niveles cuando las células experimentaban estrés (8). La ubiquitina, un polipéptido pequeño de aproximadamente 8 kDa involucrado en la degradación de proteínas, se sintetiza a niveles relativamente altos después de una agresión térmica. La HSP56, caracterizada inicialmente como parte de un complejo proteico que se une a receptores de las hormonas esteroideas (25) y que ahora se sabe que se une a inmunosupresores como el FK 506 y la rapamicina (26), muestra una expresión incrementada después del estrés (27). Otros ejemplos de proteínas que se han identificado como miembros de la familia de las proteínas anti-estrés incluyen: la hemooxigenasa, involucrada en catalizar la ruptura del grupo hemo dentro de la biliverdina; el producto del gen *mdr* de resistencia a fármacos, la P-glicoproteína, un transportador de membrana involucrado en la resistencia a muchos agentes quimioterapéuticos frente al cáncer; las  $\alpha$ -B-cristalinas, componentes integrales de la estructura de las lentes y ahora reconocida su presencia en otros tipos

Tabla I. Proteínas anti-estrés

Nombre	Tamaño (kDa)	Hom. bacterial	Localización
Ubiquitina	8	—	Citosol, núcleo
HSP10	10	Gro ES	Mitocondria, cloroplastos
HSP de bajo peso molecular	20-30	Homólogos recientemente identificados	Citosol, núcleo
HSP47	47	—	Retículo endopl.
HSP56	56	—	Citosol
HSP60	60	Gro EL	Mitocondria, cloroplastos
TCP-1	60	Gro EL	Citosol, núcleo
HSP72	70	Dna K	Citosol, núcleo
HSP73	70	Dna K	Citosol, núcleo
Grp 75	70	Dna K	Mitocondria, cloroplastos
Grp 78 (BiP)	70	Dna K	Retículo endopl.
HSP90	90	HtpG	Citosol, núcleo
HSP104/110	104/110	Familia del Clp	Citosol, núcleo

celulares; y al menos dos enzimas glicolíticas, la enolasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Para alguna de estas proteínas se tienen indicios de por qué se inducen por una situación de estrés. Así, la vía glicolítica proporciona una vía de energía esencial en el caso de que exista un desacoplamiento en la respiración aeróbica, resultado que a menudo tiene lugar después del estrés. Como consecuencia, el incremento en la síntesis de los mencionados enzimas glicolíticos puede facilitar la demanda de la vía glicolítica en las células sometidas al estrés. De manera similar, mayores niveles de ubiquitina pueden proporcionar a la célula estresada una capacidad incrementada para reconocer y degradar proteínas dañadas irreparablemente (27).

Un incremento en la expresión de los miembros de la familia Grp se observó por primera vez en células privadas de glucosa. Más tarde se demostró que la expresión de las Grp también se eleva en células tratadas con ionóforos de calcio, cuando se someten a condiciones similares a la anoxia o en respuesta a la adición de agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol (17). Cabe resaltar que muchos de los agentes inductores de las Grp afectan de modo adverso la secreción proteica; quizás no es del todo sorprendente ya que, la mayoría de las Grp se encuentran localizadas en el interior del retículo endoplásmico y participan en varios aspectos de la secreción proteica. Miembros de la familia Grp incluyen la Grp 78, la Grp 94 y una proteína de 150-170 kDa denominada Grp 170. Los datos obtenidos hasta la fecha sugieren que la Grp 170 es retenida en el retículo endoplasmático donde se expresa constitutivamente pudiendo jugar un papel en el plegamiento y ensamblaje de inmunoglobulinas en cooperación con la Grp 78 y la Grp 94 (8, 17).

Como se muestra en la Tabla I, el número de proteínas cuya expresión se eleva en células eucarióticas después del estrés metabólico, es bastante amplio y continúa creciendo siendo quizás, el descubrimiento más sorprendente aquel que otorga a las proteínas anti-estrés un papel en la biogénesis de proteínas (23-25). A este respecto, se ha demostrado que dos familias de proteínas anti-estrés, las familias de la HSP 60 y de la HSP 70, cada una de ellas consistente en miembros múltiples que se expresan constitutivamente en todas las células, participan directamente en varios aspectos de la maduración proteica. Miembros de la familia HSP 70, distribuidos a través de varios compartimentos subcelulares y expresados en células crecidas en condiciones normales incluyen: la HSP 73 (HSP 70 constitutiva, HSC 70 o HSP 70 afín), presente en el citoplasma y núcleo; la Grp 75, un componente de la mitocondria; y la Grp 78 o BiP, residente en el retículo endoplásmico. Además, en condiciones de estrés metabólico, otra forma de HSP 70, la denominada HSP 72 es inducible y exhibe una homología considerable con la HSP 73 y como ésta reside en el núcleo y en el citoplasma. En levaduras, las proteínas SSA1-4, KAR2 y SSC1 son los homólogos de la HSP 70 en el citosol, retículo y mitocondria, respectivamente. En bacterias, el homólogo de la HSP 70 es la proteína DnaK que tiene dos cofactores, DnaJ y GrpE (27, 30).

Los miembros de la familia HSP 70 se unen al ATP a través de un dominio aminoterminal muy conservado cuya estructura es muy similar a la de otras dos proteínas que se unen al ATP, la actina y la hexoquinasa. Además, las HSP 70 parece que se unen, *in vitro*, por su dominio carboxiterminal, a proteínas desplegadas y polipéptidos cortos, e interaccionan, dentro de su propio compartimento subcelular con otras proteínas celulares que se están sintetizando en el ribosoma o trasladándose a los orgánulos. Esto permite sugerir que las HSP 70 intervienen en los estados iniciales de la maduración proteica por unión y estabilización del estado desplegado de nuevas proteínas sintetizadas. Una vez que finaliza la síntesis o la traslocación de la nueva proteína, la HSP 70 se libera, en presencia de ATP, lo cual permite que la proteína comience su plegamiento y/o ensamblaje (27, 30).

De manera similar, los miembros de la familia HSP 60 se unen al ATP e interaccionan transitoriamente con los polipéptidos desplegados (29, 30). En células animales y vegetales se han observado formas relacionadas con la HSP 60, tanto en mitocondrias como en cloroplastos. Como su homólogo en bacterias, la proteína GroEL, los miembros de la familia de la HSP 60 se caracterizan por su estructura a modo de anillo, que a menudo se encuentra *in vivo* como dos anillos alineados, uno encima del otro. Además de unirse a proteínas desplegadas, los elementos de esta familia parece que catalizan el plegamiento y el ensamblaje proteico. En conjunción con un cofactor de unos 10 kDa (GroES en bacterias), la HSP 60 se une a una proteína desplegada y facilita el plegamiento. Estudios de microscopía electrónica han revelado que la proteína que se está plegando se encuentra dentro de la cavidad central del doble anillo de la HSP 60. Se ha sugerido que la proteína adquiere su estructura plegada final, vía múltiples rondas de liberación y reunión, que requieren la energía suministrada por la ruptura enzimática del ATP. Después de esta serie de uniones y desuniones, la proteína sufre cambios conformacionales que la conducen a un estado estable y correctamente plegado, impidiéndose entonces la unión con su carabina particular (26). Estudios recientes indican que pueden existir ocho o más homólogos de la HSP 60 denominados familia del TCP-1 (*t*-complex polypeptide 1) o TRiC (TCP-1 ring complex) dentro del citoplasma de levaduras y células animales (27). Las proteínas de esta familia se denominan *chaperoninas*, siendo todas ellas grandes complejos cilíndricos que promueven el plegamiento proteico en el interior de su cavidad central (28).

Las observaciones respecto a la estructura y función de las HSP 60 y HSP 70, han obligado a reconsiderar los primeros modelos sobre el plegamiento de las proteínas. Los trabajos de Anfinsen (33) en los años cincuenta y sesenta establecieron el principio del «autoensamblaje» proteico según el cual, la información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína residía en su secuencia primaria de aminoácidos. Las investigaciones con la HSP 60 y HSP 70 conducen a afirmar que el plegamiento y/o ensamblaje *in vivo* de una proteína puede ocurrir por «autoensamblaje asistido», con la ayuda de las carabinas moleculares, como las HSP 60 y HSP 70 (30, 34), que funcionan por vías que no contradicen el principio del ensamblaje propio. Por ejemplo, mientras no exista ninguna información específica para el plegamiento, las carabinas participan en el proceso previniendo interacciones intra o intermoleculares impropias o improductivas que podrían conducir a una pérdida del plegamiento y/o agregación, asegurando una elevada fidelidad y eficiencia en el plegamiento/ensamblaje. De hecho, muchos investigadores sugieren que las HSP 60 y HSP 70 pueden actuar coordinadamente facilitando la maduración proteica. Así, mientras una nueva proteína sintetizada emerge del ribosoma, la cadena nascente se estabiliza en un estado desplegado vía su interacción con la HSP 70 citosólica. Una vez finalizada su síntesis, el polipéptido comienza directamente su plegamiento o se transfiere a un miembro de la familia de las carabinas donde tiene lugar el plegamiento y ensamblaje con otros componentes proteicos (Figura 4).

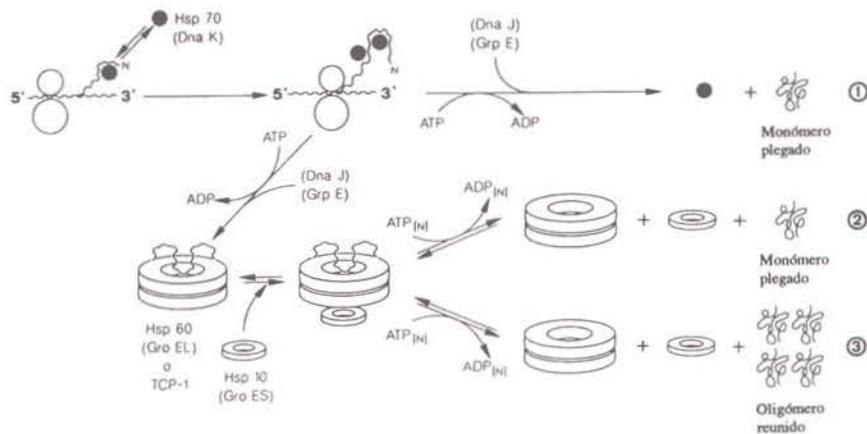


Figura 4. Modelo que explica cómo las carabinas moleculares facilitan el plegamiento y ensamblaje proteicos. Durante la síntesis proteica, la HSP 70 (DnaK) interacciona con la cadena nascente que emerge del ribosoma. Tal interacción previene un plegamiento prematuro o una interacción inapropiada con componentes de la maquinaria traduccional. (1) Para algunas proteínas, el plegamiento del polipéptido debe comenzar una vez liberado de su carabina HSP 70 y no necesita posterior ayuda. La separación de HSP 70 está mediada, probablemente, por factores adicionales, como el DnaJ y el GrpE. (2) Otras proteínas recién sintetizadas, quizás todavía unidas a HSP 70 (DnaK), se transfieren a su carabina particular (HSP60, GroEL, PCP1). De nuevo, la liberación y/o la transferencia del polipéptido de HSP70, requiere la participación de DnaJ y GrpE. La unión del polipéptido desplegado a HSP60 propicia la incorporación de la HSP 10 (GroES) al complejo HSP 60-proteína. El plegamiento del polipéptido dentro de la cavidad de la carabina, puede implicar una serie de rondas de unión y liberación del sustrato, dependientes del ATP. (3) Finalmente, es posible que HSP 60, GroEL o TCP-1, participen preferentemente en el doblaje o ensamblaje de sólo aquellas proteínas que son parte de estructuras homo o heterooligoméricas (27).

De igual manera, cuando una proteína recién sintetizada se traslada desde el citoplasma al interior de un orgánulo, lo hace en un estado relativamente desplegado, acompañada, probablemente, por una HSP 70 citosólica. Tan pronto como la proteína se encuentre en el orgánulo, será reconocida por una forma organular de la HSP 70 y así podrá mantenerse en una conformación no plegada. Al finalizar el traslado, el polipéptido se plegará, bien de manera espontánea o se transferirá sobre un miembro de la familia de las carabinas donde comenzará el plegamiento y/o ensamblaje con otros polipéptidos (Figura 5). Una variación del concepto de carabina, puede ser otra proteína del estrés constitutivamente expresada, la HSP 90, que al parecer interacciona de manera transitoria con ciertas proteínas. Por ejemplo, durante el curso de la investigación sobre la vía de maduración de la p60<sup>src</sup>, la tirosina proteína quinasa del virus del sarcoma de Rous, se observó que la p60<sup>src</sup> recién sintetizada, interaccionaba con dos proteínas citosólicas, una la HSP 90 y la otra un componente de 50 kDa, aún no identificado. Mientras se encuentra en el citoplasma, unida a sus dos acompañantes, la p60<sup>src</sup> permanece inactiva. Una vez que el complejo alcanza el lado interno de la membrana plasmática, la p60<sup>src</sup> se

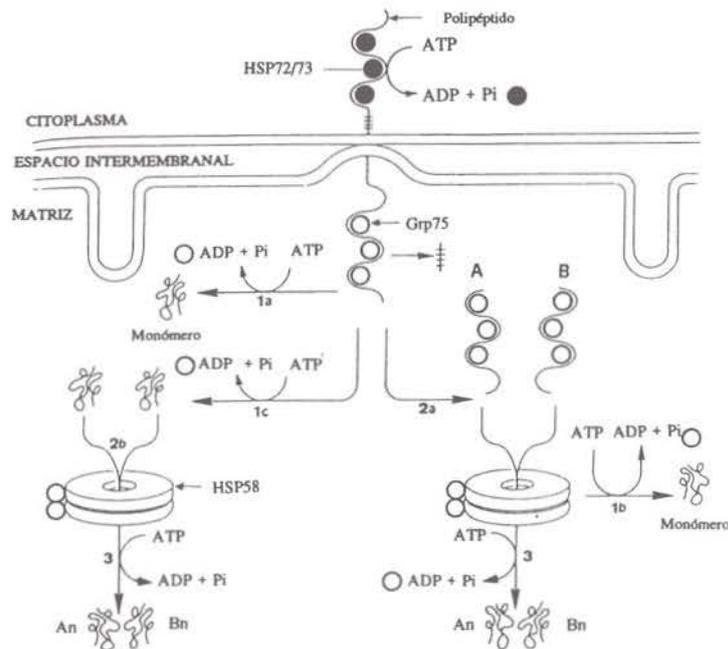


Figura 5. Modelo que describe el papel de la Grp75 y la HSP60 en el ensamblaje y plegamiento de proteínas mitocondriales. Las proteínas recién sintetizadas destinadas a las mitocondrias se mantienen en el citosol en estado desplegado competente para la traslocación mediante su interacción con las HSP citosólicas. La traslocación del polipéptido a la mitocondria se acompaña de la liberación, dependiente de ATP, de las HSP72 y HSP73. A medida que el polipéptido entra en la mitocondria se une a Grp75 hasta que la secuencia señalizadora mitocondrial se elimina por una peptidasa. Cuando todo el polipéptido se encuentra dentro, comienza el plegamiento y la liberación, dependiente del ATP, del Grp75 (1A). Para algunas proteínas monoméricas el plegamiento puede depender de una interacción con HSP58 (1B). Para el ensamblaje de las proteínas oligoméricas, el Grp75 se libera del monómero (1C); el monómero se dirige hacia HSP58 (2B) y se ensambla en su forma oligomérica (3). Alternativamente, el monómero, todavía unido a Grp75, se dirige hacia HSP58 (2A) y se ensambla en su forma oligomérica (3) (27).

libera y permanece parcialmente integrada en la membrana donde es activa. Una vía similar, aunque menos conocida, caracteriza a otras tirosina proteína quinasa oncogénicas codificadas por retrovirus (36). Hasta la fecha se desconoce el papel biológico de la HSP 90 en la maduración y/o regulación de estas proteína quinasa. Sin embargo, se ha demostrado que la HSP 90, junto con otros miembros de las proteínas del estrés (HSP 70, HSP 56), interacciona con varios receptores de las hormonas esteroideas (36). Al igual que ocurre en las proteína quinasa codificadas por virus, los receptores esteroideos parece que se mantienen en estado inactivo unidos a un complejo proteico que incluye la HSP 90. La unión de la hormona esteroidea inicia una serie de acontecimientos entre los cuales, la HSP 90 se libera y permite la oligomerización del receptor y por lo tanto la adquisición de la con-

formación de unión al DNA. En resumen, estas observaciones ponen de manifiesto el papel de la HSP 90 en la regulación de la actividad biológica de proteínas con las que interacciona transitoriamente.

Miembros de las HSP de bajo peso molecular (20-30 kDa) exhiben propiedades similares a las carabinas moleculares, facilitando el plegamiento rápido de un polipéptido diana (37). A diferencia de las otras carabinas bien definidas (HSP 60 y HSP 70), las HSP de bajo peso molecular no parece que se unan al ATP. A pesar de ello, estas HSP pueden ser importantes reguladores del citoesqueleto de la actina. Por ejemplo, las únicas HSP de bajo peso molecular en células de mamíferos, las HSP 28, HSP 27 o HSP 24, actúan, como inhibidores de la polimerización de la actina y como promotores de la desorganización de los filamentos de actina ya formados *in vitro* (38). La sobreexpresión *in vivo* de la HSP 28 de mamíferos, da como resultado una aparente estabilización de las fibras con actina (39, 40).

Por último, la HSP 110 se expresa constitutivamente y se encuentra en pequeñas concentraciones en el citoplasma, núcleo y nucleolo de células de mamíferos (8). Su homóloga en levaduras es la HSP 104. El conocimiento hasta la fecha de la HSP 110 indica que juega un papel importante en la supervivencia celular en condiciones extremas, así como en la termotolerancia adquirida, estado caracterizado por la capacidad de sobrevivir a una temperatura letal tras la exposición previa a una temperatura subletal. Los representantes de esta familia en *E. coli* son las proteínas Clp: Clp A y Clp X que sirven como cohortes de la proteasa Clp P (17).

Establecido el papel de carabinas moleculares para ciertas proteínas antiestrés, cabe preguntarse la causa por la cual tales proteínas elevan su expresión en situaciones de tensión. Posiblemente la mayor concentración de estas proteínas ofrezca a las células un medio para identificar y facilitar el nuevo plegamiento de proteínas afectadas de manera adversa por la agresión metabólica, unirse a proteínas plegadas incorrectamente para su presentación a un sistema proteolítico apropiado, y facilitar la síntesis y maduración de nuevas proteínas necesarias para reemplazar a las que han sido dañadas irreversiblemente por el trauma metabólico.

#### 4. ESTRES OXIDATIVO Y PROTEINAS DEL ESTRES

El estrés oxidativo tiene lugar como consecuencia de una elevada producción de especies reactivas de oxígeno. Pueden detectarse incrementos en la generación de estas especies en células expuestas a diferentes estímulos: luz UV, bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  y la IL-1, etc (41). Además de su papel como agentes citotóxicos cuando su producción es excesiva, por ejemplo, en el caso de los neutrófilos durante procesos inflamatorios (42), las especies activas de oxígeno actúan como segundos mensajeros en diferentes mecanismos de transducción, como son aquellos mediados por la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (43).

Una cuestión importante que acapara la atención de muchos investigadores es si las HSP juegan un papel en la protección de las células frente al estrés oxidativo que ellas mismas generan (44, 45). Las células que producen elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno, se exponen a su propia toxicidad y deben contar con un equipo de mecanismos protectores y puede que las HSP sirvan para tal función y representen una clase original de proteínas con capacidad antioxidante. La posibilidad de que las HSP formen parte de los mecanismos protectores frente al estrés oxidativo, viene avalada por una serie de observaciones que incluso ha llevado a varios autores a sugerir que las especies reactivas de oxígeno actúan como moduladores o segundos mensajeros en la respuesta al estrés (46, 47).

Se ha observado que las células o los tejidos sometidos a estrés oxidativo inducen la síntesis *in vivo* e *in vitro* de las HSP. Así, el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir una respuesta al estrés en células humanas *in vitro*, mientras que el daño por isquemia-reperfusión induce la síntesis de las HSP *in vivo* (47, 48). La isquemia se asocia con una disminución de los niveles de ATP por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que da lugar a la acumulación de xantina e hipoxantina. Estos sustratos se metabolizan normalmente por acción de la xantina deshidrogenasa, pero durante la isquemia y en presencia de calcio, este enzima actúa como xantina oxidasa. En casos de isquemia/reperfusión, la xantina se metaboliza por la xantina oxidasa, y da lugar a grandes cantidades de anión superóxido. El exceso de estos radicales de oxígeno son la causa de la inducción de las HSP en el órgano isquémico, lo cual se ha demostrado en varios modelos animales. Se ha observado que los roedores y conejos sometidos a una hipertermia causante de la elevación de HSP en corazón, sufren menor daño miocárdico cuando se someten a un episodio de isquemia/reperfusión (49, 50).

Todos los organismos aerobios poseen mecanismos de defensa antioxidante para prevenir el daño oxidativo. Bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* se adaptan a los efectos letales de los oxidantes por la inducción de los genes del estrés bajo el control de OxyR para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y SoxR para el anión superóxido. Es interesante destacar que tres de las nueve proteínas dependientes de OxyR son también inducibles por el calor y se ha descrito un mutante de *Salmonella typhimurium*, OxyR1, que es resistente a una gran variedad de agentes oxidantes y que constitutivamente expresa las HSP (46).

Otros argumentos en favor del papel protector de las HSP frente al daño oxidativo son: la protección parcial por un choque térmico de la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una línea premonocítica humana U937 y de la muerte celular inducida por oligomicina en células DS7 (52, 53); la protección por un choque térmico de la estimulación con glutamato en un modelo usado *in vitro* para conseguir un daño isquémico (oxidativo) en células neuronales (54), la protección de una hipertermia frente al daño inducido por la exposición a la luz (mediado por oxidación) en retina de rata (55); así como también la identificación de una proteína de 32 kDa, la hemoxygenasa, específica de la oxidación del grupo hemo, como un enzima con propiedades antioxidantes (56).

El choque térmico previene las alteraciones en el potencial de membrana, en la masa y en la ultraestructura inducidas en la mitocondria por el  $H_2O_2$ . Esto parece indicar que este orgánulo representa una diana selectiva para la protección, por choque térmico, frente al daño oxidativo (57). También se ha demostrado que tras un choque térmico, la HSP 70 se traslada al núcleo acumulándose transitoriamente en el nucleolo. Por el contrario, cuando lo que se adiciona es  $H_2O_2$ , la traslocación nuclear es diferente y puede correlacionarse con el daño al DNA por radicales de oxígeno (58).

El papel que las HSP puedan jugar como atrapadores (scavengers) de las especies reactivas de oxígeno, podría ser de particular importancia en aquellas condiciones en las que los clásicos sistemas antioxidantes, superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, catalasa, vitamina E, etc., sean insuficientes. Por ejemplo, la depleción del glutathion potencia la inducción de las HSP (59). La iodoacetamida es un típico agente alquilante citotóxico que reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas para formar aductos S-acetamido tioeter. Aunque la formación de aductos se asocia con la síntesis de las HSP y la muerte celular, la unión covalente de la iodoacetamida no causa la muerte celular directamente, sino que ésta va unida a una depleción del glutathion, estrés oxidativo y peroxidación lipídica. Usando este compuesto se ha observado que la perturbación en el estado redox tiólico puede ser una señal importante para la activación de la respuesta al estrés común a aquellos tóxicos que forman intermediarios reactivos. La pérdida de GSH favorece la oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas por formación de puentes disulfuro, proteína-S-S-proteína o proteína S-SG (Figura 6). Esta mezcla de proteínas oxidadas parece que se encuentra involucrada en la activación del HSF1 y en el aumento de la transcripción de los genes hsp. Por otro lado, la protección que las HSP ejercen sobre la citotoxicidad inducida por  $TNF\alpha$ , parece también estar en relación con su capacidad de mantener la concentración intracelular del glutathion (60). Sería interesante determinar si es éste un mecanismo general de activación del HSF1 con aplicación a los agentes tóxicos reactivos.

Otra situación que puede reforzar esta hipótesis es la que representa la selectiva inducción de las HSP por interleuquina-1 (IL-1) en los islotes de Langerhans (61). Comparadas con otras células, las células de los islotes pancreáticos contienen pequeñas cantidades de los sistemas enzimáticos antioxidantes superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa. Así, la selectiva citotoxicidad de la IL-1 en estas células podría relacionarse con la insuficiente capacidad de estas células para producir los clásicos antioxidantes representando la síntesis de las HSP una respuesta antioxidante alternativa.

Por tanto, los mecanismos de protección de las HSP podrían incluir: la prevención de la degradación de proteínas y de la peroxidación lipídica de las membranas, el mantenimiento de los niveles de ATP, la inducción de los enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o de moléculas como el glutathion y la inhibición de cualquiera de los múltiples pasos involucrados en la muerte celular inducida por un

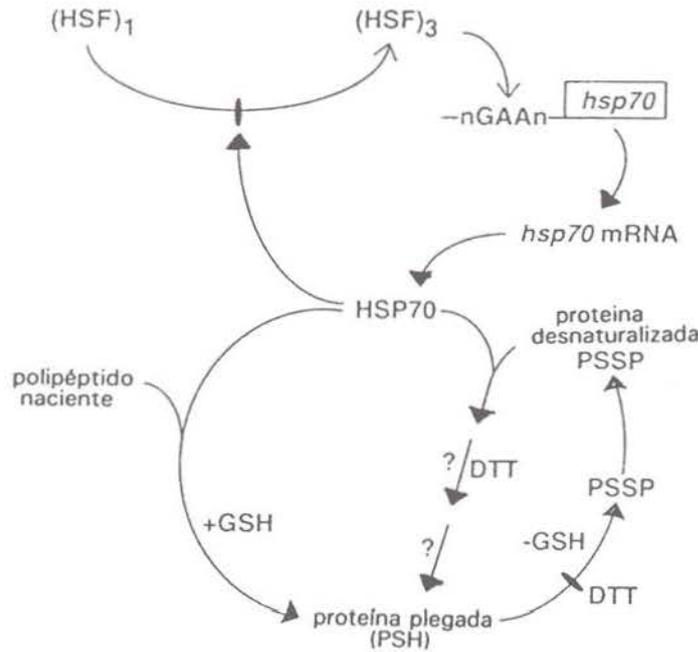


Figura 6. Estado redox tiol-disulfuro como señal para activar el HSF1 por agentes alquilantes. Los estados monoméricos y triméricos del HSF1 se muestran como (HSF)<sub>1</sub> y (HSF)<sub>3</sub>, respectivamente. PSSP y PSH indican proteínas disulfuro y proteínas tiol, respectivamente. -nGAA n representa el elemento DNA de un HSE. La barra que cruza una flecha indica un punto de inhibición. DTT = ditiotreitól, agente reductor (59).

daño oxidativo como puede ser el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y el mantenimiento de la ultraestructura celular (62).

A pesar de que las especies reactivas de oxígeno se consideran como un segundo mensajero ubicuo en la inducción de las HSP, se ha investigado la implicación de estas especies endógenas sobre la síntesis de las HSP (63,64). La fagocitosis a través de la activación de la NADPH oxidasa que genera cantidades masivas de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ha servido de modelo para estudiar en monocitos de sangre periférica la inducción de las HSP (63). Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que no es la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> la responsable directa de la inducción de las HSP durante la fagocitosis, sino el radical hidroxilo resultante de la transformación del radical superóxido en <sup>•</sup>OH en presencia de hierro. Sólo el <sup>•</sup>OH tiene capacidad de oxidar las proteínas de forma similar a la la agresión térmica, siendo la presencia de proteínas alteradas la señal última para la inducción de las HSP. Existe una diferente inducción de la expresión según que el estímulo sea la agresión térmica o la activación de la proteína quinasa C (PKC) por el éster de forbol, PMA. En el primer caso se inducen todas las HSP clásicas, HSP 110, HSP 90, HSP 70, HSC 70, HSP 65 etc., y en el segundo se induce la HSP 90 y en menor grado la mezcla

HSC 70 y HSP 70. Esto es consecuencia de la implicación de dos segundos mensajeros distintos y diferentes mecanismos de regulación molecular de la expresión de las HSP. La regulación de la inducción de las HSP por la agresión térmica implica principalmente acontecimientos transcripcionales, mientras que la inducción de las HSP mediada por el PMA (mitógenos) se verifica por un mecanismo post-transcripcional que estabiliza el mRNA (63, 65).

## 5. PROTEINAS DEL ESTRES Y HEPATOTOXICIDAD

El estudio de los mecanismos que intervienen en la respuesta al estrés, presenta un gran interés en el campo de la toxicología. Con el objeto de descubrir ensayos rápidos así como de reducir el uso de animales, los toxicólogos tratan de utilizar los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, en células *in vitro*, como indicadores sensibles y fiables de los efectos tóxicos de determinados xenobióticos. Mediante el recurso de las técnicas de DNA recombinante, se han construido líneas celulares «chivatas» para el estrés, que han de poder utilizarse en un futuro muy próximo para detectar riesgos biológicos. En esas células, las secuencias de DNA que controlan la actividad de los genes de proteínas anti-estrés se han unido a un gen que determina la síntesis de un enzima, por ejemplo, la beta-galactosidasa. Cuando las células experimentan algún tipo de estrés metabólico y producen más proteínas anti-estrés de lo normal, sintetizan el enzima chivato, el cual se detecta fácilmente con una prueba bioquímica. Una aplicación de este tipo de tecnología es el desarrollo de animales transgénicos preparados para esa respuesta. Por ejemplo, el control del promotor de una proteína de choque térmico para conducir la expresión de un gen tal como la luciferasa o la  $\beta$ -galactosidasa, puede utilizarse en la monitorización de contaminantes ambientales (66). Aunque todas estas propuestas se encuentran aún en investigación y requieren ser validadas, la explotación de los cambios en la expresión de las proteínas del estrés, así como de otros productos de los genes asociados con daño celular (metalotioninas, sistema del P-450) podría ser de gran aplicación en el campo de la toxicología (67). Las HSP pueden jugar un papel importante en la síntesis proteica, regeneración y carcinogénesis hepáticas puesto que, la expresión de las HSP 25, 60, 70 y 90 se ha identificado en hígado; la HSP 70 se induce en ratas hepatectomizadas y en hepatocitos proliferantes y la HSP 25 se sobreexpresa en adenocarcinoma en el hígado (68).

Se ha estudiado el efecto de la hipertermia *in vivo* sobre la expresión y regulación de los genes *hsp* en hígado, encontrándose una rápida respuesta en la transcripción de la HSP 70 (69). También se ha encontrado que la transcripción de la HSP 70 se induce notablemente en el estadio prereplicativo de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial, lo cual involucra a estas proteínas en los estadios tempranos de la regeneración hepática (70). La lesión lipoperoxidativa causada por exposición de hepatocitos aislados a 4-hidroxinonenal se ha observado que induce la expresión de la proteína HSP 31 dependiendo de la dosis (71). Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que una de las HSP más abundantes, la HSP 72, se

induce en hígado de ratas por efecto de sustancias hepatotóxicas tales como el halotano. Este anestésico altera la distribución subcelular de las HSP entre citoplasma y núcleo, la cual se ha podido detectar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis de Western-blot con anticuerpos anti-HSP 70, que reconocen, tanto a la forma constitutiva HSP 73, como a la inducible HSP 72, ha revelado que la HSP 72 se induce y se transloca al núcleo en aquellas células expuestas a halotano previo tratamiento con fenobarbital y en condiciones de hipoxia (72). Trabajos más recientes han puesto de manifiesto que existe una relación entre la lesión oxidativa del DNA y la translocación de la HSP 70 al núcleo (58). Andoh *et al.* (73) han detectado la presencia de la HSP 70 en hígado de rata con necrosis y regeneración inducida por tioacetamida. Con anticuerpos específicos estos autores han observado que no es en el núcleo de los hepatocitos destinados a sufrir la necrosis, en la región venosa del acino, donde se concentra la HSP.

Omar *et al.* (74) han demostrado que la HSP 70, que se encuentra fuertemente asociada a estructuras citoesqueléticas que se lesionan por el etanol, aparece en hepatocitos de alcohólicos, lo que apunta la intervención de esta HSP en la patogénesis alcohólica y en la desestabilización del citoesqueleto. La naturaleza del papel de la HSP 70 no está clara, pero la presencia de otra HSP, la ubiquitina, que se conjuga con proteínas lesionadas por efecto del etanol, marcándolas para su rápida proteólisis (75), hace pensar en una posible implicación de la HSP 70 en la eliminación de proteínas alteradas. Objetivos de la ubiquitina son a menudo las proteínas citoesqueléticas lesionadas de los cuerpos de Mallory (75).

En pacientes con hepatitis alcohólica, Koshinas *et al.* (76) han demostrado que la HSP 60 aparece en el citosol de los hepatocitos, de manera difusa y que en estas condiciones de intoxicación aguda se elevan los niveles circulantes del anticuerpo IgA de la HSP 60, lo cual puede apuntar hacia un mecanismo patogénico que subyace en el desarrollo y progresión de la lesión hepática alcohólica. En este caso se demuestra que las HSP, normalmente protectoras, pueden ser inmunogénicas. En un estudio previo (74) se identificó una HSP 70 en hígado de pacientes con enfermedad hepática alcohólica, pero no se detectaron anticuerpos circulantes frente a dicha HSP 70. El reciente hallazgo de que las HSP se expresan en las membranas en condiciones de estrés es de importancia crítica en el contexto de un anticuerpo IgA circulante (77). Diversos factores que estimulan la expresión de las HSP se generan en los alcohólicos: el factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$  y las especies reactivas de oxígeno. Ambos se producen en áreas de inflamación. El metabolismo hepático del etanol al elevar el consumo de oxígeno induce una hipoxia localizada, lo cual supone un estímulo potente para la expresión de las HSP selectivamente localizada en la región centrilobular.

Otra HSP encontrada en hígado es la HSP 47, una glicoproteína cuya expresión se induce en células de mamíferos, que posee la capacidad de unirse a colágeno nativo tipos I y IV y que en hígado se expresa en las células Ito (78). Las células Ito o células hepáticas estrelladas se encuentran estrechamente asociadas al meta-

bolismo del colágeno lo que hace pensar que la HSP 47 puede actuar en ellas a modo de carabina específica para el procolágeno. La expresión preferente de la HSP 47 en estas células parece relacionarse con la capacidad de estas células para producir colágeno, ya que esta HSP no aparece en otras células hepáticas, como los hepatocitos o las células de Kupffer (78).

Los clofibratos son una familia de compuestos hipolipidémicos que inducen una variedad de respuestas *in vivo*, incluyendo la proliferación de peroxisomas en células parenquimales hepáticas, la hepatomegalia y la hepatocarcinogénesis. Estos compuestos no son mutagénicos *per se*, por lo que se ha propuesto que la hepatocarcinogénesis inducida por clofibrato puede resultar de las alteraciones metabólicas relacionadas con la proliferación de peroxisomas. En estudios en los que se aislaron proteínas de unión al clofibrato, se demostró que esta clase de compuestos interacciona específicamente con la HSP 70 en sus dominios de unión al ATP o cercano a éstos (79). Hasta el momento se desconocen las consecuencias de tales interacciones, pero es posible que los ésteres del ftalato puedan interferir con la función de la HSP 70 y por tanto, inhibir la biogénesis organular.

Como se comentó anteriormente, la inducción de los genes del estrés en las células eucarióticas tiene lugar por la unión al HSE del HSF que es activado bajo un choque térmico y que permanece inactivo en condiciones no estresantes, probablemente por pequeñas cantidades de HSP 70 constitutivamente presentes en el citoplasma. Este ejemplo de regulación negativa es bastante similar al control negativo llevado a cabo por el inhibidor I $\kappa$ B sobre el factor de transcripción NF $\kappa$ B. En cultivos tisulares NF $\kappa$ B puede ser activado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras especies de oxígeno así, como también por un choque térmico. La exposición del hígado de ratas a altas temperaturas activa además del HSF, el NF $\kappa$ B estando la activación de éste a diferencia del primero, mediada por la producción y liberación de IL-1 (80). Se ha demostrado que el tratamiento con ésteres de forbol da lugar a una resistencia en las células tumorales a la acción citotóxica del factor de necrosis tumoral, contribuyendo a la supervivencia de las células tumorales *in vivo*, y se ha observado que es la HSP70 la que protege a las células tumorales de la citotoxicidad del TNF- $\alpha$  incluso en ausencia de estrés (81).

## 6. HSP Y ENVEJECIMIENTO

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

La limitada capacidad de los organismos senescentes para responder a situaciones de estrés y para mantener la homeostasis, es un fenómeno observado durante

el envejecimiento en todos los organismos vivos (82). Se cree que en un organismo envejecido la falta de respuesta a la agresión es en gran parte la responsable del incremento en la morbilidad y mortalidad observada a medida que el organismo envejece.

Esta serie de modificaciones pueden comprometer seriamente la capacidad de responder a cambios en el ambiente. Por ello, la edad influye en la capacidad de las células para expresar las proteínas del estrés y así, los trabajos de Heydari *et al.* (82-86) demuestran que las ratas viejas poseen menor capacidad para expresar la HSP 70 en respuesta al calor. Debido a que el envejecimiento se caracteriza por una reducida capacidad del organismo de mantener la homeostasis frente al estrés, un gran número de investigadores ha comparado el comportamiento de las células viejas frente a las jóvenes, frente a la hipertermia y la expresión de las HSP. En hepatocitos aislados de ratas viejas, de 26 a 28 meses de edad, se ha detectado una menor capacidad de expresar las HSP 70 en respuesta a un choque térmico, siendo la síntesis de estas proteínas un 50% menor de aquella encontrada en hepatocitos aislados de ratas de 4 a 6 meses de edad. La inducción del mRNA de la HSP 70 también se encuentra reducida y ello se debe a la menor capacidad de los hepatocitos de convertir el HSF1 inactivo en su forma oligomérica activa (82). Las células de ratas viejas al poseer una menor concentración de HSF activo, es menor en ellas la cantidad de HSF que puede unirse al promotor del gen *hsp70*, con lo cual resulta disminuida la transcripción de dicho gen. La disminución de la actividad del HSF para unirse al HSE puede surgir de una menor activación post-traduccional (oligomerización) del HSF por el agente que origina el estrés. En otras palabras, aunque en condiciones normales las cantidades de HSF en los hepatocitos aislados de ratas jóvenes o viejas son similares, en respuesta al estrés la cantidad de HSF activo capaz de unirse al DNA, se encuentra muy reducida en los hepatocitos de ratas viejas. Un posible mecanismo que implique la menor actividad de unión del HSF al HSE, es que a medida que transcurre la edad se acumule una forma de HSF «anormal». Evidencias experimentales han mostrado que enzimas «alterados» pueden acumularse en células senescentes (87). Estas alteraciones surgen de cambios conformacionales, no de errores en la traducción y los cambios conformacionales en las proteínas de organismos senescentes ocurre a través de modificaciones post-sintéticas (oxidación, racemización de aminoácidos, desaminación, etc.) Estos cambios dan lugar a alteraciones sutiles que a veces no se reflejan en la actividad enzimática. Una acumulación de moléculas «anormales» de HSF, que presentan una capacidad disminuida para oligomerizarse en respuesta al estrés, puede explicar el por qué las células de los organismos senescentes pierden su capacidad de responder al estrés y expresar las HSP. Esta disminución en la capacidad de las células a expresar HSP, dependiente de la edad, puede ser uno de los factores que contribuya a la mayor incidencia de muerte en personas ancianas frente al estrés térmico o tóxico.

Por otro lado, la restricción calórica es la única manipulación experimental conocida que retrasa el envejecimiento e incrementa la supervivencia de animales

de laboratorio. La restricción calórica podría revertir el efecto del envejecimiento en la inducción de la transcripción de la HSP 70 en respuesta al choque térmico previniendo la acumulación de moléculas HSF1 alteradas que normalmente existen en ratas de avanzada edad alimentadas *ad libitum* (84).

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Lindquist S y Craig EA (1988), The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 22, 631-677.
2. Morimoto RI, Tissieres A y Georgopoulos C, eds (1990), *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Litossa F (1962), A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
4. Welch WJ (1992), Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1080.
5. Georgopoulos C y Welch WJ (1993), Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9: 601-636.
6. Hightower LE (1991), Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197.
7. Anathan J, Goldberg AL y Voellmy R (1986), Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232: 252-254.
8. Welch WJ (1992), Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081.
9. Lindquist S (1986), The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 151-1191.
10. Ang D, Liberek K, Showyra D, Zylicz M & Georgopoulos C (1991), Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* 266: 24233-24236.
11. Lis JT y Wu C (1993), Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* 74: 1-4.
12. Morimoto RI, Sarger KD y Abravaya K (1992), Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 267: 21987-21990.
13. Morimoto RI (1993), Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410.
14. Sorger PK (1991), Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65: 363-366.
15. Baler R, Dahl G & Voellmy R (1993) Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 13: 2486-2496.
16. Craig EA, Weissman J y Horwich AL (1994), Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78, 365-372.
17. Macario AJL (1995), Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* 25: 59-70.
18. Georgopoulos C, Liberek K, Zylicz M y Ang D (1994), Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. En: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 233-240.
19. Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroun RI, Kim SJ, Rabindran SK, Westwood JT, Wisniewski J e Yim G (1994), Structure and regulation of heat shock transcription factor. En: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 395-416.
20. Fernandes M, O'Brien T y Lis JT (1994), Structure and regulation of heat shock gene promoters. En: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto

- RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 375-393.
21. Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE, Mathur SK, Murphy SP, Nakai A, Sarge K, Abravaya K y Sistonen LT (1994), Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. En: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 417-455.
  22. Hunt C y Morimoto RI (1985), Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6455-6459.
  23. Sorger PK (1991), Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65: 363-366.
  24. Schlesinger M y Ryan C (1993), An ATP- and hsc 70-dependent oligomerization of nascent heat-shock factor (HSF) polypeptide suggests that HSF itself could be a «sensor» for the cellular stress response. *Protein Science* 2: 1356-1360.
  25. Yem AW, Tomasselli AG, Heinrikson RL, Zurcher-Neely H, Ruff VA, Johnson A y Deibel MR Jr (1992), The hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J Biol Chem* 267: 2868-2871.
  26. Sanchez ER (1990), A novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J Biol Chem* 265: 22067-22070.
  27. Minowada G y Welch WJ (1995), Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95: 3-12.
  28. Hartl FU (1996), Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580.
  29. Hartl FU, Martin J y Neupert W (1992), Protein folding in the cell: the role of chaperones hsp70 and hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 293-322.
  30. Georgopoulos C y Welch WJ (1993), Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9: 601-634.
  31. Langer T, Pfeifer G, Martin J, Baumeistere W y Hartl FU (1992), Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accomodates the protein within its central cavity. *EMBO J* 11: 4757-4765.
  32. Kubota H, Hynes G, Canne A, Ashworth A y Willison K (1994), Identification of six TCP-1 related genes encoding divergent subunits of the TCP-1 containing chaperonin. *Curr Biol* 4: 89-99.
  33. Anfinsen CB (1973), Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 8: 223-230.
  34. Ellis RJ y van der Vies SM (1991), Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60: 321-347.
  35. Brugge JS (1986), Interaction of the Rous sarcoma Virus protein, pp60<sup>src</sup>, with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr Top Microbiol Immunol* 123: 1-23.
  36. Smith DF y Toft DO (1993), Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7: 4-11.
  37. Jakob U, Gaestel M, Engel K y Buchner J (1993), Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517-1520.
  38. Miron T, Vancompernelle K, Vandkerckhove J, Wilchek M y Geiger BA (1991), 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biol* 114: 255-261.
  39. Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM y Landry J (1993), Induction of chinese hamster hsp27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock: hsp27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem* 268: 3420-3429.
  40. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA y Landry J (1993), Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268: 24210-24214.
  41. Klebanoff SJ (1988), Phagocytic cells: Products of oxygen metabolism. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. JI Gallin, IM Goldstein, R Snyderman, eds. Raven Press, New York, 391.
  42. Hurst JK y Barrete WC (1989), Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Cr Rev Bioch Mol Biol* 24: 271.

43. Schreck R y Baeuerle PA (1991), A role for oxygen radicals as second messengers. *TIBS* 1: 39-42.
44. Young DB y Elliot TJ (1989), Stress proteins: Infection and Immune Surveillance. *Cell* 59: 5-8.
45. Jacquier-Sarlin MR, Jornot L, Polla BS. Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem* 1995, 270: 14094-14099.
46. Mehlen P, Kretz-Remy C, Briolay J, Fostan P, Mirault M-E y Arrigo A-P (1995), Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 structural organization and phosphorylation in basal and tumour necrosis factor  $\alpha$ -treated T47D human carcinoma cells. *Biochem J* 312: 367-375.
47. Becker J, Mezger V, Courgeon A-M y Best-Belpomme M (1991), On the mechanism of action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cellular stress. *Free Rad Res Comms* 12-13: 455-460.
48. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissem FLJ, Welch WJ y Wolfe CL (1992), Heat shock protein induction in rat hearts: a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 85: 769-778.
49. Currie RW, Tanguay RM y Kingma JG (1993), Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 87: 963-971.
50. Yellon D, Iliodromitis ME, Latchman DS, Van Winkle DM, Downey JM, Williams FM y Williams TJ (1992), Whole body heart stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart. *Cardiovasc Res* 26: 342-346.
51. Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS y Ames BN (1985), Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753-762.
52. Polla BS, Bonventre JV y Krane SM (1988), 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases the toxicity of hydrogen peroxide in the human monocytic line U937: role of calcium and heat shock. *J Cell Biol* 107: 373-380.
53. Polla BS y Bonventre JV (1987), Heat shock protects cells dependent on oxidative metabolism from inhibition of oxidative phosphorylation. *Clin Res* 35: 555A.
54. Slovirer RS y Lowenstein L (1992), Heat shock protein expression in vulnerable cells of the rat hippocampus as an indicator of excitation-induced neuronal stress. *J Neurosci* 12: 3004-3009.
55. Barbe MF, Tytell M, Gower DJ y Welch WJ (1988), Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241: 1817-1820.
56. Keyse SM y Tyrell RM (1989), Heme oxygenase is the major 32-KDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103.
57. Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C y Cassarizza A (1996), Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6458-6463.
58. Abe T, Konishi T, Hirano T, Kasai H, Shimizu K, Kashimura M y Higashi K (1995), Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock 70 protein into the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 548-555.
59. Liu H, Lighfoot R y Stevens JL (1996), Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. *J Biol Chem* 271: 4805-4812.
60. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X y Arrigo AP (1996), Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alpha B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF- $\alpha$ -induced cell death. *EMBO J* 15: 2695-2706.
61. Helquist S, Hansen BS, Johannesen J, Andersen HU, Nielsen JH y Nerup J (1989), Interleukin 1 induces new protein formation in isolated rat islets of Langerhans. *Acta Endocrinol* 121: 136-140.
62. Donati YRA, Slosman DO y Polla BS (1990), Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol* 40: 2571-2577.

63. Jacquier-Sarlin M, Jornot L y Polla BS (1995), Differential expression and regulation of hsp70 and hsp 90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem* 270, 14094-14099.
64. Camins A, Díez-Fernández C, Camarasa J y Escubedo E (1995), Cell surface expression of heat shock proteins in dog neutrophils induced by mitochondrial benzodiazepine receptor ligands. *Immunopharmacol* 29: 159-166.
65. Díez-Fernández C, Camins A, Sanz N, Zaragoza A y Prieto P (1996), La vitamina E inhibe la expresión en superficie de las proteínas del estrés: posible papel en la terapia del cáncer. Premio FAES de la Real Academia de Farmacia.
66. Welch WJ (1993), How cells respond to stress. *Scientific American* 268: 56-62.
67. Witzmann FA, Fultz C y Lipscomb J (1995), Comparative 2D-electrophoretic mapping of human and rodent hepatic stress proteins as potential biomarkers. *Appl Theor Electrophor* 5: 113-117.
68. Benjamin IJ (1993), Stress proteins: is their application in clinical medicine on the horizon? *Hepatology* 18: 1532-1534.
69. Schiaffonatti L, Tachini L y Pappalardo C (1994), Heat Shock response in the liver: Expression and regulation of the HSP70 gene family and early response genes after in vivo hyperthermia. *Hepatology* 20: 975-983.
70. Konishi T, Karasaki Y, Nomoto M, Ohmori H, Shibata K, Abe T, Shimizu K, Itoh H y Higashi K (1995), Induction of heat shock protein 70 and nucleolin and their intracellular distribution during early stage of liver regeneration. *J Biochem* 117: 1170-1177.
71. Cajone F, Bernelli-Zazzera A (1988) Oxidative stress induces a subset of heat shock proteins in rat hepatocytes and MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> cells. *Chem Biol Interactions* 65: 235-246.
72. Lin WQ, Van Dyke RA, Marsh HM & Trudell JR (1994), Nuclear translocation of heat shock protein 72 in liver cells of halothane-exposed rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 647-652.
73. Andoh H, Itoh H, Koyama K, Sato Y, Tashima Y (1994), Heat shock protein 70 in rat liver with necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *J Gastroenterol* 29: 293-298.
74. Omar R, Pappolla M y Saran B (1990), Immunocytochemical detection of the 70-kd heat shock protein in alcoholic liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 114: 589-592.
75. Ohta M, Marcean N, Perry G, Manetto V, Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Metzuzals J et al (1988), Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and mallory bodies of hepatocytes. *Lab Invest* 59: 848-856.
76. Koskinas J, Winrow VR, Bird GLA, Lau JYN, Portmann BC, Blake DR, Alexander GJM y Williams R (1993), Hepatic 60-kD heat-shock protein responses in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 17: 1047-1051.
77. Kauffman SHE (1990), Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11: 129-136.
78. Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, Inoue M, Nakatani K, Kaneda K y Nagata K (1996), Expression of heat-shock protein 47 in mouse liver. *Cell Tissue Res* 284: 341-346.
79. Alvarez K, Carrillo A, Yuan PM, Kawano H, Morimoto RI y Reddy JK (1990), Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP 70 protein family. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5293-5297.
80. Pogliaghi G, Tacchini L, Anzon E, Radice L y Bernelli-Zazzera A (1995), Heat shock activation of NFkB in rat liver is mediated by interleukin-1. *FEBS Letters* 372: 181-184.
81. Jäättelä M, Wissing D, Bauer PA y Li GC (1992), Major heat shock protein hsp 70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* 11: 3507-3512.
82. Heydari Ar, you S, Takahashi R, Gutschmann A, Sarge KD y Richardson A (1996), Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Developmental Genetics* 18, 114-124.
83. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R & Richardson A (1993) Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* 13, 2909-2918.
84. Heydari AR, Conrad CC y Richardson A (1995) Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J Nutr* 125, 410-418.

85. Heydari AR, Takahashi R, Gutschmann A, You S y Richardson A (1994) HSP70 and aging. *Experientia* 50, 1092-1098.
86. Wu B, Gu MJ, Heydari AR & Richardson A (1993) The effect of age on the synthesis of two heat shock proteins in the HSP70 family. *J Geront* 48, B50-B56.
87. Rothstein M (1979) The formation of altered enzymes in ageing animals. *Mech Ageing Dev* 9, 197-202.

# REDOX REGULATION OF APOPTOTIC CELL DEATH

ANDREW FG SLATER AND STEN ORRENIUS  
Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 210,  
S-17177, Stockholm, Suecia

## SUMARIO

---

1. INTRODUCTION
2. GLUTATHIONE METABOLISM DURING APOPTOSIS
  - 2.1. Apoptotic cells lose their glutathione
  - 2.2. The mechanism of GSH efflux during apoptosis
  - 2.3. The consequences of GSH efflux for apoptosis
3. DITHIOCARBAMATES AND THE REDOX-REGULATION OF T CELL APOPTOSIS
  - 3.1. Introduction to Dithiocarbamates
  - 3.2. Dithiocarbamate Biochemistry
  - 3.3. Dithiocarbamates as Inhibitors and Activators of T Cell Apoptosis
4. EXCITOTOXICITY AND THE REDOX REGULATION OF NEURONAL CELL DEATH:
  - 4.1. Apoptosis and necrosis in excitotoxicity
  - 4.2. SOD and neurone survival after growth factor withdrawal
  - 4.3. Altered reactivity of Cu/Zn SOD in Amyotrophic Lateral Sclerosis
5. CONCLUSIONS
6. REFERENCES

## 1. INTRODUCTION

Apoptotic cell death is now widely recognised as being a distinct process of importance in both normal physiology and pathology. It is characterised by morphological and biochemical changes in most cell compartments (1, 2). The microscopically observed nuclear alterations such as margination and condensation of chromatin and subsequent nuclear fragmentation are accompanied by a sequential degradation of the DNA, first into fragments of approximately 700, 300 and 50 kilobase pairs and then into small oligonucleosomal fragments. Most apoptotic cells also show a remarkable shrinkage presumably due to the loss of water and electrolytes, such that the cytoplasm gradually becomes more electron dense. The plasma membrane remains largely intact despite extensive blebbing and alterations in its phospholipid distribution. The specific movement of phosphatidylserine from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane has been proposed to play an important role in the recognition of apoptotic cells by phagocytes (3), although other membrane changes also probably contribute to this final clean-up event (4). Efficient phagocytosis of intact apoptotic bodies precludes dying cells from spilling their contents into the extracellular space, and the potential for inflammation is consequently limited.

The current paradigm for the molecular control of apoptosis is that activation of the proteolytic activity of a family of cysteine proteases known as caspases is a crucial event in the initiation of the above mentioned morphological and structural changes (5). The activation of these proteases is associated with the specific cleavage of proteins involved in recognition and repair of DNA damage (e.g. poly(ADP-ribose)polymerase, DNA-dependent protein kinase and U1-ribonucleoprotein), the attachment of DNA to the nuclear scaffold (e.g. nuclear lamins) and cytoskeletal proteins such as fodrin and actin (5-7). It thus appears that in the early stages of apoptosis the different caspases selectively cut their substrates in order to both disrupt normal cellular metabolism and initiate the degradative changes such as chromatin fragmentation that characterise this type of cell death.

Although the molecular events and morphological appearance of apoptotic cells are highly conserved, a variety of different (often cell-type specific) stimuli are known to promote the event. An increasing number of studies demonstrate that oxidants and other agents promoting a pro-oxidant state within cells are potent

inducers of apoptosis under some situations. Known oxidative inducers of apoptosis include not only classical oxidants such as hydrogen peroxide (8, 9), quinones (10) and diamide (11), but also oxidised low density lipoproteins (12), lipid hydroperoxides (13) and agents increasing the cellular content of redox active copper (14). One important observation arising from most of these studies is that each oxidising agent must be used at «optimal» concentrations if it is to trigger apoptosis, as when it is applied at high concentration cells quickly become non-specifically and irreversibly damaged. This later situation characteristically leads to necrotic rather than apoptotic cell death.

In addition to reports that oxidants are potent inducers of apoptosis, several studies also clearly indicate the presence of oxidative changes in cells undergoing apoptosis induced by non-oxidative stimuli. The oxidative changes observed range from decreased levels of reduced glutathione,  $\alpha$ -tocopherol and protein thiols (15-17), to down-regulation of primary antioxidant defence enzymes such as catalase, Mn and Cu/Zn superoxide dismutases (Mn-SOD and Cu/Zn-SOD), DT-diaphorase and thioredoxin (18). Furthermore, other studies show that externally applied antioxidants often protect cells against apoptosis induced by non-oxidative stimuli (17, 19, 20). For example, cultured primary sympathetic neurones die by apoptosis when deprived of nerve growth factor (NGF) and an increased peroxide tonus can be detected in the cells several hours after withdrawal of the growth factor. Apoptosis can be partially inhibited by injecting these cells with either Cu/Zn-SOD protein or cDNA within the first few hours of NGF removal (19).

In this review we focus on three separate topics in the field of redox-regulation of apoptosis, namely glutathione metabolism during apoptosis (section 2), modulation of T cell apoptosis by redox-active toxicants (section 3), and the redox regulation of neuronal apoptosis induced either by exposure to excitatory amino acids or withdrawal of growth factors (section 4). Although other topics could just as well have been discussed, we hope that by our concentrating on three topics from our own research background the reader will come to appreciate some of the most important themes and questions currently occupying researchers interested in this area of biological science.

## 2. GLUTATHIONE METABOLISM DURING APOPTOSIS

### 2.1. Apoptotic cells lose their glutathione

The sulphur-containing tripeptide glutathione is present at millimolar concentrations within the cytoplasm of almost all cells (21). Its thiol group exists in a predominantly reduced form, with a typical ratio of reduced to oxidised glutathione (GSH/GSSG) being greater than 20. GSH is an important component of the antioxidant defence system of a cell, participating in both the non-enzymatic and enzyme-catalysed removal of damaging oxidants. As this molecule is such an

important determinant of intracellular redox state, we were interested to investigate how its concentration might change during apoptosis.

The first system we investigated was rat thymocytes undergoing apoptosis in response to the glucocorticoid methylprednisolone or the DNA damaging agent etoposide (17). In each case we observed that cells lost glutathione concomitant with the onset of apoptosis. This finding has subsequently been duplicated in mouse thymocytes (15). Apoptotic cells can be separated from normal cells by Percoll density-gradient centrifugation (shrunken apoptotic cells are heavier than normal cells) (22), and this method was used to prepare thymocytes at different stages of apoptosis. When the glutathione content of Percoll fractionated cells was determined, apoptotic cells were found to have lost about 50% of their GSH but to contain unchanged amounts of GSSG (17, 23). It thus appears that thymocytes lose GSH during apoptosis, but that the thiol does not accumulate within the cells as an oxidised disulphide.

The principal problem with using thymocytes as a model system for studies of this type is that apoptosis is both relatively slow (4-6 hours after induction) and unsynchronised. We therefore switched our attention to Fas antibody killing of human Jurkat T cells, which probably provides the quickest and most synchronised model system currently available for apoptosis research. Fas is a member of the tumour necrosis factor (TNF) family of cytokine receptors (24). The extracellular domain of the Fas receptor is linked by a transmembrane domain to an intracellular region containing the so called death domain. This domain shares homology with part of the p60 TNF receptor, and is essential for transmitting the apoptotic signal. Ligand binding (mimicked in our experiments by addition of an anti-Fas antibody) induces trimerisation of the Fas receptor such that three death domains cluster together to form a binding site for several other cytosolic proteins. This results in formation of a complex called the Death Inducing Signalling Complex (DISC) (25, 26). Two proteins identified as part of the DISC are Fas associating protein with death domain (FADD) and caspase 8. One part of FADD binds to the death domain of Fas whereas the other part provides a binding site for caspase 8. It is postulated that receptor trimerisation and consequent formation of the DISC activates the normally latent caspase 8 such that an apoptotic signal is transduced into the cell (26).

Reports that Fas killing can occur with equal efficiency in almost anaerobic conditions indicates that classic oxidative stress related to the overproduction of reactive oxygen species (ROS) is unlikely to play an important role in this system (27, 28). We were therefore surprised to observe that when Jurkat cells were induced to undergo apoptosis in response to anti-Fas antibody GSH was rapidly lost from the cells with a half-time of approximately 60 min (29). The thiol was not oxidised within the dying cell, but rather quantitatively recovered in the incubation medium. Using the appropriate manipulations we have shown that this efflux of glutathione out of apoptotic Jurkat cells occurs in the reduced GSH redox form

(29). A similar GSH extrusion has also been detected in other cell types including rat thymocytes, monocytic U937 cells and fibroblastic L929 cells exposed to various apoptosis-inducing stimuli such as methylprednisolone, TNF or etoposide (van den Dobbelsteen *et al.*, in prep.). Thus, an efflux of GSH out of cells seems to be a general phenomenon occurring irrespective of cell type or apoptotic stimulus applied. It is also important to note that it occurs simultaneously with chromatin condensation and cell shrinkage (i.e. downstream of caspase activation), and is therefore not a signalling event (29).

## 2.2. The mechanism of GSH efflux during apoptosis

The fact that all the cell types studied maintained their membrane integrity for at least several hours after the onset of GSH efflux suggested that a transmembrane channel, rather than non-specific leakiness, was responsible for extruding the thiol. Kaplowitz and co-workers have previously described different GSH-specific transporters located in both the plasma and mitochondrial membranes of cells (30-33). Rat hepatocytes are the best characterised cell system in this respect, and have been shown to contain two different GSH transporters in their plasma membrane which can be distinguished by their relative sensitivity to various inhibitors (34). In addition, the transmembrane multidrug resistance-associated protein 1 has been shown to extrude GSH when cells are treated with chemotherapeutic agents, although this is principally believed to represent excretion of GSH conjugates (35).

We observed that GSH efflux from Fas antibody-treated Jurkat cells was blocked by bromosulphophthalein (BSP) and phenol-3,6-dibromo-sulphophthalein (diBSP) (29). As these compounds are both specific inhibitors of the hepatocyte canalicular membrane GSH transporter, we postulated that a homologous channel was responsible for GSH efflux from our apoptotic T cells. Consistent with this, inhibitors selective for the other known GSH transporters were ineffective in blocking apoptosis-associated GSH excretion.

## 2.3. The consequences of GSH efflux for apoptosis

Unfortunately only short-term incubation of T cells in the presence of BSP and diBSP can be performed as both compounds also lower GSH by direct conjugation and are therefore relatively toxic. We serendipitously discovered that two membrane impermeable, non-toxic copper chelating compounds bathophenanthroline disulphonate (BPS) and bathocuproine disulphonate (BCPS) are highly efficient inhibitors of GSH efflux from both Fas antibody-treated Jurkat T cells and etoposide-treated rat thymocytes (34). Their non-sulphonated, membrane permeable copper-chelating analogues bathophenanthroline and bathocuproine were completely without effect, indicating that sulphonation rather than metal chelation determined their inhibitory effect on GSH transport. Our discovery of these

non-toxic inhibitors has enabled us to investigate the role of GSH loss in the generation and/or development of other apoptotic changes.

We initially concentrated on the Fas antibody/Jurkat model system, where addition of 250  $\mu\text{M}$  BCPS completely inhibits GSH efflux for up to 3 hours (34). Morphological changes typical of apoptosis, such as plasma membrane blebbing and nuclear fragmentation, are unaffected by inhibition of GSH efflux. Both the redistribution of phosphatidylserine from the inner leaflet of the plasma membrane to the surface of the cell and cell shrinkage also proceeded normally in the presence of BCPS. Thus none of the classic features of apoptosis require GSH efflux in this model system. However preliminary experiments performed with etoposide-treated rat thymocytes suggest that a link between GSH efflux and the hallmark shrinkage of apoptotic cells may exist in some cases. After a 5 h incubation with 25  $\mu\text{M}$  etoposide the mean volume of the thymocytes decreases from about 100 fl to around 90 fl, and this loss of volume is almost completely prevented by the inclusion of 250  $\mu\text{M}$  BCPS in the incubation medium (Nobel et al., in prep.). The findings of Häussinger *et al.* (36) are very interesting in this respect, as they report GSH extrusion from hepatocytes during a  $\text{K}^+$  dependent regulatory cell volume decrease. As  $\text{K}^+$  fluxes have been implicated previously in cell shrinkage during apoptosis (37), additional experiments are currently being performed to further investigate this potential link between GSH efflux and  $\text{K}^+$ -dependent cell shrinkage during apoptosis.

Besides the role GSH efflux could play in cell volume regulation, other possibilities for a physiological function of this phenomenon can be envisaged. Firstly, it may be useful for a cell undergoing apoptosis to lose reducing capacity. By exporting its major intracellular antioxidant the cell can achieve this without the need for the generation of oxidants with all of their attendant non-specific reactivities. As many biochemical reactions are dependent on adequate GSH levels, the low intracellular GSH content will also eventually lead to down-regulation of cellular metabolism and thereby limit persistence of apoptotic bodies. Finally, GSH release may be of nutritional significance for normal cells surrounding an apoptotic neighbour. The expelled GSH could become a substrate for the plasma membrane-associated  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and thereby rapidly become available for re-uptake by surrounding cells (21). As reducing agents are well known to enhance the function of lymphoid cells *in vitro* (38, 39), it is possible that GSH efflux contributes to the local stimulation of phagocytic cells.

### 3. DITHIOCARBAMATES AND THE REDOX-REGULATION OF T CELL APOPTOSIS

A large variety of environmental toxicants have been reported to enhance apoptosis, particularly in cells of lymphoid and neuronal origin (23). As many of these toxicants are also redox-active (e.g. metals such as copper and mercury), their

study can shed light on the mechanisms by which cell survival is modulated by changes in redox state.

### 3.1. Introduction to Dithiocarbamates

Dithiocarbamates comprise one class of toxicants that have been widely used in studies into the redox-regulation of apoptosis. They are known to exert both pro-oxidant and antioxidant effects in cell-free and biological systems, while as cheap, usually water soluble molecules they have various agricultural (fungicides and insecticides), clinical (alcohol aversion therapy) and industrial application. Chemically, they are defined by possession of a  $(R_1)(R_2)N-C(S)-S-R_3$  functional group. Both mono- and di-alkyl compounds are known, while in some molecules two dithiocarbamates are bridged by an alkylene. They readily form salts with various metals, and their thiol groups can also be oxidised to the corresponding dithiocarbamate disulphide. Examples include diethyldithiocarbamate (DDC) and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), two molecules that have been widely used in cell biological investigations. Disulphiram (DSF), the disulphide of DDC, is used clinically in alcohol aversion therapy, while the related tetramethylthiuram disulphide (thiram) has application as a fungicide and seed disinfectant.

### 3.2. Dithiocarbamate Biochemistry

Dithiocarbamates have an extremely complicated biochemistry (40). They are potent metal chelators, able to interact with both free and protein-bound metal and thereby substantially altering the redox environment of cells. Free iron or copper ions catalyse the Haber-Weiss reaction in the presence of a reductant and hydrogen peroxide, generating toxic hydroxyl radicals (OH). By virtue of both their metal chelating and radical scavenging properties, dithiocarbamates inhibit OH generation in model systems and are believed to exert a similar effect in biological systems (41, 42). Given their high membrane permeability, dithiocarbamates have therefore been widely used as model antioxidants to probe the significance of iron and/or copper catalysed hydroxyl radical generation within cells.

Several problems exist when such an approach is adopted. Firstly, both reduced and oxidised forms of dithiocarbamates will also chelate external metals (for example those present in foetal calf serum). In doing so they form highly lipophilic complexes that act as ionophores, carrying the chelated metal across cell membranes. This is believed to be particularly significant for copper. For example, we have observed that the total intracellular copper content of rat thymocytes becomes elevated 8-fold in presence of 20  $\mu$ M PDTC and 2 % foetal calf serum, while intracellular iron content is unchanged (14). Prior chelation of external copper with non-membrane permeable BCPS completely prevents copper uptake. Similar results have also been described with DSF, while Hassani and Tombeta (43) have

recently observed dithiocarbamate-dependent copper uptake in neuronal cells *in vivo*. Thus, despite their ability to inhibit metal-dependent OH<sup>•</sup> generation *in vitro*, in cellular systems dithiocarbamates may actually enhance oxidative damage. This particularly applies when the dithiocarbamate is unstable and therefore not able to permanently inhibit free radical production from the copper ions it transports across the cell membrane.

We have recently uncovered another mechanism by which dithiocarbamates can interact with copper to impose an oxidative stress on cell (Burkitt et al., submitted). It is known that in the presence of hydrogen peroxide and GSH, dithiocarbamates exert a glutathione peroxidase-like activity (44). This involves a peroxide-dependent oxidation of the dithiocarbamate into a potent GSH-oxidising disulphide. We have found that Cu<sup>2+</sup> can replace hydrogen peroxide in this model system, to again promote a dithiocarbamate-dependent oxidation of GSH (Burkitt et al., submitted). Copper apparently acts catalytically in this reaction, and electron spin resonance studies confirm that the metal redox cycles in the presence of dithiocarbamate. Two different reaction schemes can account for this activity, the first involving copper-dependent dithiocarbamate oxidation to a disulphide that in turn oxidises GSH, and the second being a direct oxidation of GSH catalysed by the Cu<sup>2+</sup>-dithiocarbamate complex. Dithiocarbamate disulphides themselves, including DSF and the fungicide thiram, are also well known to be potent thiol oxidising agents. For example, DSF oxidises GSH to GSSG and also has the potential to form mixed disulphides with reduced protein thiols (44). This may result in the inactivation of protein function, particularly if a redox-sensitive reduced thiol is required for activity. Overall, both reduced dithiocarbamates and their related disulphides should be considered as radical-scavenging compounds with pro-oxidant activity. They remove one-electron oxidants (free radicals) while inducing a state of copper-dependent two-electron oxidative stress (GSH and protein-SH oxidation). It is important to be aware of these opposing actions when using dithiocarbamates in cell biological studies, as they cause an oxidative shift in glutathione and protein thiol redox despite efficient scavenging of ROS.

Degradative products of dithiocarbamates are also biologically active, particularly with respect to formation of molecules that covalently modify proteins. Dithiocarbamates are unstable in both acidic (breaking down to an amine and carbon disulphide) and basic (forming an isothiocyanate by elimination of HS<sup>-</sup>) conditions (40). Both CS<sub>2</sub> and isothiocyanate react covalently with numerous biological macromolecules, for example to acylate amino groups and effect covalent cross-linking of proteins (45). The tendency of dithiocarbamates to undergo either degradative pathway depends on both structure and pH; for example pK<sub>a</sub> of DDC is approximately 3.4, which means that at physiological pH decomposition to CS<sub>2</sub> is very slow. Isothiocyanate formation is more favoured for monoalkyl than dialkyl-dithiocarbamates, and is thus more likely to be significant for a herbicide like metam than DDC or PDTC. Another possible degradative pathway for a dithiocarbamate involves S-methylation and subsequent oxidative

removal of the thiono sulphur via sulfoxidation to form a sulphone derivative (46, 47). This pathway, catalysed by microsomal P450 enzymes, again generates a potent protein modifying agent. For example, it has been proposed that metabolism of DSF to a methyl-thiocarbamate sulphoxide is required for pharmacologically relevant inhibition of aldehyde dehydrogenase (allowing onset of the DSF-ethanol reaction after alcohol ingestion).

### 3.3. Dithiocarbamates as Inhibitors and Activators of T Cell Apoptosis

Dithiocarbamates have been observed to exert opposing effects on T lymphocyte survival in *in-vitro* experiments. In short term incubations both PDTC and DDC inhibit T cell and thymocyte apoptosis induced by a variety of agents (48, 49). It has been argued that this indicates the involvement of ROS in these models of apoptosis. However when rat thymocytes were incubated with micromolar concentrations of PDTC we detected a considerable oxidation of intracellular GSH (14). This PDTC-dependent GSH oxidation was associated with a short term inhibition of apoptosis induced by the glucocorticoid methylprednisolone and the topoisomerase II inhibitor etoposide. On a molar basis the thiol oxidising dithiocarbamate disulphides are more potent inhibitors of apoptosis than either PDTC or DDC, even though they are poorer radical scavengers (Nobel et al., submitted). This suggests that dithiocarbamate inhibition of apoptosis may relate to oxidation of critical intracellular thiols rather than a general scavenging of oxygen radicals.

As described in section 1, it is now widely recognised that caspase-catalysed proteolysis is a critical event initiating apoptosis. These proteases are constitutively present in cells as inactive pro-enzymes. Signal transduction for apoptosis somehow culminates in pro-enzyme processing and the appearance of caspase proteolytic activity in the cell. Using Fas antibody-treated Jurkat T cells, we have observed that both PDTC and DSF exert a time and concentration-dependent inhibition of cell death (Nobel et al., submitted). Inhibition by DSF is associated with reduced processing of the 32 kD proenzyme of caspase 3. Furthermore, DSF directly inhibits both caspase 1 and caspase 3 activity in enzyme assays using pre-processed protein (Nobel et al, unpublished data). This direct inhibition of proteolytic activity is removed in the presence of DTT, indicating that it requires the presence of a disulphide bond. We therefore propose that an intracellular oxidation of dithiocarbamates (probably copper-dependent) generates a potent thiol oxidising dithiocarbamate disulphide that impairs protein function. In short term incubations this results in moderately specific inhibition of the activation and function of cysteine proteases belonging to the caspase family, and thereby delays apoptosis.

When thymocytes are incubated with PDTC or DDC for longer incubation periods (in excess of 6 hr) typical features of apoptosis begin to be observed (cell shrinkage, chromatin condensation and fragmentation), eventually followed by cell

lysis (14). Thus, although these compounds can briefly inhibit thymocyte apoptosis induced by diverse agents, in the long run they are toxic in their own right. We observed that this toxicity was inhibited by the inclusion of non-cell membrane permeable metal chelators in the incubation medium, suggesting that the toxicity of PDTC was related to its ability to chelate metal in a lipophilic, membrane permeable complex (14). This was confirmed by the finding that the intracellular copper content of PDTC-treated thymocytes was rapidly elevated about 8-fold above normal. In agreement with this, supplementation of the incubation medium with nanomolar concentrations of copper sulphate significantly potentiated the toxicity of PDTC (14). We have recently obtained similar results with DSF, although this compound is toxic at about 5-fold lower concentrations than PDTC (significant apoptosis at 1  $\mu$ M compared with 5  $\mu$ M) (Burkitt et al., submitted). It is important to remember that as dithiocarbamates are unstable molecules, their inhibition of caspase-dependent proteolysis will gradually be lost. A copper-dependent oxidative stress then probably signals the cell to undergo apoptosis.

PDTC has also recently been reported to induce apoptosis in vascular smooth muscle cells, while the neurotoxicity associated with the *in vivo* use of DSF has been connected to an enhanced accumulation of copper in the cerebellum and hippocampus (43, 50). Toxic effects of dithiocarbamates are therefore not restricted to the T cell lineage, but rather appear to be a general phenomenon associated with their transport of copper across cell membranes. Induction of a copper-dependent oxidative stress probably also contributes to the fungicidal and insecticidal properties of these molecules, although we are unaware of any studies in this area.

#### 4. EXCITOTOXICITY AND THE REDOX REGULATION OF NEURONAL CELL DEATH

As apoptosis is believed to be the principle physiological mechanism of cell death, any event that increases the rate of apoptosis can potentially have pathological consequences. This is particularly true with respect to non-dividing neuronal tissue, as a cell death event cannot be compensated for by new cell division. Bredesen (51) has recently summarised all of the information available to indicate the involvement of apoptosis in neurological disease. Although most of the published evidence is correlative in nature, it does seem that an accelerated apoptosis of neurones can at least contribute to disease. In model systems of neurological disease an enhanced oxidative stress is often observed in those neurones undergoing apoptosis, making the topic of redox-regulation particularly significant.

##### 4.1. Apoptosis and necrosis in excitotoxicity

It is well established that overstimulation of excitatory amino acid receptors on the surface of neurones is a toxic event (52). The glutamate/glutamate receptor interaction is the most thoroughly studied event in the area of «excitotoxicity».

Agonist stimulation of this receptor elicits a rapid increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  and an associated oxidative stress that appears to be critical if cell injury is to occur (53). *In-vivo* morphological studies of excitotoxic injury provide evidence for both necrotic and apoptotic cell death occurring in the same tissue, and thus any attempt to explain the molecular mechanisms of excitotoxicity must accommodate both types of cell death. Using isolated cerebellar granule cells exposed for 30 min to various concentrations of glutamate, Ankarcona *et al* (54) have recently shown that apoptosis and necrosis can also occur side-by-side *in-vitro*. A fraction of cells were almost immediately lysed after exposure to glutamate (typical necrotic cell death associated with cell swelling and loss of ATP), while the remainder apparently survived exposure to the excitatory amino acid. However over the following 24 hours a significant fraction of the surviving neurones subsequently died (typical features of apoptotic cell death with cell shrinkage and ordered chromatin fragmentation). Similarly exposure of cortical neurones to the excitatory amino acid analogue N-methyl-D-aspartate (NMDA) induces predominantly apoptosis when applied at low concentration but necrosis at high concentration (55). As cell injury after exposure to NMDA depends at least in part on the generation of free radicals such as nitric oxide or superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), it appears that alterations in intracellular redox subsequent to excitation of cell surface amino acid receptors provides a potent signal to modulate survival of neurones. If the signal is intense, massive (presumable non-specific) cell damage results in almost immediate necrosis, while a milder signal activates the apoptotic pathway.

#### 4.2. SOD and neurone survival after growth factor withdrawal

It is widely recognised that most cells require an almost constant exposure to extracellular survival factors if they are to avoid apoptosis. One of the best characterised examples of this phenomenon is the dependency of immature neuronal cells for NGF (19, 56). When this growth factor is removed, the cells slowly undergo apoptosis during the following 24 hours, while over-expression of the anti-apoptotic gene product bcl-2 is partially protective. Greenlund *et al.* (19) used a redox-sensitive dye to detect an increased production of ROS in the same cells about 2-3 hours after NGF withdrawal. Over-expression of Cu/Zn SOD delayed the onset of cell death in this system, suggesting that the early pulse of ROS was an important event coupling growth factor removal to the later onset of apoptosis. Furthermore, chronic inhibition of Cu/Zn SOD either by pharmacological or anti-sense methods has been shown to induce apoptosis in both spinal neurones and cultured PC12 neuronal cells (57, 58). PC12 cell death was accentuated when NGF was simultaneously withdrawn from the cultures, although it still slowly occurred even in the presence of adequate concentrations of the growth factor. Exactly how the peroxide tonus becomes increased after NGF removal is unclear, but as its effects can be antagonised by over-expressing Cu/Zn SOD it can be assumed that net  $\text{O}_2^{\cdot-}$  production is somehow increased. It thus seems that an oxidative shift in the intracellular redox state of neurones provides a potent stimulus for apoptosis. As

competition between developing neurones for NGF is an important factor determining development of the mammalian nervous system, it is likely that such oxidative events are also relevant *in vivo*.

#### 4.3. Altered reactivity of Cu/Zn SOD in Amyotrophic Lateral Sclerosis

One of the best examples of how changes in intracellular redox and a corresponding alteration in cell survival can contribute to disease comes from studies of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Approximately 10% of ALS cases are inherited, and in a subset of these cases mutations in the Cu/Zn SOD gene have been identified (59). Despite initial predictions that these mutations would be associated with a reduced ability of the translated gene product to dismutate  $O_2^-$ , this is now known not to be the case (60). It rather appears that the ALS-associated mutations generate an enzyme with an altered reactivity that allows it to catalyse the oxidation of various substrates excluded from the active site of wild type Cu/Zn SOD (61). This is associated with changes in cell survival. Overexpression of wild-type Cu/Zn SOD protects neuronal cells against apoptosis occurring after growth factor withdrawal (see above), while the mutant enzymes actually accelerate cell death in the same situation (60). It thus appears that by promoting inappropriate substrate oxidation (the physiological targets are unfortunately not known) the ALS-associated mutant forms of Cu/Zn SOD alter intracellular redox and promote apoptosis. Although this pro-oxidant shift will be experienced by all cells harbouring the mutant enzyme, neurones are presumably particularly sensitive by virtue of their long life-span increasing the probability that a small cumulative increase in background substrate oxidation will cross some toxic threshold.

## 5. CONCLUSIONS

The findings discussed in this review illustrate the complexity of the interaction between oxidative stress and apoptosis. Administration of an external oxidative stress often induces cell death; if the stress is acute a rapid necrosis occurs, whereas if the stress is more moderate and/or of short duration, cells apparently recover but then subsequently tend to undergo a delayed apoptosis. It is important to understand this difference in time scales between oxidant-induced necrosis and apoptosis, as it has several consequences. As oxidative stress-induced apoptosis is slow to develop, it usually occurs sometime after the original source of the oxidative stress has decayed. Several observations even indicate that during a mild (non necrotic) oxidative stress apoptosis is blocked. This is well illustrated by our studies on the inhibition of Fas-induced apoptosis in human Jurkat T cells by dithiocarbamates and their related disulphides. These molecules are thiol-oxidising agents that by altering glutathione and protein thiol redox prevent the apoptotic machinery from functioning. We hypothesise that this inhibition operates via redox inactivation of caspase proteases. However the inhibitory dithiocarbamate molecules are unstable,

and as they decay (releasing the block on apoptosis) the general copper-dependent oxidative stress that they have imposed on the cell triggers a later apoptosis. Consistent with this, we have recently found that hydrogen peroxide will also acutely block Fas-induced apoptosis even though it is again toxic itself in the long term (Hampton & Orrenius, unpublished data).

With respect to immune cell function, it is easy to see how such dual effects of oxidative stress on cell survival could be valuable. Activation of T and B cells is often accompanied by some degree of oxidative stress, and if this were to immediately induce apoptosis it could potentially suppress the immune response. We suggest that by virtue of the acute inhibitory effect of thiol oxidation on caspase activity this fate is avoided. However, in the long run it is essential to limit the life span of activated lymphocytes, and here again a delayed oxidative-stress induced apoptosis could be valuable. Further studies with non-lymphoid cells are required to determine whether this dual effect of oxidants on apoptosis (short-term inhibition *versus* long term induction) is a general phenomenon.

Another link between oxidative stress and apoptosis occurs at the end stage of cell death, where numerous observations confirm that fully apoptotic cells have depleted antioxidant defences and contain more peroxidised lipids and proteins than healthy cells. Alterations in intracellular glutathione are particularly important in this regard. We have observed that in different cell types undergoing apoptosis intracellular GSH is lost due to its export out of the cell. This GSH efflux is both specific, as it can be inhibited by various sulphonated molecules, and seemingly distinct from other typical apoptotic events such as chromatin fragmentation and plasma membrane blebbing. Although the physiological significance of GSH efflux is unclear, it certainly represents the loss of a major cytosolic antioxidant. Its loss would thus be expected to contribute to the increased oxidative damage seen in apoptotic cells.

### Acknowledgements

We are very grateful to Diels van den Dobbelen, Stefan Nobel and Monica Kimland for their contributions to our projects on the redox-regulation of apoptosis.

### 6. REFERENCES

1. Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
2. Wyllie AH, Kerr JFR & Currie AR (1980), Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
3. Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahoubi A, Saido & Green DR (1995a), Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270: 6425-6428.

4. Savill JS, Fadok V, Henson P & Haslett C (1993), Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14: 131-136.
5. Nicholson DW (1996), ICE/ced 3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnology* 14: 297-301.
6. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry N, Miller DK & Rosen A (1996), Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic cell death. *J Exp Med* 183: 1957-1964.
7. Martin SJ, Reutelingsberger CPM, McGahon AJ, Rader JA, Van Shie RCAA, La Face DM & Green DR (1995b), Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556.
8. Lennon SV, Martin SJ & Cotter TG (1991), Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation* 24: 203-204.
9. Ueda N & Shah SV (1991), Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* 90: 2593-2597.
10. Dypbukt JM, Ankarcona M, Burkiitt M, Sjöholm Å, Ström K, Orrenius S & Nicotera P (1994), Different prooxidant levels stimulate cell growth, activate apoptosis, or produce necrosis in insulin-secreting RINm5F cells. *J Biol Chem* 269: 30553-30560.
11. Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori T, Mori K & Yodoi J (1995), Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. *J Immunol* 154: 3194-3203.
12. Escargueil I, Nègre-Salvayre A, Pieraggi M-T & Salvayre R (1992), Oxidized low density lipoproteins elicit DNA fragmentation of cultured lymphoblastoid cells. *FEBS Lett* 305: 155-159.
13. Sandstrom PA, Mannie MD & Buttke TM (1994a), Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 55: 221-226.
14. Nobel CSI, Kimland M, Lind B, Orrenius S & Slater AFG (1995), Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J Biol Chem* 270: 26202-26208.
15. Beaver JP & Waring P (1995), A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes. *Eur J Cell Biol* 68: 47-54.
16. Bustamante J, Slater AFG & Orrenius S (1995), Antioxidant inhibition of thymocyte apoptosis by dihydrolipoic acid. *Free Rad Biol Med* 19: 339-347.
17. Slater AFG, Nobel CSI, Maellaro E, Bustamante J, Kimland M & Orrenius S (1995), Nitron spin traps and a nitroxide antioxidant inhibit a common pathway of thymocyte apoptosis. *Biochem J* 306: 771-778.
18. Briehl MM, Cotgreave IA & Powis G (1995), Downregulation of the antioxidant defense during glucocorticoid-mediated apoptosis. *Cell Death Diff* 2: 41-46.
19. Greenlund LJS, Deckwerth TL & Johnson EM, Jr (1995a), Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14: 303-314.
20. Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S & Buttke TM (1994b), Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* 269: 798-801.
21. Meister A (1994), Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 54 (suppl): 1969s-1975s.
22. Wyllie AH & Morris RG (1982), Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am J Pathol* 109: 78-87.
23. van den Dobbelen DJ, Orrenius S & Slater AFG (1997b), Environmental toxicants and apoptosis. *Comments on Toxicology*, in press.
24. Nagata S & Goldstein P (1995), The Fas death factor. *Nature* 267: 1449-1455.
25. Boldin MP, Goncharov TM, Goitsev YV & Wallach D (1996), Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.

26. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scanfidi K, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter M & Dixit VM (1996), FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death Inducing Signaling Complex. *Cell* 85: 817-827.
27. Hugh H, Enari M & Nagata S (1994), No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 351: 311-313.
28. Jacobsen MD & Raff Mc (1995), Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374: 814-816.
29. van den Dobbelen DJ, Nobel CSI, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S & Slater AFG (1996), Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* 271: 15420-15427.
30. García-Ruiz C, Fernández-Checa J & Kaplowitz N (1992), Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles. *J Biol Chem* 267: 22256-22264.
31. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Rodés J, Yi J-R, Kaplowitz N & Fernández-Checa J (1995), Evidence that the rat hepatic mitochondrial carrier is distinct from the sinusoidal and canalicular transporters for reduced glutathione. *J Biol Chem* 270: 15946-15949.
32. Yi J-R, Lu S, Fernández-Checa J & Kaplowitz N (1993), Expression cloning of a rat hepatic reduced glutathione transporter with canalicular characteristics. *J Clin Invest* 93: 1841-1845.
33. Yi J-R, Lu S, Fernández-Checa J & Kaplowitz N (1995), Expression cloning of the cDNA for a polypeptide associated with rat hepatic sinusoidal reduced glutathione transport: characteristics and comparison with the canalicular transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1495-1499.
34. van den Dobbelen DJ, Nobel CSI, Samuelsson A, Orrenius S & Slater AFG (1997a), Glutathione metabolism during apoptosis. In: *Oxidative stress, Cancer, AIDS and Neurodegenerative diseases*. Marcel Dekker, New York, in press.
35. Zaman GJR, Lankelma J, Van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Oude Elferink RPJ, Baas F & Borst P (1995), Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7690-7694.
36. Häussinger D, Lang F, Bauers K & Gerok W (1990), Control of hepatic nitrogen metabolism and glutathione release by cell volume regulatory mechanisms. *Eur J Biochem* 193: 891-898.
37. Beauvais F, Michel L & Dubertret (1995), Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K<sup>+</sup> channels. *J Leukocyte Biol* 57: 851-855.
38. Fidelius RK, Ginouves P, Lawrence D & Tsan MF (1987), Modulation of intracellular glutathione concentrations alters lymphocyte activation and proliferation. *Exp Cell Res* 170: 269-278.
39. Gmunder H, Eck P, Benninghoff B, Roth S & Dröge W (1990), Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes: evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cell Immunol* 129: 32-46.
40. Thorn GD & Ludwig RA (1962), The dithiocarbamates and related compounds. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
41. Zanicco AL, Pavez R, Videla LA & Lissi EA (1996), Antioxidant capacity of diethyldithiocarbamate in a metal independent lipid peroxidative process. *Free Rad Biol Med* 7: 151-156.
42. Liu J, Shigenaga MK, Yan L-J, Mori A & Ames BN (1996), Antioxidant activity of diethyldithiocarbamate. *Free Rad Res* 24: 461-472.
43. Hassani M & Trombetta LD (1996), Induction of stress proteins by diethyldithiocarbamate (DDC) and/or copper chloride in rat hippocampal astrocytes. *Fund Appl Tox* 30: 188 (abs).
44. Kumar KS, Sancho AM & Weiss JF (1986), A novel interaction of diethyl-dithiocarbamate with the glutathione/glutathione peroxidase system. *Int J Radiation Oncology Biol Phy* 12: 1463-1467.

45. Valentine WM, Amarnath V, Amarnath K, Rimmele F & Graham DG (1995), Carbon disulfide mediated protein cross-linking by N,N-diethyl-dithiocarbamate. *Chem Res Toxicol* 8: 96-102.
46. Hart BW & Faiman MD (1993), Bioactivation of S-methyl N,N-diethyl-thiolcarbamate to S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide. *Biochem Pharmacol* 46: 2285-2290.
47. Mays DC, Nelson AN, Fauq AH, Shriver ZH, Verveka KA, Naylor S & Lipsky JL (1995), S-methyl N,N-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low  $K_m$  mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 49: 693-700.
48. Wolfe JT, Ross D & Cohen GM (1994), A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett* 352: 58-62.
49. Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin YW, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R & Heike T (1994), Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of NF $\kappa$ B activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol* 48: 1883-1889.
50. Tsai J-C, Jain M, Hseih C-M, et al (1996), Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetyl cysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 3667-3670.
51. Bredesen DE (1995), Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851.
52. Lipton SA & Rosenberg PA (1994), Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *New Engl J Med* 330: 613-622.
53. Simonian NA & Coyle JT (1996), Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 83-106.
54. Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA & Nicotera P (1995), Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
55. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P & Lipton SA (1995), Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162-7166.
56. Greenlund LSJ, Korsmeyer SJ & Johnson EM, Jr (1995b), Role of Bcl-2 in the survival and function of developing and mature neurons. *Neuron* 15: 649-661.
57. Rothstein JD, Bristol LA, Holler B, Brown RH & Kuncl RW (1994), Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4155-4159.
58. Troy CM & Shelanski ML (1994), Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6384-6387.
59. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al (1993), Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
60. Rabizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR, Gwinn R, Valentine JS, Sisodia S, Wong P, Lee M, Hahn H & Bredesen DE (1995), Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3024-3028.
61. Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS & Bredesen DE (1996), Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271: 515-518.

# ESTRES OXIDATIVO Y HOMEOSTASIS DEL CALCIO

JOSE ENRIQUE O'CONNOR<sup>1</sup>, ALBERTO ALVAREZ BARRIENTOS<sup>2</sup>,  
VIRGINIA CORROCHANO<sup>1</sup> Y ROBERT C. CALLAGHAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia; <sup>2</sup> Centro de Citometría de Flujo y Confocal, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; <sup>3</sup> Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia

## SUMARIO

---

1. INTRODUCCION
2. TECNICAS AVANZADAS DE ANALISIS DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO
  - 2.1. Interés del análisis de los niveles y distribución de calcio en células individuales
  - 2.2. Indicadores fluorescentes para el análisis de calcio intracelular
  - 2.3. Indicadores bioluminescentes para el análisis de calcio intracelular
3. HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL CALCIO
  - 3.1. Homeostasis intracelular del calcio en condiciones fisiológicas.
  - 3.2. Origen del calcio incrementado en el estrés oxidativo
4. ALTERACIONES DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN EL ESTRES OXIDATIVO: ¿CAUSA O CONSECUENCIA DE LA CITOTOXICIDAD?
  - 4.1. Secuencia de eventos metabólicos en la toxicidad de agentes oxidantes
  - 4.2. Estrés oxidativo endógeno y calcio en la apoptosis
5. PAPEL DEL CALCIO EN LA DISFUNCION MITOCONDRIAL INDUCIDA POR EL ESTRES OXIDATIVO

- 5.1. Transporte incrementado de calcio y disfunción mitocondrial
- 5.2. Incremento transitorio de la permeabilidad de la membrana interna y pérdida del potencial mitocondrial
6. DISFUNCION MITOCONDRIAL, ESTRES OXIDATIVO Y ALTERACION DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN LA APOPTOSIS
7. CONCLUSIONES
8. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo se ha propuesto que numerosas lesiones celulares, inducidas por diferentes agentes tóxicos, podrían ser la consecuencia de la alteración de los mecanismos que regulan los niveles intracelulares del ión calcio, elemento esencial en la activación regulada de distintos procesos metabólicos (1,2). En muchos casos, la disfunción en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha asociado con la lesión celular inducida por agentes que generan estrés oxidativo en las células, bien a través del aporte de especies reactivas extracelulares, bien a través de la producción endógena de dichos agentes oxidativos (3,4). En la actualidad, la relación exacta entre estrés oxidativo y homeostasis alteradas del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está por dilucidar, aunque cada vez es más evidente el papel esencial de la mitocondria como estructura dinámica capaz de relacionar ambos fenómenos entre sí y con los mecanismos de señalización, inducción y ejecución de los dos tipos descritos de muerte celular: la apoptosis, relacionada con la muerte celular programada, y la necrosis, o muerte accidental en respuesta a agresiones no fisiológicas.

## 2. ANALISIS DEL CONTENIDO DE CALCIO EN CELULAS INDIVIDUALES

### 2.1. Interés del análisis de los niveles y distribución de $\text{Ca}^{2+}$ en células individuales

En los últimos años se ha manifestado la necesidad de disponer de métodos sensibles que permitan cuantificar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y sus variaciones rápidas o reversibles en células individuales. Esta necesidad deriva de la existencia de diferentes sistemas de homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y de su papel como mensajero secundario de estímulos específicos, que actúan sólo sobre determinados tipos de células, en muchos casos minoritarias en el seno de una población heterogénea. En segundo lugar, la detección de un incremento del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en subpoblaciones minoritarias, permite incrementar la sensibilidad de los métodos de análisis aplicados a diferentes modelos de lesión citotóxica. Por último, el papel de los compartimentos subcelulares en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , requiere técnicas analíticas capaces de visualizar y cuantificar los niveles específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes orgánulos, así como el origen de sus incrementos. El desarrollo de indicadores fluorescentes, capaces de modificar sus propiedades ópticas en fun-

ción de su interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ , ha supuesto un avance notable con respecto a otros métodos espectroscópicos o bioquímicos no fluorescentes (5).

Así, la aplicación de los fluorocromos que se mencionan a continuación, puede plasmarse en métodos espectrofluorimétricos (6), donde grandes cantidades de células o partículas son analizadas globalmente, generando información similar a la proporcionada por otros métodos colorimétricos (captación de arsenazo III, ref. 7) o enzimáticos indirectos (activación de la fosfolipasa *a*, ref. 8).

La citometría de flujo, cuyo interés en el estudio del estrés oxidativo se muestra en otro capítulo de este libro, permite la aplicación de dichos fluorocromos a la cuantificación de  $\text{Ca}^{2+}$  en suspensiones de células o partículas individuales (9). La información obtenida permite estimar el contenido medio de la población y, gracias al análisis individualizado, la posible heterogeneidad de su distribución. Una ventaja importante de la citometría es que permite combinar en la misma célula o partícula la medida de  $\text{Ca}^{2+}$  con otros parámetros funcionales o estructurales, estáticos o dinámicos, permitiendo así identificar tipos celulares o integrar la medida de  $\text{Ca}^{2+}$  en el contexto de fenómenos fisiológicos (9).

La microscopía de fluorescencia permite visualizar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o en un pequeño número de células seleccionadas (10). Las técnicas informáticas de análisis digital de imágenes consiguen amplificar la resolución espacial y temporal de la microscopía de fluorescencia, de forma que es posible integrar los fenómenos cinéticos de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  con el análisis morfológico, respetando asimismo la interacción célula-célula, que puede ser esencial para la comprensión de mecanismos tóxicos a nivel tisular.

La microscopía confocal, como se apunta en otro capítulo de este libro, eleva al máximo la capacidad de resolución de la microscopía de fluorescencia, al utilizar el láser como fuente de iluminación y un sistema óptico especial de detección de fluorescencia. Su aplicación más ventajosa en el contexto que nos ocupa reside en la visualización con alta resolución tridimensional de la distribución topológica y los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como su co-localización ultraestructural con otros parámetros biológicos (5).

## 2.2. Indicadores fluorescentes para el análisis de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

En los últimos años se han desarrollado una serie de fluorocromos que sufren cambios en sus propiedades espectrales tras su unión a iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En su mayoría, son derivados fluorescentes de los quelantes clásicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , como EGTA y BAPTA, modificados químicamente para mantener distintos grados de afinidad hacia los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y adquirir capacidad de emisión de fluorescencia (5).

Los fluorocromos sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  disponibles se diferencian por sus propiedades biológicas, químicas y espectrales, que los hacen más o menos adecuados para

aplicaciones específicas. Las principales características intrínsecas de dichos fluorocromos, que definen su utilidad, se resumen a continuación.

a) *Forma molecular del indicador*: Define el proceso de penetración intracelular de la molécula y afecta a su distribución intracelular. En su mayor parte, los fluorocromos sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizan en forma de acetometoxil ésteres, capaces de difundir pasivamente a través de la membrana plasmática y acumularse en el interior de la célula, donde deben ser hidrolizados por esterasas intracelulares para ser retenidos en forma ácida (Figura 1). Los ésteres presentan el inconveniente de sufrir, en determinadas condiciones experimentales, retención en diferentes compartimentos subcelulares, pudiendo invalidar su uso para la medida de los niveles exclusivamente citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . La compartimentación subcelular puede ser aprovechada o, simplemente estimada, en estudios de microscopía de fluorescencia convencional o confocal.

En su forma salina o conjugados a macromoléculas (dextrano, proteínas), los fluorocromos no difunden a través de la membrana plasmática y deben ser incorporados por microinyección, electroporación, choque hipoosmótico, raspado o fagocitosis. Dichos conjugados presentan la ventaja de acumularse en el citosol y no sufrir compartimentación.

Por último, los fluorocromos sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  conjugados con ácidos grasos de cadena larga se incorporan a la bicapa lipídica de la membrana plasmática y permiten detectar cambios de concentración localizados en la proximidad (intra- y extracelular) de dichas membranas.

b) *Constante de disociación (Kd)*: Define el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el que se puede aplicar un determinado quelante fluorescente. Depende de numerosos factores, como pH, temperatura, fuerza iónica, viscosidad, unión a proteínas y presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y otros iones. Los indicadores actuales exhiben una respuesta detectable en un rango de concentraciones aproximado entre  $0,1-10 \times Kd$ , que debe ser adecuado al rango esperable de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la aplicación a desarrollar (Tabla I).

c) *Tipo de variación espectral*: Define el tipo de técnica en el que es aplicable un fluorocromo y el modo de análisis del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un grupo de fluorocromos sufre un aumento de intensidad de emisión de fluorescencia tras su unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 1). Su utilización es sensible a problemas en la penetración, distribución y retención intracelular, por lo que suelen utilizarse en análisis cualitativo y su uso cuantitativo requiere un adecuado número de controles. Por otra parte, existen fluorocromos que experimentan desplazamientos espectrales al unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  libre, permitiendo expresar las medidas en forma de cociente entre las intensidades de emisión a dos longitudes de onda tras excitación a una determinada longitud de onda, o bien como el cociente entre las intensidades de excitación a dos longitudes de onda cuando la emisión se fija en una determinada longitud de onda (Figura 1).

## EJEMPLOS DE INDICADORES FLUORESCENTES Y BIOLUMINESCENTES DE $\text{Ca}^{2+}$

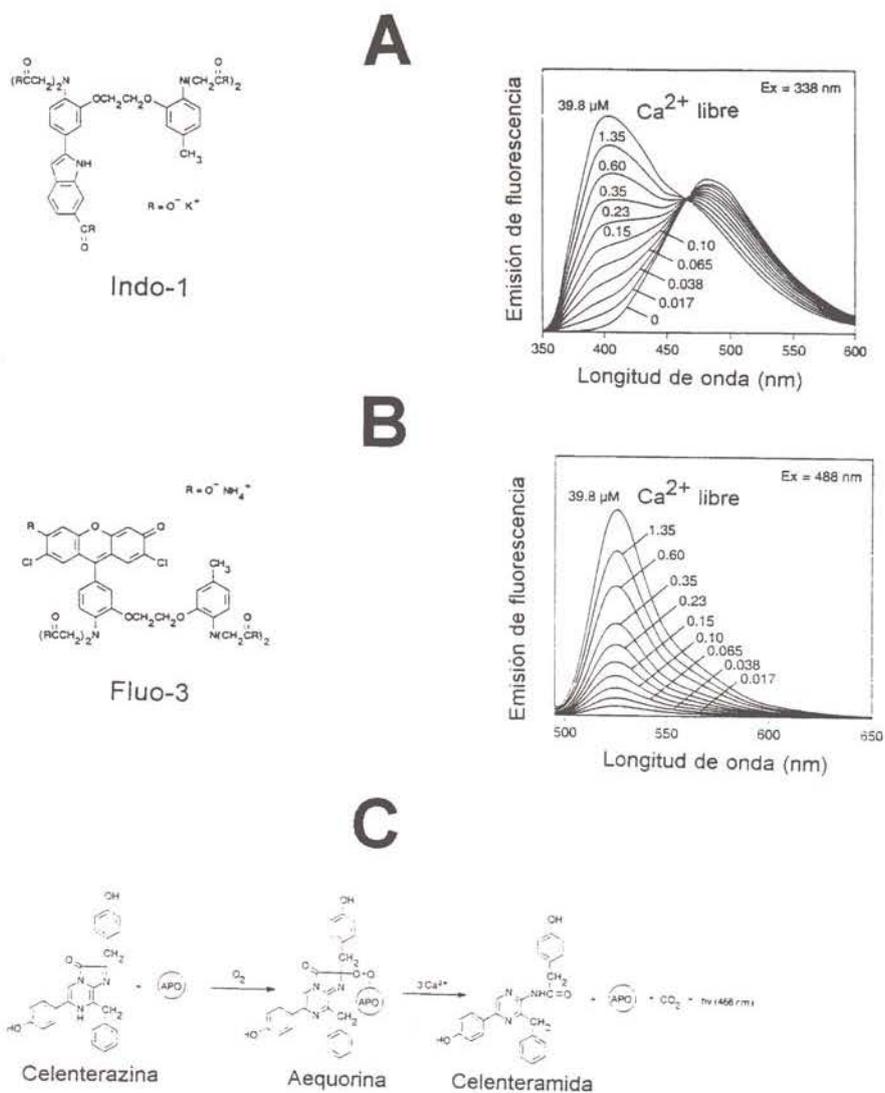


Figura 1. *Ejemplos de indicadores fluorescentes y bioluminescentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . (A) Estructura química y espectro de emisión del Indo-1, ejemplo de indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  que experimenta cambios en la longitud de onda de emisión. (B) Estructura química y espectro de emisión del Fluo-3, ejemplo de indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  que experimenta cambios en la intensidad de emisión sin modificar su longitud de onda. (C) Esquema del mecanismo molecular de la emisión de bioluminescencia por el sistema aequorina/celenterazina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .*

Las medidas en forma de cociente, a pesar de ser técnicamente más exigentes, permiten evitar los problemas mencionados anteriormente y son, por tanto, más adecuadas para la cuantificación. El tipo de variaciones espectrales experimentadas define el tipo de técnica de fluorescencia en el que se pueden utilizar (Tabla I).

Un resumen de los principales indicadores fluorescentes y bioluminiscentes, sus características y aplicación general en el estudio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Algunos indicadores fluorescentes y bioluminiscentes para la cuantificación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular

TIPO	APLICACION	EJEMPLOS	CUANTIFICACION
Fluorocromos de alta afinidad para $\text{Ca}^{++}$	Medida de $\text{Ca}^{++}$ libre en la célula entera (conc. < 500 nM)	Fura-2 Indo-1 Quin-2 Fluo-3 OG-BAPTA 1 Fluo-3+Fura Red	Ex 340nm/380nm Em 405nm/485nm Em 495 nm Em 525 nm Em 525 nm Em 525nm/650nm
Fluorocromos de baja afinidad para $\text{Ca}^{++}$	Medida de $\text{Ca}^{++}$ libre en la célula entera (conc. > 500 nM)	Bis-Fura-2 OG-BAPTA-5N	Em 340nm/380nm Em 525 nm
Fluorocromos conjugados a dextrano	Medida de $\text{Ca}^{++}$ en el citosol	Fura-Dextrano Indo-Dextrano	Ex 340/380nm Em 405/485nm
Fluorocromos conjugados a proteínas	Medida de $\text{Ca}^{++}$ en el citosol	Fura-BSA	Ex 340/380nm
Fluorocromos conjugados a ácidos grasos de cadena larga	Medida de $\text{Ca}^{++}$ en las proximidades de la membrana celular	Fura-C18 Calcium Green C18	Ex 340/380nm Em 501 nm
Indicadores bioluminiscentes	Medida de $\text{Ca}^{++}$ en citosol o en compartimentos	Apoaequorina/ Celenterazina (dirigida por secuencias génicas)	Em 405nm

Abreviaturas. Ex, excitación; Em, emisión; OG, Oregon Green

### 2.3. Indicadores bioluminescentes de $\text{Ca}^{2+}$

Diferentes sistemas bioquímicos formados por proteínas funcionales y cofactores orgánicos (luminóforos) son capaces de emitir luz como consecuencia de reacciones químicas específicas. Uno de tales sistemas está formado por la proteína apoaequorina (22.000 Da) y el luminóforo celenterazina y se encuentra en medusas y otros organismos luminiscentes marinos. La apoaequorina y la celenterazina, en presencia de  $\text{O}_2$ , se combinan para formar la holoproteína aequorina. En presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , la celenterazina se oxida a celenteramida, el complejo se disocia y emite luz azul. Recientemente, se ha clonado el cDNA de la apoaequorina, lo que ha permitido su uso para la detección bioluminiscente de calcio por técnicas de análisis de imagen. Mediante técnicas de DNA recombinante se ha conseguido, además, construir vectores que permiten la expresión transitoria o estable de aequorina y su direccionamiento, mediante secuencias específicas, hacia diferentes compartimentos subcelulares (5).

## 3. HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE $\text{Ca}^{2+}$

### 3.1. Homeostasis intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones fisiológicas

En condiciones normales, los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son mantenidos en un rango de concentración de aproximadamente  $0.1 \mu\text{M}$ , es decir, 10.000 veces inferior a la del mismo ión en el compartimento extracelular. Un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $1-10 \mu\text{M}$ ) sostenido durante algunos minutos, es suficiente para provocar alteraciones metabólicas, eléctricas y estructurales que conducen a la muerte celular. Estas alteraciones parecen mediadas por la sobreactivación de un gran número de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como proteína quinasa C, proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , fosfolipasas, proteasas, proteína fosfatasa, xantina oxidasa, endonucleasas y óxido nítrico sintasa (1-4, 11). El mantenimiento de los niveles adecuados de  $\text{Ca}^{2+}$  es el resultado de la acción coordinada de diferentes sistemas de transporte localizados sobre la membrana plasmática y en las membranas de diferentes orgánulos subcelulares, así como de la unión específica de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferentes proteínas citosólicas con distinto grado de afinidad, como se resume en la Tabla II.

En una célula idealizada, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  penetran a favor del importante gradiente de concentración, tras la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de diferente tipo. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas con afinidad para el mismo induce la regulación de otras proteínas específicas. Una vez ejecutado su papel mediador, el  $\text{Ca}^{2+}$  es extruído al espacio extracelular o secuestrado en sitios intracelulares de almacenamiento mediante bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Alternativamente, se puede liberar  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus depósitos intracelulares como respuesta a la activación de la vía de la fosfolipasa C y consiguiente producción de inositol trifosfato.

Tabla II. **Resumen de los mecanismos implicados en la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$**

<p><b>1. TRANSPORTE DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> A TRAVES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA,</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— Canales de <math>\text{Ca}^{2+}</math></li> <li>— Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math></li> <li>— ATPasa dependiente de <math>\text{Ca}^{2+}</math></li> </ul>
<p><b>2. TRANSPORTE DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> A TRAVES DE MEMBRANAS INTRACELULARES,</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— ATPasa dependiente de <math>\text{Ca}^{2+}</math> en retículo endoplásmico y calciosomas</li> <li>— Calsequestrina en cisternas terminales del retículo endoplásmico</li> <li>— Intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math> de la membrana mitocondrial</li> <li>— Transporte unidireccional dependiente del potencial de membrana mitocondrial</li> </ul>
<p><b>3. UNIÓN DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> POR PROTEÍNAS CITOSÓLICAS,</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— Calmodulina</li> <li>— Troponina C y Parvalbúmina</li> <li>— Sinexina y Calelectrinas</li> <li>— Diferentes proteínas relacionadas inmunológicamente</li> </ul>

Las proteínas capaces de unir  $\text{Ca}^{2+}$  pertenecen a dos grandes grupos, las denominadas proteínas con mano EF («EF-hand») y las anexinas. Las proteínas aceptoras de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran unidas a elementos del citoesqueleto o libres en el citoplasma. Su función puede ser la de activar a otras proteínas, tras sufrir un cambio conformacional mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  (proteínas «trigger»), o la de disminuir momentáneamente los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (proteínas «buffer») (12).

### 3.2. Origen del $\text{Ca}^{2+}$ incrementado en el estrés oxidativo

Desde hace varios años, se ha asociado la lesión celular provocada por diferentes agentes oxidantes con un incremento significativo de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (2,3). Para explicar tal fenómeno, se ha propuesto que el estrés oxidativo disminuye la actividad de los sistemas intracelulares de translocación de calcio, ocasionando un aumento incontrolado de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (2, 3). Tal efecto podría ser mediado, en principio, por tres mecanismos diferentes.

a) *Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus depósitos intracelulares:* Como mostró el grupo de Orrenius (3, 13-15), el estrés oxidativo provoca la oxidación de los grupos SH- en las ATPasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición de la actividad de estos transportadores disminuiría la capacidad de algunos compartimentos, como el retículo endoplásmico, para eliminar  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, y de la membrana plasmática

para expulsarlo al exterior de la célula. La incapacidad de mantener un nivel bajo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol provocaría la activación de enzimas degradativos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y desencadenaría o contribuiría a los fenómenos bioquímicos responsables de la lesión celular irreversible y la muerte celular asociada con la pérdida de la impermeabilidad de la membrana plasmática (3, 14, 15).

b) *Entrada de calcio desde el exterior de la célula:* Una lesión oxidativa de la membrana plasmática podría conducir a un incremento del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . La penetración de calcio sería, por tanto, secundaria a la lesión tóxica inicial y se podría producir a través de los canales de sodio (16) o a través de poros abiertos por la lesión de la membrana plasmática. Este mecanismo no se opone totalmente al anterior, puesto que la alteración oxidativa de las bombas reguladoras del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  impediría mantener un nivel suficientemente bajo de dicho catión en estas condiciones.

c) *Penetración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en células lesionadas irreversiblemente:* Este mecanismo implicaría que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es un epifenómeno asociado con los estadios finales de la lesión celular oxidativa y no estaría relacionado con su inicio o progresión. El  $\text{Ca}^{2+}$  sólo penetraría en las células que hubieran perdido de forma irreversible la impermeabilidad de su membrana plasmática.

Las características de la lesión oxidativa en diferentes modelos celulares indican que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado depende de una entrada desde el medio extracelular, más que de una liberación desde compartimentos intracelulares. Así, en estudios que incluyen condiciones de anoxia (1-6), exposición a sistemas de generación extracelular (17) o intracelular (18) de especies reactivas de oxígeno y tratamiento con acetaminofeno (19) o cianuro (20), se ha comprobado que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular asociado con la lesión oxidativa es inhibido cuando las células son incubadas en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

#### 4. ALTERACIONES DE LA HOMEOSTASIS DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN EL ESTRÉS OXIDATIVO: ¿CAUSA O CONSECUENCIA DE LA CITOTOXICIDAD?

Los datos experimentales de que disponemos muestran de forma evidente la asociación entre lesión celular por estrés oxidativo y elevación de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, no existen pruebas directas de que este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  sea el causante de la lesión celular. Si tal fuera el caso, dos premisas deberían ser demostrables experimentalmente:

a) El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debería preceder en el tiempo a la lesión celular por estrés oxidativo.

b) La prevención del aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  debería evitar o reducir la intensidad de la lesión celular oxidativa.

#### 4.1. Secuencia de eventos metabólicos en la toxicidad de agentes oxidantes

Los resultados obtenidos con diferentes tipos celulares y modelos de lesión, relacionados con el estrés oxidativo, apoyan la idea de que el incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  no precede a la lesión celular e, incluso, de que dicha elevación es un fenómeno relativamente tardío en la secuencia de eventos metabólicos de la lesión.

En algunos casos, las pruebas de la independencia de la lesión oxidativa se han obtenido aplicando técnicas digitales de fluorescencia, que han permitido estimar simultáneamente los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y la progresión de cambios morfológicos estereotipados en células individuales (10, 19, 21-23). Por otra parte, la citometría de flujo multiparamétrica con fluorocromos específicos, permite relacionar temporalmente las variaciones en el contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  con otros eventos bioquímicos y estructurales, marcadores cronológicos de las etapas de la lesión celular, como lo demuestran los datos de nuestro laboratorio que serán presentados más adelante, en relación con el papel del estrés oxidativo y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con los fenómenos de muerte celular por apoptosis.

Desde hace mucho es conocido que la formación de protuberancias en la superficie celular («blebs») es una de las primeras manifestaciones de citotoxicidad en hepatocitos (2,24). Este fenómeno está mediado por una disociación de los filamentos de actina en el citoplasma y por la rotura proteolítica de proteínas que se unen a actina, inhibiendo el anclaje de los elementos del citoesqueleto a la membrana plasmática (3). La implicación de  $\text{Ca}^{2+}$  en este evento de la lesión se proponía a partir de pruebas indirectas, como la inducción experimental de protuberancias por ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (2) y su prevención por el tratamiento con quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (25). Sin embargo, utilizando técnicas digitales de microscopía de fluorescencia, el grupo de Lemasters demostró que la formación de protuberancias precede a los cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en hepatocitos individuales expuestos a cloruro mercuríco o cistamina (21). Con el mismo tipo de aproximación metodológica, Sakaida *et al.* (22) mostraron que la muerte inducida por peróxido de ter-butilo en cultivos de hepatocitos no se asociaba a un aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Más recientemente, los estudios microscópicos cuantitativos de Harman y Maxwell (4) han confirmado que la toxicidad de agentes considerados oxidantes modelo en estudios de estrés oxidativo, como adriamicina, aloxano, menadiona o peróxido de ter-butilo, no dependía de la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sino que este catión se acumulaba en los estadios morfológicos finales de la lesión, inmediatamente antes de la pérdida de la impermeabilidad de membrana, visualizada por la penetración del fluorocromo yoduro de propidio. En otros modelos relacionados de lesión celular, como la inducida por acetaminofeno (19) o tetracloruro de carbono (23), la microscopía digital de fluorescencia confirma igualmente la dificultad en atribuir un papel causativo al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular asociado con la inducción de muerte celular por diferentes agentes tóxicos.

Puesto que los estudios que atribuyen un papel esencial al  $\text{Ca}^{2+}$  en la inducción de lesión celular se basan, fundamentalmente, en pruebas indirectas, como el papel protector de los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  o la inducción de lesión celular por ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , es posible que los resultados obtenidos se refieran a efectos bioquímicos de los propios quelantes o ionóforos (4). Así, los agentes quelantes pueden inhibir el estrés oxidativo por la formación de complejos con iones férricos, previniendo de esta forma la generación de radicales hidroxilo. Por otra parte, un ionóforo puede inducir cambios secundarios, como una caída de los niveles de ATP, que podrían ser más relevantes al proceso de la lesión que el propio incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se discutirá más adelante.

#### 4.2. Lesión celular en ausencia de incremento de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Distintos datos experimentales indican que la incubación de células en medios pobres en  $\text{Ca}^{2+}$  no proporciona una protección significativa frente a la lesión inducida por agentes oxidantes, aún en ausencia de un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (4, 19, 21). Así, Harman y Maxwell, utilizando microscopía digital de fluorescencia muestran que el transcurso morfológico de la lesión inducida por peróxido de ter-butilo en hepatocitos aislados es idéntico en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a pesar de que en este último caso, la muerte celular no se ve precedida de un aumento del nivel intracelular de calcio. Otras pruebas en este sentido surgen de modelos experimentales relacionados con el fenómeno de isquemia-reperfusión, situación lesiva asociada con estrés oxidativo (26) y alteración de la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (27). Así, la hipoxia química (desoxiglucosa más cianuro) provoca un aumento del contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y un descenso del pH intracelular en cultivos de miocitos, pero la viabilidad celular sólo se afecta cuando las células son lavadas e incubadas en medio control (modelo de perfusión), condiciones en las que se produce un aumento del pH intracelular (28). Si el aumento de pH se inhibe con dimetilamiloride, la viabilidad celular se mantiene, aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumente. Por otra parte, si los miocitos son reperfundidos en presencia de diclorobenzamilo, un inhibidor del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular disminuye, pero no se observa ningún efecto protector frente a la letalidad (29). Tales resultados indican que en el modelo de isquemia-reperfusión, es el cambio en el pH intracelular, más que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , el responsable de la lesión celular.

#### 5. PAPEL DEL CALCIO EN LA DISFUNCION MITOCONDRIAL INDUCIDA POR EL ESTRES OXIDATIVO

Los resultados mencionados anteriormente no apoyan la idea de un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como mediador fundamental de la acción citotóxica de los agentes oxidantes. Sin embargo, datos más recientes sugieren que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico está relacionado como causa o, más probablemente, resultado de una temprana despo-

larización de la membrana mitocondrial que se ha observado en muchos fenómenos de lesión y muerte celular (necrosis o apoptosis) inducida por estrés oxidativo (4). Los dos mecanismos hipotéticos propuestos implican, respectivamente, la disminución del potencial de membrana mitocondrial como consecuencia de un flujo acelerado de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la misma, o del incremento de la permeabilidad de la membrana interna, inducido por alteraciones estructurales de sus fosfolípidos.

### 5.1. Transporte incrementado de $\text{Ca}^{2+}$ y disfunción mitocondrial

Esta teoría postula que un incremento sostenido de la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través del sistema dependiente del potencial de membrana, llegaría a abolir o reducir dicho potencial (14,17). Por otra parte, la oxidación de los nucleótidos NADH y NADPH intramitocondriales resultaría en un eflujo acelerado de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria (14, 17). Dicha situación conduciría a un fenómeno de reciclaje de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial, acompañado de la pérdida de la capacidad homeostática de dicho orgánulo y de una desenergización de su membrana.

Los datos experimentales que apoyan esta hipótesis se basan en el efecto protector de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como EGTA o Quin-2, en correlación con el mantenimiento de la función mitocondrial (14, 17). Sin embargo, dichos agentes son también quelantes de iones férricos, por lo que la protección podría más bien deberse a una inhibición de la producción de radicales hidroxilo (4).

Por otra parte, la energía metabólica consumida en el reciclaje mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  no es sustancial y, probablemente, sería necesario un importante flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  para llegar a colapsar el potencial de membrana mitocondrial (4, 30). Por dicha razón, cabría esperar un aumento significativo de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  previamente a la despolarización mitocondrial. Sin embargo, diferentes datos experimentales, obtenidos independientemente con dos técnicas citométricas complementarias en modelos de lesión oxidativa, apoyan una secuencia de eventos en la que la reducción del potencial de membrana mitocondrial es un evento muy temprano, que precede al incremento significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la pérdida de la impermeabilidad de la membrana plasmática y la muerte celular (4, 31). En ambos estudios, se cuantificó la polarización mitocondrial con el fluorocromo catiónico rodamina 123, que se acumula en la matriz mitocondrial en función del potencial de membrana de la mitocondria (32, 33).

Así, Harman y Maxwell (4), mediante técnicas digitales de citometría de imagen, demuestran que la despolarización mitocondrial se produce en las etapas iniciales de la exposición de hepatocitos de ratón a concentraciones tóxicas de diferentes agentes inductores de estrés oxidativo (aloxano, adriamicina, menadiona o tBuOOH), mientras que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  es un fenómeno relativamente tardío y asociado a la lesión irreversible de la membrana plasmática y la necrosis celular.

## 5.2. Incremento transitorio de la permeabilidad de la membrana interna y pérdida del potencial mitocondrial

Recientemente, se ha renovado el interés en la conocida relación entre el estrés oxidativo y la inducción de permeabilidad transitoria en la membrana mitocondrial interna. Esta transición de permeabilidad supone una permeabilidad incrementada a los iones, hinchazón mitocondrial, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y colapso del potencial de membrana mitocondrial (34, 35). Hay datos experimentales que sugieren que dicha transición depende de cambios en el estado cíclico de acilación/desacilación de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial interna: la activación, dependiente de calcio, de la fosfolipasa  $a_2$ , conduciría a un incremento de la desacilación de fosfolípidos en condiciones de un aumento de  $Ca^{2+}$  intramitocondrial (36). Por su parte, el estrés oxidativo podría alterar aquel ciclo al inhibir la reacilación de los lisofosfolípidos y la consiguiente acumulación de éstos y de ácidos grasos en la membrana provocaría su disfunción. En este sentido, hay que destacar que la adición de lisofosfolípidos exógenos incrementa la permeabilidad mitocondrial (37), mientras que los inhibidores de la fosfolipasa  $a_2$  (38) y la ciclosporina A (39) revierten la permeabilidad.

De acuerdo con tales pruebas, es posible relacionar una elevación de  $Ca^{2+}$  intramitocondrial con un incremento de la degradación parcial de fosfolípidos de la membrana mitocondrial interna y un aumento de la permeabilidad de ésta, conducente a una despolarización de la mitocondria. Sin embargo, es difícil compatibilizar esta hipótesis con la teoría clásica que relaciona el daño oxidativo con la homeostasis de  $Ca^{2+}$  a través de la activación de enzimas degradativos, como las propias fosfolipasas, ya que dicha hipótesis predice un eflujo de  $Ca^{2+}$  intramitocondrial como consecuencia de la oxidación de tioles intramitocondriales y no un incremento de  $Ca^{2+}$  en el interior de la mitocondria (2,3).

## 6. DISFUNCION MITOCONDRIAL, ESTRES OXIDATIVO Y ALTERACION DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN LA APOPTOSIS

Hasta hace muy poco, los modelos de daño oxidativo, como los referidos anteriormente, en los que se ha evaluado la contribución de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , han consistido, fundamentalmente, en la inducción de necrosis, como punto final de la lesión celular. La muerte celular por necrosis es evidenciada metodológicamente por la pérdida irreversible de las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, bien por detección en el medio exterior de enzimas y otras macromoléculas intracelulares, bien por medida de la penetración de moléculas habitualmente excluidas por la membrana celular. En los últimos años, la Toxicología Celular ha tenido que incluir entre los sensores de daño celular el complejo fenómeno de la apoptosis, restringido hasta no hace mucho al concepto de muerte celular programada, y que, por el contrario, se ha demostrado estar presente en numerosísimos procesos farmacológicos y toxicológicos (40). Los estudios más

recientes indican que, en muchos casos (incluyendo modelos de lesión oxidativa), la inducción de muerte celular por apoptosis o por necrosis depende únicamente de la intensidad o la duración del efecto lesivo de la misma sustancia o de la sensibilidad de la célula diana (41-43).

Se entiende por apoptosis un tipo de muerte celular que difiere fundamentalmente, en naturaleza y sentido biológico, de la muerte accidental por necrosis, resultado de severos cambios lesivos no fisiológicos (40). En la apoptosis, un proceso activo de autodestrucción celular, regulado genéticamente, se dirige a la eliminación selectiva de células individuales o grupos celulares, con fines, en general, de mantenimiento de la homeostasis de una población celular. Por otra parte, el programa de apoptosis puede ser desencadenado por un gran número de señales extracelulares y su desregulación juega un papel importante en diversas patologías en las que la abundancia y la madurez funcional de poblaciones celulares específicas resultan alteradas (cáncer, inmunodeficiencias, fenómenos neurodegenerativos, etc.) (40).

Aunque los fenómenos bioquímicos relacionados con la decisión y ejecución de la muerte celular por apoptosis son todavía desconocidos en su totalidad, es importante, en el contexto del presente capítulo, destacar la conexión entre estrés oxidativo, homeostasis alterada del  $\text{Ca}^{2+}$  y disfunción mitocondrial que surge recientemente como posible ruta central que relaciona los eventos bioquímicos tempranos, posibles señalizadores metabólicos, con la instauración de un ambiente subcelular adecuado para la activación de mecanismos enzimáticos imprescindibles para la organización del proceso apoptótico. Por otra parte, dicha conexión se relaciona, a través de la función mitocondrial, con el alto coste energético del complejo y ordenado fenómeno de la apoptosis y predice la posible disyuntiva apoptosis frente a necrosis, en función del mantenimiento de un suficiente nivel intracelular de ATP (43).

Numerosos estudios experimentales demuestran que la apoptosis se acompaña por estrés oxidativo (44-48). Así, en determinadas condiciones, agentes inductores clásicos de estrés oxidativo inducen apoptosis (49). Por otra parte, la citometría de flujo funcional indica, además, que en determinados modelos de apoptosis no inducida por estrés oxidativo exógeno (como, por ejemplo, la supresión de factores de crecimiento, refs. 31, 41), se produce una generación temprana de especies reactivas del oxígeno. Una idea de la importancia fisiológica del estrés oxidativo en la apoptosis deriva del papel del protooncogén *bcl-2*, que induce una respuesta antioxidante y previene la apoptosis celular (43). Entre las especies oxidantes que han merecido atención reciente como mediadores de apoptosis, destaca el óxido nítrico (NO) y su derivado peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ), posiblemente como consecuencia de lesión oxidativa al DNA y expresión aumentada del gen supresor *p53* (50).  $\text{ONOO}^{\cdot}$ , por su parte, induce apoptosis de forma dependiente del tiempo y la concentración (51), aunque a concentraciones elevadas, puede inducir necrosis (52).

El papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la apoptosis es, aún, controvertido. Aunque desde hace muchos años es conocido que, en muchos casos, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular

acompaña a la apoptosis (40), las hipotéticas dianas metabólicas del  $\text{Ca}^{2+}$  incrementado y su papel señalizador/ejecutor en la apoptosis pueden ser múltiples. Así, la rotura secuencial de la cromatina nuclear, una marca característica de la apoptosis, parece deberse a la activación de endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , secundaria a un incremento de la concentración de este catión (11, 53). Otros enzimas degradativos podrían estar implicados en este efecto mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, diferentes proteasas de cisteína, similares a la proteasa ICE (Interleukin 1 $\beta$ -Converting Enzyme) de mamíferos y con el producto del gen pro-apoptótico *ced-3* de *Caenorabditis elegans*, son capaces de inducir la activación de nucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las especies reactivas de oxígeno y el  $\text{Ca}^{2+}$  están relacionados entre sí a través del compartimento mitocondrial. Por una parte, el estrés oxidativo estimula la liberación específica de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria y, por otra, una aceleración del ciclo liberación/captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (43). En el caso del NO, por ejemplo, su efecto está mediado por su unión a la citocromo oxidasa, la inhibición de la respiración mitocondrial y la desenergización de la mitocondria (43), mientras que el ONOO<sup>-</sup> parece activar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por una vía específica (43).

La relación indicada pone de manifiesto el importante papel de la función mitocondrial en los mecanismos de la apoptosis y, en general, de la muerte celular. Así, aunque en los fenómenos de necrosis, el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  incrementado parece ser bastante tardío en la secuencia de eventos morfológico-funcionales descritos, en los fenómenos de apoptosis, el reciclaje de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y su efecto energético parecen mucho más importantes, como postula el grupo de Richter (43), sobre la base del efecto protector de la ciclosporina A, un inhibidor de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducida por agentes oxidantes o por NO y de la supresión, por inhibidores de la captación mitocondrial de calcio, de la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . Para este grupo, la proteína bcl-2 representa el vínculo central entre estrés oxidativo,  $\text{Ca}^{2+}$  y potencial de membrana mitocondrial (PMM) en la inhibición de la apoptosis. Por una parte, bcl-2 suprimiría el reciclaje de calcio inducido por estrés oxidativo y estabilizaría así el PMM, evitando la depleción del ATP celular. Por otra parte, a través de una estabilización del cociente NADH/NAD<sup>+</sup> se podría inhibir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico por el mecanismo dependiente de la ADP-ribosa cíclica derivada de NAD<sup>+</sup> (43).

La integración de los anteriores conceptos conduce a la idea del papel regulador del PMM y, de forma inmediata, del contenido intracelular de ATP en los fenómenos de apoptosis y, también de muerte celular por necrosis. Según la hipótesis del control de la apoptosis por el nivel de ATP (43), una célula se mantendría viva mientras mantuviera un determinado nivel de ATP. Cuando el nivel de ATP cae por debajo de este umbral, se induce la apoptosis si se dispone de suficiente ATP para atender al coste energético del proceso ordenado de desintegración celular. Cuando la pérdida de ATP es demasiado severa, la muerte celular controlada se hace im-

posible y se instaura la necrosis. A favor de la hipótesis están los datos que muestran que la estabilización del PMM por sobreexpresión de bcl-2 o por acción del ionóforo nigericina previenen la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  (55) y el elevado PMM de muchas líneas de células procedentes de carcinomas (56). Muy interesante, en este contexto, es la elevada correlación positiva hallada entre la expresión de bcl-2 y el estado energético intracelular, estimado por el cociente ADP/ATP, y la relación negativa de ambos parámetros y la sensibilidad a la apoptosis inducida por glucocorticoides en seis diferentes líneas humanas o murinas de leucemia y linfoma (57). En tales experimentos, un cociente ADP/ATP cercano a 0.2 define el umbral entre supervivencia y muerte por apoptosis en todas las líneas.

La aplicación de la citometría de flujo y la separación celular permite el estudio secuencial de los cambios estructurales y funcionales que acompañan a la muerte celular (58). Mediante estas aproximaciones y utilizando un fluorocromo (JC-1) sensible específicamente al PMM, el grupo de Cossarizza (43, 59) ha mostrado que el PMM disminuye a medida que progresa la apoptosis en diferentes modelos experimentales, utilizando como indicador de progresión, la degradación endonucleásica de la cromatina nuclear en el conjunto de la población celular estudiada. Para Cossarizza et al., el PMM se mantiene en las etapas iniciales, de acuerdo con su papel energético necesario para completar determinados eventos bioquímicos, mientras que la caída del PMM en las etapas finales contribuye a la subsiguiente depleción de ATP. Por el contrario, otros grupos, en modelos similares de apoptosis, pero utilizando un fluorocromo (DiOC<sub>6</sub>(3)) de menor especificidad mitocondrial, han sugerido que el PMM disminuye ya en las primeras etapas de la apoptosis, anteriores a la degradación del DNA (60).

El carácter multiparamétrico de la citometría de flujo posibilita restringir los análisis metabólicos a células individuales en diferentes estadios del proceso apoptótico, estimados simultáneamente al parámetro funcional de interés, lo que evita la necesidad de separación física de las subpoblaciones diferenciadas o de utilizar modelos de apoptosis de progresión sincrónica. Mediante la aproximación multiparamétrica y utilizando como indicador de progresión de la apoptosis, la permeabilidad parcial al fluorocromo yoduro de propidio, en nuestro laboratorio hemos estudiado por citometría de flujo las variaciones del PMM, la generación de especies reactivas de oxígeno y los niveles intracelulares de calcio a lo largo de la progresión de la apoptosis en cultivos de hepatoma de rata incubados con bajas concentraciones de suero bovino fetal (1% SBF) o tratados durante varias horas con concentraciones bajas de peróxido de ter-butilo. Nuestros resultados (Figura 2) muestran (31, 41) que las etapas iniciales de la apoptosis están acompañadas por una reducción significativa del PMM (determinado con un fluorocromo específico mitocondrial, rodamina 123), una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y un incremento discreto del Ca<sup>2+</sup> intracelular. La progresión en el proceso apoptótico supone un notable incremento del PMM y de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. Estos datos apoyan la idea de que un menor aporte energético mitocondrial, asociado con estrés oxidativo (endógeno o exógeno) se produciría en los estadios iniciales

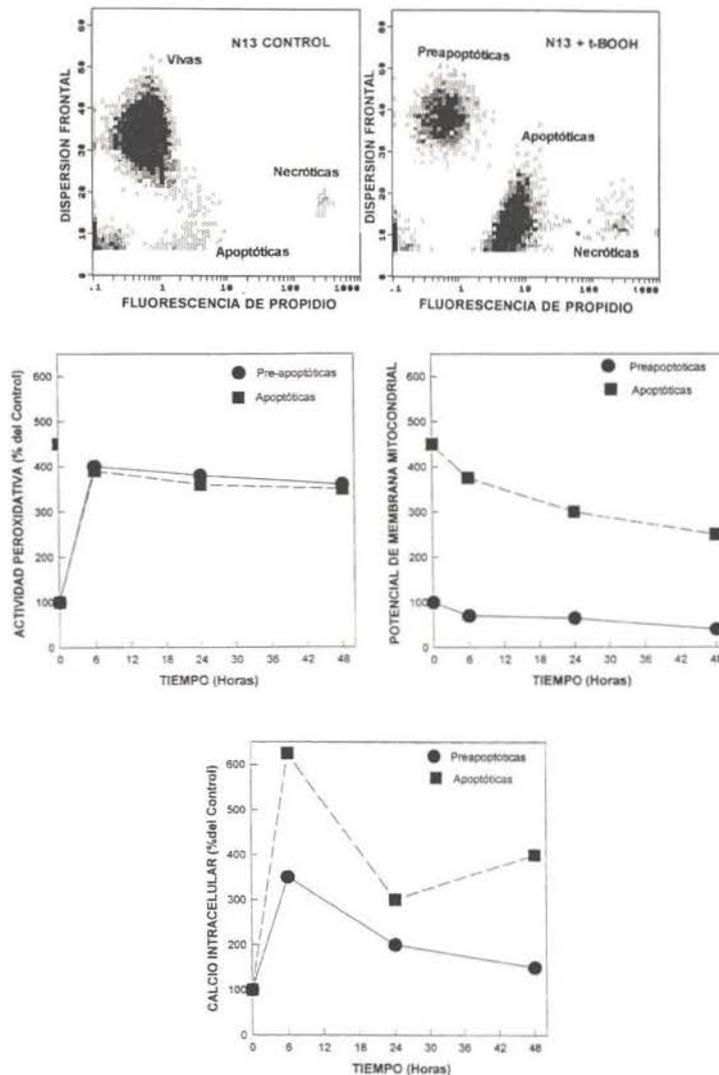


Figura 2. Secuencia de eventos metabólicos en la progresión de la apoptosis inducida por peróxido de ter-butilo 1mM en cultivos de hepatoma de rata. El panel superior de la figura muestra la discriminación por citometría de flujo de células preapoptóticas y apoptóticas por sus propiedades de dispersión de luz y permeabilidad parcial al yoduro de propidio. Se aprecia un incremento en el porcentaje de células en apoptosis en un cultivo incubado con 1 mM peróxido de ter-butilo (t-BOOH). Los trazados siguientes muestran la evolución temporal de la actividad peroxidativa, el potencial de membrana mitocondrial y los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , determinados por citometría de flujo, en las poblaciones preapoptóticas y apoptóticas en dichas condiciones experimentales. Se aprecia que la generación de especies reactivas de oxígeno es un evento temprano, que se produce con igual intensidad en las células preapoptóticas y en las apoptóticas. El potencial de membrana mitocondrial disminuye en las preapoptóticas y aumenta en las apoptóticas, mientras que la acumulación de  $Ca^{2+}$  es mucho mayor en las células apoptóticas.

de la apoptosis, mientras que la utilización de la energía mitocondrial para los procesos regulados por la vía apoptótica, podría contribuir al desabastecimiento de ATP intracelular y a la desregulación de la homeostasis del calcio.

El delicado equilibrio entre apoptosis y necrosis, podría ser alterado incluso cuando una célula ya ha iniciado la vía apoptótica de muerte celular. Así, datos recientes de nuestro laboratorio, obtenidos por citometría de flujo en células de hepatoma con restricción de SBF, sugieren que la reducción del PMM por sobrecarga de las células en etapas tempranas de apoptosis con el propio fluorocromo rodamina 123 (molécula catiónica lipofílica con propiedades análogas a las de agentes ionóforos clásicos), desvía estas células hacia la muerte por necrosis, evidenciada por una pérdida casi inmediata de la impermeabilidad al yoduro de propidio (Manuscrito en preparación).

## 7. CONCLUSIONES

La asociación entre estrés oxidativo y alteración de la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es un fenómeno biológico importante en los mecanismos de inducción de muerte celular por necrosis accidental o por apoptosis, por lo que su estudio experimental tiene importantes implicaciones en la comprensión de fenómenos tóxicos y farmacológicos, pero también de orden fisiológico en relación con el control de poblaciones celulares por muerte celular programada.

Los datos experimentales más recientes indican que el compartimento mitocondrial juega un papel esencial en la relación entre estrés oxidativo y homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo la mitocondria, a la vez fuente y diana de numerosas especies oxidantes derivadas del oxígeno y comportándose dicho orgánulo como aceptor o liberador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Precisamente, una teoría apoyada por datos experimentales concretos, postula que un incremento del reciclaje de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial supondría la desenergización de la mitocondria y redundaría en una pérdida celular de ATP. El estrés oxidativo, a su vez, es causa y consecuencia de este fenómeno y la prevención de su inducción puede inhibir o atenuar la intensidad de la lesión celular, demostrando su importante relación con las alteraciones indicadas, siendo sugerente la conexión metabólica entre la acción antioxidante de la proteína bcl-2, producto de un gen antiapoptótico, con el mantenimiento de los niveles intracelulares de energía.

El análisis bioquímico en diferentes modelos de muerte celular parece demostrar que el contenido intracelular de ATP es el parámetro clave en la determinación de la supervivencia celular frente a diferentes tipos de lesión, incluyendo lesión oxidativa. El mantenimiento de una carga energética adecuada (un cociente ADP/ATP cercano a 0.2) permitiría la supervivencia celular. Una disminución de ATP, manteniendo un nivel suficiente para la ejecución de diferentes procesos ordenados, permitiría la inducción de la muerte celular por apoptosis, mientras que una caída

más rápida o importante del ATP intracelular sería incompatible con una disgregación celular regulada y desencadenaría la destrucción celular por necrosis.

La utilización de técnicas avanzadas de análisis en células individuales, como son la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia (digital y confocal) debe permitir un avance significativo en la resolución de los fenómenos de lesión celular derivados del estrés oxidativo y la desregulación de la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y su aplicación al mejor conocimiento de un fenómeno de esencial implicación fisiológica, terapéutica y toxicológica como es la muerte celular.

### Agradecimientos

Los resultados de nuestro laboratorio presentados en este capítulo corresponden a un proyecto de investigación subvencionados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (95/0032-02) y la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana (GV-2503/94)

### 8. BIBLIOGRAFIA

1. Schanne FAX, Kane AB, Young EE y Farber JL (1979), Calcium dependence on toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206: 700-702.
2. Jewell SA, Bellomo G, Thor H y Orrenius S (1982), Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217: 1257-1259.
3. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G y Nicotera P (1989), Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10: 281-285
4. Harman AW y Maxwell MJ (1995), An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 129-144.
5. Haughland RP, Spence MTZ y Johnson ID (1996), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6<sup>th</sup> Ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. pp. 503-550.
6. Tsien RY (1981), A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290: 527-528.
7. Riollet S y Champeil P (1987), The calcium-sensitive dye arsenazo III inhibits calcium transport and ATP hydrolysis by sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Anal Chem* 162: 160-162.
8. Tsokos-Kuhn JO (1989), Evidence in vivo for elevation of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  in the liver after diquat, acetaminophen and  $\text{CCl}_4$ . *Biochem Pharmacol* 38: 3061-3065.
9. Rabinovitch PS, June CH y Kavanagh TJ (1993), Measurements of cell physiology: Ionized calcium, pH and glutathione. En: Clinical Flow Cytometry (KD Bauer, RE Duque y TV Shankey, eds.). Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 505-534.
10. Lemasters JJ, DiGiuseppi J, Nieminen AL y Herman B (1987), Swelling, reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes. *Am J Physiol* 26, C347-C354.
11. McConkey DJ y Orrenius S (1996), The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukoc Biol* 59: 775-783.
12. Persecchini A, Moncrief ND y Kretsinger RH (1990), The EF-hand family of calcium modulated proteins. *Trends Neurosci* 12: 462-467.
13. Moore MH, Thor G, Moore G, Nelson SD, Moldeus P y Orrenius S (1985), The toxicity

- of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic  $Ca^{2+}$ . *J Biol Chem* 260: 13035-13040.
14. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S (1990), The role of  $Ca^{2+}$  in cell killing. *Chem Res Toxicol* 3: 484-494.
  15. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S (1992), Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 449-470.
  16. Gasbarrini A, Borle AB y Van Thiel DH (1993),  $Ca^{2+}$  antagonists do not protect isolated perfused rat hepatocytes from anoxic injury. *Biochim Biophys Acta* 1177: 1-7
  17. Swann JD, Smith MW, Phelps PC, Maki A, Berezesky IK y Trump BF (1991), Oxidative injury induces influx-dependent changes in intracellular calcium homeostasis. *Toxicol Pathol* 19: 128-137.
  18. Rojanasakul Y, Wang L, Hoffman AH, Shi X, Dalal NS et al. (1993), Mechanisms of hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overloading in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8: 377-383
  19. Harman AW, Mahar SO, Burcham PC y Madsen BW (1992), Level of cytosolic free calcium during acetaminophen toxicity. *Mol Pharmacol* 41: 665-670.
  20. Johnson JD, Conroy WG e Isom GE (1987), Alteration of cytosolic calcium levels in PC12 cells by potassium cyanide. *Toxicol Appl Pharmacol* 88: 217-224.
  21. Lemasters JJ, Nieminen A-L, Gores GJ, Wray BE y Herman B (1989), Cytosolic free calcium and cell injury in hepatocytes. En: *Cell Calcium Metabolism* (G Fiskum, Ed.). New York, Plenum Press. pp. 46-70.
  22. Sakaida I, Thomas AP y Farber JL (1991), Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide. *J Biol Chem* 266: 712-722.
  23. Long RL y Moore L (1986), Elevated cytosolic calcium in rat hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *J Pharmacol Exp Ther* 238: 186-191.
  24. Lemasters JJ y Thurman RG (1981), Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. *Science* 213: 661-663.
  25. Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor H y Orrenius S (1989), Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are modulated by oxidative and  $Ca^{2+}$ -dependent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 270: 478-488.
  26. McCord JM (1985), Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163.
  27. Nayler WG, Poole-Wilson PA y Williams A (1979), Hypoxia and calcium. *J Mol Cell Cardiol* 11: 683-706.
  28. Bond JM, Chacon E, Herman B y Lemasters JJ (1993), Intracellular pH and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 34: C129-C137.
  29. Bond JM, Harper IS, Chacon E, Reece JM, Herman B y Lemasters JJ (1994), The pH paradox in the pathophysiology of reperfusion injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Ann NY Acad Sci* 723: 25-37.
  30. Stucki JW e Ineichen A (1974), Energy dissipation by calcium recycling and the efficiency of calcium transport in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 48: 365-375.
  31. Callaghan RC, Alonso A, Castro B, Gil R, Juan G y O'Connor, J.E. (1996), Flow cytometric and confocal study of functional alterations leading to apoptosis in a rat hepatoma. *Cytometry Suppl.* 8: 138.
  32. Emaus RK, Grunwald R y Lemasters JJ (1986), Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria, spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850: 436-448.
  33. Juan G, Cavazzoni M, Sáez GT y O'Connor JE (1994), A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with Rhodamine 123 and flow cytometry. *Cytometry* 15: 335-342.
  34. Hunter DR, Haworth RA y Southard JH (1976), Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251: 5069-5077.

35. Gunter TE y Pfeiffer DR (1990), Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258: C755-C786.
36. Beatrice MC, Steirs DL y Pfeiffer DR (1984), The role of glutathione in retention of Ca<sup>2+</sup> by mitochondria. *J Biol Chem* 259: 1279-1287.
37. Dalton S, Hughes BP y Barritt GJ (1984), Effects of lysophospholids on Ca<sup>2+</sup> transport in rat liver mitochondria incubated at physiological concentrations in the presence of Mg<sup>2+</sup> phosphate and ATP at 37°C. *Biochem J* 224: 423-430.
38. Brockemeier KM, Schmid PC, Schmid HHO y Pfeiffer DR (1985), Effects of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors on ruthenium red-induced Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. *J Biol Chem* 260: 105-113.
39. Fournier N, Ducet G y Crevat A (1987), Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr* 19: 297-303.
40. Thompson CB (1995), Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 267: 1456-1462.
41. Alvarez-Barrientos A, Callaghan RC, Cascales M, Juan G y O'Connor JE (1993), Flow cytometric analysis of in vivo and in vitro apoptosis in hepatocytes and hepatoma cells. *Eur J Histochem* 37 (Suppl. 2), 92
42. Juan G (1994), Análisis citométrico en modelos de lesión metabólica y muerte celular en hepatocitos de rata normales y transformados. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
43. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A y Franceschi C (1996), Control of apoptosis by the cellular level. *FEBS Lett* 378: 107-110.
44. Adams JD, Mukherjee SK, Klaidman LK, Chang ML y Yasharel R (1996), Apoptosis and oxidative stress in the aging brain. *Ann NY Acad Sci* 786: 135-151.
45. McGowan AJ, Fernandes RS, Samali A y Cotter TG (1996), Anti-oxidants and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 24: 229-233.
46. Kohno T, Yamada Y, Hata T, Mori H, et al. (1996), Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells. *J Immunol* 156: 4722-4728
47. Payne CM, Bernestein C y Bernstein H (1995), Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma* 19: 43-49.
48. Baier-Bitterlich G, Wachter H y Fuchs D (1996), Oxidative stress and apoptosis in HIV infection. *Science* 271: 582-583.
49. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, et al. (1995), Oxidants in mitochondria, from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 67-74.
50. Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P y Brüne B (1994), p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 355: 23-25
51. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B y Wong PYK (1995), Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 270: 16487-16490.
52. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P y Lipton SA (1995), *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162-7166.
53. Kokileva L (1994), Multi-step chromatin degradation in apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 339-343.
54. Martin SJ y Green DR (1995), Protease activation in apoptosis, death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349-352.
55. Hennes T, Bertoni G, Richter C y Peterhans E (1993), Expression of BCL-2 protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in Tumor Necrosis Factor-mediated cell death. *Cancer Res* 53: 1456-1460.
56. Chen LB (1988), Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 4: 155-181.
57. Smets LA, Van den Berg J, Acton D, Top B, Van Rooij H y Verwijs-Janssen (1994), Bcl-2 expression and mitochondrial activity in leukemia cells with different sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood* 84: 1613-1619
58. Darzynkiewicz Z., Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T y Traganos F. (1996), Cyto-

metry in cell necrobiology. Analysis of apoptosis, accidental cell death and necrosis. *Cytometry* 25: 1-20.

59. Barbieri D, Grassilli E, Monti D, Salvioli S et al. (1994), D-ribose and deoxy-D-ribose induce apoptosis in human quiescent peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 1109-1116.
60. Zamzani N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C et al. (1995), Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 181: 1661-1672.

# OXIDO NITRICO Y ENFERMEDADES VASCULARES

JESUS MARIN<sup>1</sup> Y SALVADOR MONCADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, Madrid y <sup>2</sup>The Cruciform Project London, Reino Unido.

## SUMARIO

---

### RESUMEN

1. INTRODUCCION
2. ENDOTELIO VASCULAR Y SINTESIS DE NO
  2. 1. EDRF y NO
  2. 2. Síntesis celular del NO
  2. 3. Características de las isozimas de la NOS
  2. 4. Mecanismos de acción del NO
3. ACCIONES CARDIOVASCULARES DEL NO
4. ENFERMEDADES VASCULARES Y NO
  4. 1. NO e hipertensión
  4. 2. NO y aterosclerosis
  4. 3. NO y diabetes mellitus
  4. 4. NO, isquemia cerebral y migraña
  4. 5. NO y sepsis
  4. 6. NO, insuficiencia cardíaca e isquemia miocárdica
5. POSIBILIDADES TERAPEUTICAS
  5. 1. Donadores de NO
  5. 2. L-arginina
6. BIBLIOGRAFIA

## RESUMEN

En este trabajo se ha analizado el efecto de las enfermedades vasculares sobre la síntesis y función del óxido nítrico (NO) a nivel vascular. El NO se sintetiza a partir del nitrógeno del terminal guanidino de la L-arginina por medio de la NO sintasa (NOS) de la que se han descrito dos isoformas, una constitutiva (neuronal y endotelial) y otra inducible, dependiente e independiente de calcio y calmodulina, respectivamente. El NO activa la guanilato ciclasa soluble en las células receptoras, incrementando sus niveles intracelulares de GMPc, que en el caso de las células musculares lisas o de las plaquetas media los efectos vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios, producidos básicamente por su capacidad para reducir el calcio libre intracelular. El NO es además depresor de la contractilidad miocárdica y citostático. Una deficiencia en la formación de NO se ha implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades, tales como la hipertensión esencial, la aterosclerosis, la angina y el vasospasmo. En otros casos, una excesiva producción de NO puede ser inapropiada y estar implicada en la hipotensión, sepsis, accidentes isquémicos cerebrovasculares, depresión miocárdica y respuestas inflamatorias. La hipertensión produce cambios morfológicos que afectan al endotelio y que usualmente conducen a un desbalance entre los factores endoteliales vasoconstrictores (como el tromboxano A<sub>2</sub>) y vasodilatadores (prostaciclina y NO). El tratamiento antihipertensivo no parece revertir la disfunción endotelial en los pacientes hipertensos. La aterosclerosis y la diabetes mellitus producen una reducción de la relajación endotelio-dependiente debido a una disminución de la formación endotelial de NO así como a un incremento de los radicales libres de oxígeno, y en el caso de la diabetes también a un incremento de los eicosanoides vasoconstrictores. En el shock séptico existe una excesiva producción de NO por activación de la NOS inducible lo que explica la marcada depresión miocárdica y la incapacidad de los agentes vasoconstrictores, como la dopamina, para inducir respuestas. En los procesos patológicos antes mencionados, en los que se ha constatado una deficiencia en la formación vascular de NO, se ha intentado subsanar por diferentes vías que aportan este compuesto, incluida la administración directa de NO; entre estas vías merece especial mención los agentes donantes de NO, considerados como profármacos, y la L-arginina que facilita su formación.

## 1. INTRODUCCION

En la actualidad se considera al endotelio vascular como una glándula endocrina capaz de generar una serie de sustancias que juegan un papel importante en la modulación de la homeostasis vascular, así como en la regulación de determinadas funciones fisiológicas, tales como la inflamación, la agregación plaquetaria, la fibrinólisis, la angiogénesis y la mecanorrecepción (1-3). Posee la enzima convertidora de la angiotensina que participa en el metabolismo de compuestos tales como la angiotensina y la bradicidina (1, 2).

El endotelio sintetiza una gran variedad de sustancias paracrinas tales como el potente agente vasoconstrictor endotelina, los agentes antiadherentes y antiagregantes, como la prostaciclina y el factor relajante derivado del endotelio (EDRF), el factor activador de plaquetas, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), el factor tisular activador de plasminógeno, interleucinas, el factor von Willebrand y algunos factores de crecimiento (1, 4-8). Asimismo, se ha demostrado que el EDRF es el radical libre óxido nítrico (NO) (7, 9-12).

El objeto del presente estudio es comentar los resultados descritos en la literatura científica relacionados con el papel del NO en las enfermedades vasculares analizando previamente los mecanismos implicados en la síntesis de NO.

## 2. ENDOTELIO VASCULAR Y SINTESIS DE NO

### 2.1. EDRF y NO

Furchgott y Zawadzki (13) descubrieron en 1980 el EDRF al demostrar la capacidad de las células endoteliales para liberar este potente agente vasodilatador que modula determinadas respuestas vasodilatadoras. Este factor induce una vasodilatación rápida y transitoria (11, 13, 14). Inicialmente se sugirió que el EDRF podría ser un factor lábil que participaba en las reacciones redox a pH fisiológico (14-16), incluyendo la posibilidad de que el EDRF fuera un radical libre derivado del metabolismo del ácido araquidónico (7, 14). En 1987, Palmer *et al.* (9) demostraron que las células endoteliales de aorta de cerdo en cultivo liberaban NO, que detectaron por quimioluminiscencia, en una concentración suficiente para inducir vasodilatación, demostrando de esta manera que el EDRF era precisamente NO. El hecho de que el NO también produjera una relajación transitoria en anillos de aorta de conejo, similar a la relajación causada por el EDRF, y que ambas relajaciones se inhibieran de forma semejante por la hemoglobina y se potenciaran por superóxido dismutasa, barredores de NO y del anión superóxido ( $O_2^-$ ), respectivamente (11, 17), confirmó adicionalmente que el EDRF y el NO parecían ser la misma sustancia. Otros experimentos también apoyaron esta hipótesis, es decir, que el EDRF y el NO son indistinguibles farmacológicamente, con vida media similar (9, 11). Todos estos hallazgos permitieron concluir definitivamente que el EDRF es NO (7, 9-11).

El NO es una de las más pequeñas y ubicuas moléculas conocidas y un importante metabolito en las células de los mamíferos (11, 18). Es un gas con una solubilidad moderada en agua, alcanzando en condiciones normales a nivel de saturación una concentración de 1,9 mM (19, 20). Es un radical libre conteniendo un electrón desapareado que puede intervenir en varias reacciones, actuando como un débil oxidante o reductor (21). Su carga neutra le permite una difusión libre a través de las membranas biológicas (22).

El NO puede reaccionar con el  $O_2^-$  formando en una solución acuosa el potente oxidante denominado peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que parece estar implicado en la oxidación de proteínas en condiciones fisiológicas (12, 22).

El NO es capaz de formar S-nitrosotioles al reaccionar con grupos sulfhidrilo (-SH). Los S-nitrosotioles son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria y vasodilatadores como el EDRF (22).

## 2.2. Síntesis celular del NO

Un número elevado de células poseen la capacidad de sintetizar NO a partir del átomo de nitrógeno del grupo guanidino terminal de la L-arginina por medio de la enzima NO sintasa (NOS) (9, 10, 23) (Figura 1). Esta síntesis implica la formación del compuesto intermedio,  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (L-OHArg) por medio de la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) (11, 24). El compuesto L-OHArg se forma por N-oxigenación de la L-arginina (25-27), a continuación se produce una ruptura oxidativa del enlace C=N de la L-OHArg, conduciendo a la formación del aminoácido citrulina y el NO (25-28); en ambos pasos se consume NADPH y  $O_2$  (25, 26, 29) (Figura 1).

Dada la importancia de la L-arginina para la actividad de la NOS, las células que sintetizan NO poseen un sistema para la captación activa intracelular de la arginina. El transportador para esta captación o incorporación es, esencialmente, el denominado  $y^+$ , que transporta aminoácidos catiónicos (20, 30). Algunos inhibidores de la NOS, tales como la L- $N^G$ -metilarginina y L-iminoetilornitina, parecen competir con la arginina por el transportador  $y^+$ , por lo que su potencia puede incrementarse al reducirse la cantidad de arginina disponible (20).

La síntesis y liberación de EDRF es un proceso dependiente de calcio (11, 29, 31, 32). Existe un consenso general de que las células endoteliales no poseen canales de calcio voltaje-dependientes funcionales (33, 34). El tipo de canal de calcio por el que entra a las células o la vía por la que se incrementan los niveles intracelulares de calcio no está claramente establecido. Se ha sugerido que la entrada se produce a través de canales dependientes de receptores y que la liberación de calcio de los depósitos intracelulares parece participar en el incremento de estos niveles (35).

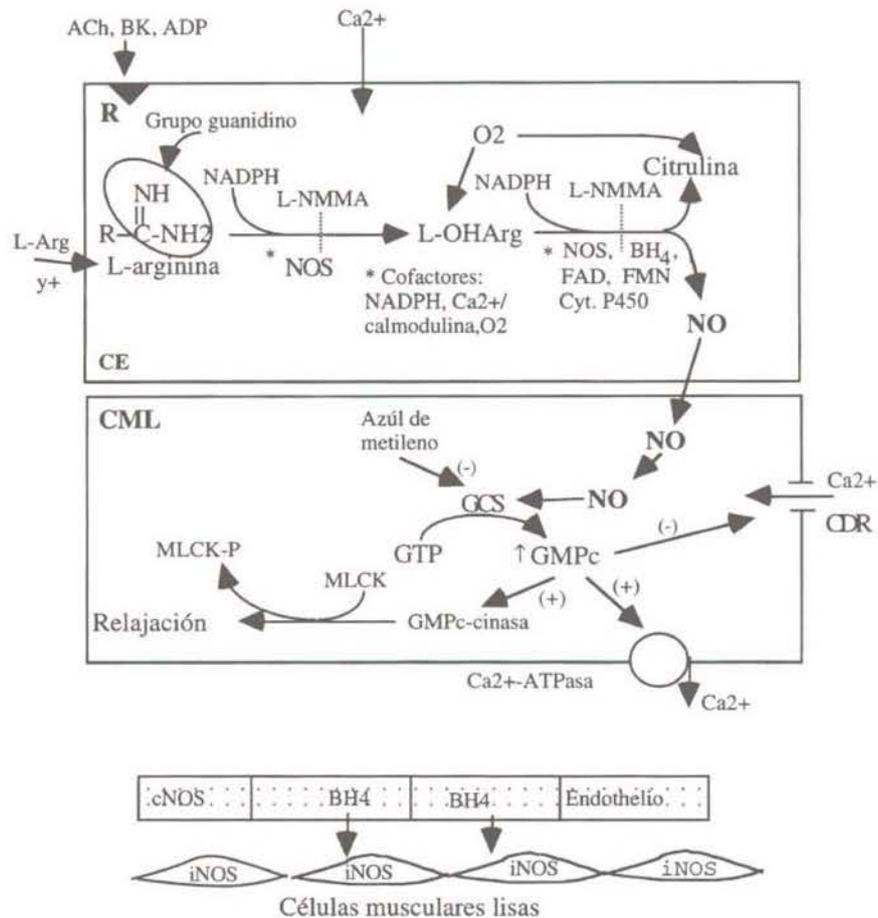


Figura 1. Biosíntesis del NO a partir del grupo guanidino terminal de la L-arginina por la célula endotelial (CE); L-arginina (L-Arg) entra a la célula endotelial a través del sistema  $\gamma^+$ . En las células endoteliales, la activación de receptores (R) por sus correspondientes agonistas (acetilcolina, ACh; bradicidina, BK; ADP, etc.) conduce a la entrada de calcio y a la síntesis de NO por activación de la NO sintasa (NOS) que incorpora oxígeno ( $O_2$ ) para formar L-citrulina y NO a través de un compuesto intermediario  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (L-OHArg). Esta sintasa se bloquea con  $N^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA). La oxidación de L-OHArg a L-citrulina también requiere NADPH y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ). El citocromo P450 puede también catalizar el segundo paso en la formación de NO y citrulina. En la célula muscular lisa (CML), el NO activa la guanilato ciclasa soluble (GCS) incrementando los niveles de GMPC, dicha enzima se inhibe con el azul de metileno. El GMPC formado tras la estimulación de la GCS produce relajación por varios mecanismos entre los cuales podemos mencionar la inhibición (-) de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales dependientes de receptores (CDR), estimulación (+) de la ATPasa cálcica de la membrana o de la cinasa dependiente del GMPC que puede fosforilar a la miosina de cadena ligera (MLCK); mecanismos que conducen a la vasodilatación. En la parte inferior: en la inflamación las células endoteliales regulan la síntesis de NO en células musculares lisas a través del aporte de  $BH_4$ , cNOS y iNOS= NO sintasa constitutiva e inducible. Para más detalles consultar el texto.

El mecanismo fundamental implicado en la relajación del músculo liso vascular inducido por el NO consiste en la reducción del calcio libre intracelular (36-38). Sin embargo, este mecanismo no es único puesto que parece existir otro independiente del calcio libre citosólico (38).

La despolarización y la ouabaína, un inhibidor de la ATPasa Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- dependiente, reducen la vasodilatación dependiente del EDRF (39,40,41), lo que sugiere una implicación de esta enzima en el efecto o liberación de este factor.

La supresión del endotelio incrementa la vasoconstricción inducida por diferentes agentes (10,42). Tal hecho podría ser debido a un efecto inhibitorio del EDRF sobre los mecanismos contráctiles de las células musculares lisas o a una inhibición de la liberación de este factor por esos agentes contráctiles. En cualquier caso, el EDRF parece interferir con el desarrollo de la contracción, probablemente por simple antagonismo fisiológico.

La estabilidad del NO es menor que la del otro poderoso vasodilatador endotelial prostaciclina. Este último compuesto posee una vida media de unos 3 min puesto que es rápidamente convertido en otro inactivo 6-ceto-prostaglandina F<sub>1α</sub> (43). La prostaciclina y el NO son antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores por diferentes mecanismos. En efecto, el NO produce sus efectos por activación de la guanilato ciclasa (ver más adelante), que incrementa los niveles de GMPc de las plaquetas y de las células musculares lisas (44-46). Sin embargo, la prostaciclina produce efectos similares, pero mediados por la estimulación de la adenilato ciclasa, que incrementa los niveles intracelulares de AMPc (47). Además, los efectos del NO y de la prostaciclina se potencian para inhibir la agregación plaquetaria; así, el NO liberado de los neutrófilos y de otras células blancas incrementa el efecto antiagregante plaquetario de la prostaciclina endotelial (48).

### 2.3. Características de las isozimas de la NOS

La NOS es una enzima que está presente en una gran variedad de células. Se ha descrito la existencia de varias isoformas o isozimas de la NOS, dos de las cuales son constitutivas (cNOS) y otra es inducible (iNOS) por estímulos inmunológicos. La cNOS se subdivide en dos subtipos, la detectada inicialmente en el endotelio, denominada NOS endotelial (eNOS), y la presente en el sistema nervioso central y periférico denominada NOS neuronal (nNOS) (49-51). Así, la nNOS se expresa constitutivamente en cerebro (52, 53), médula espinal (54), ganglios simpáticos (55, 56), nervios nitrérgicos periféricos (descritos previamente como no adrenérgicos no colinérgicos, NANC) (57, 58), glándulas suprarrenales (56, 59), células epiteliales del útero, pulmón y estómago (60), plaquetas (61, 62) y células pancreáticas (63). La iNOS usualmente no se expresa constitutivamente, y puede ser inducida por el lipopolisacárido bacteriano y las citocinas en los macrófagos (64-66), células endoteliales (67, 68), hepatocitos (67, 69, 70), neutrófilos (71, 72) o células

musculares lisas (73). La eNOS se expresa constitutivamente en las células endoteliales (74-76).

Aunque la nNOS, eNOS e iNOS se han asociado, respectivamente, a neuronas, endotelio e inducibilidad por citocinas, no siempre tienen esa ubicación o propiedad (51). Así, también se ha localizado la eNOS en las plaquetas (62) y en ciertas poblaciones neuronales de cerebro (77) y la nNOS en los epitelios de tráquea y bronquios (78). Asimismo, la actividad y cantidad de las sintetas constitutivas, eNOS y nNOS, puede incrementarse, indicando que esas isoformas son capaces de inducirse. Por el contrario, la iNOS, originalmente descrita como inducible en condiciones patológicas, también parece funcionar en condiciones fisiológicas (50). Así, el tratamiento con estradiol y durante el embarazo se incrementan los mRNAs para la eNOS y la nNOS (79). La distensión vascular *in vitro* y el ejercicio crónico también incrementan la expresión del gen de la eNOS en el endotelio de aorta (50, 80). La nNOS e iNOS son enzimas predominantemente solubles o citosólicas, mientras que la nNOS es particulada o membranosa en más de un 90% (81). Recientemente, se han desarrollado unos ratones mutantes («knockout mice») que no expresan el gen de determinadas isoformas de la NOS (ver 82), como la isoforma nNOS (83) o la iNOS (84), lo que permite analizar la importancia o implicación de una isoforma en la función que se desea investigar. Estos animales abren una interesante vía para investigar la función del NO en determinados procesos.

Se han purificado y clonado las isozimas de la NOS de diferentes fuentes, incluyendo cerebro de rata, macrófagos de ratón, células musculares lisas vasculares, células endoteliales bovinas, entre otras (20, 50, 85).

Las secuencias del DNA complementario de esas enzimas se han aislado de diferentes tipos de células. Especialmente en el hombre, se ha descrito la presencia de tres diferentes genes que codifican las tres isozimas nNOS, iNOS y eNOS, los cuales están localizados en los cromosomas 12 (86, 87), 17 (88) y 7 (86, 88), respectivamente.

Se han caracterizado los DNAs complementarios de la nNOS de rata y hombre, los cuales han mostrado que existen especies de mRNA de aproximadamente 10 kb que codifican proteínas de 1429 y 1433 aminoácidos, respectivamente. La identidad de la secuencia de esas proteínas correspondiente a las dos especies es elevada (93%) (49-50). La eNOS difiere de la nNOS en la masa molecular (133.000 para la eNOS purificada, 162.000 para nNOS), y las dos proteínas humanas comparten sólo el 57% de identidad de la secuencia de aminoácidos (29, 49, 50). El término NH<sub>2</sub> de la eNOS posee unos 220 aminoácidos menos en su dominio aminoacídico que la nNOS, y puede reaccionar con el ácido mirístico (89) o palmítico, formando compuestos que facilitan su localización en la membrana celular (20, 50).

En la iNOS de macrófagos procedentes de roedores, se han observado unas especies de mRNA de 4 a 5 kb que codifican a una proteína de 130,6 kDa.

Su semejanza en la identidad de secuencia de aminoácidos con la eNOS y la nNOS es de sólo 51% y 54%, respectivamente. En el riñón de rata, se han identificado dos formas diferentes de iNOS, cuya expresión puede inducirse de forma diferente por el lipopolisacárido bacteriano y las citocinas, lo que sugiere que algunos tipos de células tienen la capacidad de expresar diferentes isoformas de la iNOS (90).

Todas las mencionadas isoformas de la NOS utilizan L-arginina así como oxígeno molecular y NADPH durante las reacciones catalizadas. Además, las tres isoformas contienen un grupo hemo y requieren como cofactores a  $BH_4$ , flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN) (27, 52, 64). Se ha descrito que las citocinas, tales como el interferon- $\gamma$  o el factor  $\alpha$  necrosante tumoral, incrementan marcadamente las concentraciones de  $BH_4$ , que es un cofactor limitante para la actividad de la NOS (91). La nNOS y la eNOS son enzimas dependientes de calcio y calmodulina (52, 81, 92, 93), mientras que la iNOS se activa plenamente en ausencia de calcio exógeno o calmodulina y es regulada transcripcionalmente por varias citocinas. La iNOS puede también fijar calmodulina (65, 66), y de hecho, en macrófagos de ratón, esta fijación es tan fuerte que se puede considerar a la calmodulina como una subunidad de la iNOS (94). Esta iNOS produce una mayor liberación de NO y de más larga duración que la generada por la eNOS y nNOS que es pequeña (11, 50, 95). Ambas, las constitutivas y la iNOS, se inhiben competitivamente por la  $N^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA) y otros compuestos análogos de la L-arginina (11, 18, 96) (Figura 1), mientras que la enzima inducible se inhibe con corticoides (11, 97).

La eNOS y la nNOS pueden fosforilarse, siendo la nNOS fosforilada por la proteína cinasa II dependiente de calcio y calmodulina, proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa cAMP-dependiente (92, 93). La fosforilación por la PKC produce una clara reducción de la actividad de la enzima (98). La fosforilación de la eNOS parece regular su translocación celular y, por tanto, su reactividad a la distensión vascular, que produce liberación de hormonas y agentes vasodilatadores, como la bradicidina, de las células endoteliales al ser estimuladas (20).

Se ha descrito en células endoteliales en cultivo que la actividad de la NOS se modula también por la PKC (99). Así, la inhibición de la PKC incrementa la actividad basal de la NOS y la estimulada por agonistas, mientras que su activación reduce la liberación de NO (100, 101). Sin embargo, no está claro si el resultado de tales intervenciones son consecuencia de un efecto de la PKC en la propia NOS, descrito en cerebro (92), o en la señal intracelular de calcio (100). Por consiguiente, un mecanismo esencial por el que las enfermedades vasculares pueden interferir en la formación del NO endotelial es facilitando la activación de la PKC que inhibe el incremento de calcio posterior a la activación del receptor endotelial (97, 102, 103), y también pueden inhibir la NOS directamente (93, 97). Asimismo, el NO puede inhibir la NOS regulando su síntesis y actuando como un mecanismo de control endógeno (20, 104, 105).

Las NOSs muestran un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos con la NADPH-citocromo P450 reductasa (20, 106) (Figura 2). En particular, la NOS del cerebelo de rata y la citocromo P450 reductasa de rata muestran en su mitad carboxílica terminal un 36% de identidad y un 58% de estrecha homología (107) (Figura 2). De hecho, la NOS de los macrófagos de ratón se caracteriza espectral y enzimáticamente como una hemoproteína del tipo P450 (108). La presencia de FAD y FMN y de la sorprendente homología con la NADPH-citocromo P450 reductasa indican que la NOS es la primera enzima soluble P450 de mamífero catalíticamente autosuficiente, conteniendo una reductasa y un dominio citocromo P450 (106, 108). Además, los P450s microsomales hepáticos son capaces de catalizar la oxidación de la L-OHArg a L-citrulina y a óxidos de nitrógeno, incluyendo el NO (109, 110). Se han descrito resultados similares en células musculares lisas de rata en cultivo. En tales células, la L-OHArg induce una formación dosis-dependiente de nitrito, que se inhibe con miconazol, un inhibidor de la citocromo P450 (111).

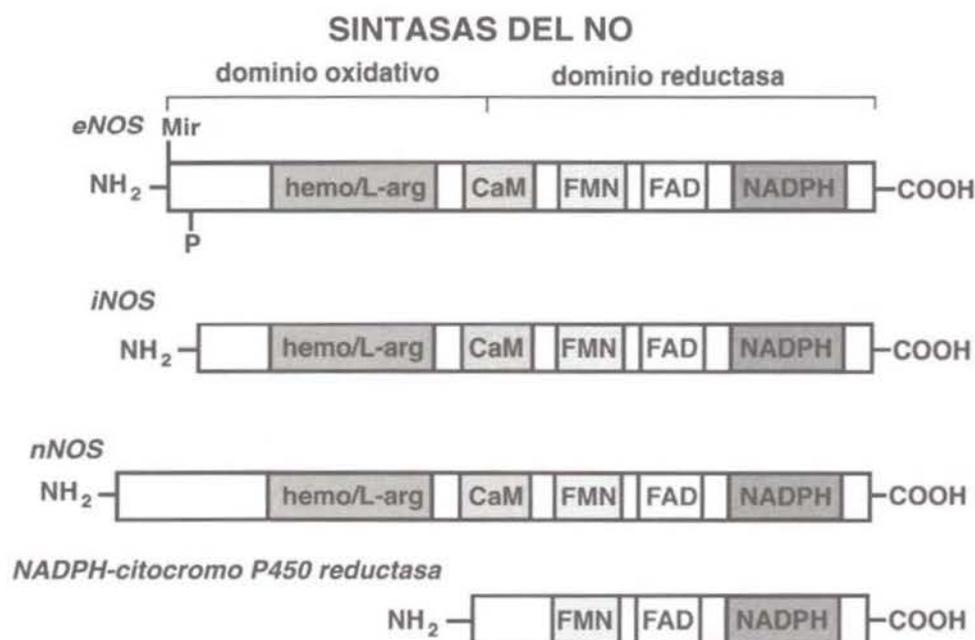


Figura 2. Estructura esquemática de las diferentes NOSs (*n*= neuronal, *i*= inducible y *e*= endotelial) y del citocromo P450 reductasa y sus lugares de fijación comunes para NADPH, flavin-adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN) en los dominios carboxílicos terminales. También se han representado los lugares de fijación para calmodulina (CaM), hemo, L-arginina (L-arg) en el NH<sub>2</sub> terminal así como para la fosforilación (P) y miristoilación (Mir) en el caso de la eNOS.

Es interesante comentar que las especies reactivas derivadas del oxígeno pueden contribuir a regular la actividad de la NOS. Algunos estudios indican que: (a) en el cerebro, la isoforma citosólica convierte a la L-arginina en NO a través del proceso catalítico que implica el  $O_2^-$ , el peróxido de hidrógeno y probablemente el radical hidroxilo (112), y (b) el propio NO puede comportarse como un inhibidor de la actividad de NOS (104, 113, 114). En este caso, no está claro si la diana para la reactividad del NO es el tiolato unido al grupo hemo de la enzima, que es un tiol crítico, otros aminoácidos de las cadenas laterales de la enzima o un factor sensible a los procesos redox que normalmente están en continua reposición en las células intactas (12, 115, 116).

#### 2.4. Mecanismos de acción del NO

Una serie de estímulos, tales como la 5-hidroxitriptamina, la acetilcolina (ACh), la trombina, el ionóforo de calcio A23187, el ácido araquidónico, cambios en la presión arterial, la estimulación eléctrica, etc., son capaces de liberar NO de las células endoteliales (7, 9-11).

Una vez liberado el NO activa la enzima guanilato ciclasa soluble (un heterodímero que contiene un grupo hemo así como un ion cobre) de las células musculares lisas, plaquetas, neuronas y otras células, incrementando los niveles intracelulares de GMPc (44-46) (Figura 1). El receptor endógeno para el NO es probablemente la mitad hemo de la guanilato ciclasa (117). El hierro del hemo es desplazado por el enlace NO-guanilato ciclasa produciendo un cambio conformacional de la enzima, que a su vez activa al centro catalítico (117-120). El incremento de GMPc produce relajación de las células musculares lisas por diferentes mecanismos. Así, el GMPc activa la proteína cinasa GMPc-dependiente que fosforila la cinasa de la miosina de cadena ligera (MLCK), que regula la actividad de la ATPasa de la actomiosina (22, 121, 122). La fosforilación de la MLCK disminuye su afinidad por calcio/calmodulina, reduciendo la fosforilación de la MLC que estabiliza la forma inactiva de la miosina (22, 122, 123) (Figura 1). La activación de la proteína cinasa GMPc-dependiente puede también producir fosforilación de los transportadores de calcio, complejando el calcio intracelular lo que facilita la relajación del músculo liso (22, 37, 44). Un mecanismo similar parece estar implicado en la inhibición de la agregación plaquetaria producida por el NO (11, 36).

### 3. ACCIONES CARDIOVASCULARES DEL NO

En la regulación de la contractilidad miocárdica, la agregación plaquetaria y el tono vascular el NO tiene un papel importante (Figura 3). Por consiguiente, una alteración en la regulación de la formación de NO se ha implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades, tales como la hipertensión, la aterosclerosis y la hipotensión asociada al shock séptico (11, 22).

El NO parece poseer un papel regulador directo de la contractilidad miocárdica. Así, existe evidencia de que la NOS inducible y/o constitutiva está presente en los miocitos, tejido ventricular, pequeños vasos sanguíneos y células inmunes que se infiltran en el tejido cardíaco (124, 125). Además, el NO endógeno parece regular la respuesta de los miocitos ventriculares de rata a estímulos adrenérgicos y colinérgicos (22, 126).

Los vasos de pequeño diámetro parecen ser capaces de producir una mayor liberación basal de EDRF-NO que otros de mayor diámetro (36, 127). Estos resultados sugieren que el NO está implicado en la regulación del tono del músculo liso vascular y la resistencia periférica. Asimismo, el NO participa en el control del tono vascular periférico en arteriolas humanas (128), contribuyendo de forma importante al control de la presión arterial (129). El NO también parece modular la distribución del flujo sanguíneo entre las diferentes ramificaciones de las arteriolas (130), lo que sugiere una importante función en la regulación de la distribución del flujo sanguíneo en los lechos vasculares (22). Diferentes estímulos fisiológicos pueden participar en la liberación de NO, tales como la distensión vascular, cambios en la concentración de calcio o en la tensión de oxígeno (131). Se ha sugerido que la distensión vascular producida en la superficie luminal del endotelio en respuesta a incrementos del flujo sanguíneo es el estímulo fisiológico más importante para la liberación endotelial de NO (99).

Asimismo, se ha descrito ampliamente la capacidad del NO para inhibir la agregación de las plaquetas (3, 132, 133) y para desagregarlas (3, 36, 133), acciones acopladas a un incremento de los niveles de GMPc (11, 134).

La regulación de la adhesión y de la agregación plaquetaria la ejerce el NO y la prostaciclina que actúan sinérgicamente (135). Sin embargo, el NO, en contraste con la prostaciclina, inhibe la adhesión plaquetaria (22, 36).

Recientemente, se ha demostrado que el ONOO<sup>-</sup> produce agregación de plaquetas lavadas y revierte la inhibición de la agregación inducida por prostaciclina e indometacina. Sin embargo, ONOO<sup>-</sup> no posee capacidad proagregatoria y actúa como un inhibidor de la agregación plaquetaria en plaquetas a las que se les adiciona plasma (136). Estos resultados opuestos son debidos a la presencia en plasma de NO y S-nitrosoglutation en cantidad suficiente para ejercer los efectos antiagregantes observados. Por consiguiente, la acción de este agente depende de su entorno biológico (136).

Otro efecto cardiovascular normal del NO es su capacidad para inhibir la proliferación del músculo liso cardiovascular (22, 137) (Figura 3).

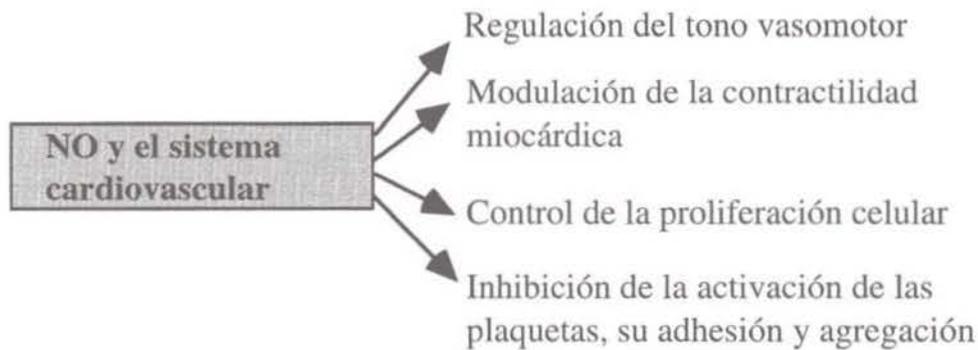


Figura 3. Implicación del NO en diferentes funciones del sistema cardiovascular. Para más detalles consultar el texto.

#### 4. ENFERMEDADES VASCULARES Y NO

Se comentó previamente que el NO posee un importante papel en procesos fisiológicos diferentes e interrelacionados, tales como la neurotransmisión, la contractilidad miocárdica, interacción plaquetas-endotelio, regulación del tono vascular, inmunomodulación y citostasis (Figura 3). Por consiguiente, una reducción en su síntesis o en la eficacia de su sistema efector podría estar implicada en la patogénesis de la hipertensión, angina, vasospasmo y aterosclerosis; en otros casos, una producción excesiva puede ser inapropiada y estar implicada en la hipotensión, sepsis, accidentes isquémicos cerebrovasculares, depresión miocárdica y en las respuestas inflamatorias (22, 138). Las diferentes alteraciones endoteliales en esas enfermedades cardiovasculares se indican en la Tabla I y se comentan a continuación.

Tabla I. Diferentes alteraciones endoteliales en las enfermedades vasculares

1. Reducción de la formación de NO o de su actividad o aumento de su metabolismo.
2. Incremento de la formación de eicosanoides contráctiles, de angiotensina II o endotelina.
3. Aumento de la formación o reducción del metabolismo de radicales libres derivados del oxígeno.
4. Estimulación de la PKC.

#### 4.1. NO e hipertensión

La hipertensión causa cambios morfológicos que afectan al endotelio, a la íntima y a las células musculares lisas vasculares de la capa media. Así, se han descrito cambios en el citoplasma, y en el tamaño y forma de las células endoteliales (139), así como en la replicación endotelial (140). La íntima y la media sufren cambios estructurales y bioquímicos, que dan lugar a hipertrofia y, probablemente, hiperplasia (139, 141, 142). Se ha considerado que las anomalías en las células endoteliales son los principales factores responsables del incremento de la resistencia vascular periférica, lo que conduce al aumento de la presión arterial (143). Las alteraciones genéticas pueden dar lugar a una formación predominante de los factores contráctiles derivados del endotelio y a factores mitógenos que incrementan las contracciones inducidas por los agentes vasoconstrictores y reducen la luz vascular. Entre las sustancias contráctiles producidas por el endotelio se incluyen el  $O_2^{\cdot -}$  (7, 144), el tromboxano  $A_2$  (7, 145) y los péptidos denominados endotelinas (146, 147). Parece que la hipertensión incrementa el estrés oxidativo en la pared arterial así como la formación del  $O_2^{\cdot -}$ , lo que conduce a una reducción de las relajaciones endotelio-dependientes que parece contribuir al mantenimiento de la hipertensión (148).

La endotelina-1 es un potente agente vasoconstrictor formado por 21 aminoácidos, producido a partir de un compuesto intermedio menos activo, denominado proendotelina-1 (146, 147). Se han observado en pacientes con hipertensión esencial incrementos significativos en la concentración plasmática de endotelina-1 con respecto a los niveles de este compuesto existentes en individuos normales (149). Sin embargo, la concentración plasmática de este potente agente vasoconstrictor está reducida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y no modificada en ratas transformadas en hipertensas por tratamiento con el mineralcorticoide DOCA, aunque la reactividad vascular a este agente está incrementada en ambos tipos de ratas, comparada con los animales controles (150, 151). Estos hallazgos sugieren un posible papel a la endotelina como mediador en la patogénesis o en el mantenimiento de la hipertensión. Estos agentes vasoconstrictores y los mecanismos antes descritos limitan la vasodilatación y perpetúan la hipertensión (143).

La activación de la mitogénesis descrita en la hipertensión (143) se induce por: (a) incremento en la actividad simpática observada en la hipertensión (152), que causa un efecto trófico en los vasos (153, 154), y (b) liberación de agentes vasoactivos, tales como endotelinas, angiotensina II, 5-hidroxitriptamina, prostaglandinas y tromboxano que pueden adicionalmente modular el crecimiento vascular (155, 156). Otros mitógenos implicados son el factor de crecimiento transformante  $\beta$  y el factor de crecimiento plaquetario (143, 157).

El análogo de la L-arginina, L-NMMA, que inhibe la formación endotelial de NO (158), produce hipertensión (11) y reducción de las relajaciones endotelio-dependientes (7, 11, 159, 160), lo que sugiere una implicación del NO endotelial en

la regulación de la presión arterial (129). Además, como en la hipertensión parece estar alterado el balance entre la producción endotelial de agentes vasoconstrictores (incremento de la formación de tromboxano  $A_2$ ) y vasodilatadores (reducción de la síntesis de prostaglandinas y NO) (143, 161, 162); desbalance que parece participar en el desarrollo de la hipertensión. En efecto, la reducción de la síntesis de NO conduce a un incremento de la proliferación del músculo liso, dado que el NO es un inhibidor de la misma, como se ha comentado anteriormente. Todos estos hallazgos explican la existencia de una excesiva vasoconstricción que da lugar a un aumento de la liberación de NO como mecanismo de defensa; si la cantidad de NO generada es insuficiente se producirá la hipertensión (163). Sin embargo, Tschudi *et al.* (164) demostraron en arterias mesentéricas de resistencia de rata que la hipertensión se asocia a un incremento del metabolismo del NO, mientras que su liberación no se altera. Esto puede ser importante en la patogénesis de la hipertensión y sus complicaciones vasculares.

Se ha sugerido que la vía que conduce a la síntesis endotelial de NO y al incremento de los niveles de GMPc puede estar alterada en la hipertensión (165). Un interesante candidato que podría estar alterado es el gen de la NOS. Sin embargo, se ha observado recientemente que variantes moleculares comunes del gen de la NOS no están implicadas en la hipertensión esencial (165), por lo que se ha descartado esta hipótesis.

Se ha descrito que la normalización de la presión arterial restaura la capacidad del endotelio para producir vasodilatación (166,167). Sin embargo, las relajaciones endotelio-independientes, como las inducidas por el nitroprusiato sódico, se inhiben menos o no se afectan con la hipertensión, indicando que no se alteran los mecanismos implicados en la relajación (10, 138, 159, 168, 169).

La reversión de la disfunción endotelial con el tratamiento antihipertensivo descrito en modelos de animales hipertensos no se ha observado en pacientes hipertensos (170). La hipertensión se asocia usualmente a la capacidad de la ACh para inducir contracciones endotelio-dependientes en algunos vasos sanguíneos que contrarresta sus vasodilataciones endotelio-dependientes. Diferentes estudios experimentales indican que la disfunción endotelial es consecuencia, pero no causa, de la hipertensión, aunque algunos estudios describen una alteración endotelial en los inicios de la enfermedad (170).

El hecho de que el tratamiento antihipertensivo eficaz clínicamente no restaure la inhibición de las relajaciones endotelio-dependientes en la hipertensión esencial, sugiere que la disfunción endotelial es primaria o se hace irreversible una vez que la hipertensión está establecida (171). Además, se ha descrito que el tratamiento de larga duración, pero no de corta duración, con el antagonista de calcio verapamil o el inhibidor del enzima conversor de angiotensina trandolaprilo mejora la relajación endotelio-dependiente en la hipertensión por deficiencia de NO producida al tratar ratas normotensas con el éster metílico de la  $N^G$ -nitro-L-arginina (L-NAME). Estos

resultados indican que el papel de otros sistemas vasodilatadores alternativos implicados en la vasodilatación, que normalmente participan mínimamente en la regulación del tono vascular, se incrementa con el tratamiento de larga duración con estos fármacos. Entre los posibles candidatos alternativos podemos mencionar al EDHF, prostaglandina E<sub>2</sub>, radicales libres de oxígeno y adenosina. Estas observaciones remarcan la importancia potencial de esos tratamientos en el control de la hipertensión en la que está reducida la formación de NO (172).

Se ha observado la existencia de cierta heterogeneidad en la alteración endotelial inducida por la hipertensión, ya que se han descrito: (a) incrementos de las respuestas endoteliales en diferentes modelos de hipertensión en rata (170); (b) pequeñas disfunciones endoteliales en conejos hipertensos (170, 173), y (c) no modificación del incremento del flujo sanguíneo del antebrazo causado por la ACh en pacientes con hipertensión esencial (174). En vasos aislados y en estudios *in vivo*, se ha medido la liberación basal de NO analizando las respuestas contráctiles inducidas por inhibidores de la NOS (128, 170, 175). En arterias mesentéricas de resistencia y en la aorta de ratas SHR, L-NMNA produce una contracción muy pequeña, pero incrementa la contracción inducida por la noradrenalina en una menor extensión en SHR que en ratas WKY normotensas (170,176). Estos resultados sugieren que la formación basal de NO está disminuida en la hipertensión. Otros autores no observaron ninguna reducción en la liberación basal de NO en segmentos aórticos de SHR (177). Analizando las variaciones producidas por la ACh en la circulación sanguínea del antebrazo humano, L-NMMA reduce la respuesta a la ACh en mayor extensión en normotensos que en hipertensos (128, 170), lo que sugiere una respuesta reducida a la ACh en la hipertensión (128, 178). La existencia de algún inhibidor de la NOS, como ADMA (dimetil argininas asimétricas) en la hipertensión, justificaría la reducción de la respuesta a ACh, como se ha observado en ratas stroke-prone SHR (179, 180).

Además, se ha descrito la existencia de una inhibición en la formación de EDRF por la células endoteliales de los vasos umbilicales humanos en la hipertensión causada por el embarazo, que no se restablece por infusión de superóxido dismutasa o L-arginina (181). Tal reducción en la generación de EDRF es producida probablemente por factores endógenos citotóxicos formados en el embarazo.

Los hallazgos anteriormente mencionados sugieren que los mecanismos que subyacen en la disminución de las relajaciones endotelio-dependientes en la hipertensión no están claros, siendo necesario analizar si está implicada una liberación reducida de NO, un incremento de su metabolismo o una respuesta disminuida a este agente. Existe alguna evidencia en aorta de ratas hipertensas por tratamiento con DOCA que los niveles de GMPc inducidos por ACh están reducidos, lo que indica la existencia de un defecto en la respuesta o en la formación de NO (97, 182, 183). Por el contrario, la liberación basal de NO parece estar incrementada en esas ratas (184), así como la respuesta de la aorta a los agentes contráctiles comparada con ratas normotensas sólo después de la supresión del endotelio.

Sin embargo, la respuesta fue similar o inferior a la normal en aorta hipertensa intacta, lo que sugiere un marcado efecto endotelial inhibitorio en los vasos hipertensos. Los inhibidores de la NOS impiden este efecto lo que indica una liberación o actividad del NO incrementada. Tales cambios no se asocian a alteraciones en las relajaciones a ACh. Estos efectos en la producción basal de NO pueden ser dependientes de la duración de la hipertensión, porque en otros estudios este modelo de hipertensión muestra una disminución de la relajación a ACh (183, 185).

Se ha comentado previamente que la reducción de las respuestas de los vasodilatadores endotelio-dependientes podría ser debida a un incremento de los factores contráctiles derivados del endotelio (186-188). En efecto, se ha observado la existencia de elevadas cantidades de prostanoides en la aorta de rata hipertensa (187, 189) y el efecto antihipertensivo de los antagonistas de los prostanoides en ratas hipertensas (190, 191). La participación de la angiotensina II, formada a partir de la angiotensina I en las células endoteliales, en la hipertensión, actuando como un factor contráctil endotelial, es materia de discusión (97).

Por consiguiente, en arterias procedentes de animales o individuos hipertensos, las respuestas endotelio-dependientes pueden estar impedidas por una liberación incrementada de factores contráctiles derivados del endotelio o una reducida: (a) liberación de factores endoteliales vasodilatadores, tales como EDRF o prostaciclina, (b) difusión de tales factores a las células musculares lisas vasculares, y (c) sensibilidad de las células musculares lisas vasculares a las sustancias vasodilatadoras (8).

Recientemente existe un consenso de que la disfunción endotelial se produce por la exposición crónica de las arterias a una excesiva presión arterial que da lugar a un incremento de la distensión vascular. Otros mecanismos pueden contribuir tales como diferentes factores de crecimiento implicados en la hipertrofia del músculo liso de la pared arterial hipertensa (192). Estos factores pueden formarse en las células endoteliales, las plaquetas o el propio músculo liso, y el propio endotelio puede responder a los factores de crecimiento. El endotelio de la aorta de rata y de la arteria coronaria de cerdo, entre otras grandes arterias, poseen receptores para los factores de crecimiento derivados de las plaquetas que regulan la liberación de NO (193). Por tanto, las alteraciones en la función de la célula endotelial causadas por la hipertensión podrían ocurrir como una respuesta paracrina o autocrina a los factores de crecimiento.

Las relajaciones dependientes de endotelio producidas por la perfusión intraluminal de ACh están reducidas en arterias mesentéricas de resistencia de SHR, pero no cuando este agente se aplica extraluminalmente (176). Este hecho sugiere que la porción de endotelio situada en el lado intraluminal, la más expuesta a la presión sanguínea, es la que está más deteriorada (8).

No todas las formas de hipertensión y todos los tipos de vasos muestran alteraciones en la vía L-arginina-NO. Así, en la circulación coronaria de ratas SHR muy viejas, se ha descrito escasa alteración endotelial (194). Experimentos de bioensayo

en aorta de SHR perfundida muestran una liberación de NO similar a la de la rata normotensa (195). Dichos experimentos muestran también que la liberación luminal de EDRF y prostaciclina inducida por ACh e histamina en SHR es normal o está levemente incrementada (195). Por consiguiente, en ciertas condiciones, la vía puede estar incrementada, presumiblemente como un mecanismo contrarregulador (8).

Se ha demostrado la influencia del sexo en la disfunción endotelial en la aorta de SHR. Así, las relajaciones endotelio-dependientes inducidas por la ACh se preservaron más en ratas hembras que en ratas machos (196). Sin embargo, las vasodilataciones causadas por agentes donantes de NO exógeno, como nitroprusiato sódico, fueron similares en anillos aórticos sin endotelio de machos y hembras SHR, lo que descarta la existencia de diferencias en la reactividad del músculo liso al NO debidas al sexo. Probablemente, la mayor relajación inducida por la ACh en hembras de SHR puede ser debida a una formación endotelial incrementada de EDRF-NO. Estos autores ya habían demostrado por bioensayo de superfusión una mayor liberación de EDRF-NO en la aorta torácica aislada de ratas hembras normotensas que de ratas machos (196). Estos investigadores concluyeron que las hormonas sexuales pueden regular la reactividad vascular endotelio-dependiente, y que la alteración endotelial menos severa en las hembras de SHR puede ser responsable de las diferencias debidas al sexo descritas en cuanto a la extensión y la tasa de progresión de la hipertensión en ratas SHR (196).

A finales de los años setenta ya se describió el importante papel de los esteroides sexuales en el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR (197), así como que los estrógenos pueden reducir significativamente la presión sanguínea (198, 199). Estudios más recientes sugieren que la testosterona es responsable del desarrollo y mantenimiento de la hipertensión en ratas SHR (200, 201). El mecanismo que subyace en el efecto de las hormonas sexuales es desconocido, siendo materia de discusión si la presión arterial elevada está asociada al cromosoma Y (202, 203). Estos datos sugieren que las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona) pueden afectar positivamente a la función endotelial, lo que puede contribuir a la lenta progresión y baja incidencia de hipertensión en las mujeres y animales hembras.

Además, existe evidencia epidemiológica que muestra que la carencia de estrógenos está asociada a una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares; este efecto beneficioso de los estrógenos puede estar mediado por el endotelio, puesto que los estrógenos parecen aumentar la producción de EDRF(s) en animales (79, 204, 205). Asimismo, los estrógenos poseen propiedades antioxidantes significativas que pueden incrementar la vasodilatación endotelio-dependiente (97, 204, 206), y ser responsables de los efectos protectores de los estrógenos en las enfermedades cardiovasculares (207, 208).

Se ha descrito una mayor incidencia de hipertensión en el envejecimiento (30-65% de este grupo de población), y de la hipertensión sistólica aislada (alrededor del 18% de los individuos de más de 80 años) (209-211). Los hipertensos de edad

avanzada poseen doble riesgo de sufrir alteraciones cardiovasculares que los jóvenes hipertensos (210, 212), y una mayor incidencia de ciertas enfermedades asociadas a la edad (212). Las propiedades viscoelásticas se modifican lo que conduce a un incremento de la rigidez vascular que participa en el aumento de la presión arterial sistólica y de la presión arterial con la edad (212-215). A este aumento también contribuye el incremento de la resistencia vascular basal con la edad (216, 217). Estos hechos indican que la hipertensión parece incrementar, generalmente, el envejecimiento cardiovascular (176, 218, 217). La asociación de hipertensión y envejecimiento incrementa el riesgo de cambios en la modulación endotelial del tono vascular y del deterioro de la función endotelial (218, 219, 220).

Relacionado con la edad comentaremos los resultados que hemos obtenido. Hemos observado que concentraciones bajas de noradrenalina inducen contracciones en anillos aórticos de ratas SHR y ratas WKY normotensas de 5 semanas, mientras que altas concentraciones producen relajación (221). Esta relajación se reduce y abole en anillos de ratas normotensas de 3 y 6 meses, respectivamente. En anillos de ratas SHR de 5 semanas y 3 meses, la relajación es parecida a la obtenida en ratas WKY de 3 y 6 meses, respectivamente. La vasodilatación inducida por la noradrenalina en ambas cepas se reduce por el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, y el propranolol, bloqueante de los  $\beta$ -adrenoceptores, pero no se modifica con la yohimbina, un bloqueante de los  $\alpha_2$ -adrenoceptores. Estos resultados indican que la hipertensión produce efectos similares a la edad avanzada, y que en aortas de ratas WKY jóvenes y SHR prehipertensas, la noradrenalina induce relajaciones mediadas por activación de los  $\beta$ -adrenoceptores endoteliales y liberación de NO (221). El mecanismo exacto por el que el envejecimiento vascular reduce la relajación endotelio-dependiente causada por la noradrenalina es desconocido; quizá la pérdida de respuesta al agonista de los  $\beta$ -receptores relacionada con la edad es consecuencia de una reducción de la proteína cinasa AMPc-dependiente (222) o de la función de las proteínas fijadoras de GTP (223).

#### 4.2. NO y aterosclerosis

Se ha demostrado que las vasodilataciones endotelio-dependientes en lechos vasculares periféricos y coronarios se reducen en pacientes hipercolesterolémicos (97, 224, 225). Asimismo, se ha descrito que la administración de colesterol a conejos (226, 227), cerdos (228) y monos (229) produce hipercolesterolemia, crecimiento de la neointima y una relajación endotelio-dependiente anormal. El grado de reducción de esta relajación está asociada a la extensión de las lesiones de la neointima (97,230), lo que podría impedir al NO alcanzar el músculo liso, aunque esta hipótesis no explica completamente la disfunción anteriormente descrita. El hecho de que la liberación endotelial de NO parece estar disminuida (231), y que los antioxidantes incrementan las relajaciones endotelio-dependientes, sugiere que la barrera física no impide la transferencia de NO (230, 232, 233) y que otros procesos pueden estar implicados.

Se ha descrito que la reducción de la respuesta de las células musculares lisas de las arterias hipercolesterolémicas al EDRF-NO es debida posiblemente a una disminución de respuesta de esas células al GMPc (231).

Diferentes investigadores han observado que la respuesta contráctil inducida por bajas concentraciones de 5-hidroxitriptamina está incrementada en las arterias hipercolesterolémicas (234, 235), aunque la máxima contracción está disminuida en algunos casos (236, 237). Tal efecto parece ser debido a la inducción de la NOS en células no endoteliales de la pared vascular arteriosclerótica, que incrementa la síntesis de NO y reduce las contracciones. Así, la administración de inhibidores de la NOS aumenta las contracciones en las arterias hipercolesterolémicas de forma similar en arterias con o sin endotelio (237), mientras que no se alteran en arterias normales sin endotelio. Es posible también que las sustancias vasoconstrictoras derivadas del endotelio se sinteticen en exceso en la hipercolesterolemia (97).

Los radicales libres derivados del oxígeno que producen oxidación de las lipoproteínas parecen iniciar la aterosclerosis (238). Estos lípidos oxidados presentes en las proteínas de baja densidad activan la adhesión de los monocitos a las células endoteliales (239), favoreciendo la entrada de tales células al espacio subendotelial, en donde se transforman en macrófagos que captan lípidos a través del receptor barredor («scavenger») (97). Se ha observado en aortas de conejos suplementados con colesterol un incremento de tres veces en la formación de  $O_2^{\cdot -}$  en comparación con vasos controles, mecanismo implicado en la reducción de las relajaciones endotelio-dependientes (148).

Se ha descrito que las lipoproteínas de baja densidad son capaces de inducir contracciones endotelio-dependientes en arterias coronarias de cerdo (240), y que las lipoproteínas oxidadas reducen las relajaciones endotelio-dependientes en arterias coronarias de cerdo y en aorta de conejo (228, 241-243). En dichas contracciones existe una participación de los radicales libres derivados del oxígeno (240) y de la lisofosfatidilcolina, la fracción lipídica de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (241, 244). La alteración de la función de la célula endotelial por las lipoproteínas oxidadas causa disfunción del endotelio que puede ser el precursor de la aterosclerosis. Los cambios selectivos en las relajaciones endotelio-dependientes descritos en las etapas iniciales de la hipercolesterolemia pueden ser debidos a la lisofosfatidilcolina, que impide las vasodilataciones endotelio-dependientes mediadas por activación de receptores, mientras que no se afectan las inducidas por el ionóforo de calcio A23187 y por los nitrovasodilatadores; las relajaciones de estos últimos son independientes del endotelio (242, 245). Se ha sugerido la participación de la PKC en los efectos de esas lipoproteínas oxidadas porque: (a) la PKC se activa por la lisofosfatidilcolina (245, 246); (b) el efecto deletéreo de los lípidos oxidados se reduce por los inhibidores de la PKC, y (c) los ésteres de forbol, activadores de la PKC, inducen alteraciones similares de las relajaciones endotelio-dependientes mediadas por activación de receptores (103, 247).

Los vasos ateroscleróticos producen cantidades mayores de  $O_2^-$  (248), lo que explicaría la reducción de la relajación inducida por el EDRF-NO y el NO exógeno, y el incremento de las relajaciones endotelio-dependientes en presencia de barredores de radicales libres (97). La enzima guanilato ciclasa, otras enzimas y ciertos canales iónicos que contienen grupos tioles esenciales sensibles a los procesos redox pueden verse también influenciados por esos radicales (249).

Aunque las relajaciones endotelio-dependientes parecen estar reducidas en la aterosclerosis, la producción de óxidos de nitrógeno está más bien incrementada en aorta de conejo aterosclerótico (20), así como los niveles de NO en tejidos de modelos *in vivo* de aterosclerosis (250). El NO puede convertirse en otros productos al reaccionar con el  $O_2^-$  comportándose como un agente citoprotector (251), pero la biodisponibilidad del NO se reduce y puede ser insuficiente para barrer el  $O_2^-$  que está también presente en los ateromas. Un débil desbalance entre la formación de NO y  $O_2^-$  puede contribuir gradualmente con el tiempo a la aterosclerosis (20).

Se ha comentado anteriormente que la proliferación de células musculares lisas vasculares puede inhibirse por el NO (22, 252) de aquí que si existe deficiencia en la formación de NO se facilitará esta proliferación. Además, los potentes mitógenos vasculares, tales como los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, pueden inhibir la producción endógena de NO durante la aterogénesis (253), lo que facilita dicha proliferación.

Se ha descrito una reducción en la producción de NO secundario a la angioplastia o a la aterosclerosis (254). Esta disminución en la liberación de NO en un territorio al estar el endotelio dañado puede conducir a: (a) una facilitación de la agregación plaquetaria al carecer del efecto opuesto del NO, (b) una vasoconstricción inducida por las plaquetas, al mantenerse la capacidad contráctil del músculo liso de alrededor, y (c) la adhesión de leucocitos; todos estos efectos contribuyen al proceso aterosclerótico (22,131).

#### 4.3. NO y diabetes mellitus

Estudios realizados en vasos aislados tanto humanos (255) como de rata (256), y estudios *in vivo* que evalúan el flujo sanguíneo en el antebrazo (257, 258) demuestran la existencia de una disfunción de las células endoteliales o una respuesta reducida al NO endotelial en la diabetes (97). Observaciones recientes, utilizando cultivos de células endoteliales y altas concentraciones de glucosa, muestran un incremento de la apoptosis (259), sugiriendo la existencia de un daño endotelial potencial por la hiperglicemia en pacientes diabéticos. Sin embargo, las relajaciones causadas por el ionóforo de calcio A23187 y los nitrovasodilatadores no se modificaron. Estos datos pueden explicarse por la capacidad de la diabetes para interferir con la activación de los receptores endoteliales o por la existencia de un incremento intracelular de calcio iniciado después de la estimulación del receptor (260).

Al comienzo de la diabetes existe una disfunción selectiva de las respuestas de los vasodilatadores, como ACh y ADP, que producen relajaciones endotelio-dependientes por activación de receptores endoteliales; esta alteración endotelial puede estar relacionada con cambios en la liberación o en la respuesta al NO (261). Con una duración más prolongada de la diabetes el deterioro endotelial es más generalizado, los niveles de GMPc parecen estar disminuidos, debido también a una reducida liberación o acción del NO (262, 263).

Una excesiva formación y efecto de los eicosanoides vasoconstrictores puede estar implicada en la reducción de las vasodilataciones endotelio-dependientes porque: (a) se ha descrito una síntesis incrementada de tromboxano  $A_2$ , de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , y del ácido 15-hidroxiicosatetraenoico en células endoteliales diabéticas (264). (b) La indometacina es capaz de normalizar la alteración de las relajaciones endotelio-dependientes en arterias diabéticas (265). Los eicosanoides  $PGG_2$  o  $PGH_2$ , precursores del tromboxano y de las prostaglandinas, parecen estar implicados puesto que las respuestas no se normalizan con la administración de inhibidores de la tromboxano sintetasa (265, 266). Además, la glicosilación de lipoproteínas de baja densidad parece estar implicada en la aterosclerosis acelerada observada en la diabetes (267).

La respuesta reducida al NO en vasos diabéticos, cuyo mecanismo subyacente es desconocido, podría ser debida a una mayor destrucción endotelial de NO. Esta alteración puede prevenirse con la administración de superóxido dismutasa, porque normaliza o previene las relajaciones endotelio-dependientes anormales o las inducidas por NO en vasos diabéticos (148, 261, 268). Otros radicales libres, aparte del  $O_2^-$ , pueden estar también implicados puesto que la catalasa y la deferoxamina, barredores del peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo, también restauran la disfunción endotelial en la diabetes (268). Estos datos indican una excesiva generación de radicales libres en esta enfermedad que parecen participar en la reducción de la relajación endotelio-dependiente. Por otra parte, se ha descrito que la administración de L-arginina en la diabetes parece mejorar las relajaciones endotelio-dependientes reducidas, probablemente debido a una menor utilización de L-arginina por la NOS para sintetizar NO (269).

La respuesta disminuida al NO puede deberse a una reducción de la actividad de la guanilato ciclasa, a un incremento del metabolismo del GMPc, a una escasa actividad de la proteína cinasa GMPc-dependiente o a la alteración de la actividad de la ATPasa  $N^+,K^+$ -dependiente que parece estar reducida en las arterias diabéticas (270, 271). El estar reducida la actividad de esta ATPasa produce despolarización que por sí misma disminuye la relajación inducida por el EDRF-NO ya que parece estar mediada, al menos en parte, por activación de los canales de potasio o bien la propia enzima puede participar en la relajación a EDRF-NO (270, 271, 272).

La reducida respuesta al EDRF-NO en la diabetes puede ser debida a una alteración de la formación de productos avanzados de glicosilación (AGEs) (256, 273).

Estos productos se forman por un mecanismo oxidativo en el que la glucosa (en exceso en esta enfermedad) reacciona directamente con las proteínas. Así, los AGEs son capaces de eliminar el NO (256), lo que explica que la respuesta a los nitrovasodilatadores esté reducida en la diabetes severa y prolongada. Los canales iónicos y ciertas enzimas pueden glicosilarse inhibiendo su función. Se ha descrito la capacidad de la aminoguanidina, un inhibidor de la síntesis de AGEs, para incrementar las relajaciones endotelio-dependientes y las causadas por los nitrovasodilatadores en ratas diabéticas (256), lo que apoya la participación de los AGEs en las respuestas vasodilatadoras disminuidas de la diabetes.

#### 4.4. NO, isquemia cerebral y migraña

Se ha descrito que el NO endotelial y exógeno producen respuestas vasodilatadoras en los vasos cerebrales (134,160), y que la producción endotelial de NO regula el flujo sanguíneo, protegiendo al tejido cerebral de la isquemia (134, 274). Sin embargo, una excesiva producción de NO es peligrosa para el cerebro por su neurotoxicidad (20, 275). Además, se ha propuesto que el NO es un importante mediador en la migraña y otras algias vasculares cerebrales (276), propuesta sustentada por el hecho de que la jaqueca vascular causada por la nitroglicerina se parece a la de la migraña (20).

#### 4.5. NO y sepsis

En modelos animales de shock endotóxico, en el shock inducido por citocinas o incluso en el shock anafiláctico, la síntesis excesiva de NO parece ser responsable de la enfermedad vascular asociada que consiste en una marcada vasodilatación e hipotensión. El exceso de síntesis de NO es consecuencia de la inducción de la iNOS cuyo efecto puede ser bloqueado por inhibidores de la NOS que restauran la presión arterial y las respuestas vasculares en esos modelos animales (20, 277, 278). Se ha sugerido que las células endoteliales regulan la síntesis de NO en las células musculares lisas en el shock séptico por su capacidad para suplementar a estas últimas de  $BH_4$  con el fin de conservar la función del factor relajador inflamatorio endotelio-dependiente a través del sistema nitrovasodilatador (279) (Figura 1).

La marcada vasodilatación que aparece en el shock séptico causada por el NO puede explicar la inhibición de la vasoconstricción inducida por agentes tales como la dopamina (280).

La septicemia (281) o anafilaxis (278) también inducen una marcada depresión de la función contráctil miocárdica, y se piensa que las citocinas modulan este efecto por inducción de la síntesis miocárdica de NO.

#### 4. 6. NO, insuficiencia cardíaca e isquemia miocárdica

Los nodos sinusal y auriculoventricular poseen una densa red de fibras y terminales que presentan inmunoreactividad por la NOS, lo que sugiere que el NO está implicado en el control de la frecuencia cardíaca. Además, en pacientes con cardiomiopatía dilatada expresan iNOS en el miocardio (20, 282) lo que conduce a un incremento de los niveles plasmáticos de nitrato (20). Además, se ha observado que el incremento de la actividad de la iNOS se acompaña por un descenso de la cNOS. Este hecho sugiere que el NO puede tener un papel tanto fisiológico como patológico en el miocardio humano (282). Por otra parte, estos pacientes poseen un exceso de sustancias vasoconstrictoras neuronales para compensar las consecuencias de la insuficiencia cardíaca, la excesiva producción de NO trata de atenuar los efectos contráctiles de esas sustancias vasoconstrictoras. Sin embargo, un exceso en la formación de NO puede reducir el tono vascular, pero también puede causar un efecto directo inotrópico negativo y depresor cardíaco que no es beneficioso para esta enfermedad (20, 22, 125, 283).

La depresión miocárdica que se observa en la reperfusión del miocardio isquémico se produce por una producción excesiva de NO generada por las citocinas (281). Además, en este período isquémico se produce también  $O_2^-$  que reacciona con el NO, antes mencionado, dando lugar a ONOO<sup>-</sup> que es un poderoso oxidante responsable en gran parte del daño miocárdico producido (284). Por consiguiente, la administración de donadores de NO inhibe la isquemia por sus efectos relajantes e inhibidores de la agregación plaquetaria, y la inhibición de la NOS parece proteger contra el NO que media el daño por reperfusión.

#### 5. POSIBILIDADES TERAPEUTICAS

Se ha comentado que una disfunción en la formación vascular de NO está implicada en la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes, la angina estable e inestable, el vasospasmo coronario, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca congestiva. Por consiguiente, es de interés clínico el uso de fármacos que generan NO en esas enfermedades.

Entre estos fármacos podemos incluir la administración directa de NO, fármacos que liberan NO, estimulación de receptores acoplados a la síntesis de NO a través de la vía L-arginina-NO, incremento de la acción del NO endógeno o administrando L-arginina, el sustrato de la NOS para incrementar su síntesis (50, 285).

##### 5.1. Donadores de NO

Los fármacos más antiguos capaces de generar NO son los nitrovasodilatadores que se han utilizado para el tratamiento de la angina por más de 100 años y se utilizan todavía en diferentes situaciones. Se pueden clasificar en distintos grupos,

incluyendo los nitratos orgánicos (como la nitroglicerina), nitritos (como el nitrito de amilo), el compuesto nitroso inorgánico denominado nitroprusiato sódico, sidnoniminas (como la molsidomina y su metabolito el SIN-1), y los nitrosotioles (como S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina) (50, 286). Todos estos fármacos se denominan «donadores de NO» porque actúan como profármacos, ejerciendo sus efectos farmacológicos después de su biotransformación en NO (286). Los tioles (con grupos -SH), particularmente la cisteína, se requieren para la conversión no enzimática de NO, y S-nitrosotioles, que también liberan NO, pueden generarse como compuestos intermedios. Por el contrario, el nitroprusiato sódico libera NO espontáneamente, mientras que las sidnoniminas se transforman sucesivamente en sus metabolitos SIN-1 y SIN-1A produciendo NO; en dicho proceso participa el oxígeno molecular y se genera también  $O_2^-$  que puede reaccionar con el NO eliminándolo (50, 287).

Existen algunos procesos patológicos cardiovasculares que se tratan usualmente con donadores de NO tales como la angina estable e inestable, el infarto de miocardio, el vasospasmo coronario, y la insuficiencia cardíaca congestiva. Los efectos beneficiosos de estos fármacos en la angina es debido a su efecto vasodilatador en los lechos arteriales y venosos y a su capacidad para producir vasodilatación de los grandes vasos coronarios, incrementando el flujo coronario. Algunas enfermedades vasculares en las que las vasodilataciones endotelio-dependientes parecen estar impedidas, como en el síndrome de Reynaud, pueden ser también aliviadas por aplicación transdérmica de nitroglicerina (288). Existe una situación patológica asociada a una formación reducida de NO, y es caso de las mujeres embarazadas con riesgo de preeclampsia; en ellas se ha descrito que la infusión de la nitroglicerina incrementa el flujo sanguíneo en la arteria uterina (289). Asimismo, se ha descrito que los donadores de NO, a parte de su efecto vasodilatador, pueden tener otras acciones biológicas clínicamente útiles como inhibir la agregación plaquetaria, caso del S-nitrosoglutatión, a concentraciones que no afectan la presión arterial (290), por lo que podría utilizarse como antitrombótico.

## 5.2. L-Arginina

La L-arginina es un aminoácido esencial para el crecimiento en la infancia y un sustrato para diferentes e importantes enzimas como, arginasa, NOS, arginina decarboxilasa, etc. (291). La arginasa es la clásica enzima que cataboliza a la arginina en el ciclo de la urea y la arginina decarboxilasa cataliza la transformación de L-arginina en agmatina (291), un agonista endógeno de los  $\alpha_2$ -adrenoceptores (292) que puede estar implicado en los efectos antihipertensivos de la L-arginina (291). Regunathan *et al.* (293) describieron que en aorta de rata y músculo liso vascular contienen agmatina, y que en membranas de aorta de rata y células endoteliales en cultivo, pero no en células musculares lisas, expresan cantidades significativas de arginina decarboxilasa. Asimismo, observaron que el músculo liso vascular y el endotelio contienen receptores imidazólicos, cuya estimulación inhibe la proliferación del músculo liso vascular, que esos receptores pueden ser funcionalmente

activos y que las células endoteliales sintetizan agmatina. También se ha descrito que la agmatina y su metabolito hidroxiamatina producen relajación endotelio-dependiente mediada por la formación de NO que puede ser generado por una vía biosintética similar a la de la L-arginina a citrulina a través de L-OHArg; tanto agmatina como su compuesto hidroxilado pueden ser precursores alternativos para la biosíntesis de NO (294). Estos datos sugieren que el mecanismo básico de la L-arginina es complejo.

Las concentraciones plasmáticas de L-arginina están entre 80-120  $\mu$ M siendo mayores (por encima de 1 mM) sus concentraciones intracelulares (50,291). Existe un exceso tisular de arginina porque su  $K_m$  como sustrato para la NOS está en la región de 1-10  $\mu$ M.

En conejos alimentados con colesterol y en pacientes hipercolesterolémicos, la infusión de L-arginina mejora la dilatación endotelio-dependiente (295), sugiriendo que un aumento en la formación de NO limita la progresión de la aterosclerosis (97, 296). Así, la administración intravenosa de L-arginina produce vasodilatación en individuos normotensos por incremento de la producción de NO (297).

En algunos pacientes hipertensos se ha observado que la administración intravenosa de L-arginina produce una disminución de la presión arterial media, incremento de la frecuencia cardíaca y del gasto cardíaco y una reducción de la resistencia periférica total. Todos estos efectos son indicadores de un aumento de la liberación de NO durante su administración (298, 299). La concentración plasmática de L-citrulina y GMPc se incrementan significativamente a los 20 min. Las catecolaminas plasmáticas y la actividad de renina no muestran cambios significativos, excepto en pacientes con hipertensión renovascular. En todos los pacientes, los niveles de aldosterona plasmática disminuyen significativamente en respuesta a la administración de L-arginina, sin considerar los niveles basales de actividad de renina y los niveles de aldosterona. Estos resultados indican que la L-arginina exógena produce vasodilatación por incremento de la producción de NO y que la L-arginina o la liberación de NO, modula la secreción de hormonas neuroendocrinas en individuos hipertensos (299).

Se desconoce si los efectos del suplemento de L-arginina se deben a su biotransformación en NO o a que pueda estar promoviendo la utilización del sustrato endógeno. Es interesante investigar si los incrementos en la concentración plasmática de L-arginina conducen a una mayor formación fisiológica de NO en alguna zona localizada o en el conjunto del organismo.

### **Agradecimientos**

Este estudio ha recibido el apoyo económico de DGICYT (PB94-0152), FIS (95/1954) y Bayer España. Agradecemos a doña Ana B. Baena su ayuda en la parte bibliográfica del manuscrito.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Vane JR, Änggård EE y Botting RM (1990), Regulatory functions of the vascular endothelium. *New Engl J Med* 323: 27-36.
2. Ramos KS (1992), Vascular Toxicology. A cellular and molecular perspective. In: *Cardiovascular Toxicology*, 2nd Ed., pp. 483-516, Acosta D Jr (ed), Raven Press, New York.
3. Wu KK y Thiagarajan P (1996), Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med* 47: 315-331.
4. Rubanyi GM (1991), Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46: 27-36.
5. Hanahan DJ (1986), Platelet-activating factor; a biologically active phosphoglyceride. *Ann Rev Biochem* 55: 483-509.
6. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM y Houston DS (1986), Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 48: 307-320.
7. Marín J y Sánchez-Ferrer CF (1990), Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen Pharmacol* 21: 575-587.
8. Lüscher TF y Dubey RK (1995), Endothelium and platelet-derived vasoactive substances: role in the regulation of vascular tone and growth. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 2nd Ed., Larag JH y Brenner BM (eds), pp. 609-630, Raven Press, Ltd., New York.
9. Palmer RMJ, Ferrige AG y Moncada S (1987), Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
10. Angus JA y Cocks TM (1989), Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther* 41: 303-351.
11. Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA (1991), Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
12. Marín J y Rodríguez-Martínez MA (1995), Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15: 279-307.
13. Furchgott RF y Zawadzki J (1980), The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 28: 373-376.
14. Furchgott RF (1984), The role of the endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Tox* 24: 175-197.
15. Rubanyi GM, Lorenz RR y Vanhoutte PM (1985), Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s). Inactivation by catecholamines. *Am J Physiol* 249: H95-H101.
16. Rubanyi GM y Vanhoutte PM (1986), Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 250: H815-H821.
17. Furchgott RF (1988), Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: *Vasodilatation*, vol. IV. Vanhoutte PM (ed), pp. 401-414. Raven Press, New York.
18. McCall T y Vallance P (1992), Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol Sci* 13: 1-6.
19. Shaw A y Vosper AJ (1977), Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans* 8: 1239-1244.
20. Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr y Feldman PL (1995), Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362.
21. Kanner J, Harel S y Granit R (1991), Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 289: 130-136.
22. Welch G y Loscalzo J (1994), Nitric oxide and the cardiovascular System. *J Card Surg* 9: 361-371.
23. Palmer RMJ y Moncada S (1989), A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 158: 348-352.
24. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD y Wishnok JS (1988), Macrophage oxidation

- of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711.
25. Marletta MA (1993), Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268: 12231-12234.
  26. Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS y Moncada S (1991), Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 266: 23790-23795.
  27. Tuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF y Nathan CF (1991), Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7773-7777.
  28. Korth HG, Sustmann R, Thater C, Butler AR y Ingold KU (1994), On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N<sup>w</sup>-Hydroxy-L-arginine to citrulline and nitric oxide. *J. Biol Chem* 269: 17776-17779.
  29. Farrel AJ y Blake DR (1996), Nitric oxide. *Annals Reumat Dis* 55: 7-20.
  30. Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD y Mann GE (1996), Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol* 490: 229-241.
  31. Long CJ y Stone TW (1985), The release of endothelium-dependent relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 22: 205-208.
  32. Griffith TM, Edwards DH, Newby AC, Lewis MJ y Henderson AH (1986), Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc Res* 20: 7-12.
  33. Morgan-Boyd R, Stewart JM, Vavrek RJ y Hassid A (1987), Effect of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 253: C588-C598.
  34. Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT y Kunze DL (1987), Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 61: 632-640.
  35. Johns A, Lategan TW, Lodge NJ, Ryan US, Van Breemen C y Adams DJ (1987), Calcium entry through receptor-operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Tissue Cell* 19: 733-745.
  36. Ignarro LJ (1989), Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65: 1-21.
  37. Blatter LA y Wier WG (1994), Nitric oxide decreases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15: 122-131.
  38. Chabaud F, Danna M y Bény JL. (1994), A vascular smooth muscles nitric oxide relaxation by a mechanism distinct of calcium changes. *Life Sci* 54: 1449-1458.
  39. Rapoport RM, Schwartz K y Murad F (1985), Effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump inhibitors and membrane depolarizing agents on acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 110: 203-209.
  40. Rapoport RM, Schwartz K y Murad F (1985), Effects of sodium-potassium pump inhibitors and membrane depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation of cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ Res* 57: 164-170.
  41. Greenberg S, Diecke FPJ y Tanaka TP (1986), Species and vascular bed responses of veins and arteries to endothelial derived relaxing factor in dog and pig. *Drug Dev Res* 7: 299-309.
  42. Martin W, Smith JA y White DG (1986), The mechanism by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br J Pharmacol* 89: 563-571.
  43. Fitzgerald GA, Brash AR, Falardeau P y Oates JA (1981), Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation of normal man. *J Clin Invest* 68: 1272-1275.
  44. Ignarro LJ y Kadowitz PJ (1985), The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Rev Pharmacol Tox* 25: 171-191.

45. Nakatsu K y Diamond J (1989), Role of cGMP in relaxation of vascular and other smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 251-262.
46. Lincoln T (1989), Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 41: 479-502.
47. Salvemini D y Botting R (1990), The effects of free radical scavengers on platelet adhesion and aggregation. *Drug News Perspect* 4: 202-212.
48. Salvemini D, De Nucci G, Gryglewski RJ y Vane JR (1989), Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6328-6332.
49. Knowles RG y Moncada S (1994), Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.
50. Moncada S y Higgs EA (1995), Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9: 1319-1330.
51. Moncada S, Higgs EA y Furchgott R (1997), International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* (en prensa),
52. Bredt DS y Snyder SH (1990), Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685.
53. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ y Moncada S (1989), Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5159-5162.
54. Dun NJ, Dun SL, Förstermann U y Tseng LF (1992), Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 147: 217-220.
55. Sheng H, Gagne GD, Matsumoto T, Miller MF, Förstermann U y Murad F (1993), Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J Neurochem* 61: 1120-1126.
56. Dun NJ, Dun SL, Wu SY y Förstermann U (1993), Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett* 158: 51-54.
57. Sheng H, Schmidt HH, Nakane M, Mitchell JA, Pollock JS, Förstermann U y Murad F (1992), Characterization and localization of nitric synthase oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* 106: 768-773.
58. Hassall CJ, Saffrey MJ, Belai A, Hoyle CH, Moules EW, Moss J, Schmidt HH, Murad F, Förstermann U y Burnstock G (1992), Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart. *Neurosci Lett* 143: 65-68.
59. Palacios M, Knowles RG, Palmer RMJ y Moncada S (1989), Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 802-809.
60. Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF y Murad F (1992), Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH-diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 40: 1439-1456.
61. Radomski MW, Palmer RMJ y Moncada S (1990), Characterization of the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 101: 325-328.
62. Radomski MW, Palmer RMJ y Moncada S (1990), An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5193-5197.
63. Schmidt HH, Warner TD, Ishii K, Sheng H y Murad F (1992), Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 255: 721-723.
64. Hevel JM, White KA y Marletta MA (1991), Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 266: 22789-22791.
65. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Dinig A, Troso T y Nathan C (1992), Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228.
66. Lyons CR, Orloff GJ y Cunningham JM (1992), Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267: 6370-6374.

67. Knowles RG, Salter M, Brooks SL y Moncada S (1990), Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Comm* 172: 1042-1048.
68. Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ y Moncada S (1990), Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Comm* 173: 541-547.
69. Billiard TR, Curran RD, Stuehr DJ, Stadler J, Simmons RL y Murray SA (1990), Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 1034-1040.
70. Knowles RG, Merrett M, Salter M y Moncada S (1990), Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 270, 833-836.
71. Wright CD, Mulsch A, Busse R y Osswald H (1989), Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* 160: 813-819.
72. McCall TB, Boughton-Smith NK y Palmer RMJ (1989), Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem J* 261: 293-296.
73. Wood KS, Buga GM, Byrns RE y Ignarro LJ (1990), Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm* 170: 80-88.
74. Pollock JS, Nakane M, Buttery LK, Martinez A, Springall D, Polak JM, Förstermann U y Murad F (1993), Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265: C1379-C1387.
75. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P y Michel T (1992), Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6348-6352.
76. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S y Michel T (1992), Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307: 287-293.
77. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A y Snyder SH (1994), Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4214-4218.
78. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D y Stamler JS (1993), Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Resp Cell Mol Biol* 9: 371-377.
79. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG y Moncada S (1994), Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5212-5216.
80. Sessa WC (1994), The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31, 131-143.
81. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M y Murad F (1991), Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1788-1792.
82. Huang PL y Fishman MC (1996), Genetic analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice. *J Mol Med* 74: 415-421.
83. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC y Moskowitz MA (1994), Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885.
84. Wei X-q, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng G-j, Huang F-p, Xu D, Muller W, Moncada S y Liew FY (1995), Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408-411.
85. Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Förstermann U y Murad F (1993), Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316: 175-180.
86. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM Tsui LC y Schappert KT (1993), Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268: 17478-17488.

87. Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Lizhi L y Emson P (1993), Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1), to 12q 24. 2->24. 31 by fluorescent in situ hybridation. *Cytogenet Cell Genet* 64: 62-63.
88. Xu W, Charles I, Moncada S, Gorman P, Liu L y Emson P (1993), Chromosomal assignment of the inducible NOS gene and endothelial NOS gene to human chromosome 17p 11-17q 11 and chromosome 7, respectively. *Endothelium* 1: S24 (abstr).
89. Busconi L y Michel T (1993), Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268: 8410-8413.
90. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS y Kone BC (1994), Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 46: 653-665.
91. Werner ER, Werner-Felmayer G y Wachter H (1993), Tetrahydrobiopterin and cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* 203: 1-12.
92. Bredt DS, Ferris CD y Snyder SH (1992), Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976-10981.
93. Nakane M, Mitchell J, Förstermann U y Murad F (1991), Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Comm* 180: 1396-1402.
94. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD y Nathan C (1992), Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599-604.
95. Nathan CF y Hibbs JB (1991), Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70.
96. Joly GA, Ayres M, Chelly F y Kilbourn RG (1994), Effects of N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Comm* 199: 147-154.
97. Cohen RA (1995), The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Progress Cardiovasc Dis* 38: 105-128.
98. Dawson TM, Steiner SP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR y Snyder SH (1993), Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9808-9812.
99. Fleming I y Busse R (1995), Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Advan Pharmacol* 34: 187-206.
100. Hecker M, Lückhoff A y Busse R (1993), Modulation of endothelial autacoid release by protein kinase C: feed-back inhibition or non-specific attenuation of receptor-dependent cell activation. *J Cell Physiol* 156: 571-578.
101. Davada RK, Chandler LJ y Guzman NJ (1994), Protein Kinase C modulates receptor-independent activation of endothelial nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 266: 237-244.
102. Lewis MJ y Henderson AH (1987), A phorbol ester inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor. *Eur J Pharmacol* 137: 167-171.
103. Flavaham NA, Shimokawa H y Vanhoutte PM (1991), Inhibition of endothelium-dependent relaxations by phorbol myristate acetate in canine coronary arteries: role of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 50-55.
104. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY y Moncada S (1993), Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108: 833-837.
105. Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y y Ignarro LJ (1994), Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. *J Biol Chem* 269: 21644-21649.
106. Prince RC (1993), Rising interest in nitric oxide synthase. *Trends Biol Sci* 18: 35-36.
107. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed R y Snyder SH (1991), Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718.

108. White AK y Marletta MA (1992), Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoproteine. *Biochemistry* 31: 6627-6631.
109. Boucher JL, Genet A, Vandon S, Delaforge M, Henry Y y Mansuy D (1992), Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Comm* 187: 880-886.
110. Renaud JP, Boucher JL, Vandon S, Delaforge M y Mansuy D (1993), Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Comm* 192: 53-60.
111. Schott CA, Bogen CM, Vetrovsky P, Berton CC y Stoclet JC (1994), Exogenous N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine causes nitrite production in vascular smooth muscle cells in the absence of nitric oxide synthase activity. *FEBS Lett* 341: 203-207.
112. Mittal CK (1993), Nitric oxide synthase: involvement of oxygen radicals in conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm* 193: 126-132.
113. Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP y Ignarro LJ (1993), Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 151: 6329-6337.
114. Ravichandran LV, Johns RA y Rengasamy A (1995), Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am J Physiol* 268: H2216-H2223.
115. Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M, Manning J, Paik J y Nathan C (1994), Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 152: 4110-4118.
116. Nathan C y Xie Q (1994), Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-13728.
117. Ignarro JL, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ y Wolin MS (1982), Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme: comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718: 49-59.
118. Schmidt HHHW (1992), ·NO, CO and ·OH endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett* 307: 102-107.
119. Ignarro LJ (1992), Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans* 20, 465-469.
120. Tsai A (1994), How does NO activate hemoproteins? *FEBS Lett* 341: 141-145.
121. Ignarro LJ (1989), Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 3: 31-36.
122. Hathaway DR, Konicki MV y Coolican SA (1985), Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP and cGMP dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* 17: 841-850.
123. Ikebe M y Reardon S (1990), Phosphorylation of myosin light chain kinase by smooth muscle Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *J Biol Chem* 265: 8975-8978.
124. Schultz R, Nava E y Moncada S (1992), Induction and potencial biological relevance of a calcium-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105: 575-580.
125. Hare J and Colucci WS (1995), Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Res* 28: 155-166.
126. Balligand J, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW y Michel T (1993), Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 347-351.
127. Galle J, Bauersachs J, Bassenge E y Busse R (1993), Arterial size determines the enhancement of contractile responses after supression of endothelium-derived relaxing factor formation. *Plügers Archiv* 422: 564-563.
128. Vallance P, Collier J y Moncada S (1989), Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* ii: 997-1004.

129. Rees DD, Palmer RMJ y Moncada S (1989), Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86: 3375-3378.
130. Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Harrison TJ y Evans KT (1987), EDRF coordinates the behavior of vascular resistance vessels. *Nature* 329: 442-445.
131. Vanhoutte PM y Shimokawa H (1989), Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 80: 1-9.
132. Melliott BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL y Kadowitz PJ (1981), Evidence for inhibitory role of guanosine 3'-5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57: 946-955.
133. Radomski MW, Palmer RMJ y Moncada S (1987), The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646.
134. Akopov S, Sercombe R y Seylaz J (1996), Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. *Cerebrovasc Brain Metabol Rev* 8: 11-94.
135. Radomski MW, Palmer RMJ y Moncada S (1987), Comparative pharmacology of endothelium derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92: 181-187.
136. Moro MA, Darley-USmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radowski MW y Moncada S (1994), Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6702-6706.
137. Assender JW, Southgate KM y Newby AC (1991), Does nitric oxide inhibit smooth muscle proliferation? *J Cardiovasc Pharmacol* 17 (Suppl. 3): S104-S107.
138. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE y Epstein SE (1990), Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl J Med* 323: 22-27.
139. Haudenschild CC, Prescott MF y Chobanian AV (1979), Effects of hypertension and its reversal on aortic intima lesions of the rat. *Hypertension* 2: 33-44.
140. Huttner I y Gabbiani G (1983), Vascular endothelium in hypertension. In: *Hypertension*. Genest J, Kuchel O, Hamet P y Cantin M (eds), pp. 473-488. McGraw-Hill, New York.
141. Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D y Mullins JJ (1992), Transgenic rats carrying the mouse renin gene-morphological characterization of a low-renin hypertension. *Kidney Int* 41: 24-36.
142. Peiró C, De Sagarra MR, Redondo J, Sánchez-Ferrer CF y Marín J (1992), Vascular smooth muscle proliferation in hypertensive transgenic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 (Suppl. 12): S128-S131.
143. Shepherd JT (1990), Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. *J Hypertens* 8 (Suppl. 7): S15-S27.
144. Katusic ZS y Vanhoutte PM (1989), Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 257: H33-H37.
145. Auch-Schwelk W, Katusic ZS y Vanhoutte PM (1990), Thromboxane A<sub>2</sub>-receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 15: 699-703.
146. Yanagisawa M, Kurihar H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K y Masaki T (1988), A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.
147. Sánchez-Ferrer CF y Marín J (1990), Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol* 21: 589-603.
148. Katusic ZS (1996), Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Rad Biol Med* 20: 443-448.
149. Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Kimoto S, Ogura M, Inoue A y Marumo F (1990), Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 15: 493-496.
150. Suzuki N, Miyauchi T, Tomobe Y, Matsumoto H, Goto K, Masaki T y Fujino M (1990), Plasma concentrations of endothelin-1 in spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Comm* 167: 941-947.

151. Bolger GT, Liard F, Jodoin A y Jaramillo J (1991), Vascular reactivity, tissue levels, and binding sites for endothelin: a comparison in the spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 406-413.
152. Marín J (1993), Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol* 13, 127-176: 1993.
153. Hart MN, Heistad DD y Brody MJ (1980), Effect of chronic hypertension and sympathetic denervation on wall/lumen ratio of cerebral vessels. *Hypertension* 2: 419-423.
154. Bevan RD (1984), Trophic effects of peripheral adrenergic nerves on vascular structure. *Hypertension* 6 (Suppl. III): III19-III26.
155. Dubin D, Prat RE, Cooke JP y Dzau VJ (1989), Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *J Vasc Med Biol* 1: 150-154.
156. Harris EL, Grigor MR y Millar JA (1990), Differences in mitogenic responses to angiotensin II, calf serum and phorbol ester in vascular smooth muscle cells from two strains of genetically hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Comm* 170: 1249-1255.
157. Simonson MS, Wann S, Mené P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR y Dunn MJ (1989), Endothelin stimulates phospholipase Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 83: 708-712.
158. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF y Moncada S (1989), A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96: 418-424.
159. Nakamura T y Prewitt RL (1991), Effect of N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine on endothelium-dependent relaxation in arterioles of one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 17: 875-880.
160. Alonso MJ, Saláces M, Sánchez-Ferrer CF y Marín J (1992), Predominant role for nitric oxide in the relaxations induced by acetylcholine in cat cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 12-21.
161. Lüscher TF (1990), Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors: a new concept in hypertension. *Am J Hypertens* 3, 317-330.
162. Minuz P, Barrow S, Cockcroft JR y Ritter JM (1990), Prostacyclin and thromboxane biosynthesis in mild essential hypertension. *Hypertension* 15: 469-474.
163. Moncada S (1994), Nitric Oxide. *J Hypertens* 12 (Suppl 10): S35-S39.
164. Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF y Malinski T (1996), Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27: 32-35.
165. Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P y Soubrier F (1995), Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 91: 96-102.
166. Lamping KG y Dole WP (1987), Acute hypertension selectively potentiates constrictor responses of large coronary arteries to serotonin by altering endothelial function in vivo. *Circ Res* 61: 904-913.
167. Van De Voorde J, Vanheel B y Leusen I (1988), Depressed endothelium-dependent relaxation in hypertension: relation to increased blood pressure and reversibility. *Pflügers Archiv* 411: 500-504.
168. Lüscher TF, Vanhoutte PM y Rajj L (1987), Antihypertensive treatment normalizes endothelium-dependent relaxation in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 9 (Suppl. III): III-193- III-197.
169. Yang ST, Mayhan WG, Furaci FM y Heistad DD (1991), Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension* 17, 612-618.
170. Lüscher TF (1994), The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J Hypertens* 12 (Suppl 10): S105-S116.
171. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS y Epstein SE (1993), Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 21: 1145-1151.
172. Takase H, Moreau P, Küng CF, Nava E y Lüscher TF (1996), Antihypertensive therapy

- prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 27: 25-31.
173. Wright CE y Angus JA (1986), Effects of hypertension and hypercholesterolemia on vasodilation in the rabbit. *Hypertension* 8: 361-371.
  174. Lüscher TF (1994), The endothelium and cardiovascular disease: a complex relation. *New Engl J Med* 330: 1081-1083.
  175. Richard V, Tanner FC, Tschudi M y Lüscher TF (1990), Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am J Physiol* 259: H1433-H1439.
  176. Dohi Y, Thiel M, Bühler FR y Lüscher TF (1990), Activation of the endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension* 16: 170-179.
  177. Arnal JF, Battle T, Ménard J y Michel JB (1993), The vasodilatory effect of endogenous nitric oxide is a major counter-regulatory mechanism in the spontaneously hypertensive rat. *J Hyperten* 11: 945-950.
  178. Lüscher TF y Haefeli WE (1993), The L-arginine pathway in the clinical arena: tool or remedy? *Circulation* 87: 1746-1748.
  179. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J y Moncada S (1992), Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572-575.
  180. Dominiczak AF y Bohr DF (1995), Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Am. Heart Assoc.* 25: 1202-1211.
  181. Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P, Guerritore T, Miranda L, Biondi A y Martinell P (1991), Endothelial-derived relaxing factor released by endothelial cells of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obst Gynecol* 164: 507-513.
  182. Shirasaki Y, Kolm P, Nickols A y Lee TJJ (1988), Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular responses in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 53-58.
  183. Otsuka Y, Dipiero A, Hirt E, Brennaman B y Lockette W (1988), Vascular relaxation and cGMP in hypertension. *Am J Physiol* 254: H163-H169.
  184. Bockman CS, Jeffries WB, Pettinger WA y Abel PW (1992), Enhanced release of endothelium-derived relaxing factor in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 20: 304-313.
  185. Kirchner KA, Scanlon PH, Dzielak DJ y Hester RL (1993), Endothelium-derived relaxing factor responses in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 265: R568-R572.
  186. Ito T, Kato T, Iwama Y, Shimizu K, Asano H, Okumura K, Hashimoto H y Satake T (1991), Prostaglandin H<sub>2</sub> as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with endothelium-derived nitric oxide. *J Hypertens* 9: 729-736.
  187. Lin L, Balazy M, Pagano PJ y Nasjletti A (1994), Expression of prostaglandin H<sub>2</sub>-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. *Circ Res* 74: 197-205.
  188. Iwama Y, Kato T, Muramatsu M, Asano H, Shimizu K, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H y Ito T (1992), Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19: 326-332.
  189. Auch-Schwelk W y Vanhoutte PM (1991), Endothelium-derived contracting factor released by serotonin in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 4: 769-772.
  190. Mistry M y Nasjletti A (1988), Role of pressor prostanoids in rats with angiotensin II-salt-induced hypertension. *Hypertension* 11: 758-762.
  191. Lin L, Mistry M, Stier CT y Nasjletti A (1991), Role of prostanoids in renin-dependent and renin-independent hypertension. *Hypertension* 17: 517-525.
  192. Struyker-Boudier HAJ, Van Bortel LMAB y DeMey JGR (1990), Remodeling of the vascular tree in hypertension: drug effects. *Trends Pharmacol Sci* 11: 240-245.
  193. Cunningham LD, Brecher P y Cohen RA (1992), PDGF receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxations via nitric oxide in rat aorta. *J Clin Invest* 89: 878-882.

194. Tschudi MR, Criscione L y Lüscher TF (1991), Effect of aging and hypertension on endothelial function of rat coronary arteries. *J Hypertens* 9 (Suppl 6): 164-165.
195. Lüscher TF, Romero JC y Vanhoutte PM (1986), Bioassay of endothelium-derived vasoactive substances in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 4 (Suppl 6): 81-83.
196. Kauser K y Rubanyi GM (1995), Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 25 (part 1): 517-523.
197. Tanase H (1979), Genetic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Exp Anim* 28: 519-530.
198. Iams SG y Wexler BC (1979), Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med* 94: 608-616.
199. Iams SG y Wexler BC (1977), Retardation in the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy. *J Lab Clin Med* 90: 997-1003.
200. Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmerman F, Ganten D y Stock G (1989), Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *Hypertension* 7: 721-726.
201. Chen YF y Meng QC (1991), Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci* 48: 748-759.
202. Ely DL y Turner ME (1990), Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* 16: 277-281.
203. Vincent M, Kaiser MA, Orea V, Lodwick D y Samani NJ (1994), Hypertension in the spontaneously hypertensive rat and sex chromosomes. *Hypertension* 23: 161-166.
204. Gisclard V, Flavaham NA y Vanhoutte PM (1987), Alpha adrenergic responses of blood vessels of rabbits after ovariectomy and administration of 17- $\beta$ -estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 466-470.
205. Williams SP, Shackelford DP, Iams SG y Mustafa SJ (1988), Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 145: 205-207.
206. Yagi K y Komura S (1986), Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochem Int* 13: 1051-1055.
207. Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S y Ramwell PW (1993), Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonari hypertension in rats. *Br J Pharmacol* 110: 719-723.
208. Keaney JF Jr, Shwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL y Vita JA (1994), 17- $\beta$ -Estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 89: 2251-2259.
209. Smith WM (1988), Epidemiology of hypertension in older patients. *Am J Med* 38 (Suppl. 3B): 2-6.
210. Vokonas PS, Kannel WB y Cupples LA (1988), Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham study. *J Hypertens* 6 (Suppl. 1): S3-S9.
211. Borhani NO (1988), Isolated systolic hypertension in the elderly. *J Hypertens* 6: S15-S19.
212. Wadsworth RM (1990), Calcium and vascular reactivity in ageing and hypertension. *J Hypertens* 8: 975-983.
213. Safar ME (1985), Focus on the large arteries and in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 7 (Suppl. 2): S1-S4.
214. Julius S (1988), The therapeutic dilemma of hypertension in the elderly. *Drugs* 36, 7-17.
215. Nielsen H, Hasenkam JM, Pilegaard HK, Aalkjaer C y Mortensen FV (1992), Age-dependent changes in  $\alpha$ -adrenoceptor mediated contractility of isolated human resistance arteries. *Am J Physiol* 263: H1190-H1196.
216. Folkow B y Svanborg A (1993), Physiology of vascular aging. *Physiol Rev* 73: 725-764.
217. Marín J (1995), Age-related changes in vascular responses: a review. *Mech Ageing Develop* 79: 71-114.
218. Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H y Torner J (1988), Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke* 19: 892-897.

219. Lee TJF, Shirasaki Y y Nickols GA (1987), Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. *Blood Vessels* 24: 132-136.
220. Shimamura K, Osugi S, Moriyama K y Sunano S (1991), Impairment and protection of endothelium-dependent relaxation in aortae of various strains of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 (Suppl. 3): S133-S136.
221. Arribas S, Marín J, Ponte A, Balfagón G y Salaíces M (1994), Norepinephrine-induced relaxations in rat aortae mediated by endothelial  $\beta$ -adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 520-527.
222. Deisher TA, Mankani S y Hoffman BB (1989), Role of cyclic AMP-dependent protein kinase in the diminished beta adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle with increasing age. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 812-819.
223. Kazanietz MG y Enero MA (1991), Decreased  $\beta$ -adrenoceptor-mediated vasodilation in aortae from aged rats: possible involvement of a stimulatory GTP-binding protein. *Eur J Pharmacol* 198: 177-181.
224. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Hai H, Sugimachi M, Suzuki S y Takeshita A (1993), Impaired coronary artery blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91: 29-37.
225. Casinó PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM y Panza JA (1993), The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation* 88: 2541-2547.
226. Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S y Henry PD (1987), Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 79: 170-174.
227. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnenkeyn LL, Van-Hove CE, Coene MC y Herman AG (1986), Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 58: 552-564.
228. Shimokawa H y Vanhoutte PM (1989), Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 64: 900-914.
229. Sellke FW, Armstrong ML y Harrison DG (1990), Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 81, 1586-1593.
230. Simon BC, Haudenschild CC y Cohen RA (1993), Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovasc Pharmacol* 21, 893-901.
231. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC y Heistad DD (1987), Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 80, 1808-1811.
232. Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Calentano J, Shwaery GT, Loscalzo J y Vita JA (1994), Low-dose  $\alpha$ -tocopherol improves and high-dose  $\alpha$ -tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 93, 844-851.
233. Bar RS (1992), Vascular endothelium and diabetes mellitus. In: *Endothelial Cell Dysfunctions*. Simionescu N y Simionescu M (eds), pp. 363-381, New York Plenum Press.
234. Lefer AM y Ma XL (1993), Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 771-776.
235. López JAG, Armstrong ML, Piegors DJ y Heistad DD (1989), Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane  $A_2$ , and ADP. *Circulation* 79: 698-705.
236. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC y Cunningham LD (1988), Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ Res* 63: 903-910.

237. Verbeuren TJ, Bonhomme E, Laubie M y Simonet S (1993), Evidence for induction of non-endothelial NO synthase in aortas of cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 841-845.
238. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC y Witztum JL (1989), Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* 320: 915-924.
239. Kume N, Cybulsky MI y Gimbrone MA Jr (1992), Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cell. *J Clin Invest* 90: 1138-1144.
240. Simon B. C, Cunningham LD y Cohen RA (1990), Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the big coronary artery. *J Clin Invest* 86: 75-79.
241. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R y Henry PD (1990), Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 334: 160-162.
242. Plane F, Bruckdorfer KR, Kerr P, Stever A y Jacobs M (1992), Oxidative modification of low-density lipoproteins and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 105: 216-222.
243. Jacobs M, Plane F y Bruckdorfer KR (1990), Native and oxidized low density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium derived relaxing factor in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 100: 21-26.
244. Mangin EL Jr, Kugiyama K, Nguy JH, Kerns SA y Henry PD (1993), Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Circ Res* 72: 161-166.
245. Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Murohara T, Fukunaga K, Miyamoto E y Yasue H (1992), Lysophosphatidylcholine inhibits surface receptor-mediated intracellular signals in endothelial cells by a pathway involving protein kinase C activation. *Circ Res* 71: 1422-1428.
246. Oishi K, Raynor RL, Charp PA y Kuo JF (1988), Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. *J Biol Chem* 263: 6865-6871.
247. Tesfamariam B, Brown ML y Cohen RA (1991), Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* 87: 1643-1648.
248. Ohara Y, Peterson TE y Harrison DG (1993), Hypercholesterolemia increases endothelium superoxide dismutase production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551.
249. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jarak O, Michel T, Single DJ y Loscalzo J (1992), S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 444-448.
250. Minor RLJ, Myers PR, Guerra RJ, Bates JN y Harrison DG (1990), Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxide from rabbit aorta. *J Clin Invest* 86: 2109-2116.
251. Mehta JL, Lawson DL, Nicolini FA, Cain DA, Mehta P y Schreier H (1990), Evidence for generation of a large amount of nitric oxide-like vascular smooth muscle relaxant by cholesterol risk neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 438-442.
252. Nakaki T, Nakayama M y Kato R (1990), Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 189: 347-353.
253. Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC y Vanhoutte PM (1992), Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells: effects on cell proliferation. *Circ Res* 71: 1088-1100.
254. Dinerman JL y Mehta JL (1990), Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 16: 207-222.
255. Sáenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ y Cohen RA (1989), Impaired

- neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *New Engl J Med* 320: 1025-1030.
256. Bucala R, Tracey KJ y Cerami A (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87: 432-438.
  257. Halkin A, Benjamin N, Doktor HS, Todd SD, Viberti G y Ritter JM (1991). Vascular responsiveness and cation exchange in insulin-dependent diabetes. *Clin Sci* 81: 223-232.
  258. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW y Hayes JR (1992). Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients type 2 (non-insulin-dependent), diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 771-776.
  259. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A y Waldhäusl W (1995). High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44: 1323-13-27.
  260. Cohen RA y Tesfamariam B (1992). Diabetes mellitus and the vascular endothelium. In: *Hyperglycemia, Diabetes and Vascular Disease*. Ruderman N (ed. ), pp. 44-49, Oxford University, New York.
  261. Hattori Y, Kawaski H, Abe K y Kanno M (1991). Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxations in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 261: H1086-H1094.
  262. Kamata K, Miyata N, Abiru T y Kasuya Y (1992). Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci* 50: 1379-1387.
  263. Abiru T, Watanabe Y, Kamata K, Miyata N y Kasuya Y (1990). Decrease in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 68: 13-25.
  264. Weisbrod RM, Brown ML y Cohen RA (1993). Effect of elevated glucose on cyclic GMP and eicosanoids produced by porcine aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 915-923.
  265. Tesfamariam B, Jakubowski JA y Cohen RA (1989). Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived  $\text{PGH}_2\text{-TxA}_2$ . *Am J Physiol* 257: H1327-H1333.
  266. Shimizu K, Muramatsu M, Kakegawa Y, Asano H, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H y Ito T (1993). Role of prostaglandin  $\text{H}_2$  as an endothelium-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes* 42, 1246-1252.
  267. Steinberg D y Witztum JL (1990). Antioxidants and atherosclerosis. *JAMA* 264, 3047-3052.
  268. Tesfamariam B y Cohen RA (1992). Free radical mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 90, 727-732.
  269. Pieper GM y Peltier BA (1995). Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 397-403.
  270. Tesfamariam B, Gupta S, Oates PJ, Ruderman NB y Cohen RA (1993). Reduced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump activity in diabetic rabbit carotid artery: reversal by aldose reductase inhibition. *Am J Physiol* 34: 1194-1198.
  271. Gupta S, Sussman I, McArthur CS, Tornheim K, Cohen RA y Ruderman NB (1992). Endothelium-dependent inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia: possible role of endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 90: 727-732.
  272. Gupta S, McArthur C, Grady C y Ruderman NB (1994). Stimulation of vascular  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol* 266: H2146-H2151.
  273. Wolff SP y Dean RT (1987). Glucose autooxidation and protein modification. The role of oxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 245: 234-250.
  274. Kelly PAT, Ritchie IM y Collins FM (1995). Cerebrovascular consequences of repeated exposure to  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester. *Br J Pharmacol* 116: 2771-2777.
  275. Dalkara T, Yoshida T, Irikura K y Moskowitz MA (1994). Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 33: 1447-1452.

276. Thomsen LL, Iversen HK, Lassen LH y Olesen J (1994), The role of nitric oxide in migraine pain. *CNS Drugs* 2: 417-422.
277. Kilbourn RG, Owen-Schaub LB, Cromeens DM, Gross SS, Flaherty MJ, Santee SM, Alak AM y Griffith OW (1994), N<sup>o</sup>-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric-oxide formation, reverses IL-2-mediated hypotension in dogs. *J Appl Physiol* 76: 1130-1137.
278. Mitsuhashi H, Shimizu R y Yokoyama M (1995), Role of nitric oxide in anaphylactic shock. *J Clin Immunol* 15: 277-283.
279. Schoedon G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S y Schaffner A (1995), Nitric oxide and infection: another view. *Clin Infect Dis* 21 (Suppl. 2): S152-S157.
280. Petros A, Bennett D y Vallance P (1991), Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 338: 1557-1558.
281. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG y Simmons RL (1992), Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257: 387-389.
282. De Belder AJ, Radomski MW, Why HJF, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF y Moncada S (1993), Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 341: 84-85.
283. Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM y Macdonald PS (1994), Increase nitric oxide production in heart failure. *Lancet* 344: 373-374.
284. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA y Freeman BA (1990), Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624.
285. Schröder H (1996), Bioactivation of organic nitrates and other nitrovasodilators. *Advan Drug Res* 28: 253-267.
286. Feelisch M (1993), Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. *Eur Heart J* 14: 123-132.
287. Govantes C, Rodríguez-Martínez MA y Marín J (1996), Vasodilator effect and tolerance induced by the nitrocompound SIN-1 in rabbit femoral artery. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 18: 387-395.
288. Nahir AM, Shapira D y Scharf Y. (1986), Double-blind randomized trial of nitroderm TTS in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Israel J Med Sci* 22: 139-142.
289. Ramsey B, De Belder A, Campbell S, Moncada S y Martin JF (1994), A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 24: 76-78.
290. De Belder AJ, Lees C, Martin J, Moncada S y Campbell S (1995), Treatment of HELLP syndrome with nitric oxide donor. *Lancet* 345: 124-125.
291. Nakaki T y Kato R (1994), Beneficial circulatory effect of L-arginine. *Jpn J Pharmacol* 66: 167-171.
292. Reis DJ, Li G y Regunathan S (1995), Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine displacing substance (CDS), and agmatine. *Ann NY Acad Sci* 763: 295-313.
293. Regunathan S, Youngson C, Raasch W y Reis DJ (1995), Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 1272-1282.
294. Ishikawa T, Misonou T, Ikeno M, Sato K y Sakamaki T (1995), N<sup>o</sup>-hydroxyagmatine: a novel substance causing endothelium-dependent vasorelaxation. *Biochem Biophys Res Comm* 214: 145-151.
295. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ y Cooke J. P (1992), L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic human. *J Clin Invest* 90: 1248-1253.
296. Cooke JP, Singer AH, Tsao PS, Zera P, Rowan RA y Billingham ME (1992), Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 90: 1168-1172.
297. Hishikawa K, Nakaki T, Tsuda M, Esumi H, Ohshima H, Suzuki H, Saruta T y Kato R (1992), Effects of systemic L-arginine administration on hemodynamics and nitric oxide release in man. *Jpn Heart J* 33: 41-48.

298. Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, Kato R y Saruta T (1992), L-arginine as an antihypertensive agent. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S196-S197.
299. Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, Kato R y Saruta T, (1993), Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens* 11: 639-645.

## INTOXICACION ETILICA Y ESTRES OXIDATIVO

MARIA CASCALES<sup>1</sup>, E. MANUEL ROBLES-CHILLIDA<sup>2</sup>,  
CARMEN CASCALES<sup>1</sup> Y MIGUEL ANGEL SANTOS-RUIZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Plaza Ramón y Cajal sn, 28040 Madrid

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Velazquez 144, 28006 Madrid

<sup>3</sup> Hospital Gomez Ulla, Servicio de Farmacia Glorieta del Ejército sn, 28047 Madrid

### SUMARIO

---

1. INTRODUCCION
2. METABOLISMO OXIDATIVO DEL ETANOL
  - 2.1. Efecto del etanol sobre la disminución de NAD<sup>+</sup>
  - 2.2. Inducción del sistema microsómico de oxidación del etanol (SMOE)
    - 2.2.1. Inducción del citocromo P-450 2E1 en células de Kupffer
3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO GENERADAS EN EL METABOLISMO OXIDATIVO DEL ETANOL
4. OXIDO NITRICO E INTOXICACION ETILICA
5. ETANOL Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE
6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Desde el punto de vista clínico, el etanol es la sustancia hepatotóxica más estudiada debido a su utilización de manera abusiva por el ser humano y al impacto del consumo del etanol en la incidencia de enfermedad hepática. El metabolismo del etanol comienza en la mucosa gástrica, pero es el hígado el órgano que se encarga principalmente de su metabolismo y eliminación y el que más sufre sus efectos tóxicos. A pesar de que las influencias genéticas, inmunológicas y nutricionales juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica, se asume que el etanol es hepatotóxico *per se*. Buena parte de los mecanismos celulares que intervienen en la citotoxicidad del etanol permanecen aún controvertidos, debido a la gran cantidad de modelos experimentales de hepatotoxicidad inducida por el etanol.

El estrés oxidativo es el resultado de una alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante celular, en favor de la oxidación. El metabolismo del etanol en el hígado puede inducir la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, capaces de oxidar lípidos y ocasionar lesiones en las membranas celulares. Existen evidencias que demuestran la intervención del etanol en la peroxidación de lípidos y está claro que el estrés oxidativo originado como consecuencia de la oxidación del etanol, juega un papel clave en la patogénesis de la lesión hepática asociada al alcoholismo (1).

Los factores que conducen a la enfermedad hepática inducida por el etanol son muy diversos y entre ellos cabe citar, las alteraciones en el estado de oxido-reducción celular, la inducción del sistema microsómico de oxidación del etanol dependiente del citocromo P-450, la desviación del metabolismo del etanol desde la alcohol deshidrogenasa (la vía fisiológica normal) hacia el sistema de oxidación microsómico ubicado en el retículo endoplásmico, el mayor consumo de oxígeno por este sistema, la generación disminuída de ATP y el bajo estado energético intracelular (2, 3).

## 2. METABOLISMO OXIDATIVO DEL ETANOL

En el hepatocito de los mamíferos, el etanol se oxida a acetaldehído por tres vías: La *alcohol deshidrogenasa (ADH)*, enzima citosólica de importancia primor-

dial cuando el etanol se ingiere de manera esporádica y en dosis moderadas (Figura 1, A); el *sistema microsómico de oxidación del etanol (SMOE)* dependiente del citocromo P-450, ubicado en el retículo endoplásmico, sistema adaptativo que juega un papel importante en la intoxicación etílica crónica, (Figura 1, B); y el metabolismo peroxisómico del etanol, catalizado por la *catalasa* en presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por acción de la NADPH oxidasa. Este último sistema parece ser de menor importancia por su escaso grado de contribución a la oxidación del etanol (Figura 1, C) (1-3)

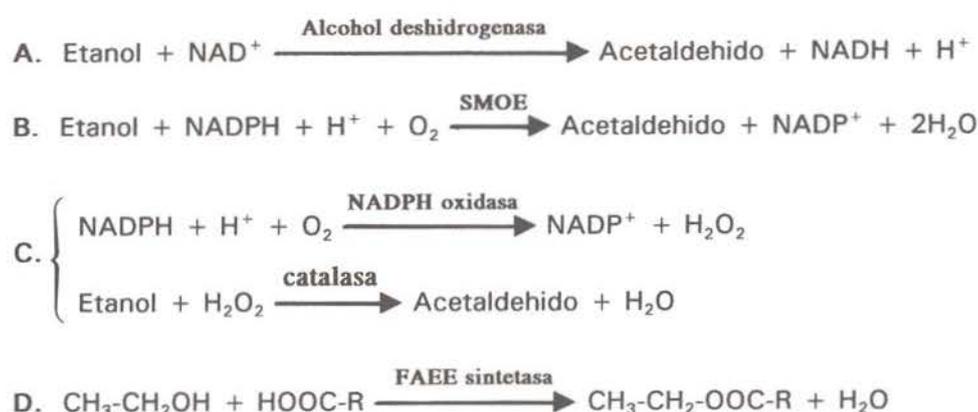


Figura 1. *Metabolismo oxidativo (A - C) y no oxidativo (D) del etanol.*

La oxidación del etanol a acetaldehido por la alcohol deshidrogenasa genera el coenzima nicotinamido adenin dinucleótido en su forma reducida (NADH) a expensas del mismo coenzima en forma oxidada (NAD<sup>+</sup>), y su actividad está condicionada a la reoxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>. Esto se consigue a través de diversos sistemas de oxido reducción en el citoplasma del hepatocito y de la transferencia de los metabolitos reducidos a la mitocondria via los mecanismos de lanzadera (2 - 4). Si se generan excesivas cantidades de NADH, que superen la capacidad del hepatocito de mantener la homeostasis redox NAD<sup>+</sup>/NADH, se suceden una serie de alteraciones, tales como: acumulación de metabolitos reducidos en el citosol (glicerol fosfato, malato y lactato (Figura 2)), con un incremento en la lactacidemia que contribuye a la acidosis y reduce la capacidad renal de excretar ácido úrico (hiperuricemia); alteraciones en el metabolismo de la glucosa (5), generación de purinas, depleción del ATP, etc. El incremento en la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis), demostrada en casos de intoxicación etílica, es otra de las vias de utilización del exceso de equivalentes reductores (6).

Existe una alcohol deshidrogenasa en la *mucosa gástrica* que metaboliza el etanol cuando éste se ingiere unido a la dieta, en dosis denominadas «sociales» (7-10). La ADH gástrica, ha sido ya aislada y existe en tres formas caracterizadas por

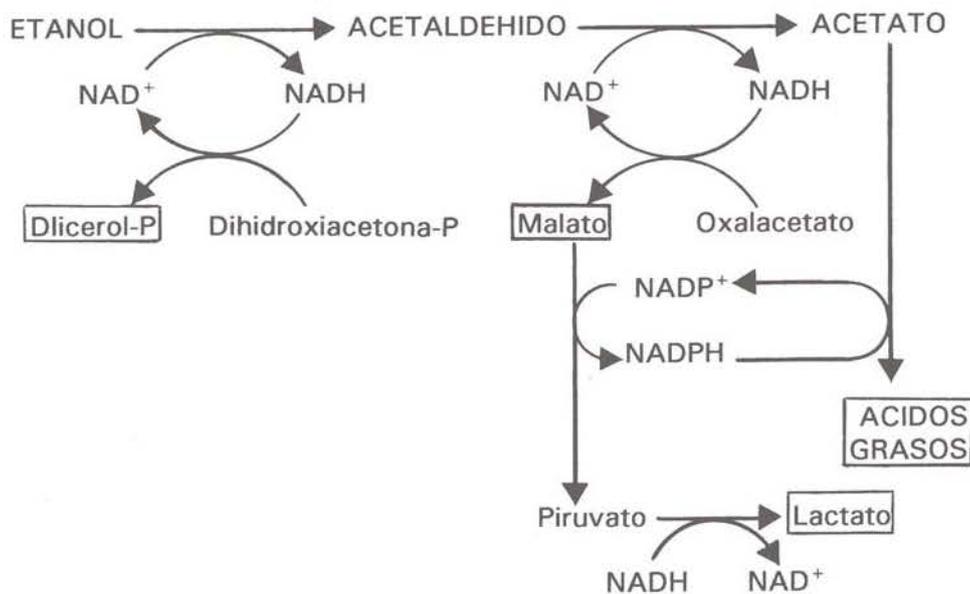


Figura 2. Interrelaciones del metabolismo del etanol en el citoplasma del hepatocito.

presentar diferentes afinidades por el etanol ( $K_m$  alta, baja e intermedia). La ADH gástrica presenta una variabilidad étnica y se sabe que el 80% de los japoneses carecen de una de las isoformas. La ADH gástrica se inhibe por fármacos, no existe en individuos que han sufrido la gastrectomía ni en alcohólicos crónicos y está inhibida en casos de ayuno (11). La actividad de la alcohol deshidrogenasa gástrica es significativamente menor en el sexo femenino (12). Esta vía primera del metabolismo del etanol puede llegar a metabolizar en el estómago una fracción considerable del etanol ingerido, evitando su paso a la circulación sistémica (13)

Los sistemas enzimáticos implicados en la oxidación del etanol antes mencionados presentan distinta afinidad por el etanol, calculada por la constante de Michaelis ( $K_m$ ). En la ADH hepática la  $K_m$  fluctúa entre 0,2 a 2 mM, en la ADH gástrica entre 40 a 100 mM (2) y en el SMOE entre 8 a 10 mM. Esto indica que la ADH hepática, aunque sea la más abundante, por su elevada afinidad por el etanol se satura a concentraciones muy bajas, mientras que la ADH gástrica al poseer una  $K_m$  muy elevada (baja afinidad), puede actuar frente a concentraciones de alcohol más altas y actuar así como mecanismo «protector» que previene del efecto de cantidades saturantes de etanol en la circulación periférica. El SMOE, dependiente del citocromo P-450, es la vía de emergencia que actúa cuando la cantidad de etanol sobrepasa la capacidad de la ADH hepática y se caracteriza por su capacidad de ser inducida en caso de alcoholismo crónico. La isoforma del P450 que se induce por el etanol es en su mayor parte la 2E1 codificada por el gen CYP2E1 (14, 15).

La vía no oxidativa del metabolismo del etanol (Figura 1, D) implica la formación de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena larga, catalizada por la ácido graso etil ester (FAEE = fatty acid ethyl ester) sintetasa. Esta vía es muy operativa en fetos cuando se administra el etanol por vía intraperitoneal a ratas preñadas en determinados momentos de la gestación (16), y existe también en diversos órganos como miocardio, corteza cerebral, páncreas, hígado y médula ósea (17).

### 2.1. Efecto del etanol sobre el NAD<sup>+</sup>

A pesar de que uno de los requerimientos de la ADH hepática para oxidar el etanol es la recuperación del nicotinamido adenin dinucleótido en forma oxidada, NAD<sup>+</sup>, se ha observado en cultivos de hepatocitos, que es el propio etanol a concentraciones de 8 a 10 mM, el que promueve la disminución del NAD<sup>+</sup> por varias vías. Una de ellas es estimulando la formación del NADP<sup>+</sup> mediante la activación de la NAD<sup>+</sup> quinasa, la única reacción conocida que, en presencia de ATP, convierte el NAD<sup>+</sup> en NADP<sup>+</sup> (18, 19). El descenso en la concentración intracelular del NAD<sup>+</sup> por esta vía, puede llegar a ser del 15% (19). Otra vía utilizada por el etanol para consumir NAD<sup>+</sup> es mediante la activación de otras enzimas, como la NAD<sup>+</sup>-hidrolasa y la poli (ADP ribosa) polimerasa, ambas necesarias para ADP-ribosilar las proteínas nucleares implicadas en el proceso de reparación del DNA (Figura 3) (20). La depleción del NAD<sup>+</sup> presenta alteraciones metabólicas importantes, entre ellas la de limitar, no sólo la oxidación del etanol por la vía de la alcohol deshidrogenasa, sino también la de bloquear la formación de los residuos de ADP-ribosa de las proteínas nucleares con consecuencias sobre la reparación y proliferación celular (21).

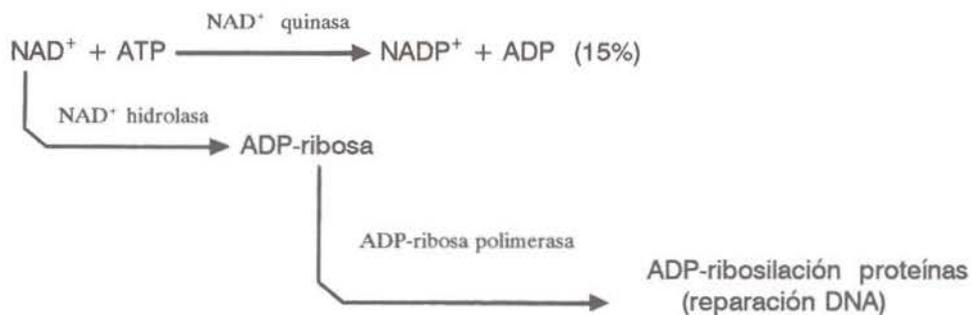


Figura 3.- Vías inducidas por el etanol que consumen NAD<sup>+</sup>.

### 2.2. Inducción del sistema microsómico de oxidación del etanol (SMOE)

El mecanismo que conduce a la lesión hepática inducida por alcohol es bastante complejo y se encuentra sujeto a muchos factores, entre los que cabe destacar: (a) alteraciones en el estado redox del hepatocito, (b) inducción del SMOE, (c) elevada

concentración de etanol en sangre y (d) disminución del oxígeno hepático. Por otra parte, la ingestión crónica de etanol al inducir el SMOE en el hepatocito, promueve una serie de alteraciones debidas al incremento del consumo de oxígeno, al incremento en el gradiente de tensión del O<sub>2</sub> en el sinusoides y al estado resultante de hipoxia en los hepatocitos perivenosos (14, 15).

La isoforma del citocromo P-450 que se induce predominantemente por efecto del etanol es la CYP2E1, la cual se eleva de 5 a 10 veces, por activación transcripcional del gen CYP2E1 o por estabilización del mRNA CYP2E1. A dosis bajas de etanol la inducción se verifica a nivel post-traducional, mientras que a dosis elevadas la inducción se verifica en la transcripción (2, 15).

El citocromo P450 2E1 se encuentra distribuido de manera heterogénea en el espacio acinar siendo más abundante en la región perivenosa del acino. Su inducción en la vecindad del terminal venoso, unida a la menor presión de oxígeno existente en esta zona, son factores que impiden la recuperación del NAD<sup>+</sup>. Todo ello, si va asociado además, con una prolongada ingestión de etanol, favorece la iniciación de la secuencia de eventos que va a conducir al estrés oxidativo y a la peroxidación lipídica (22 - 24). Por tanto, la desviación del metabolismo del etanol, desde la alcohol deshidrogenasa citosólica al sistema microsómico de oxidación del etanol, es lo que va a producir la hipoxia relativa en la región perivenosa del acino, la cual va unida a un descenso en la generación del ATP y en el estado energético celular. En condiciones de máxima inducción, el citocromo P450 2E1 llega a alcanzar en las células perivenosas, concentraciones entre 50 y 100 µM.

Esta isoforma P450 2E1 cataliza también la oxidación de diversas hepatotoxinas y solventes y exhibe en presencia de NADPH una elevada capacidad de consumir oxígeno. Los ácidos grasos de la dieta ejercen gran influencia sobre la inducción de la expresión del CYP2E1 por el etanol, de manera, que una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (linoleico), estimula dicha inducción. Por ejemplo, al comparar la adición a la dieta de grasa de buey (0,7% linoleico) o de aceite de maíz (58% linoleico), se ha observado que el aceite de maíz, por su mayor contenido en linoleico, es el que produce una estimulación mayor sobre la inducción, dependiente del etanol, del sistema microsómico de oxidación en general y del CYP2E1 (24). La evidencia de que el sistema CYP2E1 sea capaz de inducir la peroxidación lipídica en las áreas perivenosas en momentos previos al desarrollo de la lesión alcohólica hepatocelular ha logrado convencer de la implicación de la lipoperoxidación en la enfermedad hepática alcohólica (25-27).

La peroxidación lipídica inducida por el etanol es el resultado, no sólo de la elevada generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, sino también de la actividad deficitaria de los mecanismos de defensa responsables de la eliminación de dichos radicales. Los mecanismos implicados en la generación de especies activas de oxígeno durante el metabolismo del etanol incluyen los siguientes: (a) la cadena mitocondrial de transporte electrónico (28), (b) el sistema microsómico

co CYP2E1 y la citocromo P450 NADPH reductasa (29, 30) (c) la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, NADP oxidasa, etc, (1-3)

Las evidencias sugieren que los sistemas microsómicos son la fuente más importante de especies reactivas de oxígeno en casos de intoxicación etílica crónica debido a la inducción del sistema CYP2E1 y de la citocromo P-450 NADPH reductasa (31-33). El CYP2E1 posee una actividad NADPH oxidasa muy elevada y se encuentra poco acoplado a la NADPH citocromo P-450 reductasa. Se ha descrito que los microsomas de hígado de ratas inducidos con etanol generan más activamente el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), en presencia de NADPH como reductor microsómico (31) y se ha observado que dicho radical ataca al DNA produciendo roturas en sus cadenas.

La cadena respiratoria mitocondrial es una de las fuentes fisiológicas del anión superóxido. La mitocondria posee una superóxido dismutasa activa que destruye dicho anión con producción de peróxido de hidrógeno, el cual, a su vez, es eliminado por la glutatión peroxidasa mitocondrial. El incremento de equivalentes reductores inducido por el etanol puede exacerbar la actividad mitocondrial incrementando el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y elevar con ello la generación del anión superóxido en la mitocondria (28). A pesar de los mecanismos de defensa, parte del peróxido de hidrógeno puede escapar de su eliminación enzimática y reaccionar, en presencia de hierro (34), generando radicales más agresivos, como el radical hidroxilo, que alteran la función y estructura de la mitocondria. El metabolismo hepático del etanol puede originar una situación de estrés oxidativo y peroxidación lipídica (26, 27). El estrés oxidativo originado, en casos de intoxicación aguda, afecta particularmente a la mitocondria ya que la oxidación del etanol por la alcohol deshidrogenasa hace que la mitocondria genere mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas afectan a la membrana mitocondrial aumentando su susceptibilidad a la lipoperoxidación y disminuyendo los niveles mitocondriales de GSH (35). También estas especies y los productos derivados de la peroxidación lipídica pueden lesionar el DNA mitocondrial que se encuentra menos protegido que el nuclear (36, 37).

La xantina oxidasa puede jugar también un papel en la generación de especies activas de oxígeno especialmente en casos de baja tensión de oxígeno en las áreas perivenosas (32, 38). La elevación del NADH y la degradación de los nucleótidos de adenina favorecen la formación de radicales libres vía xantina oxidasa (39). Por otro lado, el hierro juega un papel destacado en los mecanismos de peroxidación ya que el acetaldehído por acción de la aldehído oxidasa inicia la movilización del hierro a partir de la ferritina (34). El incremento del cociente NADH/NAD<sup>+</sup> favorece esta movilización y el hierro libre actúa como catalizador importante en la generación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (29). El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) presenta una agresividad mucho más elevada que el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, y al contrario que estos dos últimos, no se conoce hasta la fecha ningún sistema enzimático que bloquee su acción.

Se ha considerado que son los hepatocitos la fuente primaria de los radicales de oxígeno en los alcohólicos, dado su papel preponderante en el metabolismo del etanol, pero otras células hepáticas pueden también contribuir a este proceso. Así, las células de Kupffer son una fuente importante de radical superóxido en casos de intoxicación etílica (40, 41), debido a la inducción del CYP2E1 en ellas, por efecto del etanol. La consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno en las células de Kupffer ha de ser diferente si se la compara con los hepatocitos, ya que una de las funciones de las células de Kupffer es actuar como modulador de la activación de las células Ito para la producción de colágeno. Se sugiere, por tanto, que la generación de especies activas de oxígeno inducida por el etanol en las células de Kupffer, puede jugar un papel en la expresión del TGF $\beta$ 1 y en la fibrogénesis.

#### 2.2.1. Inducción del CYP 2E1 en células de Kupffer

Las células de Kupffer, los macrófagos residentes en hígado, intervienen de manera importante en la patogénesis del alcoholismo (42). Estas células poseen cuando se activan, además de su misión de defensa inmunológica, funciones moduladoras de otras células hepáticas mediante la secreción de mediadores tales como citoquinas y especies reactivas de oxígeno. El etanol actúa sobre las células de Kupffer alterando su función celular a nivel de fagocitosis (43, 44) y produciendo cambios en la liberación de citoquinas (TNF $\alpha$ , y TGF $\beta$ ) (45-47) y en la generación del anión superóxido. Estas alteraciones son importantes porque pueden contribuir a la iniciación de la fibrogénesis alcohólica, ya que el TGF $\beta$ , las especies reactivas de oxígeno y los productos de la peroxidación lipídica, inducen la síntesis de las proteínas de la matriz por los fibroblastos y las células Ito (48). Aunque el CYP2E1 se encuentra mayoritariamente en los hepatocitos, se ha descrito la presencia de este sistema inducible en células de Kupffer (2). Un reciente estudio de Koivisto *et al.* (41), ha demostrado la inducción del CYP2E1 en células Kupffer de rata con intoxicación etílica crónica. La inducción relativa fué de la misma magnitud que en hepatocitos, pero el contenido en CYP2E1 fué 10 veces menor.

La inducción del CYP2E1 en células de Kupffer por el etanol provoca en estas células serias consecuencias debidas a la elevación intracelular de acetaldehído. Se ha observado que la contribución relativa del CYP2E1 de estas células a la generación total de acetaldehído puede ser más elevada que en los hepatocitos (49). En células Kupffer de murinos los inhibidores del citocromo P-450 inhiben el metabolismo del etanol en más de un 50%, mientras que los inhibidores de la alcohol deshidrogenasa y de la catalasa lo inhiben menos de un 10% (50). También se ha descrito que el alcoholismo crónico tiende a elevar el metabolismo del etanol en estas células, lo cual sostiene la hipótesis de que el CYP2E1 inducible por etanol es el principal sistema operativo. De ser así, una inducción que eleve varias veces la cantidad de CYP2E1 supondría una producción de acetaldehído en las células de Kupffer incluso superior que en hepatocitos. El acetaldehído es capaz de unirse

covalentemente a las proteínas, incluso al propio CYP2E1 (51), y formar aductos estables con las proteínas, los cuales pueden actuar como neoantígenos. Como las células de Kupffer son capaces de presentar antígenos a los linfocitos (52), es posible que la formación de estos aductos origine una respuesta inmunológica. Esto es importante porque existen evidencias de que los anticuerpos producidos frente a los aductos acetaldehído-proteína contribuyen al desarrollo de la hepatitis alcohólica (53). La producción de IgE anti-aductos del acetaldehído-proteína puede conllevar reacciones de hipersensibilidad al etanol (54). Otro mecanismo por el cual el acetaldehído puede afectar la función de las células de Kupffer se basa en su capacidad para unirse a la cisteína y al glutatión, disminuyendo así la concentración de glutatión (55).

El CYP2E1 al oxidar el etanol a acetaldehído genera especies reactivas de oxígeno las cuales pueden iniciar la peroxidación lipídica microsómica (56, 57). Cuantitativamente la peroxidación lipídica dependiente del CYP2E1 es mucho más pronunciada en hepatocitos que en células de Kupffer. Sin embargo, el incremento en la lipoperoxidación en las células de Kupffer puede dar lugar a fenómenos diferentes. Las células de Kupffer se sabe que son importantes moduladores de la activación de las células Ito y los productos de la peroxidación lipídica estimulan la producción de colágeno por estas células (58). Además, se ha demostrado que la expresión de un importante mediador de la fibrogénesis hepática, el TGF $\beta$ , se inhibe por la acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol (59), sugiriéndose un posible papel de las reacciones de peroxidación en la regulación de la expresión génica del TGF $\beta$ . El que el CYP2E1 de las células de Kupffer influya en tal regulación y juegue un importante papel en la iniciación de la fibrogénesis hepática supone un avance en el conocimiento de la patogénesis alcohólica, que necesita ser más estudiado.

### 3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO GENERADAS EN EL METABOLISMO OXIDATIVO DEL ETANOL

Las especies reactivas de oxígeno se generan como subproductos en el proceso de reducción del oxígeno molecular que tiene lugar para la formación de H<sub>2</sub>O. El proceso requiere la adición secuencial de electrones. La figura 4 muestra la formación del anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (60).

La formación de estas especies de oxígeno, especialmente el anión superóxido, ocurre en condiciones normales en la cadena respiratoria mitocondrial, a nivel de la NADH deshidrogenasa y la ubiquinona. La administración aguda de etanol eleva significativamente la generación de este anión debido a que el exceso de NADH producido en la oxidación del alcohol, vía alcohol deshidrogenasa, promueve la actividad de la cadena electrónica mitocondrial (28). Otro sistema enzimático, ya citado anteriormente, que genera anión superóxido en hígado por efecto de la administración aguda de etanol, es la xantina deshidrogenasa/oxidasa citosólica (61). La xantina deshidrogenasa, dependiente de NAD<sup>+</sup> se inhibe en presencia de los

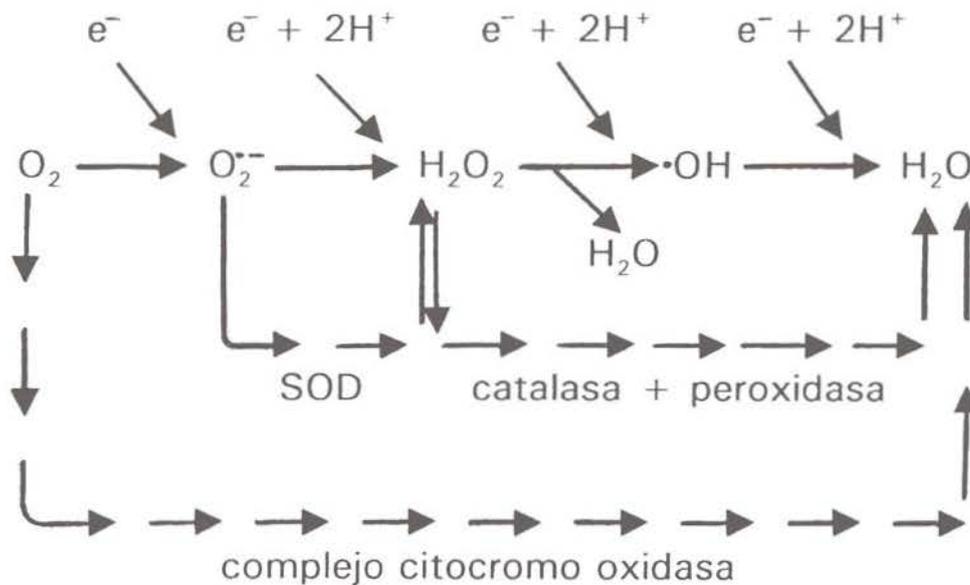


Figura 4. Formación de especies activas de oxígeno por adición de electrones al oxígeno molecular.

elevados niveles de NADP<sup>+</sup> generados por el etanol en su metabolismo microsómico, con lo cual el sistema enzimático se comporta como xantina oxidasa. El metabolismo de las purinas, via xantina oxidasa, produce radicales de oxígeno y a ello contribuye el estado de hipoxia relativa inducida por el propio etanol en los hepatocitos perivenosos, la cual activa las proteasas en las células de esta región del acino. El acetaldehído influye también en la activación de la xantina oxidasa por su efecto sobre los grupos -SH libres. La superproducción de anión superóxido por efecto del etanol, se debe a la mayor afinidad de la xantina oxidasa por sustratos como la hipoxantina y la xantina, generados en la degradación de los adenin nucleótidos, que se activa, a su vez, en presencia de etanol (62).

El sistema microsómico de oxidación del etanol dependiente del citocromo P-450 es un sistema generador de especies reactivas de oxígeno. El funcionamiento de esta monooxigenasa de función mixta implica, en primer lugar, la unión del citocromo P-450 con el sustrato lo cual perturba el equilibrio de la molécula y facilita la entrada del primer electrón, con la intervención de la NADPH citocromo P-450 reductasa. Esto hace que el Fe<sup>+3</sup> del citocromo P-450 pase a Fe<sup>+2</sup> (Figura 5). La oxigenación se inicia por unión del O<sub>2</sub> al Fe<sup>+2</sup>, lo que da lugar a un intermediario que se encuentra en equilibrio con su forma resonante Fe<sup>+3</sup>(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Se verifica entonces la transferencia del segundo electrón con la intervención del citocromo b<sub>5</sub>. El siguiente paso implica la rotura del enlace oxígeno-oxígeno, la incorporación de dos protones y la generación de un oxígeno activo. La inserción del oxígeno en el

sustrato puede ir unida a la sustracción de hidrógeno del sustrato y la recombinación de los radicales hidroxilo y el radical R para dar el producto. La disociación del producto restaura el citocromo P-450 en su estado férrico inicial (15, 62). La isoforma del citocromo P-450 implicada en el metabolismo microsómico del etanol, la CYP2E1, presenta una elevada actividad oxidasa y juega un papel importante en la generación microsómica de especies reactivas de oxígeno (1, 63). La contribución de la vía microsómica dependiente del CYP2E1 al metabolismo oxidativo del etanol es mayor en casos de alcoholismo crónico, ya que en estas condiciones se induce su actividad en el proceso de adaptación.

Los microsomas hepáticos de ratas tratadas con etanol generan, en presencia de NADPH, el radical OH, debido a la reacción del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en presencia de metales, por la reacción de Fenton. La intervención

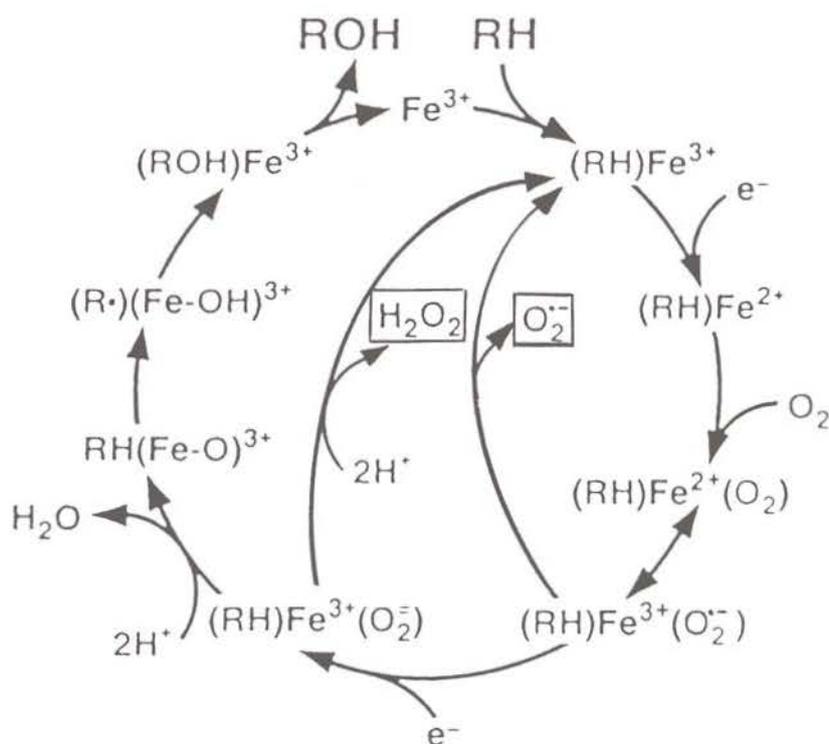


Figura 5. Mecanismo de acción del citocromo P-450 y generación de las especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ). RH, sustrato; ROH, producto de la monooxigenación.

activa del CYP2E1 en la producción del OH inducida por el etanol (15) puede evaluarse fácilmente por su capacidad para promover la rotura de las cadenas del DNA (Figura 6). Se ha utilizado esta capacidad de rotura del DNA por los microsomas hepáticos inducidos por etanol e incubados en presencia de etanol y NADPH,

como medio de evaluar la cantidad de radicales de oxígeno (31). Este método es más sensible aún que el de espectroscopía de resonancia electrónica y requiere cantidades relativamente más pequeñas de proteína microsómica.



Figura 6. Acción de las especies activas de oxígeno producidas en el metabolismo microsómico del etanol sobre la molécula del DNA

#### 4. OXIDO NITRICO E INTOXICACION ETILICA

El óxido nítrico es otra especie química reactiva y citotóxica, ubicua y multiregulada, que posee una vida extremadamente corta. Este radical deriva de la oxidación del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) (64).

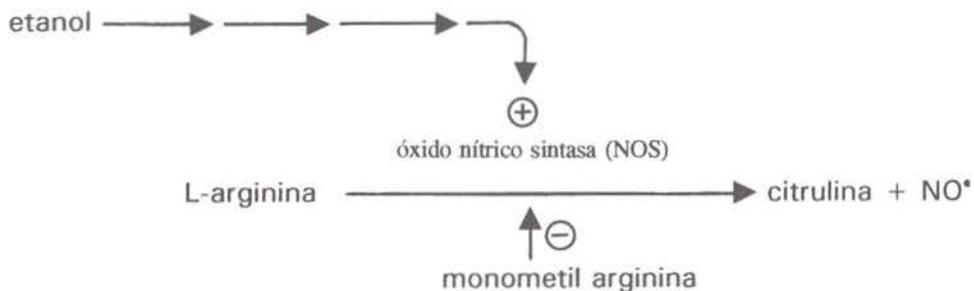


Figura 7. Formación del óxido nítrico (NO) por acción catalítica de la óxido nítrico sintasa (NOS). La monometil arginina actúa como inhibidor de la reacción por su analogía con el sustrato L-arginina.

Se ha demostrado (65) que el óxido nítrico se encuentra involucrado en la patogénesis de la lesión hepática alcohólica. Mediante infusión de etanol en hígado de rata (25 a 100 mM), por perfusión a través de la vena porta y recogiendo los perfusatos a través de una cánula inserta en la vena cava, se ha observado que la presión portal se eleva inmediatamente por efecto del etanol y después disminuye gradualmente manteniéndose un poco por encima de los valores basales. La infusión simultánea de un inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, la N<sup>G</sup>-monometil arginina elevó hasta cuatro veces el incremento de la presión portal inducido por el etanol y esta elevación pudo ser revertida mediante la coinfusión de un exceso de L-arginina.

Sobre las bases de los efectos inhibidores del óxido nítrico sobre la síntesis proteica y la respiración mitocondrial en el hepatocito, una elevación en la producción de NO se asume que ejerce efectos citotóxicos sobre el hígado. Sin embargo, en hepatitis alcohólica este incremento del óxido nítrico debe considerarse como un mecanismo hepático adaptativo, para paliar los efectos vasoconstrictores del etanol (66). En la regulación del tono hepático vascular actúan dos sustancias vasoactivas, la endotelina 1 y el óxido nítrico. La acción vasoconstrictora de la endotelina 1 activada por el etanol se contrarresta, al llegar a un máximo, por efecto del óxido nítrico que comienza a actuar como un vasodilatador disminuyendo gradualmente la presión portal (67-69). No es arriesgado especular que el etanol activa indirectamente la producción de óxido nítrico mediante la inducción de la expresión de la NOS hepática en su forma inducible (Figura 7).

Se ha descrito (66) que los monocitos de pacientes con hepatitis alcohólica exhibían una producción basal de NO significativamente elevada. Aunque se ha propuesto repetidas veces que una elevada producción de NO ejerce efectos citotóxicos sobre el hígado, el caso descrito por Hunt debe ser considerado como un mecanismo adaptativo del hígado que genera mayores cantidades de NO para contrarrestar el efecto vasoconstrictor del etanol.

## 5. ETANOL Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

La situación de estrés oxidativo en casos de enfermedad hepática alcohólica puede tener su origen en defectos en los mecanismos celulares de defensa antioxidante, los cuales implican sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Para evitar las lesiones inducidas por las especies activas de oxígeno, el hígado posee una serie de enzimas, estratégicamente compartimentalizados, que actúan concertadamente convirtiendo el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, por acción de la superóxido dismutasa, y el peróxido de hidrógeno en agua, por acción de la catalasa. Por otro lado, la glutatión peroxidasa, utiliza el poder reductor del glutatión reducido (GSH) para eliminar los peróxidos. En esta reacción el GSH se oxida a GSSG. La acción concertada de estas enzimas impide la formación del radical hidroxilo (70, 72). La glutatión peroxidasa, a su vez, se acopla a la glutatión reductasa para

regenerar el GSH y para ello la glutatión reductasa requiere la presencia de un equivalente reductor en forma de NADPH. Este equivalente lo proporcionan los sistemas citosólicos del hepatocito que generan NADPH a expensas del NADP<sup>+</sup>, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el enzima málico. La glutatión-S-transferasa es otro sistema enzimático involucrado en la eliminación de radicales libres catalizando la conjugación de dichos radicales libres con el residuo SH de la cisteína del glutatión. El esquema de la Figura 8 muestra el acoplamiento de estas reacciones con el metabolismo del etanol por el SMOE dependiente del citocromo P 450 2E1.

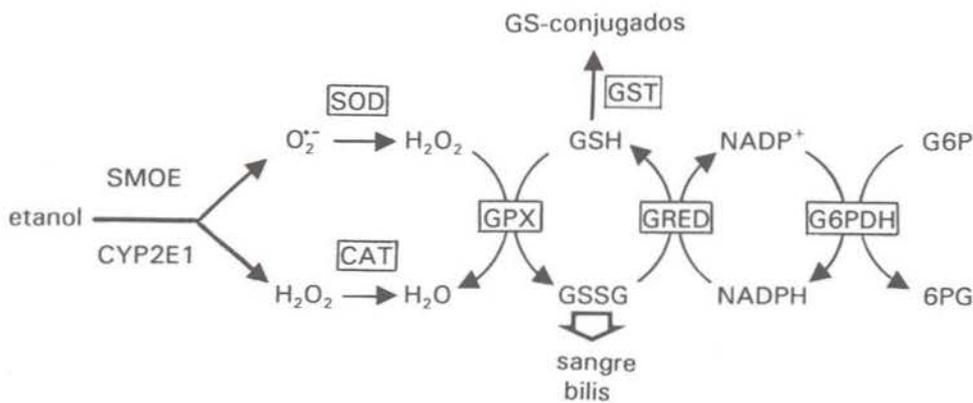


Figura 8. Reacciones enzimáticas acopladas al metabolismo del etanol por el SMOE, para eliminar las especies activas de oxígeno. SOD superóxido dismutasa; CAT catalasa; GPX glutatión peroxidasa; GRED glutatión reductasa; G6PDH glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; GST glutatión S-transferasa.

Otra línea de antioxidantes no enzimáticos está representada por aquellos que actúan interfiriendo en la cascada peroxidativa inducida por los radicales libres. Entre éstos se encuentra la vitamina E que es capaz de reaccionar con los radicales lipoperóxidos de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana. Durante esta reacción el  $\alpha$ -tocoferol se convierte en su radical. La regeneración del  $\alpha$ -tocoferol se consigue por reducción de dicho radical mediante el ascorbato (73). También el glutatión representa un sistema auxiliar para la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol. Considerando la diversidad de mecanismos de defensa antioxidantes, el estrés oxidativo sólo ocurrirá cuando estos sistemas protectores sean superados por una generación excesiva de especies reactivas. Esto se ha demostrado recientemente mediante infusión intragástrica continuada de etanol a ratas (74). En estas condiciones la disminución de la defensa antioxidante juega un papel importante en la severidad de la lesión hepática alcohólica, la cual se relacionó de manera significativa con el grado de peroxidación lipídica, de oxidación tiólica y con la formación de grupos carbonilos en proteínas específicas.

Una serie de agentes protectores se utilizan en clínica en casos de patología hepática alcohólica ya que pueden actuar previniendo la situación de estrés oxidativo inducida por etanol a la vez que disminuyendo los efectos de su hepatotoxicidad. Por ejemplo la administración de S-adenosil metionina al elevar el nivel de GSH hepático, atenúa la lesión hepatocelular alcohólica y moviliza los lípidos acumulados (75-77). De igual manera se ha observado que suplementos a la dieta de vitamina E pueden ser beneficiosas ya que previenen la peroxidación lipídica inducida por etanol (73). Kato *et al.* (38) han demostrado que sustancias como el alopurinol inhiben la peroxidación lipídica inducida por etanol probablemente a través de la inhibición de la xantina oxidasa.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Albano E, Tomasi A, Parola M, Comoglio A, Ingelman-Sundberg M y Dianzani MU (1993), Mechanisms responsible for free radical formation during ethanol metabolism and their role in causing oxidative injury by alcohol, en *Free radicals and antioxidants in nutrition* (eds Corongui F, Banni S, Dessì MA y Rice-Evans C), pp 77-96. Richelieu Press Londres.
2. Lieber CS (1994), Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106, 1085-1105
3. Cascales M (1987), Metabolismo del etanol y aspectos energéticos, en: Aspectos básicos del alcoholismo. Actas V Reunión Científica del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, pp. 21-30. Madrid.
4. Cascales C y Cascales M (1990), Metabolismo del etanol y lesiones hepáticas inducidas, en *Hepatología. Nuevas Tendencias* (eds M. Cascales y J Rodés) vol. 13, pp. 107-127. CSIC, Madrid.
5. Cascales C, Santos-Ruiz MR, Cascales M y Santos-Ruiz A (1981), Effect of chronic ethanol and acetaldehyde administration on glycolysis in rat liver. *Cien Biol (Portugal)* 6: 219-222.
6. Cascales C, Cascales M, Benito M, Caldés T y Santos-Ruiz A (1983), The effect of chronic ethanol administration on lipogenesis in liver and adipose tissue. *British J Nutrition* 50: 549-553.
7. Lamboeuf Y, LaDroite PH y Saint-Blanquat G de (1983), The gastro-intestinal metabolism in the rat. The effect of chronic ethanol intoxication. *Arch Int Pharmacodyn* 261, 127-169.
8. Caballeria JE, Baraona M y Lieber (1987), The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. *Life Sci* 41: 1021-1027.
9. Moreno A y Parés X (1991), Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J Biol Chem* 266: 1128-1133.
10. Lim Jr RT, Gentry RT, Ito D, Yokoama H, Baraona E y Lieber CS (1993), First pass metabolism of ethanol in rats is predominantly gastric. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1337-1344.
11. Di Padova C, Worner TM, Julkunen RJK y Lieber CS (1987), Effects of fasting and chronic ethanol consumption on the first-pass metabolism of ethanol. *Gastroenterology* 92: 1169-1173.
12. Frezza C, Di Padova C, Pozzato M, Terpin M, Baraona E y Lieber CS (1990), High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and blood ethanol levels. *New Engl J Med* 322: 95-99.
13. Lewitt MD, Lewitt DG, Furne J y DeMaster EG (1994), Can the liver account for first-pass metabolism of ethanol in the rat? *Am J Physiol* 267: G452-G457.
14. Orme-Johnson WH y Ziegler DM (1965), Alcohol-mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochim Biophys Res Commun* 21: 78-62.
15. Koop DR (1992), Oxidative and reductive metabolism of cytochrome P-4502E1. *FASEB J* 6: 724-730.

16. Bearer CF, Gould S, Emerson R, Kinnuen P y Cook CS (1992), Fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters. *Pediat Res* 31: 492-495.
17. Hungund BL, Gokhale VS (1994), Reduction of fatty acid ethyl ester accumulation by ganglioside GM1 in rat fetus exposed to ethanol. *Biochem Pharmacol* 48, 2103-2108.
18. McGuinness ET, Butler JR (1985), NAD<sup>+</sup> kinase: A review. *Int J Biochem* 17, 1-11.
19. Akinshola BE, Potter JJ y Mezey E (1991), Ethanol increases the formation of NADP<sup>+</sup> in rat hepatocytes. *Hepatology* 13: 509-514.
20. Akinshola BE, Sharma S, Potter JJ y Mezey E. (1992), Ethanol enhances ADP- ribosylation of proteins in rat hepatocytes. *Hepatology* 15: 471-476
21. Ueda K y Hayaishi O (1985), ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* 54: 73-100.
22. Kurose I, Higuchi H, Kato S, Miura S, Ishii H. (1996), Ethanol-induced oxidative stress in the liver. *Alcoholism: Clin & Exp Res* 20: 77A-85A
23. Bautista A y Spitzer JJ (1992), Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by in situ perfused rat liver. *Hepatology* 15: 892-898.
24. Lindros KO (1995), Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. *J Hepatol* 23 (Suppl 1): 7-15
25. Takahashi H, Johansson I, French SW y Ingelman-Sundberg M. (1992), Effects of dietary fat composition on activities of the microsomal ethanol oxidizing system and ethanol-inducible cytochrome P-450 (CYP2E1) in the liver of rats chronically fed ethanol. *Pharmacology and Toxicology* 70: 347-352.
26. Kamimura S, Gaal R, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G y Tsukamoto H (1992), Increased 4-hydroxynonanal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with lipid fibrogenesis. *Hepatology* 16: 448-453.
27. Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M (1988), Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol inducible cytochrome p-450. *Biochem Pharmacol* 38: 1313-1319.
28. Sinaceur J, Ribiere C, Sabourault D y Nordman R (1985), Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication. Possible role in alcohol hepatotoxicity. en *Free radicals in liver injury* (eds Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU y Slater TF), pp. 175-177. IRL Press. Londres.
29. Winston GW, Cederbaum AI (1983), NADPH-dependent production of oxy-radicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. *J Biol Chem* 258: 1509-1519.
30. Reinke LA, Rau JM, McGay PB (1990), Possible roles of the free radicals in alcoholic tissue damage. *Free Rad Res Commun* 9: 205-211.
31. Kukielka E & Cederbaum AI (1994), DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P4502E1 in the increased activity after ethanol-treatment. *Biochem J* 302: 773-779.
32. Lindros KO (1988), Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450(IIE1) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 55-60.
33. Sergent O, Morel I, Chevanne M, Cillard P Cillard J (1995), Oxidative stress induced by ethanol in rat hepatocyte cultures. *Biochem Mol Biol Intern* 35: 575-583
34. Shaw S (1989), Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Rad Biol Med* 7: 741-747.
35. Fernández-Checa JC, García Ruiz C, Ookhtens M y Kaplowitz N (1991), Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol fed rats. Tracer kinetics studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *J Clin Invest* 87: 397-405.
36. Kukielka E, Dicker E, Cederbaum AI (1994), Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 309: 377-386.
37. Fromenty B, Grimbert S, Mansouri A, Beaugrand M, Erlinger S, Rötig A y Pesayre D. (1995), Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics: Association with microvesicular steatosis. *Gastroenterol* 108: 193-200.
38. Younes M, Stubelt O (1987), Enhancement of hypoxic liver damage by ethanol. Involvement of xantine oxidase and the role of glycolysis. *Biochem Pharmacol* 36: 2973-2977

39. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS (1990), Role of xantine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 98: 203-210.
40. Koop DR, Chernosky A Brass EP (1991), Identification and induction of cytochrome P-450 2E1 in rat Kupffer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 1072-1076.
41. Koivisto T, Mishin VM, Mak KM, Cohen PA, Lieber CS. (1996), Induction of cytochrome P-4502E1 by ethanol in rat Kupffer cells. *Alcoholism: Clin & Exp Res* 20: 207-212.
42. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG (1994), Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20: 453-460.
43. Shiratori Y, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K, Tanaka M. (1989), Kupffer cell function in chronic ethanol fed rats. *Liver* 9: 351-359.
44. Earnest D, Sim W, Kirckpatrick D, Eskelton C, Sipes I. (1989), Effects of ethanol and acetaldehyde on Kupffer cell function, in Wisse E, Knook D, McCuskey R (eds): *Cells of the Hepatic Sinusoid*, vol 2. Rijswijk, The Netherlands, The Kupffer Cell Foundation, pp. 325-329.
45. Matsuoka M, Tsukamoto H (1990), Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor  $\alpha$ : Implication for a pathogenic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 11: 599-605.
46. Earnest DL, Abril EA, Jolley CS, Martínez F. (1993), Ethanol and diet induced alterations in Kupffer cell function. *Alcohol* 28: 73-83.
47. Basista 1993 MH, Gavaler J, Stieffenhofer A, Love K, Rosenblum E, Dindzans VJ (1993), *Alcohol Clin Exp Res* 17: 556-560
48. Casini A, Pinzani M, Milani S, Grappone C, Galli G, Jezequel AM, Schuppan D, Rotella CM, Surrenti C. (1993), Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor  $\beta$  in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 105: 245-253.
49. Earnest DL, Abril ER, Jolley CS, Eskelson CD. (1993), Kupffer cell function is modified by both diet and ethanol. *Adv Biosci* 86: 181-190.
50. Wickramasinghe SN, Barden G, Levy L. (1987), The capacity of macrophages from different murine tissues to metabolize ethanol and generate an ethanol-dependent non-dialyzable cytotoxic activity in vitro. *Alcohol* 22: 31-39.
51. Behrens UJ, Hoerner M, Lasker JM, Lieber CS. (1988), Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIE1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 584-590.
52. Shiratori Y, Okano K, Matsumoto K y Murao S. (1984), Antigen presentation by Kupffer cells in the rat. *Scand J Gastroenterol* 19: 733-739.
53. Yokoyama H, Ishii H, Nagata S, Kato S, Kamegaya K y Tsuchiya M. (1993), Experimental hepatitis induced by ethanol after immunization with acetaldehyde adducts. *Hepatology* 17: 14-19.
54. Israel Y, MacDonald A, Niemelä O, Zamel D, Shami E, Zywułko M, Klajner F y Borgono C. (1992), Hypersensitivity to acetaldehyde-protein adducts. *Mol Pharmacol* 42: 711-717.
55. Shaw S, Rubin KP y Lieber CS. (1983), Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 28: 585-589.
56. Ekström G, Ingelman-Sundberg M (1989), Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol* 38: 1313-1319.
57. Nanji AA, Zhao S, Lamb RG, Hossein-Sadrzadeh SM, Dannenberg AJ y Waxman DJ. (1993), Changes in microsomal phospholipases and arachidonic acid in experimental alcoholic liver injury: Relationship to cytochrome P-450 2E1 induction and conjugated diene formation. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 598-603.
58. Parola M, Muraca R, Dianzani I, Barrera G, Leonarduzzi G, Bendinelli P, Piccolletti P y Poli G. (1992), Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression in the rat liver. *FEBS Lett* 308: 267-270.
59. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P y Dianzani MU. (1993), Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen  $\alpha$ 1 (I) gene expression in human fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1044-1050.

60. Kehrer JP (1993), Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48.
61. Sultatos LG (1988), Effects of acute ethanol administration on the hepatic xantine dehydrogenase/oxidase system in the rat. *J Pharmacol & Experimental Therapeutics* 246: 946-949.
62. Martín-Sanz P y Cascales M (1990), Metabolismo de fármacos en hígado y sus alteraciones. en *Hepatología. Nuevas tendencias* (eds M Cascales y J Rodés) vol. 13, pp. 83-106, CSIC. Madrid.
63. Koch OR, Galeotti T, Bartoli GM, Boveris A (1991), Alcohol-induced oxidative stress in rat liver. *Xenobiotica* 21: 1077-1084.
64. Moncada S Palmer RMJ & Higgs EA (1991), Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109.
65. Oshita M, Takei Y, Kawano S, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. (1994), Alcohol and endogenous nitric oxide in hepatic microcirculation. *Alcohol & Alcoholism* 29: 5-7.
66. Hunt NCA y Golding RD (1992), Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 14: 146-150.
67. Oshita M, Sato N, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, Goto M et al. (1992), Ethanol-induced vasoconstriction causes focal hepatocellular injury in the isolated perfused liver. *Hepatology* 16: 1007-1013.
68. Oshita M, Takei Y, Kawano S, Yoshihara H, Hijioka T, Fukui H, Goto M et al (1993), Roles of endotelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. *J Clin Invest* 91: 1337-1342.
69. Oshita M, Takei Y, Kawano S, Hijioka T, Masuda E, Goto, M et al. (1994), Endogenous nitric oxide attenuates ethanol-induced perturbation of hepatic circulation in the isolated-perfused rat liver. *Hepatology* 20: 961-965.
70. Nordman R (1994), Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol & Alcoholism* 29: 513-522.
71. Kawase T, Kato S y Lieber CS (1989), Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10: 815-821.
72. Chen LH, Hu N y Huang TL (1990), Effects of acute alcohol intoxication on liver antioxidant defense systems in rats. *Biochem Arch* 8: 95-100.
73. Odeleye OE, Eskelton CD, Watson RR, Mufti SI y Chapil M (1991), Vitamin E reduction of lipid peroxidation products in rats fed cod liver oil and ethanol. *Alcohol* 8: 273-277.
74. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M y Nordmann R (1997), Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 25: 351-355.
75. Vendemiale G, Altomare E y Trizio T (1989), Effects of oral S-adenosyl methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 24: 407-415
76. Santos-Ruiz MA, Martín-Sanz P y Cascales M (1983), Influencia de factores lipotropos sobre el anabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo de rata tratada con etanol y dieta grasa. *Anal Real Acad Farm* 49: 723-740.
77. Santos-Ruiz MA (1984), Influencia de factores lipotropos sobre el Metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo de rata tratada con etanol y dieta grasa. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

## **METABOLISMO OXIDATIVO DE LA COCAINA EN HIGADO**

MARIA CASCALES<sup>1</sup>, ASUNCION ZARAGOZA<sup>1</sup>,  
CARMEN DIEZ-FERNANDEZ<sup>1</sup> Y LOURDES FERNANDEZ-SIMON<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Bioquímica (CSIC - UCM). Facultad de Farmacia.  
Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Toxicología. Luis Cabrera, 9. 28004 Madrid

### **SUMARIO**

---

1. INTRODUCCION
2. COCAINA E HIGADO
3. COCAINA, METABOLISMO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y HEPATOTOXICIDAD
4. INFLUENCIA DE LA INDUCCION DEL SISTEMA MONOOXIGENASA MICROSOMICO SOBRE LA HEPATOTOXICIDAD DE LA COCAINA
5. COCAINA, ETANOL Y ESTRES OXIDATIVO
6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

La cocaína (benzoilmetilecgonina) es un alcaloide natural introducido como agente terapéutico por sus propiedades anestésicas locales, que se conoce principalmente por sus efectos euforizantes y estimulantes. Su uso no es reciente, ya que se han encontrado hojas de coca en tumbas de momias indias de 600 años a.C. El uso y abuso de esta droga se ha desarrollado en la pasada década y hoy se reconoce como una de las drogas más peligrosas por inducir una serie de complicaciones (1). La hepatotoxicidad de la cocaína en humanos fue descrita por vez primera en 1967 por Marks y Chapple (2), si bien ha sido en los últimos diez años cuando esta acción ha despertado un mayor interés, dado el incremento del consumo y abuso de esta droga. La cocaína es un agente hepatotóxico que induce la muerte celular en el interior del acino hepático (3, 4), a través de la formación de metabolitos activos, productos de su oxidación, que son los verdaderos responsables de su toxicidad (5). Existe evidencia que demuestra que la biotransformación de la cocaína en hígado, a través del sistema microsómico monooxigenasa dependiente del citocromo P-450, juega un papel fundamental en su hepatotoxicidad. La administración de inductores de la actividad oxidativa microsómica, como el fenobarbital (6) o el etanol (7), o la misma cocaína (8), aceleran la biotransformación de la cocaína y elevan su hepatotoxicidad.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar los efectos hepatotóxicos de la cocaína. El primero implica la formación de un derivado activo, que puede ser la norcocaína nitróxido u otro metabolito aún no identificado, el cual, al unirse por enlace covalente a las macromoléculas celulares, acarrea la muerte celular (9). En el segundo, interviene un ciclo redox entre la norcocaína nitróxido y la N-hidroxi-norcocaína que consume NADPH y oxígeno molecular en ambos sentidos y genera peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Estas dos especies activas de oxígeno, a su vez, pueden reaccionar en presencia de metales (el Fe del citocromo P-450) y generar así especies activas aún más tóxicas, como el radical hidroxilo (10), con gran capacidad para reaccionar con las macromoléculas celulares.

## 2. COCAINA E HIGADO

El metabolismo oxidativo de la cocaína juega un importante papel en su hepatotoxicidad. A tal conclusión se ha llegado después de comparar la potencia hepa-

totóxica entre esta droga y sus diferentes metabolitos, las correlaciones entre la actividad metabólica y la susceptibilidad a la hepatotoxicidad entre diferentes razas y especies animales y los efectos de inductores e inhibidores sobre la intensidad de la lesión hepática inducida por administración de cocaína.

Las vías del metabolismo de la cocaína se muestran a grandes rasgos en la Figura 1. La cocaína una vez ingerida, se metaboliza casi en su totalidad y sólo 1-5% se elimina por orina sin sufrir alteraciones. La vía predominante para su transformación es la hidrolítica. En humanos, un 90% de la cocaína se metaboliza por hidrólisis y se excreta por la orina en forma de benzoilecgonina y ecgonina metil éster. Las esterasas plasmáticas y hepáticas son las responsables de la formación del éster metílico de la ecgonina. Las pequeñas cantidades de ecgonina encontradas en la orina humana parecen derivar de la hidrólisis de la benzoilecgonina y quizás de la hidrólisis no enzimática del éster metílico de la ecgonina (11, 12).

Ninguno de los metabolitos derivados de la hidrólisis de la cocaína (benzoilecgonina, éster metílico de la ecgonina y ecgonina) son hepatotóxicos cuando se administraron a ratones en dosis elevadas. Se ha observado que la inhibición de esta vía hidrolítica con diazinon, produce una marcada elevación de la hepatotoxicidad de la cocaína en ratón (13), lo que confirma que el metabolismo hidrolítico de la cocaína es una vía de destoxificación. Parece existir una clara competitividad entre los enzimas hidrolíticos y los enzimas oxidativos (citocromo P450 y FAD monooxigenasa) por la cocaína, ya que la inhibición de las esterasas ocasiona, no solo una elevación en la concentración de cocaína, sino también una elevación en la formación de metabolitos oxidados. Por ejemplo, en ratones tratados con diazinon a los que se administró cocaína, se encontró una concentración hepática de N-hidroxinorcocaína 60 veces más elevada que en ratones no tratados con diazinon (14). Por tanto, la operatividad de la vía hidrolítica del metabolismo de la cocaína, ejerce una importante influencia sobre la hepatotoxicidad de este fármaco, a través de sus efectos sobre las concentraciones hepáticas de cocaína o de sus derivados oxidados.

En humanos en condiciones normales, un 10 % de la cocaína ingerida sufre la oxidación del nitrógeno del tropano, catalizada por sistemas enzimáticos ubicados en los microsomas hepáticos. En la oxidación secuencial de la cocaína, el primer paso es la desmetilación de la cocaína a norcocaína. La norcocaína puede derivar directamente de la cocaína, via citocromo P-450 o a través de la formación de un derivado N-óxido, catalizada por la FAD monooxigenasa, con la subsiguiente oxidación a norcocaína mediada por el citocromo P-450 (10). El grado de contribución de la N-desmetilación al metabolismo total de la cocaína varía entre las especies. Se ha estimado en un 45 % en ratón, un 20 % en rata y un 10% en humanos (12, 15). La norcocaína, al ser administrada a ratones, presenta un potencial hepatotóxico similar a la cocaína (16), pero el tratamiento con inhibidores del P-450 impide el desarrollo de la lesión hepática, lo que indica que la norcocaína necesita ser oxidada para llegar a la especie hepatotóxica. El siguiente paso es la N-hidroxilación de la norcocaína a N-hidroxinorcocaína, mediada por el citocromo P-450/FAD

monooxigenasa (14). La N-hidroxinorcocaína, al ser administrada directamente a animales, se observó que posee mayor potencia hepatotóxica que la cocaína y la norcocaína (13), pero aún así su hepatotoxicidad se bloquea por tratamiento con SKF-525A, lo cual muestra que se necesita una oxidación adicional para llegar al verdadero hepatotóxico. La posterior oxidación de la N-hidroxinorcocaína conduce al radical norcocaína nitróxido. Charkoudian y Shuster (17) han observado que una posterior oxidación electroquímica de la norcocaína nitróxido conduce a la formación de un ión norcocaína nitrosonio reactivo. Se ha demostrado que la hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido poseen capacidad para estimular la peroxidación lipídica, siendo la norcocaína nitróxido la más efectiva en la iniciación de este proceso.

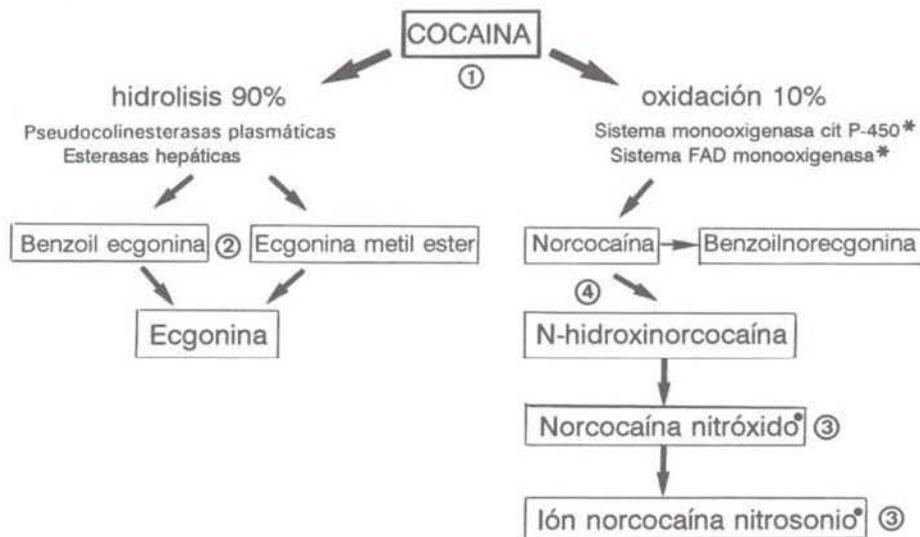


Figura 1. *Metabolismo oxidativo y no oxidativo de la cocaína.* (1) Del 1 al 5% de la cocaína se excreta en orina sin metabolizar. (2) Metabolitos excretados en orina. (3) Metabolitos reactivos. (4) La FAD monooxigenasa actúa también en la conversión de Norcocaína a N-hidroxinorcocaína. \* sistemas enzimáticos inducidos por fenobarbital.

Además de la inhibición de la vía hidrolítica, citada anteriormente, existe otro medio de examinar el potencial de la vía oxidativa en el desarrollo de la hepatotoxicidad de la cocaína. Este es el uso de agentes que inducen la actividad de los sistemas microsómicos monooxigenasas dependientes del citocromo P450. El pretratamiento con agentes inductores del citocromo P-450, como son el fenobarbital, el etanol y la misma cocaína, potencia de manera notable la capacidad hepatotóxica de la cocaína.

La localización intraacinar y la severidad de la lesión pueden alterarse en condiciones en las que se induzca la vía oxidativa del metabolismo de la cocaína (3). El fenobarbital tiene la capacidad de potenciar dicha hepatotoxicidad e incrementar

la severidad de la lesión hepática, a través de la inducción del sistema microsómico monooxigenasa, dependiente del citocromo P-450 (4, 18). Además, el fenobarbital promueve un cambio en la localización intraacinar de la lesión. En este aspecto, la cocaína es única en alterar la ubicación de la zona lesionada según la influencia de otras sustancias (4, 18, 19), lo cual añade un peligro más a la ingestión de esta droga por su interacción con otros fármacos. La localización de la zona necrosada se debe a la distribución intraacinar de los sistemas oxidativos inducibles, responsables de la biotransformación de la cocaína (4).

Se ha descrito recientemente en humanos, que es el enzima plasmático butirilcolinesterasa (EC 3.1.1.8), el que metaboliza la cocaína originando compuestos hidrosolubles, farmacológicamente inactivos (20). Estos compuestos son el ácido benzoico y el anteriormente mencionado, ester metílico de la ecgonina que se excretan por la orina. La hidrólisis de la cocaína por este enzima puede ser utilizada como terapia frente a la intoxicación de la cocaína, ya que reduce rápidamente la concentración de la droga en el organismo. La presencia en plasma de estas hidrolasas, aunque beneficiosa frente a la intoxicación, ha supuesto un problema por enmascarar la verdadera toxicidad de la cocaína, ya que ha evitado el estudio de la capacidad real hepatotóxica de esta droga. Por ello en la actualidad se están utilizando estrategias para potenciar dicha toxicidad y estudiar los mecanismos implicados en la biotransformación oxidativa de esta droga. Una de estas estrategias es inducir el sistema microsómico monooxigenasa de función mixta, dependiente del citocromo P-450 mediante el pretratamiento con fenobarbital, y otra es el uso de cultivos primarios de hepatocitos. La inducción del sistema microsómico hace que la cocaína se metabolice con mayor intensidad y origine metabolitos reactivos a velocidad superior a la de las hidrolasas. La otra estrategia son los experimentos *in vitro* en cultivos primarios de hepatocitos con lo cual se elimina la acción *in vivo* de las hidrolasas plasmáticas sobre la molécula de cocaína. Actualmente muchos grupos de investigación están utilizando las dos estrategias: (1) Inducir *in vivo* el sistema microsómico dependiente del citocromo P-450 por pretratamiento de ratas con fenobarbital, y (2) adicionar la cocaína sobre hepatocitos en cultivo obtenidos de las ratas previamente inducidas.

En cultivos celulares el efecto citotóxico de los xenobióticos se detecta mediante métodos rápidos que implican la salida al medio de cultivo de enzimas citoplasmáticas, de las células lesionadas (21). Por ese medio se detecta la integridad de la membrana plasmática para retener los enzimas celulares. La citotoxicidad se detecta después de someter los cultivos celulares a xenobióticos tales como agentes terapéuticos, drogas de abuso, agentes medioambientales y condiciones de hipoxia/isquemia. La lactato deshidrogenasa es un enzima ubicuo en las células de vertebrados cuya actividad se determina con facilidad. Como no existe evidencia de que las células secreten activamente LDH, la liberación de este enzima al medio se utiliza como una manifestación de la lesión celular. Esta liberación al medio que rodea las células del cultivo se relaciona con la rotura de la permeabilidad de la barrera celular de la membrana plasmática.

### 3. COCAINA, METABOLISMO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y HEPATOTOXICIDAD.

Las vías oxidativas de la degradación de la cocaína requieren la participación de la FAD monooxigenasa y de los sistemas dependientes del citocromo P450 hepáticos (10). Estas vías conducen a la formación de radicales libres derivados de la cocaína y especies reactivas de oxígeno (Figura 2).

Numerosos xenobióticos son transformados por el citocromo P-450, unos en metabolitos estables y otros en metabolitos reactivos. Estos últimos son metabolitos inestables que atacan las macromoléculas hepáticas (DNA, lípidos insaturados, proteínas y glutatión) y pueden actuar como mutágenos, cancerígenos o produciendo lesiones tisulares. El citocromo P-450, a pesar de representar un sistema extraordinariamente versátil y adaptado a la eliminación de los xenobióticos liposolubles, introduce un problema adicional al generar metabolitos reactivos potencialmente tóxicos. La existencia de este sistema generador de radicales libres ha dado lugar al desarrollo (inducción) de diversos mecanismos de protección.

Un primer mecanismo de protección, que se incluye automáticamente en el sistema es la propia **inactivación** del citocromo P-450 por ciertos intermediarios reactivos (22). En efecto, un intermediario reactivo recién formado en la hendidura hidrófoba de la molécula del citocromo P-450, puede atacar al mismo P-450 y destruirlo. Esta inactivación suicida limita la formación del intermediario reactivo y con ello su toxicidad. Otro mecanismo lo constituyen las diversas isoformas citosólicas y microsómicas de la glutatión-S-transferasa, las cuales catalizan la conjugación de metabolitos reactivos electrófilos con el glutatión hepático. Para evitar que formación de especies reactivas de oxígeno conduzca a un fenómeno de peroxidación lipídica, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa actúan secuencial y coordinadamente para limitar la toxicidad que podría resultar de la formación inicial del anión superóxido.

Gracias a los mecanismos de protección, la puesta en funcionamiento del citocromo P-450 como medio de eliminación de los xenobióticos liposolubles, se hace tolerable en la medida en que la mayor parte de los diversos metabolitos reactivos formados por el citocromo P-450 puedan ser inactivados. Esto no ocurre en el caso de ingestión masiva del xenobiótico o de un metabolismo particularmente rápido de ese mismo xenobiótico, ya que la formación de metabolitos reactivos va a ser lo suficientemente elevada como para entrañar un ataque masivo de las macromoléculas hepáticas.

Un primer tipo de lesión molecular es la peroxidación lipídica ocasionada por los radicales libres. Un segundo tipo se observa con los metabolitos reactivos electrófilos que reaccionan con los grupos nucleófilos de las proteínas (residuos -SH de la cisteína o residuos -NH<sub>2</sub> de la lisina), sobre los cuales se fijan formando aductos por unión covalente. También, los metabolitos electrofílicos pueden conjugarse con

el grupo -SH del glutatión. Aunque la formación de estos conjugados es muy importante, si el consumo del glutatión supera la capacidad del hígado para resintetizarlo, se llegará a una depleción de este tripéptido. La disminución del GSH, la fijación covalente sobre los tioles proteicos o su oxidación directa conducirán a una disminución de los tioles proteicos celulares. Una primera consecuencia es la formación de macroagregados no funcionales de actina por la formación de puentes -S-S- entre sus cadenas (23). Esto afecta a los microfilamentos que se insertan en las proteínas de la membrana plasmática para mantener su estructura. La destrucción de los microfilamentos entraña la aparición de protuberancias en la membrana plasmática, cuya rotura acarrea la muerte celular. Otra consecuencia de la oxidación de los tioles proteicos es la de disminuir la actividad de las translocasas del calcio de la membrana plasmática (24). El papel de estas translocasas es la de mantener los niveles de calcio ionizado en el interior del hepatocito. Su inhibición origina un aumento prolongado del calcio citosólico, el cual va a activar fosfolipasas, proteasas y endonucleasas. La activación de las proteasas dependientes del calcio va a contribuir a la alteración de la red microfilamentaria. La activación de las endonucleasas escinde las cadenas del DNA en la región endonucleosómica y puede en ciertos casos conducir al fenómeno de apoptosis (25). Una última consecuencia de la oxidación de los tioles proteicos es la de afectar la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, disminuyendo el potencial de membrana y la producción de ATP (26).

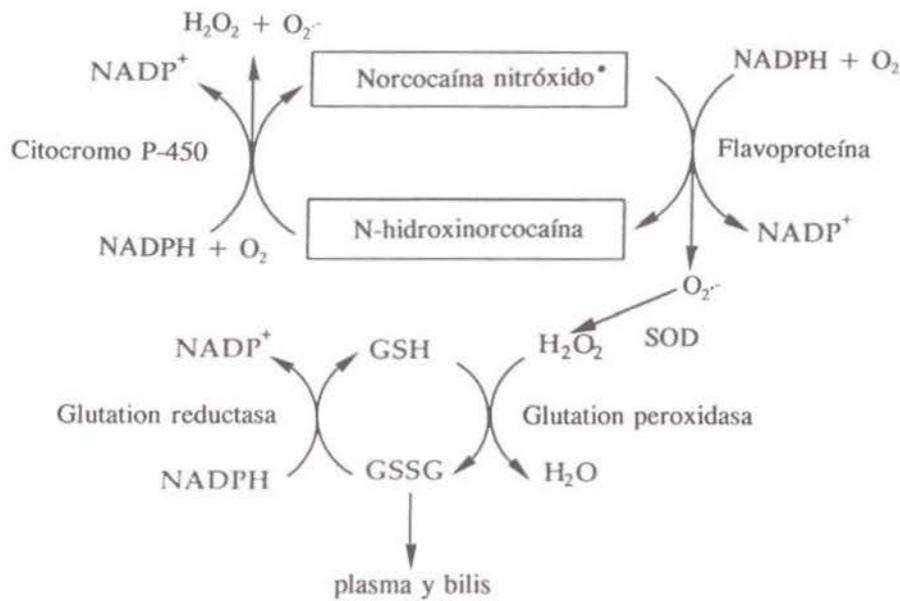


Figura 2. Generación de especies activas de oxígeno en la secuencia de reacciones del metabolismo oxidativo de la cocaína: el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno se generan en el ciclo redox entre la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido.

El citocromo P-450 al catalizar la oxidación de múltiples xenobióticos va a dar lugar a derivados reactivos citotóxicos, mutagénicos o carcinogénicos que se forman por introducción de un átomo del oxígeno molecular en los sustratos y reduciendo el otro átomo de oxígeno con la formación de peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Las diferentes isoformas del P-450 catalizan, por tanto, la monooxigenación de diversos sustratos endógenos y exógenos (27). Para catalizar la reacción eficientemente, la función monooxigenasa requiere oxígeno molecular y un agente reductor, el NADPH, a través de la NADPH citocromo P450 reductasa (28). Existen discrepancias acerca de la forma individual del citocromo P-450 responsable de la N-desmetilación de la cocaína. En hígado de rata es el CYP2B1 inducible por fenobarbital (29, 30), mientras que en ratón y humanos se ha descrito que es la isoforma CYP3A la responsable del primer paso de la cascada de bioactivación de la cocaína (31, 32).

Los estudios sobre la hepatotoxicidad de la cocaína en humanos son escasos (2, 33-35). En animales la hepatotoxicidad aguda o crónica de cocaína se ha demostrado principalmente en ratones (14, 16, 36). En este modelo experimental se han observado elevaciones en las transaminasas séricas, dependientes de la dosis. La histología hepática muestra necrosis predominante en las áreas perivenosa (19, 37-39), mediozonal (37) o periportal (16, 18, 36). La susceptibilidad de los animales y la topografía zonal de la necrosis varía de acuerdo con la raza (39), especie (13) y uso previo de agentes moduladores del citocromo P-450 (13, 36, 39, 40). Una interesante característica es que la intensidad de hepatotoxicidad de la cocaína se relaciona con su grado de oxidación por los microsomas hepáticos (39). Esta observación indica que un metabolito reactivo de la cocaína es el responsable de la lesión hepática. Diversos estudios *in vivo* han demostrado que la previa inducción del citocromo P-450 por fenobarbital (18, 37-39) o etanol (19) potencia la hepatotoxicidad de la cocaína. Por el contrario, el pretratamiento con inhibidores del citocromo P-450, tales como la cimetidina, el SKF525A, el cloranfenicol o la iproniazida, elimina la toxicidad de la cocaína (11, 38, 39). De la misma manera, la incubación de hepatocitos con cocaína conduce a alteraciones funcionales que se incrementan por inducción o se previenen por inhibición del sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 (9, 10). El metabolismo hepatotóxico de la cocaína es aún materia de debate, y se discute aún sobre la identidad del verdadero metabolito responsable de la hepatotoxicidad. Existen evidencias que implican a los metabolitos oxidados de la N-hidroxinorcocaína, tales como la norcocaína nitróxido (41) o el ión norcocaína nitrosonio (17). También se discute el mecanismo que utilizan los metabolitos reactivos para producir el desequilibrio de la función celular que conduce a la muerte. Se ha propuesto la peroxidación de los lípidos de las membranas (10), pero su papel en la necrosis hepatocelular no ha sido demostrada (42). Se ha sugerido también que la unión irreversible de los metabolitos reactivos a las proteínas hepáticas puede intervenir, tanto después de la administración de la cocaína *in vivo* (13), como en cultivos de hepatocitos expuestos a cocaína o norcocaína (9). Se encuentra también controvertido, el papel de la disminución del glutatión hepático inducida por la cocaína. Por un lado, esta disminución es débil, sólo de un

20 - 40% (13, 18, 36, 43), cuando se compara con la observada después de la administración de un hepatotóxico clásico, como el acetaminofeno, que es de un 90% (38). Se ha demostrado que los pretratamientos que inducen la depleción del glutatión hepático elevan la hepatotoxicidad de la cocaína (36), mientras que la previa administración de cisteína, un precursor del glutatión, presenta un efecto protector (13, 36). El mecanismo que interviene en la disminución del glutatión no parece que implique una reacción directa de los metabolitos de la cocaína con el glutatión (9) y parece que es secundario al efecto adrenérgico de la droga (44). Se propone más bien, que sean las especies reactivas de oxígeno, que se generan en la oxidación de la cocaína por los sistemas monooxigenasa microsómicos, las que intervengan directamente en estos procesos. La mayor parte de estudios sobre la hepatotoxicidad de la cocaína se han realizado en ratones y aunque en ellos se ha apuntado que el mecanismo de toxicidad ha de estar mediado por la formación de metabolitos, la confirmación de estos resultados en otras especies animales y su extrapolación a humanos puede ser discutida (45). Se ha postulado que la cocaína puede tener un efecto sobre la homeostasis del calcio debido a una interacción de los metabolitos de la cocaína con grupos tiólicos críticos de proteínas de la membrana plasmática o de las Ca-ATPasas microsómicas (46). Utilizando hepatocitos en cultivo (30) se han descrito dos mecanismos diferentes responsables de la hepatotoxicidad de la cocaína, según que los hepatocitos procedieran de ratas inducidas o no con fenobarbital. En los hepatocitos previamente inducidos el mecanismo de hepatotoxicidad incluyó una rápida depleción del glutatión y una peroxidación lipídica masiva, mientras que en los no inducidos el cambio más notable, fue una elevación sostenida en los niveles de calcio citosólico que se inició a las 2 horas de la exposición de los hepatocitos a elevadas concentraciones de cocaína.

#### 4. INFLUENCIA DE LA INDUCCION DEL SISTEMA MONOOXIGENASA MICROSOmico SOBRE LA HEPATOTOXICIDAD DE LA COCAINA

La localización y extensión de la lesión hepática inducida por la administración de cocaína a ratones difiere si los animales han recibido un tratamiento previo con fenobarbital. Una serie de parámetros bioquímicos y sistemas hepáticos involucrados en la biotransformación oxidativa de la cocaína, resultan marcadamente afectados por este tratamiento. Con todo ello se han conseguido una serie de datos acerca del comportamiento de esta droga, de su capacidad hepatotóxica y de la modulación de su toxicidad cuando se administra unida a inductores o aceleradores de su propio metabolismo.

El fenobarbital es el prototipo de numerosos agentes inductores enzimáticos que elevan la actividad de la función hepática monooxigenasa de función mixta microsómica y la de la UDP-glucuronil transferasa, dos sistemas implicados en la detoxificación. El fenobarbital induce diversas isoformas del citocromo P-450 pertenecientes a las familias genéticas 2B, 2C, 2A, y 3A (47). En la mayoría de los casos la inducción se debe a una estimulación de la transcripción del gen. Se desconocen

hasta la fecha los factores y el mecanismo responsables de dicha inducción. En cultivos de hepatocitos de rata se ha observado que el fenobarbital induce por diferentes vías los mRNA correspondientes a los genes 2B y 3A (8, 32). Una complicación para la identificación de los mecanismos implicados en la hepatotoxicidad de la cocaína en hepatocitos inducidos con fenobarbital, es la dificultad de separar los efectos inductores de aquellos asociados directamente con el fenobarbital y sus metabolitos. En ratas, el fenobarbital se metaboliza por p-hidroxilación del anillo fenilo seguido de conjugación con el UDP-glucuronato. El fenobarbital, por tanto, puede inhibir la formación de glucurónidos, bien por competición directa con la UDP-glucuronil transferasa o por agotamiento del UDP-glucuronato hepático (48).

En nuestro laboratorio se han realizado una serie de experimentos mediante la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg peso corporal) a ratones Swiss macho, con lo cual se ha conseguido inducir una lesión que afecta aquellas células localizadas, en la región perivenosa. Esta lesión se detectó, a las 24 horas de la administración de la droga, por el incremento en la actividad de los enzimas plasmáticos y por visualización de la zona necrosada en cortes de hígado. En ratones pretratados con fenobarbital, el cambio en la localización de la lesión a la región periportal, indica que esta sustancia promueve una inducción preferente del sistema monooxigenasa en el área periportal. Este cambio de localización intraacinar de la lesión hepática tiene que reflejarse en cambios metabólicos importantes dada la diferente distribución de enzimas y metabolitos en el acino hepático. Por ejemplo, la actividad de la isocitrato deshidrogenasa sérica fue utilizada para evaluar el grado de lesión debido a que es un marcador muy sensible de la necrosis ya que este enzima se ubica preferentemente en el área perivenosa. Los cambios observados (Figura 3) (18) indican que la intensidad de la lesión fue significativamente mayor en el caso de la necrosis periportal inducida por cocaína en ratas pretratadas con fenobarbital.

La magnitud de las actividades enzimáticas hepáticas en suero, no solo está influenciada por la heterogeneidad zonal, sino también por la severidad de la lesión. Existe una heterogeneidad bioquímica entre las células del acino hepático según que su localización sea cercana al terminal portal o al venoso (49, 50). De esta manera es posible predecir la localización intrahepática mediante la zonación metabólica del acino. La información sobre la localización de la necrosis puede ayudar a reconocer el mecanismo patológico de la lesión. Así, en nuestros experimentos se detectó una disminución en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima generador de NADPH, en hígado de ratón intoxicado con cocaína, disminución no observada en hígado pretratado con fenobarbital. Esto se debe a que este enzima aparece en mayor concentración en la región perivenosa del acino que es la que se lesiona en casos de animales no inducidos (43, 49).

En cortes de hígado de ratón obtenidos después de la administración de cocaína se detectó la localización intraacinar de la necrosis hepática y la distribución zonal

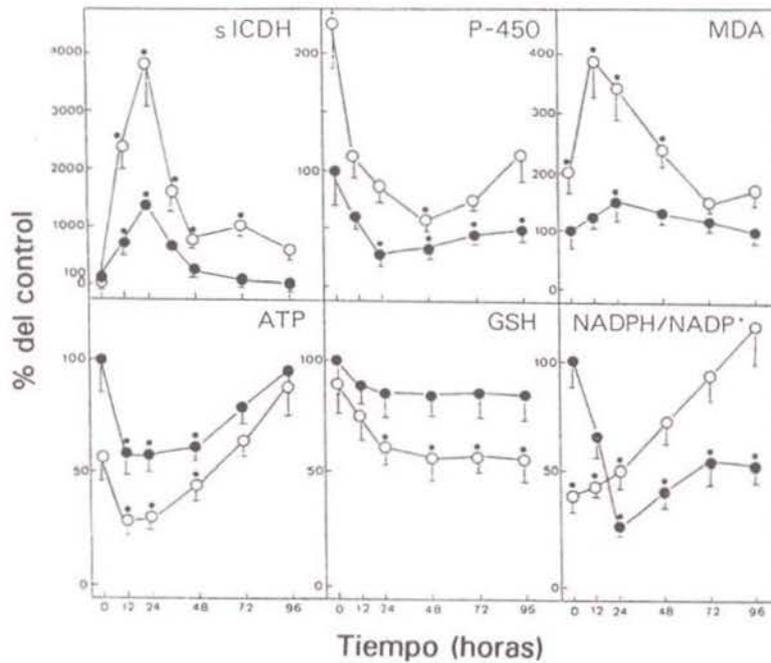


Figura 3. Parámetros de lesión hepática inducida por administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg) a ratones Swiss macho. ●—● cocaína; ○—○ pretratamiento con fenobarbital + cocaína.\*  $p < 0.001$ . (Cascales et al, 1994) (18).

de la lesión se caracterizó por microscopía óptica (18, 51, 52). En la Figura 4A se muestra un corte de hígado a 400 aumentos, donde se aprecia un terminal venoso procedente de un ratón a las 24 horas de la inyección de cocaína. Puede observarse con claridad una fila de células necróticas. La necrosis periportal fue detectada en un corte de hígado obtenido de un ratón pretratado con fenobarbital a las 24 hr de la exposición a cocaína (Figura 4B). En los dos casos los espacios intraacinares afectados por la droga aparecen con una clara necrosis que rodea el vaso terminal respectivo. En la necrosis perivenosa las células necróticas rodean el terminal venoso mientras que en la periportal (Figura 4B) una fila limitante de hepatocitos permanece ilesa y adyacente a ella se observa la zona de células necrosadas. En estos cortes se visualiza un cambio total desde el terminal venoso al terminal portal (18, 43). Estudios de otros autores (3) en ratones DBA/2HA han descrito que la cocaína induce necrosis mediozonal que cambia a periportal por pretratamiento con fenobarbital. Esta peculiar característica de la hepatotoxicidad de la cocaína parece ser común a ratones y a humanos (10, 33).

El cambio de localización de la lesión hepática relativa a la presencia de otras drogas es un fenómeno interesante que proporciona un medio para estudiar cómo las interacciones de las drogas alteran la respuesta del hígado. Este esquema de

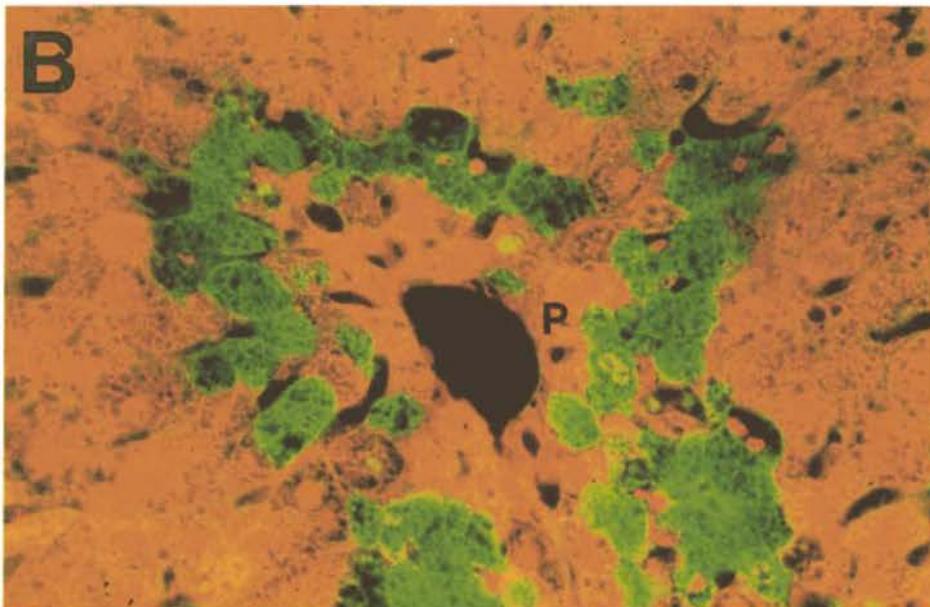
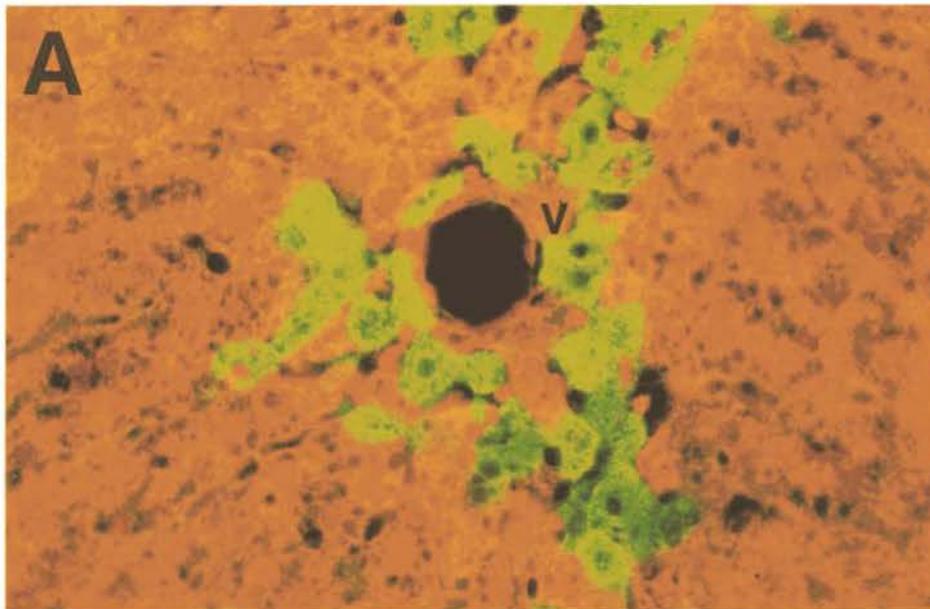


Figura 4. Secciones de hígado de ratón Wistar macho donde se muestran las lesiones hepáticas inducidas por cocaína (60 mg/Kg peso corporal) (A) Corte de hígado obtenido a las 24 horas de la administración de cocaína a ratón control, mostrando necrosis perivenosa (V = terminal venoso) x400. (B) Corte de hígado a las 24 horas de la administración de cocaína a ratón pretratado con fenobarbital (5 días en el agua de bebida, 1g/l), mostrando necrosis periportal (P = terminal porta) x400. (Naranja de Acrinida).

lesión hepática permite comparar las consecuencias de la muerte celular en la vecindad de las dos regiones opuestas del acino.

El pretratamiento de los ratones afecta también a la toxicidad *in vitro*, la cual ha sido estudiada por diversos autores (30). La potenciación de la citotoxicidad en hepatocitos en cultivo, evaluada por la liberación de lactato deshidrogenasa al medio, resulta ser 13 veces superior en animales inducidos cuando se compara con los no inducidos (controles) (30). La diferencia en la susceptibilidad a la cocaína se relaciona con la actividad del citocromo P-450 y con los mecanismos que conducen a la muerte celular. En animales inducidos es mayor la depleción de glutatión, mayor la peroxidación lipídica y mayor la severidad de la necrosis. Todo ello es debido a una mayor velocidad del funcionamiento del ciclo redox entre N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido, que consume NADPH y O<sub>2</sub> en ambos sentidos y que genera anión superóxido e peróxido de hidrógeno.

Las reacciones de destoxificación consumen el GSH hepático a la vez que promueven una activación compensatoria de la síntesis del GSH (53). En casos de intoxicación masiva, la velocidad de consumo del GSH hepático puede sobrepasar la de su síntesis y ello conducirá a una depleción de este tripéptido. La depleción del GSH precede a cualquier fenómeno hepatotóxico, ya que los cambios en el cociente GSH/GSSG juegan un importante papel en el estrés oxidativo y en la muerte celular. La cocaína *in vivo* promueve una débil disminución en la concentración del GSH (20%) que es más acusada en el grupo inducido con fenobarbital (40%) (Figura 3) (18). La destrucción celular selectiva en el área portal inducida por cocaína en ratones pretratados con fenobarbital ha de ser la responsable de la menor concentración de GSH en este grupo experimental, ya que en esta zona el GSH se encuentra en cantidades dos veces superior que en el área perivenosa (49, 50). Alternativamente, se ha demostrado que el fenobarbital incrementa el transporte electrogénico del GSH a la bilis (54), por tanto, debe esperarse una disminución intracelular de glutatión. La demostración de la compartimentación nuclear del GSH en hepatocitos (55), refuerza el interés de este tripéptido, ya que se ha descrito una diferencia de concentración entre el núcleo y el citoplasma (aproximadamente 3). Además la compartimentación del GSH es crítica para proteger frente al estrés oxidativo. En este aspecto solo el GSH mitocondrial parece ser relevante y la regulación de su concentración se controla por diversos mecanismos complejos (56). Al contrario que el glutatión el malondialdehído, metabolito marcador de la lipoperoxidación, se eleva en los dos grupos estudiados, siendo el cambio significativamente mayor en el grupo pretratado con fenobarbital (Figura 3).

La actividad de la catalasa disminuye notablemente por efecto de la cocaína en ambos grupos, aunque en el inducido por fenobarbital la disminución fue aún mayor, ya que el fenobarbital por sí mismo promueve un descenso en esta actividad (51, 52). Sin embargo, las dos formas, citosólica y mitocondrial de superóxido dismutasa apenas experimentan variaciones. El equilibrio entre la catalasa y la SOD es extremadamente importante en las células. Un fallo en la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

puede conllevar a la formación del radical hidroxilo (OH), catalizada por la propia actividad SOD (57). La adaptación al estrés oxidativo es un mecanismo importante mediante el cual las células pueden hacer frente a las fluctuaciones en los niveles de oxidantes (58). La respuesta adaptativa al estrés oxidativo implica la expresión de muchos genes lo que indica que se requieren proteínas sintetizadas de nuevo para dicha adaptación (59). Quizás esta falta de coordinación entre las actividades de la catalasa y la SOD, sea la responsable de la hepatotoxicidad de la cocaína a través de la excesiva producción de especies activas de oxígeno, con lo cual serían estas especies y no a los metabolitos reactivos derivados de la cocaína, los inductores de la lesión. Como enzima generador de equivalentes reductores en forma de NADPH, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se encuentra involucrada en los procesos de desintoxicación. La oxidación hepática de la cocaína es un proceso secuencial que consume NADPH, por tanto no es de extrañar que la actividad de este enzima sufriera alteraciones. La disminución de la actividad G6PDH, por efecto de la cocaína, contrasta con la práctica no variación por esta misma droga en ratones pretratados con fenobarbital (51, 52). Las células ubicadas en la zona perivenosa del acino son las que contienen mayor cantidad de G6PDH por tanto la cocaína al destruir selectivamente las células de esta zona, hace descender la cantidad de este enzima, la cual se repone durante la regeneración postnecrótica (50).

Una de las consecuencias de la administración de cocaína *in vivo*, no descrita con anterioridad, ha sido la de muerte celular por apoptosis, detectada por un pico hipodiploide de DNA y por fragmentación del DNA en gel de agarosa en hepatocitos de ratas a las 12 horas de la administración de la droga. La población de células que sufrió la apoptosis fue mayor en hepatocitos de ratón pretratados con fenobarbital, un 31% de la población, versus un 13 % en los no tratados (Figura 5). Las piezas oligonucleosómicas producidas por la degradación de cromatina, proceso que caracteriza a las células que sufren apoptosis, se detectaron en muestras de hepatocitos de animales control y pretratados con fenobarbital, por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 5 se muestran los fragmentos de DNA en los hepatocitos correspondientes. La presencia de fragmentos de DNA indica que en las dos condiciones, la actividad endonucleasa, en la que se encuentra implicado el nivel de calcio citoplasmático, se elevó por efecto de la cocaína y que los picos hipodiploides obtenidos por citometría de flujo corresponden a células apoptóticas.

La muerte celular por apoptosis se considera que es un medio importante para regular la función y número de células. El fenobarbital sobre el hígado produce una hiperplasia debido al aumento del número de hepatocitos (60). El exceso resultante de células, después de la retirada del fenobarbital, marca el inicio de un proceso que conduce a la apoptosis de ciertas células. De ser así, el pico de incidencia de apoptosis en hígado pretratado con fenobarbital ocurre 2 días después del tratamiento final (60). En nuestros experimentos, los picos de apoptosis inducidos por cocaína aparecieron a las 12 horas en los dos grupos. El pico hipodiploide correspondiente al grupo tratado solo con cocaína, puede ser considerado como un tipo espontáneo de muerte celular promovida por los metabolitos de la cocaína. Sin embargo, el pico

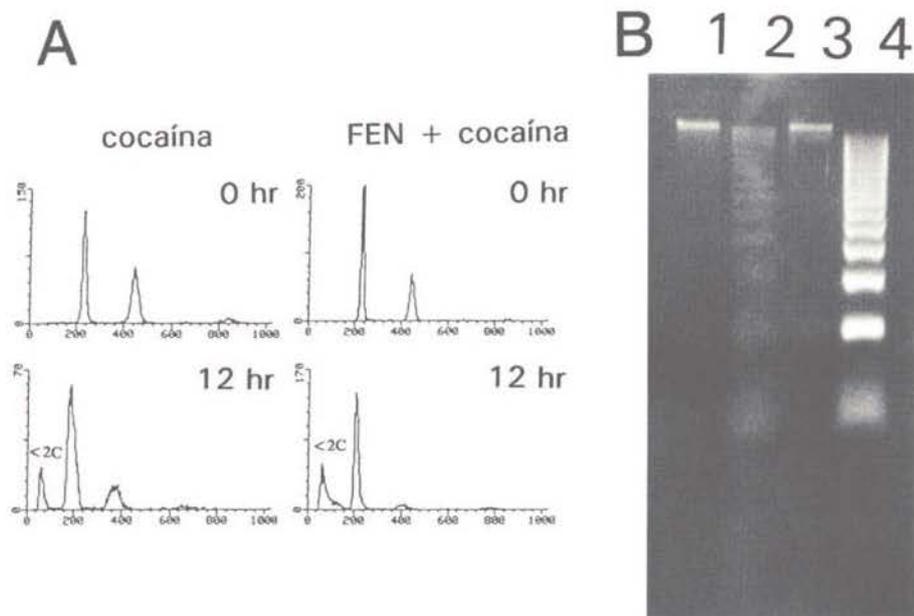


Figura 5. (A) Distribución del DNA en la población hipodiploide <2C, característica de apoptosis en hepatocitos aislados de ratón a las 12 horas de la administración de una dosis subletal de cocaína (60 mg/Kg). (B) Fragmentación del DNA en gel de agarosa. Líneas 1 y 3 corresponden a hepatocitos de ratón control y pretratado con fenobarbital, respectivamente. Líneas 2 y 4 corresponden a hepatocitos de ratón control y pretratado con fenobarbital a las 12 horas de la administración de cocaína (Cascales et al, 1994) (18).

de células hipodiploides evidenciado en animales pretratados con fenobarbital puede ser debido, en parte, a la reducción apoptótica del exceso celular en hígado hipertrófico inducido por fenobarbital. La apoptosis *in vivo* es muy rápida y la discriminación histológica entre apoptosis y necrosis es difícil. Esto explica el porqué, a pesar de los valores de un 13% y 31% de hepatocitos hipodiploides detectados por citometría de flujo por efecto de la cocaína en ratones no tratados y pretratados con fenobarbital, respectivamente, no se detectaron cuerpos apoptóticos en los cortes de hígado teñidos con naranja de acridina. Sería interesante estudiar la contribución relativa de apoptosis y necrosis en la lesión hepática inducida por cocaína y responder a la pregunta que emerge de nuestros resultados, si las células apoptóticas derivan de las poblaciones diploides o de las tetraploides.

La capacidad del hígado para metabolizar los xenobióticos deriva de su contenido celular en citocromo P-450 (61). La disminución de citocromo P-450 inducida por cocaína, descrita también para otras sustancias hepatotóxicas (62) es el resultado de la destrucción del grupo hemo, en el que parece encontrarse implicada la hemo oxigenasa (63). Las monooxigenasas dependientes del NADPH, responsables del metabolismo de la cocaína, se encuentran ubicadas en el retículo endoplásmico

liso (14). Este retículo predomina en el área perivenosa e incrementa preferentemente en este área por efecto del fenobarbital (60), y los enzimas dependientes del NADPH predominan también en la misma área. No está claro el medio que utiliza el fenobarbital para sensibilizar a los hepatocitos periportales a la cocaína.

Los cambios en la concentración relativa de NADPH y GSH median probablemente el efecto del fenobarbital y están probablemente implicados en el cambio de localización de la lesión. En nuestros experimentos, el fenobarbital no es hepatotóxico, como se deduce por los niveles de la actividad sérica de ICDH o de la histología hepática, pero algunos parámetros de lesión hepática, tales como ATP, MDA y NADPH aparecen alterados. El destacado descenso en ATP por efecto del fenobarbital debe ser investigado a nivel de enzimas de la membrana mitocondrial implicados en la génesis del ATP. Además, se ha descrito (54, 56) que el fenobarbital incrementa el eflujo del GSH y este efecto puede ser un mecanismo potencial por el cual el fenobarbital incrementa la hepatotoxicidad de los fármacos. Por tanto, los cambios observados entre ambos grupos han de ser interpretados teniendo en cuenta la localización de la zona del acino hepático lesionada y también la heterogeneidad en la distribución intraacinar de los enzimas y metabolitos implicados. Cabe destacar que los enzimas de detoxificación se ubican en la zona perivenosa, mientras que el GSH de la zona periportal es dos veces superior al de la perivenosa.

Recientemente se ha propuesto que la cocaína eleva su propio metabolismo a través de la producción de norcocaína catalizada por el CYP3A, mientras que el CYP2B10, también inducido juega un menor papel en la hepatotoxicidad de la cocaína (8). La inducción de la N-desmetilación de la cocaína por la activación del CYP3A, puede derivar en inesperadas interacciones con otros fármacos en cocainómanos crónicos.

## 5. COCAINA, ETANOL Y ESTRES OXIDATIVO

El abuso combinado de cocaína y etanol ocasiona concentraciones plasmáticas de cocaína más elevadas y prolongadas, lo cual potencia el efecto tóxico y farmacológico de la cocaína, e incrementa la severidad de la lesión hepática asociada a estas dos drogas. La presencia de etanol durante el uso de la cocaína origina la formación de un metabolito, el cocaetileno, que presenta una hepatotoxicidad mayor que la cocaína (64-66). La lesión hepática que origina el cocaetileno surge de la situación de estrés oxidativo consecuencia de los radicales libres y especies activas de oxígeno acumulados en el metabolismo oxidativo de ambas sustancias. La exposición crónica al etanol se ha observado que retrasa la velocidad de eliminación de la cocaína y del cocaetileno. Debido a la relevancia clínica de estos datos resulta de interés primordial el estudio de la caracterización de factores que afectan la inhibición del metabolismo hidrolítico de la cocaína por el etanol y la conversión de la cocaína en cocaetileno (67).

La conversión de la cocaína en cocaetileno se ha demostrado en rata (68), en ratón (64, 69) y en humanos (69, 70), evidenciando la existencia de carboxilesterasas microsómicas que catalizan la transesterificación del éster 2-carboximetílico de la cocaína en su derivado 2-carboxietílico. El cocaetileno se detectó por primera vez en orina de cocainómanos que consumían alcohol (12, 19, 46, 64). Su afinidad por los receptores de dopamina es similar a la de la cocaína, así como su capacidad para inhibir la incorporación de la dopamina en los sinaptosomas, pero su toxicidad es mayor. La capacidad del cocaetileno para generar especies reactivas de oxígeno en presencia de NADPH, oxígeno molecular y citocromo P-450, es incluso superior a la de la cocaína (71). Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno generadas en el metabolismo oxidativo de la cocaína, responsables de su hepatotoxicidad, se elevan cuando la cocaína se ingiere simultáneamente al etanol.

El metabolismo de la cocaína y el etanol implica tres clases de reacciones: *hidrólisis*, *transesterificación* y *N-desmetilación*. La hidrólisis de la cocaína y el

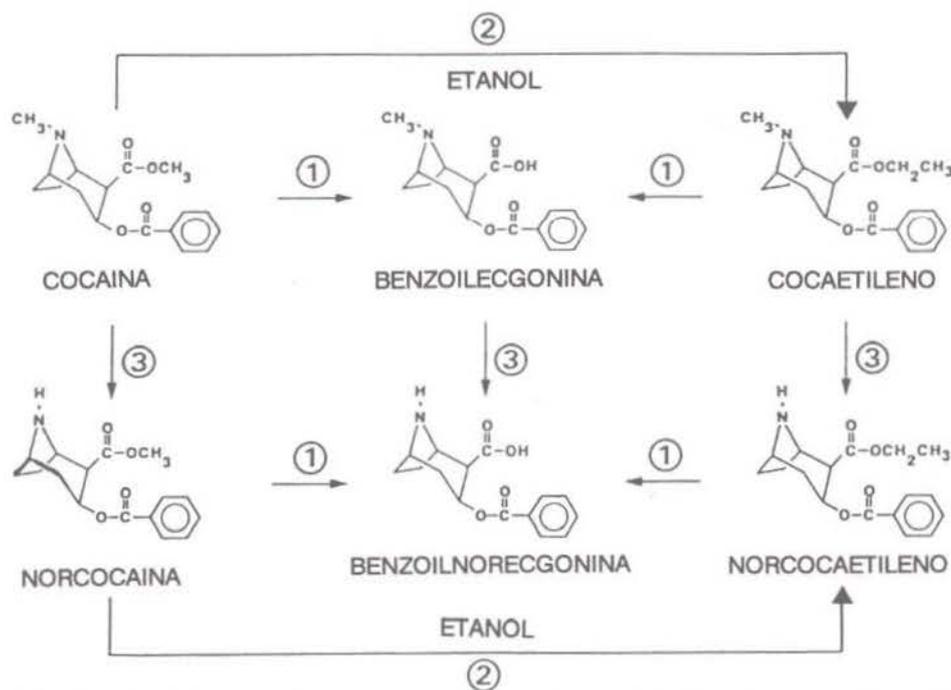


Figura 6. *Metabolismo de la cocaína en presencia de etanol. Implica tres clases de reacciones: hidrólisis, transesterificación y N-desmetilación. La hidrólisis de la cocaína y el cocaetileno está catalizada por la carboxilesterasa hepática. La norcocaína y el norcocaetileno son sustratos del mismo enzima y dan lugar a la benzoilnorecgonina. Hidrólisis espontánea puede ocurrir en los ésteres metílicos y etílicos de estos compuestos. El etanol inhibe las reacciones catalizadas por la carboxilesterasa. (1) carboxilesterasa hepática inhibida por el etanol (2) transesterificación inducida por el etanol: cocaína → cocaetileno y norcocaína a norcocaetileno (3) N-desmetilación catalizada por un enzima dependiente del citP450 directamente o después de la oxidación de la cocaína a su derivado N-oxido catalizada por una FAD-monooxigenasa.*

cocaetileno a benzoilecgonina está catalizada por una carboxilesterasa presente en hígado humano (70). La norcocaína y el norcocaetileno son sustratos del mismo enzima y pueden originar benzoilnorecgonina. El etanol inhibe las reacciones hidrolíticas de la carboxilesterasa e induce simultáneamente la transesterificación etílica de la cocaína con formación del cocaetileno (70). El etanol puede también inducir la transesterificación etílica de la norcocaína a norcocaetileno. La N-desmetilación de la cocaína a norcocaína está catalizada, bien directamente, por un enzima dependiente del citocromo P-450, o después de la oxidación de la cocaína a su derivado N-óxido, por una FAD monooxigenasa (10). La N-desmetilación de la benzoilecgonina a benzoilnorecgonina ha sido demostrada en rata (72).

La transesterificación de la cocaína a cocaetileno está catalizada por una carboxilesterasa inespecífica (73). La misma enzima hepática cataliza la hidrólisis de la cocaína a benzoilecgonina, metabolito sin actividad estimulante psicomotora. Esta esterasa se inhibe por etanol, de manera que el etanol suprime la inactivación de la cocaína en su conversión a benzoilecgonina y cataliza la transesterificación etílica con la cocaína para formar el cocaetileno, metabolito farmacológicamente activo. Esta desviación en el metabolismo de la cocaína, inducido por el etanol puede explicar el porqué la ingestión de etanol incrementa la toxicidad de la cocaína (70).

Dada la concurrencia del abuso de etanol y cocaína, las implicaciones en la salud humana de estas dos drogas es cada vez mayor. Se estima que un 70% de los adictos a la cocaína ingieren bebidas alcohólicas, debido a que la cocaína y alcohol producen efectos eufóricos más intensos y duraderos y que este uso combinado elimina las secuelas desagradables (cefaleas y migrañas) de la cocaína. La coadministración de cocaína y etanol influye sobre la velocidad de eliminación y sobre el perfil metabólico de la cocaína. El abuso combinado de cocaína y etanol da lugar a concentraciones plasmáticas de cocaína más elevadas y más prolongadas que pueden potenciar los efectos toxicológicos y farmacológicos de la cocaína. La exposición crónica a etanol retrasa la velocidad de eliminación de la cocaína y el cocaetileno. El retraso en la eliminación origina su acumulación en casos de abuso repetido el cual puede ocasionar complicaciones serias (68). Se ha descrito que a dosis toleradas de ambas drogas se produjeron las alteraciones siguientes: elevación de la peroxidación lipídica y de la actividad de los radicales libres y necrosis hepatocelular (74). A su vez, la cocaína actúa elevando la concentración de etanol en sangre, bien porque inhibe su metabolismo hepático o porque eleva su absorción gastrointestinal. Aunque el etanol se metaboliza por una forma de citocromo P450E1, diferente a la de la cocaína, parece que una parte de cocaína puede ser metabolizada por el CYP2E1 (46).

La formación de cocaetileno incrementa la mortalidad de la cocaína debido a que la LD<sub>50</sub> para el cocaetileno es significativamente menor que para la cocaína (65). La ingestión aguda de etanol eleva la hepatotoxicidad de la cocaína en hepatocitos humanos en cultivo (75). El incremento de la concentración hepática y

plasmática de cocaína se debe a la inhibición por el etanol de la hidrólisis de la cocaína a benzoilecgonina, catalizada por la carboxilesterasa. Al inhibir el metabolismo hidrolítico, el metabolismo de la cocaína se desvía hacia el oxidativo y con ello se eleva la hepatotoxicidad. Esto ocurre también con otros inhibidores de la carboxilesterasa (40). La formación de norcocaetileno y la elevada concentración de benzoilnorecgonina apoyan esta posibilidad (76).

De acuerdo con lo anteriormente descrito en relación a cocaína y alcohol puede resumirse lo siguiente (65, 71). La letalidad del cocaetileno es significativamente menor que la de la cocaína, lo que aumenta la mortalidad y el riesgo de muerte súbita en 18 veces. El cocaetileno se ha detectado en orina, sangre, cerebro e hígado de autopsias de individuos muertos de sobredosis.

Las razones que promueven a los adictos a la cocaína a ingerir etanol son la potenciación de la estimulación psicomotora y la eliminación de los efectos colaterales debidos a la capacidad vasoconstrictora de la cocaína y sus metabolitos. Por ello, es difícil evitar el abuso de estas dos drogas cuyo efecto hepatotóxico sinérgico está comprobado. El uso de agentes terapéuticos capaces de inhibir o retardar la peroxidación lipídica, de agentes antioxidantes, pueden ser clínicamente efectivos en la prevención de la lesión hepática inducida por alcohol y cocaína.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Cregler LL y Mark H (1986), Medical complications of cocaine abuse. *New Engl Med* 315: 1495-1500.
2. Marks V y Chapple P (1967), Hepatic dysfunction in heroin and cocaine users. *Br J Addict* 62: 189-195.
3. Kloss M, Rosen G y Rauckman E (1982), Acute cocaine-induced hepatotoxicity in DBA/2Ha male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 65: 75-83.
4. Roth L, Harbison R, James R, Tobin T y Roberts S (1992), Cocaine hepatotoxicity: Influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* 15: 934-940.
5. Rauckmann E, Rosen G y Cavagnaro J (1981), Norcocaine Nitroxide. A potential hepatotoxic metabolite of cocaine. *Mol Pharmacol* 21: 458-463.
6. Powell C, Connolly A y Charles S (1991), Shifting necrosis: butylated hydroxytoluene (BHT) and phenobarbital move cocaine-induced hepatic necrosis across the lobule. *Toxicol Letters* 55: 171-178.
7. Smith AC, Freeman RW y Harbison RD (1981), Ethanol enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 30: 453-458.
8. Pellinen P, Stenbäck F, Kojo A, Honkakosti P, Gelborn HV y Pasanen M (1996), Regenerative changes in hepatic morphology and enhanced expression of CYP2B10 and CYP3A during daily administration of cocaine. *Hepatology* 23: 515-523.
9. Bouis P y Boelsterli UA (1990), Modulation of cocaine metabolism in primary rat hepatocyte cultures: effects on irreversible binding and protein biosynthesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 104: 429-439.
10. Kloss M, Rosen G y Rauckmann E (1984), Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review. *Biochem Pharmacol* 33: 169-173.
11. Steward JD, Inaba T, Lucassen M y Kalow W (1979), Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharmacol Ther* 25: 464-468.

12. Roberts SM, Roth L, Harbison RD y James RC (1992), Cocaethylene hepatotoxicity in mice. *Biochem Pharmacol* 43: 1989-1995.
13. Evans MA (1983), Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. *J Pharm Exp Ther* 224: 73-79.
14. Shuster L, Casey E y Welankiwar SS (1983), Metabolism of cocaine and norcocaine to N-hydroxynorcocaine. *Biochem Pharmacol* 32: 3045-3051
15. Inaba T, Stewart D y Kallow W (1978), Metabolism of cocaine in man. *Clin Pharmacol Ther* 23: 547-552.
16. Freeman RW y Harbison RD (1981), Hepatic periportal necrosis induced by chronic administration of cocaine. *Biochem Pharmacol* 30: 777-783.
17. Charkoudian JC y Shuster L (1985), Electrochemistry of norcocaine nitroxide and related compounds: implication for cocaine hepatotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1044-1051.
18. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L (1994), Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* 20: 992-1001.
19. Smith AC, Freeman RW y Harbison RD (1981), Ethanol enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 30: 453-458.
20. Mattes C, Bradley R, Slaughter E y Browne S (1996), Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE): Determination of enzymatic parameters. *Life Sci* 58: 257-261.
21. Welder AA y Acosta D (1994), Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in cultured cells. En: *Methods in Toxicology* vol 1B, pp 46-49, Academic Press, New York, London.
22. Labbe G, Descatoire V, Beaune P, Letteron P, Larrey D y Pessayre D (1989), Suicide inactivation of cytochrome P-450 by methosalen. Evidence for the covalent binding of a reactive intermediate to the protein moiety. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 1034-1042.
23. Mirabelli F, Salis A, Marinoni V, Finardi G, Bellomo G y Thor H (1988), Menadione induced bleb formation in hepatocytes is associated with the oxidation of thiols groups in actin. *Arch Biochem Biophys* 264: 261-269.
24. Bellomo G y Orrenius S (1985), Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5: 876-882.
25. Shen W, Kamendulis LM, Sidhartha DR y Corcoran GB (1992), Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: Effect of Ca<sup>2+</sup>-endonuclease, DNA repair and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol and Applied Pharmacol* 112: 32-40.
26. Fagian MM, Pereira-Da Silva L, Martins IS y Vercesi AE (1990), Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. *J Biol Chem* 265: 19955-19960.
27. Guengerich FP y Shimada T (1991), Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome p-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4: 391-401.
28. White RE y Coon MJ (1980), Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem* 49: 315-356.
29. Boelsterli UA, Lanzotti A, Gölding C y Oerle M (1992), Identification of cytochrome P450IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured hepatocytes. *Drug metab Dispos* 20: 96-101.
30. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ y J Castell JV (1993), Cocaine hepatotoxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-induced hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46: 1967-1974.
31. LeDuc BW, Sinclair PR, Shuster L, Sinclair JF, Evans JE y Greenblatt DJ (1993), Norcocaine and N-hydroxynorcocaine formation in human liver microsomes: role of cytochrome P-450 3A4. *Pharmacology* 46: 294-300.
32. Pellinen P, Honkakoski P, Stenbäk F, Niemitz M, Alhava E, Pelkinen O, Lang M y Pasanen M (1994), N-demetylation and the metabolism-related hepatotoxicity can be prevented by cytochrome P450 3A inhibitors. *Eur J Pharmacol Env Toxicol Pharmacol* 270: 35-43.
33. Perino LE, Warren GH y Levine JS (1987), Cocaine-induced hepatotoxicity in humans. *Gastroenterology* 93: 176-180.

34. Wanless IR, Dore S, Gopinath N, Tan J, Cameron R, Heathcote EJ, Blendis LM y Levy G (1990), Histopathology of cocaine hepatotoxicity. Report of four patients. *Gastroenterology* 98: 407-501.
35. Kanel GC, Cassidy W, Shuster L y Reynolds TB (1990), Cocaine-induced liver cell injury: Comparison of morphological features in man and in experimental models. *Hepatology* 11: 646-651.
36. Evans MA y Harbison RD (1978), Cocaine-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 45: 739-754.
37. Shuster L, Quimby F, Bates A y Thompson ML (1977), Liver damage from cocaine in mice. *Life Sci* 20: 1035-1042.
38. Peterson FJ, Knodell RG, Lindemann NJ y Steele NM (1983), Prevention of acetaminophen and cocaine hepatotoxicity in mice by cimetidine treatment. *Gastroenterology* 85: 122-129.
39. Thompson ML, Shuster L, Casey E y Kanel GC (1984), Sex and strain differences in response to cocaine. *Biochem Pharmacol* 33: 1299-1307.
40. Thompson ML, Shuster L y Shaw K (1979), Cocaine-induced hepatic necrosis in mice. The role of cocaine metabolism. *Biochem Pharmacol* 28: 2389-2395.
41. Rauckman EJ, Rosen GM y Cagnavaro J (1982), Norcocaine nitroxide. A potential hepatotoxic metabolite of cocaine. *Mol Pharmacol* 21: 458-463.
42. Donnelly DA, Boyer CS, Petersen DR y Ross D (1988), Cocaine-induced biochemical changes and cytotoxicity in hepatocytes isolated from both mice and rats. *Chem Biol Interact* 67: 95-104.
43. Cascales M, Díez-Fernández C y Sanz N (1994), Modulación de la hepatotoxicidad por interacción de xenobióticos. *Anal Real Acad Farm* 60: 615-629.
44. James RC, Schiefer MA, Roberts SM y Harbison RD (1987), Antagonism of cocaine-induced hepatotoxicity by the alpha adrenergic antagonists phentolamine and yohimbine. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 726-732.
45. Mallat A y Dhumeaux D (1991), Cocaine and the liver. *J Hepatol* 12: 275-278.
46. Boelsterli UA y Goldlin C (1991), Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 65: 351-360.
47. Nebert D y González F (1987), P450 genes: structure, evolution and regulation. *Annu Rev Biochem* 56: 945-993.
48. Bouwer KLR (1993), Acute phenobarbital administration alters the disposition of acetaminophen metabolites in the rat. *Drug Metab Disp* 21: 1129-1133.
49. Jungerman K y Katz N (1982), Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 2: 385-395.
50. Katz N y Jungermann K (1993), Metabolic heterogeneity of the liver. En: *Hepatic transport and bile secretion* (eds Tavoloni N & Berk PA), pp 55-70. Raven Press, New York.
51. Gascó P (1993), Hepatotoxicidad de la cocaína en ratón. Alteraciones funcionales, bioquímicas y morfológicas durante la necrosis y regeneración hepáticas. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
52. Gascó P, Fernández-Simón L, Martín-Sanz P, Díez-Fernández C, Sancho M, Sanz N y Cascales M (1994), Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de la lesión hepatocelular en ratón. *Rev Toxicol* 11: 105-111.
53. Lauterbug B y Smith C (1986), Stimulation of hepatic efflux and turnover of glutathione by methionine in the rat. *Eur J Clin Invest* 16: 494-499.
54. Fernández-Checa JC, Ookhtens M y Kaplowitz N (1993), Selective induction by phenobarbital of the electrogenic transport of glutathione and organic anions in rat liver canalicular membrane vesicles. *J Biol Chem* 268: 10836-10841.
55. Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P y Orrenius S (1992), Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4412-4416.
56. Lu SC, Ge JL, Huang HY, Kuhlenkamp J y Kaplowitz N (1993), Thiol-disulfide effects on hepatic glutathione transport. Studies in cultured rat hepatocytes and perfused livers. *J Clin Invest* 92: 1188-1197.

57. Amstad P, Moret R y Cerutti P (1994), The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochem J* 30: 9305-9313.
58. Wiesa AG, Pacifici RE y Davies KJA (1995), Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 318: 231-240.
59. Grawford DR y Davies KJA (1994), Adaptative response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 102: 25-28.
60. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G y Schulte-Hermann R (1990), Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11: 847-853.
61. Mitchell JR y Jollow DJ (1975), Metabolic activation of drugs to toxic substances. *Gastroenterology* 68: 392-410.
62. Ortiz de Montellano PR y Correia MA (1983), Suicidal destruction of cytochrome P-450 during oxidative drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol & Toxicol* 23: 481-503.
63. Maines MD (1984), New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *CRC Crit Rev Toxicol* 12: 241-314.
64. Boyer CS y Petersen DR (1991), Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse. *Hepatology* 14: 1209-1216.
65. Hearn WL, Rose S, Wagner J, Ciarleglio A y Mash DC (1991), Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 531-533.
66. Katz JL, Terry P y Witkin JM (1992), Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). *Life Sci* 50: 1351-1361.
67. Morse AC, Erwin VG y Jones BC (1995), Pharmacogenetics of cocaine. A critical review. *Pharmacogenetics* 5: 182-192.
68. Hedaya MA y Pan WJ (1996), Cocaine and alcohol interactions in naive and alcohol-pretreated rats. *Drug Metabolism Disp* 24: 807-812.
69. Roberts SM, Harbison RD y James RC (1993), Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine in mouse and human liver. *Drug metab Dispos* 21: 537-541.
70. Dean RA, Christian CD, Sample RHB y Bosron WF (1991), Human liver cocaine esterases: ethanol mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J* 5: 2735-2739.
71. Boelsterli UA, Wolf A y Gödlin C (1993), Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite cocaethylene in rat hepatocytes. *Hepatology* 18: 1154-1161.
72. Misra AL, Nayak PK, Bloch R y Mule SJ (1975), Estimation and disposition of [<sup>3</sup>H]benzoilecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. *J Pharm Pharmacol* 27: 784-786.
73. Boyer CS y Petersen DR (1992), Enzymatic basis for the transesterification of cocaine in the presence of ethanol: Evidence for the participation of microsomal carboxylesterases. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 939-945.
74. Odeleye OE, Watson RR, Eskelton CD y Earnest D (1993), Enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity by ethanol. *Drug Alcohol Dependence* 31: 253-263.
75. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ, Herrero C, Del Pino J y Castell JV (1991), Potentiation of cocaine hepatotoxicity by ethanol in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 107: 526-534.
76. Dean RA, Harper ET, Dumaul D, Stoeckel DA y Bosron WF (1992), Effect of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaethylene. *Toxicol App Pharmacol* 117: 1-8.

# **HEPATOTOXICIDAD DE LA CICLOSPORINA A, FARMACO DE ELECCION EN LA TERAPIA DE LOS TRASPLANTES**

NURIA SANZ, DAVID ANDRES Y MARIA CASCALES  
Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Avda. Ramón y Cajal, s/n.  
28040-Madrid.

## **SUMARIO**

---

1. INTRODUCCION
2. FARMACOLOGIA DE LA CICLOSPORINA
3. TOXICIDAD DE LA CICLOSPORINA
4. CICLOSPORINA A Y ESTRES OXIDATIVO
5. PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS
6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

La ciclosporina A (CsA) es un potente agente inmunosupresor que fue identificado inicialmente por Borel *et al.* en 1976 (1). A este descubrimiento le siguieron una serie de estudios demostrando, en modelos experimentales, la efectividad del fármaco en la prevención del rechazo de órganos (2). Las propiedades farmacológicas de la CsA, han sido decisivas para el logro del éxito de los trasplantes, sin embargo, su utilización terapéutica se ve disminuida por sus efectos secundarios adversos, que incluyen neuro, nefro y hepatotoxicidad (3). Aunque han sido frecuentemente estudiados los mecanismos responsables de su actuación sobre el sistema inmune, no ha ocurrido lo mismo con los mecanismos que conducen a la toxicidad y la forma de prevenirlos.

## 2. FARMACOLOGIA DE LA CICLOSPORINA

La ciclosporina A (CsA) pertenece a una familia de péptidos cíclicos producidos por un hongo, el *Tolypocladium inflatum gams*, también denominado como *Trichoderma polysporum* o *Cylindrocarpon lucidium*. Está constituida por 11 aminoácidos de naturaleza lipofílica que impiden la solubilidad de la CsA en medio acuoso. Presenta un aminoácido de 9 carbonos muy especial, ubicado en la posición 1, y una llamativa ausencia de otros grupos funcionales (4). El nitrógeno de todos los grupos amido está unido a hidrógeno o está metilado y la actividad biológica es muy sensible a alteraciones en la configuración estereoquímica y a modificaciones de los residuos en las posiciones 1, 2, 3, 10 y 11. La CsA contiene un sólo residuo D-aminoácido en la posición 8 y el residuo metil-amido entre las posiciones 9 y 10 está en la configuración *cis*, en tanto que todos los demás residuos metil-amido están en la forma *trans* (Figura 1).

Debido a las propiedades de la CsA como potente agente inmunosupresor, su principal uso terapéutico va dirigido a la reducción de la incidencia de los rechazos que pudieran originarse después de un trasplante de órganos (5, 6). Su efecto inmunosupresor se debe a la interferencia con las funciones normales de las células T (7), ya que inhibe la producción de interleuquina-2, la cual interviene en la proliferación y diferenciación de dichas células (8, 9).

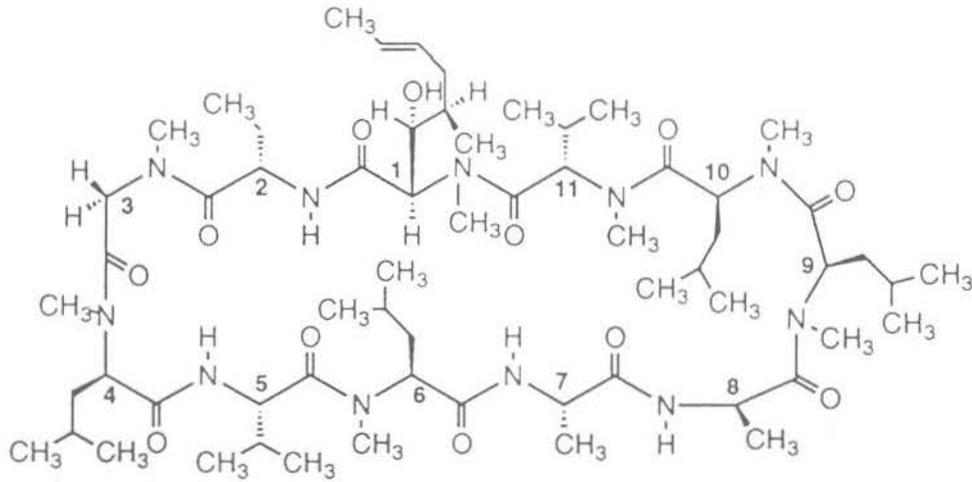


Figura 1. Estructura de la ciclosporina A.

La respuesta inmune se inicia cuando los antígenos específicos, presentados por las células presentadoras de antígenos (APC), se unen al receptor de las células T (TCR). Así se activa una cascada de señalizaciones que incluye la fosforilación a nivel de un residuo de tirosina que activa la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y con ello la hidrólisis del fosfatidil-inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> origina un aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico responsable de la activación de la actividad fosfatasa dependiente de calcio de la calcineurina, como paso crucial de la activación y traslocación nuclear de la subunidad del factor de transcripción citoplasmático NF-ATc (10). Por otra parte el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que induce la subunidad nuclear de este mismo factor (NF-ATn). Otro factor de transcripción involucrado es el NF- $\kappa$ B proteína heterodimérica constituida por las subunidades p50 y p65 y estabilizada por unión a una tercera proteína, la I $\kappa$ B. La desfosforilación de esta última por la calcineurina libera el NF- $\kappa$ B que se trasloca al núcleo. Tanto el complejo formado por las dos subunidades del NF-AT como el NF- $\kappa$ B se unen a la zona promotora del gen que codifica para la IL-2. La IL-2 sintetizada se libera al exterior celular uniéndose a su receptor IL-2R. El proceso de señalización mediado por esta unión implica la activación de JAK-quinosas, STATs (transductores de señal y activadores de transcripción), RAFTs (dianas de la FKBP y rapamicina) y quinasa p70<sup>src</sup>, responsables de que las células progresen de G<sub>1</sub> a S (Figura 2).

El mecanismo por el cual la CsA ejerce su acción inmunosupresora se debe a la formación de complejos ciclofilina A-CsA que actúan a nivel de la calcineurina bloqueando su actividad fosfatasa y con ello la activación de los factores de transcripción mencionados anteriormente (11-14).

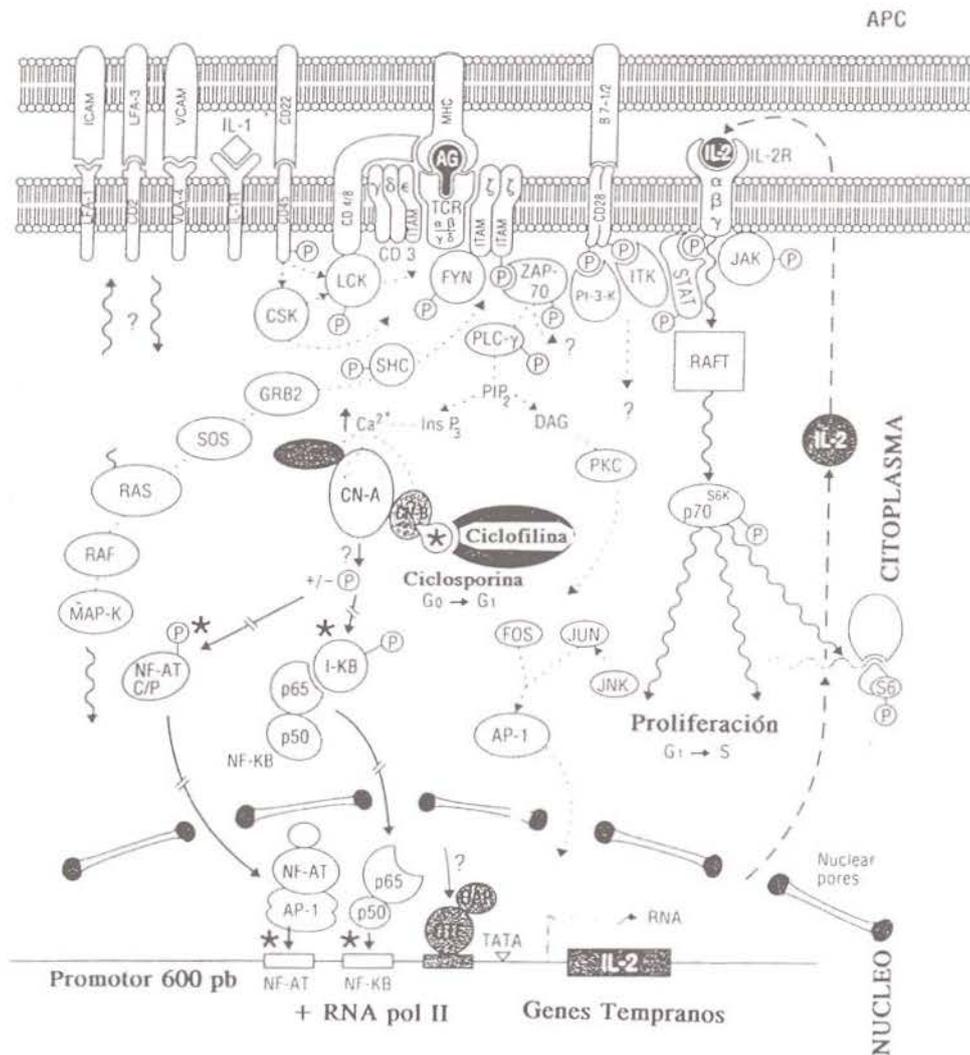


Figura 2. Activación de células T. Mecanismo de acción de la ciclosporina A.

La ciclofilina A (CypA) es una proteína de bajo peso molecular (18 kDa) de la familia de las inmunofilinas. Se trata de una molécula esférica consistente en ocho cadenas antiparalelas de lámina-β, dos α-hélice y una serie de bucles y giros (15). La CsA se une a la CypA mediante los aminoácidos situados en las posiciones 1, 2, 3, 9, 10 y 11, lo que implica un cambio conformacional de *cis* a *trans* en la amida localizada entre las posiciones 9 y 10 (16) (Figura 3).

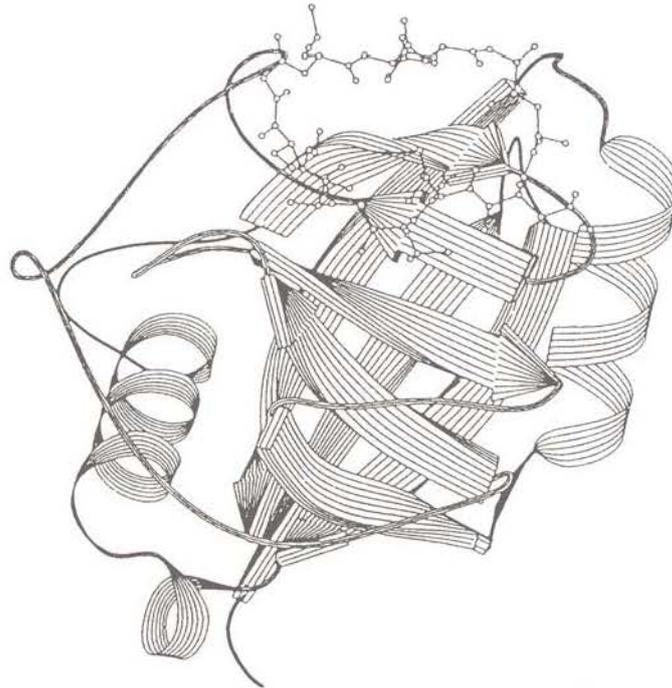


Figura 3. *Complejo formado por la ciclosporina A y la ciclofilina A. La orientación de las moléculas es tal que la región del complejo interactúa con la calcineurina cara a cara.*

Durante casi 30 años, los agentes citotóxicos permitieron efectuar con éxito trasplantes de aloinjertos. Sin embargo, la introducción de la ciclosporina y su empleo en combinación con otros inmunosupresores aumentaron las posibilidades de éxito en los trasplantes de órganos, que permitió prolongar la vida a miles de pacientes cada año (17). Aunque los trasplantes que predominan son los renales, la frecuencia y el éxito de los trasplantes cardíacos y hepáticos aumentan de forma continua (18). La tasa de supervivencia de 1 año de injertos de riñones procedentes de cadáveres fluctúa entre el 70 y el 85%, mientras que en el caso de los injertos hepáticos es superior al 60%. En algunos centros, la tasa de supervivencia de 1 año después de un trasplante cardíaco supera el 80%. El trasplante de médula ósea se ha convertido en el tratamiento de elección para muchos pacientes con anemia aplásica, leucemia no linfocítica aguda y un síndrome grave de inmunodeficiencia combinada. La CsA se emplea como fármaco alternativo del metotrexato para prevenir la evolución de la enfermedad del rechazo de injerto en estos pacientes; algunos protocolos emplean ambos agentes (19).

La CsA presenta además otras utilidades terapéuticas, como en el tratamiento de una variedad de trastornos autoinmunes relacionados, en la que se incluyen

la artritis reumatoidea (20), glomerulonefritis y aplasias eritrocíticas (21), uveítis (22), la enfermedad inflamatoria del intestino (23) y la psoriasis (24). También ha sido utilizada como tratamiento de la alopecia areata (25), la pioderma gangrenosa (26) y la dermatitis atópica (27). Se ha observado que coestimula la producción de anticuerpos IgE y la regulación de los receptores Fc de membrana para la IgE de los linfocitos T, sin afectar otras clases de respuestas humorales inmunes (28). En los casos de diabetes mellitus insulino-dependientes, la administración de CsA dentro de las 6 primeras semanas de su iniciación, puede revertir de forma temporal esta condición, presumiblemente por inhibición de una reacción autoinmune (29).

La CsA tiene otras propiedades que no parecen estar relacionadas con sus efectos sobre las células T y que pueden ser un reflejo de la ubicuidad en la distribución de las ciclofilinas. Una variedad de infecciones parasitarias, que incluyen la esquistosomiasis y el paludismo, responden a este compuesto, posiblemente por una acción directa sobre el parásito (30). La CsA también puede restablecer la sensibilidad de líneas celulares y de tumores experimentales resistentes a distintos agentes quimioterapéuticos que se emplean para el tratamiento del cáncer, que induce la sobreexpresión de P-glicoproteínas (el producto del gen *mdr*, gen de la multiresistencia) (31). Se cree que el mecanismo de este efecto no está relacionado con el mecanismo responsable de la inmunosupresión, dado que tanto los análogos activos como los inactivos de la ciclosporina pueden provocarlo.

La CsA es objeto de importantes interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que complican su utilización clínica. Fármacos como la fenitoína pueden reducir las concentraciones de CsA en sangre a niveles subterapéuticos, mientras que otros como la eritromicina aumentan su concentración a niveles potencialmente tóxicos. Aunque es bien conocido que ambos agentes producen alteraciones en el metabolismo hepático de xenobióticos, existen evidencias que sugieren que modifican la absorción intestinal de la CsA (32). La metoclopramida, fármaco que estimula el vaciamiento gástrico, incrementa la absorción de la CsA (33), mientras que el anestésico isoflurano, por reducción del flujo sanguíneo y la movilidad intestinal, disminuye su absorción (34). Existen evidencias de que antagonistas del calcio como el diltiazem (35), el verapamilo (36) y la nicardipina (37) incrementan también las concentraciones sanguíneas de CsA en pacientes con hipertensión post-trasplante o angina. Sin embargo la nifedipina, otro antagonista de calcio, no tiene tal efecto porque es sustrato del mismo isoenzima del citocromo P-450 que metaboliza la CsA (38).

### 3. TOXICIDAD DE LA CICLOSPORINA

A pesar de sus efectos secundarios como hipertensión, neuro, nefro y hepatotoxicidad (39-41), la CsA es el agente inmunosupresor más utilizado en la terapia de los trasplantes. Según evidencias experimentales parece ser que la alteración en

la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra implicada en esta toxicidad, pues uno de los objetivos de este fármaco es la mitocondria, orgánulo subcelular clave regulador de la homeostasis del calcio. La ciclosporina impide el flujo normal de salida del calcio de la mitocondria por inhibir el «poro de transición de la permeabilidad». El mecanismo por el cual se produce este hecho, es la unión de la CsA a la ciclofilina lo que impide que ésta induzca un cambio conformacional, debido a su actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (42, 43), de la adenina nucleótido translocasa evitando así la apertura de este canal iónico (44). En general esta excesiva acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  causa alteraciones en las funciones mitocondriales (45) ya que varias deshidrogenasas mitocondriales son reguladas por concentraciones micromolares y se desactivan a concentraciones superiores. Del mismo modo se inhiben la carbamoil fosfato sintetasa, la piruvato carboxilasa y la síntesis de ATP y RNA (46-48). Como consecuencia de la inactivación de las deshidrogenasas, se produce un aporte insuficiente de electrones que causa la caída de los niveles de GSH mitocondrial (49). Esto explicaría que las células renales sean más sensibles que los hepatocitos a la acción de la CsA, pues contienen niveles basales menores de GSH (50).

La ciclosporina A, en función de la dosis y la duración del tratamiento, da lugar a alteraciones bioquímicas y estructurales en el hígado (51, 52). Las alteraciones bioquímicas comprenden la elevación de la fosfatasa alcalina asociada con incrementos en los niveles de bilirrubina y sales biliares en sangre, representativos ambos de un proceso de colestasis (53, 54). Algunos autores postulan que este proceso no se produce como consecuencia de un daño directo sobre las células hepáticas, sino que es debido a un desequilibrio en la secreción biliar originado por la interacción del fármaco con las proteínas transportadoras de sales biliares (55) o por modificaciones del metabolismo del colesterol (56).

#### 4. CICLOSPORINA A Y ESTRES OXIDATIVO

Experimentos *in vitro* han demostrado que la CsA induce una disminución en los niveles de GSH que desemboca en una situación de estrés oxidativo acompañada de una peroxidación lipídica y disminución de los grupos tiólicos proteicos, ocasionando en última instancia la muerte celular por necrosis (57).

Sometiendo cultivos primarios de hepatocitos a concentraciones crecientes de ciclosporina A (0, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ), comprobamos que su efecto citotóxico depende tanto de la concentración de la droga como de la duración del tratamiento. Este efecto citotóxico se detectó por evaluación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) liberados al medio. La LDH es un enzima citosólico utilizado como marcador de la ruptura de la membrana plasmática y por consiguiente de la necrosis celular. Su actividad fue incrementando paulatinamente, dependiendo de la concentración, hasta alcanzar valores significativos con la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de CsA a las 24 horas de cultivo (Tabla I).

Tabla I. Efectos citotóxicos de la ciclosporina A en hepatocitos en cultivo primario. Los valores de LDH se expresan como porcentaje de actividad del enzima liberado al medio a las 3, 18 y 24 horas de incubación. Los resultados son media  $\pm$  SEM de tres placas procedentes de dos experimentos representativos (\*  $p < 0,001$ ).

Concentración de CsA ( $\mu$ M)	Tiempo		
	3 horas	18 horas	24 horas
0	6,9 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 0,9	19,4 $\pm$ 1,1
0,5	6,9 $\pm$ 0,6	14,2 $\pm$ 1,0	20,0 $\pm$ 1,4
1	7,3 $\pm$ 0,6	18,3 $\pm$ 1,3	32,1 $\pm$ 3,0
5	6,7 $\pm$ 0,6	21,5 $\pm$ 1,9	32,4 $\pm$ 3,1
10	6,4 $\pm$ 0,5	22,6 $\pm$ 2,0	34,6 $\pm$ 3,3
25	6,3 $\pm$ 0,4	22,8 $\pm$ 2,0	34,3 $\pm$ 3,2
50	7,3 $\pm$ 0,8	25,5 $\pm$ 2,1	39,7 $\pm$ 3,6*

La citotoxicidad de la CsA podría ser consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que se ha demostrado que la administración conjunta con antioxidantes como la vitamina E o el glutatión, es capaz de inhibir la peroxidación lipídica inducida por el inmunosupresor (58). Estas especies se generan posiblemente, tanto a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial, como en el retículo endoplásmico donde la CsA se metaboliza por el citocromo P-450 3A, originando 15 metabolitos desmetilados e hidroxilados (38) a la vez que se generan una molécula de  $H_2O_2$  y otra de  $O_2^-$  por cada molécula de CsA biotransformada (59).

Con el objeto de determinar la generación de dichas especies reactivas de oxígeno, utilizamos técnicas de microscopía confocal que permiten diferenciar, mediante el uso de fluorocromos específicos, tanto la producción de radical superóxido como la de peróxido de hidrógeno y peróxidos de bajo peso molecular. La hidroetidina (HEt) en presencia del  $O_2^-$  da lugar a etidio que se intercala en el DNA formando un complejo fluorescente responsable de la emisión roja (60). La 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) en el interior de las células viables es desacetilada originándose el compuesto 2',7'-diclorofluorescina que en presencia de peróxidos se oxida dando lugar a 2',7'-diclorofluoresceína que fluoresce en el espectro verde (61). En el caso de la DFCH-DA se incubó junto con yoduro de propidio (IP) con el fin de evaluar la viabilidad celular al ser un fluorocromo intercalante del DNA que sólo penetra en células muertas (emisión en la banda del rojo).

Los resultados obtenidos nos muestran que los niveles de radical superóxido permanecen constantes, mientras que la generación de peróxidos aumenta progre-

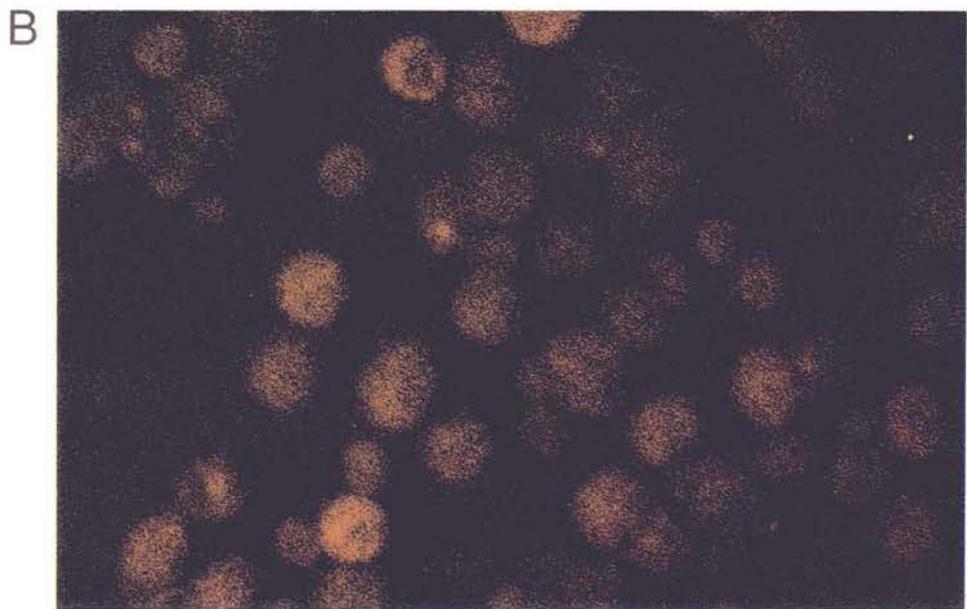
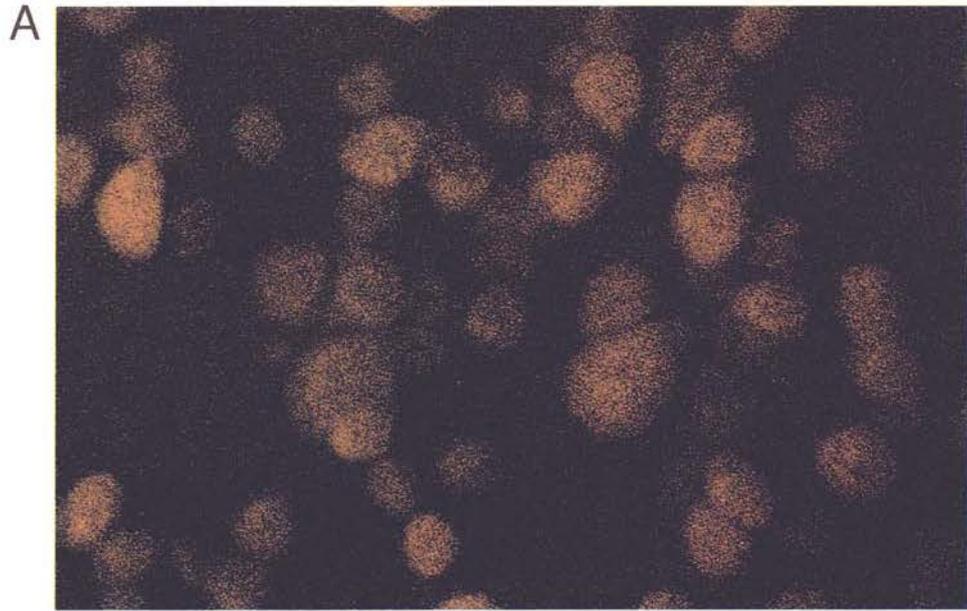


Figura 4. *Producción de radical superóxido analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con hidroetidina durante 30 min. (A) control y (B) CsA 50  $\mu$ M.*

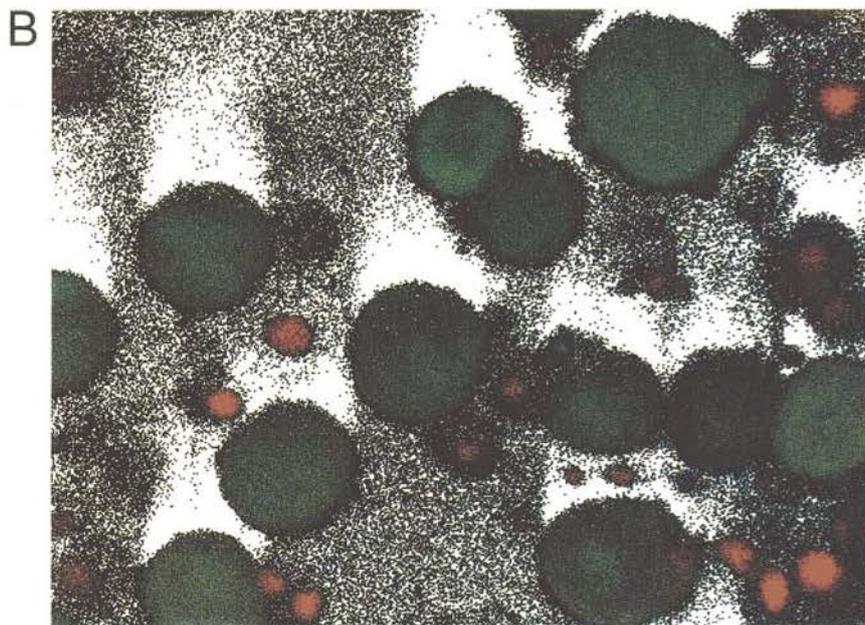
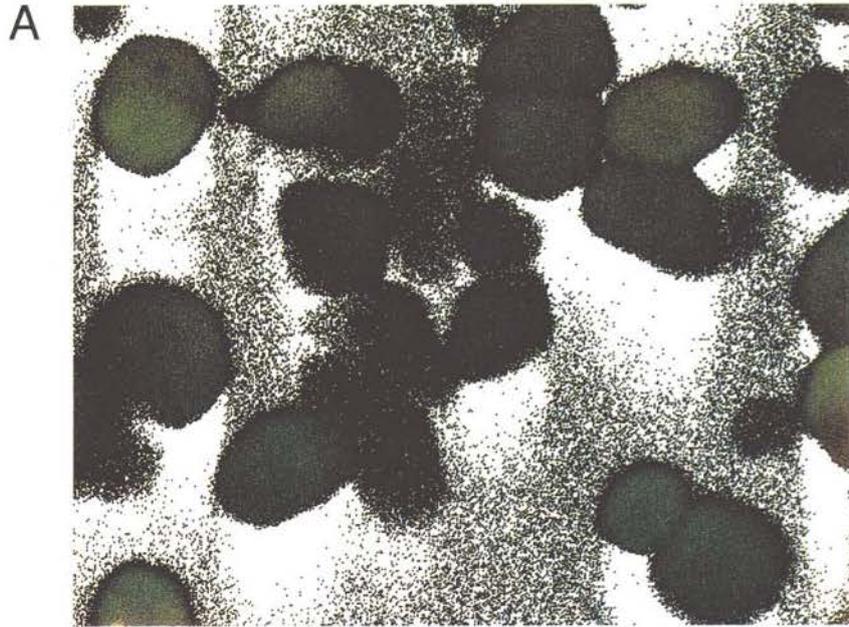


Figura 5. *Análisis por microscopía confocal de la producción de peróxidos. Imágenes obtenidas al incubar las células con yoduro de propidio y diclorofluorescina diacetato durante 30 min. (A) control y (B) CsA 50  $\mu$ M*

sivamente con la concentración de CsA (Figuras 4 y 5). Esto nos lleva a proponer un desequilibrio entre los enzimas del sistema de defensa antioxidante hepático, ya que la superóxido dismutasa es capaz de actuar eficientemente sobre el radical superóxido, en tanto que catalasa y glutatión peroxidasa no son lo suficientemente eficaces en la eliminación de los peróxidos. Esta pérdida de la acción concertada que debe existir entre la SOD y la catalasa, trae como consecuencia la acumulación de  $H_2O_2$  que vía SOD genera el radical hidroxilo (OH), altamente reactivo y responsable de las lesiones celulares (62).

El estudio comparativo de la citotoxicidad y la producción de especies reactivas de oxígeno, nos permite concluir que la generación de ROS precede a la manifestación de la toxicidad.

El estudio de las variaciones del DNA celular en poblaciones hepatocelulares se considera un análisis de gran precisión en determinaciones sobre la citotoxicidad y la genotoxicidad de xenobióticos (63). Mediante técnicas de citometría de flujo es posible cuantificar la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, así como los cambios producidos por agentes químicos sobre la ploidía de las células, cuando se marca el DNA celular con compuestos fluorescentes, tales como el yoduro de propidio. Así podemos distinguir, según la intensidad de fluorescencia emitida, las células con contenido normal de DNA (2C), correspondiente a la fase  $G_0/G_1$ , células con el doble del contenido normal de DNA (4C), fase  $G_2/M$ , y células con valores intermedios, asignadas a la fase S del ciclo celular. Los núcleos apoptóticos pueden reconocerse por la aparición de un pico hipodiploide con un contenido en DNA  $<2C$ , que puede observarse a la izquierda del pico diploide en el histograma (Figura 6).

El análisis cuantitativo de los picos hipodiploides de cada uno de los histogramas muestra que el porcentaje de células apoptóticas aumenta progresivamente con la dosis de CsA hasta alcanzar su máximo valor con la concentración de  $10 \mu M$  (17,04%). A concentraciones superiores se registra un descenso hasta alcanzar un 8,75% que se corresponde con la concentración de  $50 \mu M$ , donde se acentuaba el efecto necrótico de la CsA. De los resultados citométricos obtenidos se desprende también la aparición de un porcentaje considerable de células apoptóticas en los controles (8,50%). Esto puede reflejar el hecho de que los cultivos no contengan todas las citoquinas y los factores de crecimiento apropiados. Sin embargo, estos resultados coinciden con estudios de otros autores que demuestran que los hepatocitos en cultivo sufren un proceso de ruptura del DNA muy lento, pero que se incrementa con la duración del cultivo (64).

La muerte celular por apoptosis puede ocurrir después del tratamiento con una gran variedad de compuestos tóxicos, unas veces precediendo a la aparición de la necrosis y otras coexistiendo con ella. Dependiendo de las células, la dosis y/o los estímulos desencadenados, puede observarse apoptosis, necrosis o ambos fenómenos (65). En el caso de la CsA vemos como al iniciarse la situación de estrés

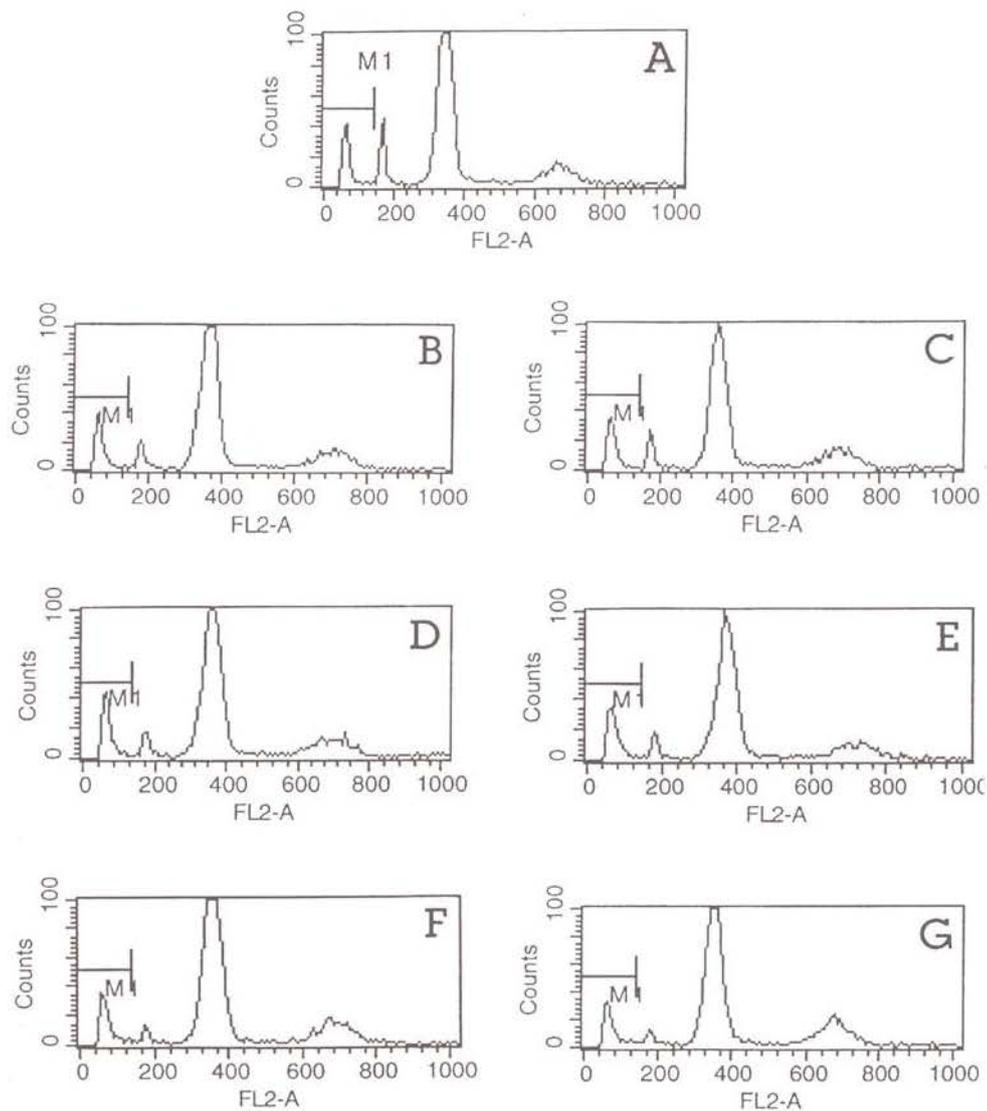


Figura 6. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo. Las células tratadas con Csa se procesaron según las indicaciones del kit Kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Los histogramas son de un experimento representativo y se corresponden a las células tratadas con concentraciones crecientes de Csa (A) control, (B) 0,5  $\mu\text{M}$ , (C) 1  $\mu\text{M}$ , (D) 5  $\mu\text{M}$ , (E) 10  $\mu\text{M}$ , (F) 25  $\mu\text{M}$  y (G) 50  $\mu\text{M}$  de Csa.

oxidativo se induce la muerte celular por apoptosis, mientras que cuando la situación se hace más severa desciende la apoptosis en favor de la necrosis.

El mecanismo por el que el estrés oxidativo induce la apoptosis no se debe a la interacción directa de las especies reactivas de oxígeno con el DNA, sino que éstas

incian una serie de eventos que conducen en última instancia su fragmentación. Por un lado, el proceso de peroxidación lipídica inducido por las especies reactivas de oxígeno origina modificaciones de la permeabilidad de las membranas biológicas que interfieren en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  de tal modo que se activan las endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  responsables de la fragmentación del DNA (66). Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno inducen la activación de la poli-ADP-ribosa transferasa y la acumulación de p53, ambos asociados directamente con la apoptosis (67). Finalmente, mediante la activación del factor NF- $\kappa$ B se induce la transcripción de los llamados «genes de muerte celular» (68). Las células presentan una serie de sistemas de defensa, entre los que cabe destacar el producto del gen *bcl-2* y los antioxidantes endógenos, que cuando son insuficientes o ineficaces dejan vía libre a la cascada de reacciones que finalizan en la apoptosis (69) (Figura 7).

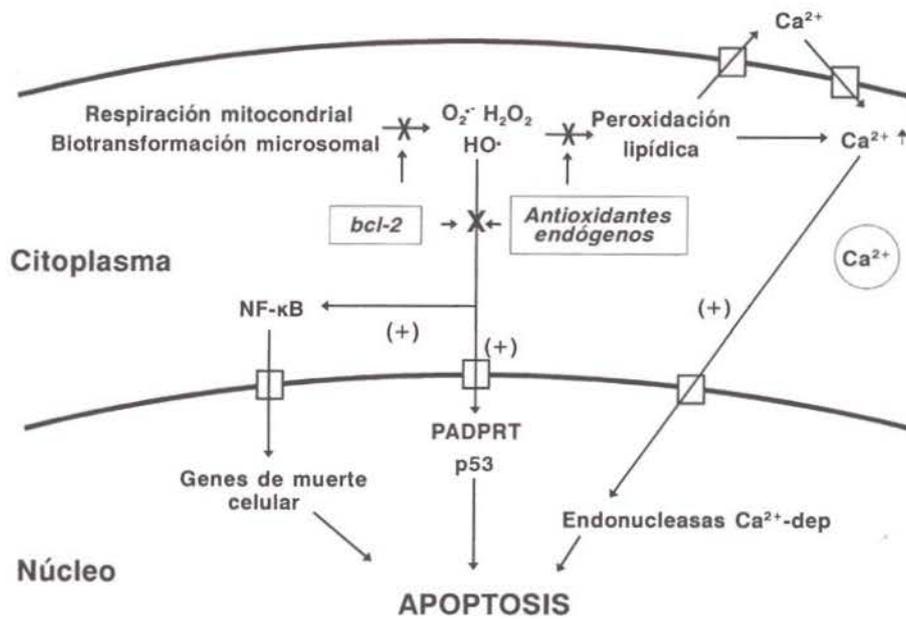


Figura 7. El estrés oxidativo como mediador de la apoptosis.

## 5. PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS

Desde el descubrimiento de la CsA, la búsqueda de otros agentes inmunosupresores ha sido objeto de un intenso trabajo. Así en 1984 se aisló del *Streptomyces tsukubaensis* el FK-506, también llamado tacrólimus, macrólido con una potencia inmunosupresora 100 veces superior a la ciclosporina A *in vitro* (70). Se ha demostrado que la toxicidad del FK-506 en hepatocitos en cultivo es inferior a la de la CsA (71) y que produce menor lesión a nivel gastrointestinal y miocárdico en perros, y a nivel neuronal y renal en ratas. Esto lo convierte en el agente immuno-

supresor de elección en trasplantes de intestino delgado (72); sin embargo en otros tipos de trasplantes presenta ciertas complicaciones terapéuticas, que imposibilitan a corto plazo una alternativa inmunosupresora que mejore sustancialmente las complicaciones de la CsA (73, 74).

Debido a que en la actualidad prevalece la utilización de la CsA, y como en la toxicidad de la misma juega un papel crucial el estrés oxidativo, una posible perspectiva terapéutica sería la administración conjunta de antioxidantes. Se ha demostrado que la incubación de CsA con antioxidantes como ditioneitol, agente reductor que evita la disminución del cociente GSH/GSSG, ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol potentes inhibidores de la peroxidación lipídica, disminuye sus efectos tóxicos (58).

## BIBLIOGRAFIA

1. Borel JF, Feurer C, Gübler HU y Stahelin H (1976), Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions* 6: 468-475.
2. Borel JF (1989), Pharmacology of cyclosporin (sandimmun), IV. Pharmacological properties in vivo. *Pharmacol Rev* 41: 259-371.
3. Kahan BD (1989), Cyclosporine. *N Engl J Med* 321: 1725-1738.
4. Wenger RM (1986), Synthesis of cyclosporin and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog Allergy* 38: 46-64.
5. Fowler MB y Schroeder JS (1986), Current status of cardiac transplantation. *Mod Concept Cardiovasc Dis* 55: 37-41.
6. Kahan BD, Mickey R, Flechner SM, Lorber MI, Wideman CA, Kerman RH, Tersaki P y Van Buren CT (1987), Multivariate analysis of risk factors impacting on immediate and eventual cadaver allograft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 43: 65-70.
7. Sigal NH y Dumont FJ (1993), Immunosuppression. En: *Fundamental Immunology*, Paul WE, ed. Tercera edición. New York: Raven Press, 903-915.
8. Granelli-Piperno G (1990), Lymphokine gene expression *in vivo* is inhibited by cyclosporine A. *J Exp Med* 171: 533-544.
9. Kasaian MT y Biron CA (1990), Cyclosporine A inhibition of interleukin 2 gene expression, but not natural killer cell proliferation, after induction *in vivo*. *J Exp Med* 171: 299-306.
10. Northrop JP, Ullman KS y Crabtree GR (1993), Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT), complex. *J Biol Chem* 268: 2917-2923.
11. Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR y Herzenberg LA (1990), The actions of cyclosporine A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 9: 4425-4433.
12. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I y Schreiber SL (1991), Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP - FK 506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
13. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ y Crabtree GR (1991), Nuclear association of a T cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporine A. *Nature* 352: 803-807.
14. Baumann G, Geisse S y Sullivan M (1991), Cyclosporine A and FK-506 Both affect DNA binding of regulatory nuclear proteins to the human interleukin-2 promoter. *New Biol* 3: 270-278.
15. Ke H, Zydowsky LD, Liu J y Walsh CT (1991), Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9483-9487.

16. Thieriault Y, Logan TM, Meadows R, Yu L, Holzman TF, Simmer RL y Fesik SW (1993), Solution structure of the cyclosporine A/cyclophilin complex by NMR. *Nature* 361: 88-91.
17. Bennett WM y Norman DJ (1986), Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med* 37: 215-224.
18. O'Grady JG, Forbes A, Rolles K, Calne RY y Williams R (1988), An analysis of cyclosporine efficacy and toxicity after liver transplantation. *Transplantation* 45: 575-579.
19. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Doney K, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R y Hansen J (1989), Graft-versus-host disease prevention by methotrexate combined with cyclosporine compared to methotrexate alone in patients given marrow grafts for severe aplastic anemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Br J Haematol* 72: 567-572.
20. Shand N, y Richardson B (1988), Sandimmun (cyclosporine A): mode of action and clinical results in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol [Suppl.]* 76: 265-278.
21. Totterman TH, Hoglund M, Bengtsson M, Simonsson B, Almqvist D y Killander A (1989), Treatment of pure red-cell aplasia and aplastic anaemia with cyclosporin: long-term clinical effects. *Eur J Haematol* 42: 126-133.
22. Nussenblatt RB, Palestine AG y Chan CC (1985), Cyclosporine therapy for uveitis: long-term follow-up. *J Ocul Pharmacol* 1: 369-382.
23. Sachar DB (1989), Cyclosporine treatment for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 321: 894-896.
24. von Graffenried B (1989), Sandimmun (cyclosporin), in autoimmune diseases. *Am J Nephrol* 9: 51-56.
25. Gupta AK, Ellis CN, Tellner DC y Voorhees JJ (1988), Cyclosporine A in the treatment of severe alopecia areata. *Transplant Proc* 20: 105-108.
26. Shelley ED y Shelley WB (1988), Cyclosporine therapy for pyoderma gangrenosum associated with sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *J Am Acad Dermatol* 18: 1084-1088.
27. Logan RA y Camp RDR (1988), Severe atopic eczema: response to oral cyclosporine A. *J R Soc Med* 81: 417-418.
28. Chen SS (1988), Cyclosporin A acts as a potent co-stimulator in up-regulation of IgE antibody synthesis and expression of Fc receptor for IgE—a unifying hypothesis of the cellular mechanisms of cyclosporin A. *Transplant Proc* 20: 92-102.
29. Bach JF, Feutren G y Boitard C (1988), The prospects of immunosuppression in Type I diabetes. *Adv Neurol* 17: 321-340.
30. Nickell SP, Scheibel LW y Cole GA (1982), Inhibition by cyclosporine A of rodent malaria *in vivo* and human malaria *in vitro*. *Infect Immun* 37: 1093-1100.
31. Hait WM, Stein JM, Koletsky AJ, Harding MW y Handschumacher RE (1989), Activity of cyclosporine A and a non-immunosuppressive cyclosporine against multidrug resistant leukemic cell lines. *Cancer Commun* 1: 35-43.
32. Gupta Sk, Bakran A, Johnson RW y Rowland M (1988), Erythromycin enhances the absorption of cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* 25: 401-402.
33. Wadhwa NK, Schoroeder TJ, O'Flaherty E, Pesce AJ, Myre SA y First MR (1987), The effect of metoclopramide on the absorption of cyclosporine. *Transplantation* 43: 211-213.
34. Brown MR, Brajbord D, Johnson D, Ramsay MAE y Paulsen AW (1989), Efficacy of oral cyclosporine given prior to liver transplantation. *Anesth Analg* 69: 773-775.
35. Pochet JM y Pierson Y (1989), Cyclosporine-diltiazem interaction. *Lancet* 1: 979.
36. Lindholm A y Henricsson S (1987), Verapamil inhibits cyclosporine metabolism. *Lancet* 1: 1262-1263.
37. Bourbigot B, Guiserix J, Airiau J, Bressolette L, Morin JF y Cledes J (1986), Nicardipine increases cyclosporine blood levels. *Lancet* 1: 1447.
38. Kronbach T, Fisher V y Meyuer UA (1988), Cyclosporin metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporin-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporin with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 43: 630-635.

39. Bowers LD (1990), Studies of cyclosporin and metabolite toxicity in renal and hepatocyte culture systems. *Transplant Proc* 22: 1135-1136.
40. Bennett W y Buss WC (1991), Cyclosporine and calcium: implications for drug action, interactions and toxicity. Calcium-regulating hormones. II. Calcium transport, bone metabolism, and new drugs. *Morn H ed. Basel, Karger* 91: pp. 50-56.
41. Remuzzi G, y Perico N (1995), Cyclosporin-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int Suppl* 52: S70-S74.
42. Takahashi N, Hayano T y Suzuki M (1989), Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337: 473-475.
43. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T y Schmid FX (1989), Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337: 476-478.
44. Halestrap AP y Davidson AM (1990), Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondria-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160.
45. Tuena De Gómez-Poyou M, Gavilanes M, Gómez-Poyou A y Ernster L (1980), Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of proton-motive force and Ca<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta* 592: 396-405.
46. Reed DJ (1990), Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 603-631.
47. Mihatsch MJ, Olivieri W, Marbet U, Thiel G, Harder F y Zollinger HU (1981), Giant mitochondria in renal tubular cells and cyclosporin A. *Lancet* 1: 1162-1163.
48. Jung K y Pergande M (1985), Influence of cyclosporine A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett* 183: 167-169.
49. Jung K, Reinholdt C y Scholz P (1987), Inhibited efficiency of kidney mitochondria isolated from rats treated with cyclosporine A. *Nephron* 45: 43-45.
50. Schlegel J, Meier P, Kass GEN y Richter C (1991), Inhibition by cyclosporine A of the prooxidant-induced but not the sodium-induced calcium release from rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 42: 2193-2197.
51. Galán AI, Fernández E, Morán D, Muñoz ME y Jiménez R (1995), Cyclosporine A hepatotoxicity: Effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 260-265.
52. Actis GC, Debernardi-Venon W, Lagget M, Marzano A, Ottobrelli A, Ponzetto A, Rocca G, Boggio-Bertinet D, Balzola F, Bonino F y Verme G (1995), Hepatotoxicity of intravenous cyclosporine A in patients with acute ulcerative colitis on total parenteral nutrition. *Liver* 15: 320-323.
53. Mason J (1989), Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune). VII. Pathophysiology and toxicology of cyclosporine in humans and animals. *Pharmacol Rev* 43: 423-434.
54. Arias IM (1993), Cyclosporin, the biology of the bile canaliculus, and cholestasis. *Gastroenterology* 104: 1558-1560.
55. Stacey NH y Kotecka B (1988), Inhibition of taurocholate and ouabain transport in isolated rat hepatocytes by cyclosporine A. *Gastroenterology* 95: 780-786.
56. Chanussot F, Botta-Fridlung D, Porte PL, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Hauton J, Gauthier A y Lafont H (1992), Effects of cyclosporine and corticosteroids on bile secretion in the rat. *Transplantation* 54: 226-231.
57. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P y Cordier A (1994), Role of glutathione in cyclosporine A *in vitro* hepatotoxicity. *Transplant Proc* 26: 2912-2914.
58. Wolf A, Trendelenburg CF, Díez-Fernández C, Prieto P, Houy S, Trommer WE y Cordier A (1997), Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *Journal Pharmacol Exp Toxicol* (en prensa).
59. Porter TD y Coon MJ (1991), Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 266: 13469-13472.
60. Rothe G y Valet G (1990), Flow cytometry analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol* 47: 440.

61. Dawson T, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B y Lemasters JJ (1993), Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 264: C961-C967.
62. Gille G y Sigler K (1995), Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* 40: 131-152.
63. Dallas CE y Evans DL (1990), Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* 345: 557-558.
64. Cain K, Salmaan H, Hussain I, Covet C, Qin H y Oberhammer F (1996), A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocyte undergo a time depended increase in DNA cleavage and chromatine condensation which is augmented after TGF- $\beta$ 1 treatment. *Cytometry* 23: 312-321.
65. Bortner CD, Oldenburg NBE y Cidlowski JA (1995), *Trends Cell Biol* 5: 21-26.
66. Forrest VJ, Kang Y-H, McClain DE, Rovinson DH y Ramakrishnan N (1994), Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Rad Biol Med* 16: 675-684.
67. Schwartzman RA y Cidlowski JA (1993), Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 14: 133-151.
68. Schreck R, Albermann KAJ y Baeuerle PA (1992), Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Rad Res Comm* 17: 221-237.
69. Buttke T y Sandstrom PA (1994), Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 14: 7-10.
70. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H y Ochiai T (1987), FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J Antibiot (Tokyo)*, 40: 1256-1265.
71. Loréal O, Fautrel A, Meunier B, Guyomard C, Guillouzo A y Launis B (1991), FK-506 is less cytotoxic than cyclosporine to human and rat hepatocytes *in vitro*. *Transplant Proc* 23: 2825-2828.
72. Hoffman AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S y Starzl TE (1990), The use of FK-506 for small intestine allotransplantation. Inhibitions of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. *Transplantation* 49: 483-490.
73. Kahan BD (1993), Cyclosporine: the base for immunosuppressive therapy-present and future. *Transplant Proc* 25: 508-510.
74. Starzl TE (1993), FK-506 versus cyclosporine. *Transplant Proc* 25: 511-512.

## LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y RADICALES LIBRES DE OXIGENO

JUAN MANUEL MONTERO VAZQUEZ

Hospital Militar «Gómez ULLA». Servicio del Aparato Digestivo. Glorieta del Ejercito sn.  
28047 Madrid.

La enfermedad inflamatoria intestinal comporta un proceso inflamatorio crónico, del intestino delgado o grueso, que se origina mediando una susceptibilidad genética todavía no bien definida, por la acción de antígenos bacterianos de diversa naturaleza en la luz intestinal (LPS, FMLP, peptidoglicanos, etc.) (1) que, pasando la barrera intestinal transportados y preparados por las células M (2) del revestimiento epitelial, alcanzan el sistema linfático de las placas de Peyer e inician una serie de acontecimientos que despiertan una respuesta inflamatoria que, por motivos todavía no bien conocidos, se mantiene y no es autolimitada como acontece normalmente. Variantes en los mediadores de esta respuesta, sobre todo a nivel de los linfocitos T «helper», h1 ó h2 (3), configurarían las dos variantes clínicas, la denominada enteritis regional (enfermedad de Crohn) y la colitis ulcerosa, de la enfermedad inflamatoria intestinal.

El macrófago y el granulocito liberan una serie de citoquinas comprometidas en desencadenar la activación de los linfocitos intestinales (4). En las fases de actividad de la enfermedad, gran número de neutrófilos y monocitos dejan el torrente circulatorio emigrando a la mucosa y submucosa inflamadas, e incluso alcanzando la luz intestinal. Durante su desplazamiento, provocado por potentes factores quimiotácticos, ocasionan efectos destructores.

Los neutrófilos y monocitos de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tienen alteraciones funcionales intrínsecas combinadas con la existencia en el suero de factores inhibidores de la actividad quimiotáctica, que se modificarían con los fármacos habitualmente utilizados en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

La unión de los fagocitos a la pared endotelial que precede a la migración tisular, está mediada por las denominadas moléculas de adhesión como la LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1, CD11a) que se une a la ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1, CD54), cuya expresión aumenta de modo muy importante en las células endoteliales en las fases de actividad de la enfermedad, al tiempo que se eleva la expresión de CD11a en los fagocitos mononucleares (5).

Los macrófagos sintetizan y segregan, una vez estimulados y activados, una serie de potentes mediadores proinflamatorios como la interleuquina 1 (IL-1 alfa o beta), interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF alfa). La interleuquina 1 ocasiona fiebre, estimula la síntesis de las proteínas reactantes de fase aguda y participa en la activación linfocitaria.

La IL-1 y el TNF alfa, comparten estas funciones y ambos en grado diverso activan la quimiotaxis de macrófagos y granulocitos, inducen la síntesis de moléculas de adhesión, preparan y activan los macrófagos, activan los linfocitos T y B aumentando la actividad del sistema inmunitario, incrementan la síntesis de prostaglandinas por los fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, aumentan la producción de citoquinas por los macrófagos y del PAF (factor de activación plaquetario), en las células endoteliales.

Además debe señalarse la importancia en la enfermedad inflamatoria intestinal de otras citoquinas y mediadores como la interleuquina 2 (IL-2), el leucotrieno B4 (LTB4), las prostaglandinas E2 e I2 (PGE2, PGI2) y el tromboxano A2.

Los granulocitos y macrófagos producen también metabolitos tóxicos del oxígeno, que sin duda contribuyen al amplio daño tisular evidenciado en la enfermedad inflamatoria intestinal.

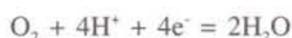
Aunque el oxígeno se identifica por J. Priestley en el siglo XVIII, hay que esperar a la década de los años 60, para establecer la toxicidad de los radicales libres dependientes del oxígeno. Un radical libre es una molécula o un átomo con un electrón desapareado en su órbita más externa. Los organismos producen en condiciones normales radicales libres de oxígeno (RLO), que rápidamente son reducidos por los pertinentes sistemas enzimáticos a agua.

Cuando la capacidad de neutralizarlos se ve disminuida o es desbordada aparecen los efectos tóxicos. Por tanto, el fiel de la balanza oxidativa se mantiene de una parte por la acción de los prooxidantes (drogas, sustancias contaminantes, radiaciones, etc) y de otra por los antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, etc), siendo este equilibrio obligatorio para mantener en el organismo el adecuado grado de tensión oxidativa. El desequilibrio con la producción de RLO, altamente reactivos puede originar la lesión y muerte celular.

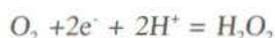
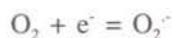
Ejercen su toxicidad, mediante la desnaturalización de los ácidos nucleicos (6), despolimerización del ácido hialurónico de los mucopolisacáridos y del coláge-

no (7), así como por la desintegración de las membranas celulares y de organelas intracelulares mediante la peroxidación lipídica con formación de enlaces entre lípidos, puentes disulfuro y liberación de malondialdehído por oxidación de los ácidos grasos (8).

En condiciones normales los electrones e hidrogeniones liberados por el metabolismo de la mayor parte del oxígeno (99 %) en el ciclo de Krebs, son captados por el sistema citocromo oxidasa, originándose una reducción tetravalente completa y simultánea del oxígeno sin creación de productos intermedios:



Una pequeña parte del oxígeno (1 %) sufre una reducción univalente y secuencial, ocasionando la aparición de metabolitos intermedios que son RLO: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.



El radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) se puede generar por reacciones enzimáticas (xantina oxidasa, citocromo P-450, etc), no enzimáticas (del oxígeno con la cistina o la riboflavina o activado por la luz) y por la autooxidación mitocondrial.

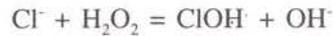
El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es producido por reacciones enzimáticas (glucosa oxidasa, diaminoácido oxidasa), no enzimáticas (autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre) y de modo espontáneo o por la acción de la superóxido dismutasa (SOD).

El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) puede formarse por radiolisis del agua mediante la acción de las radiaciones ionizantes; también por la reducción del agua oxigenada en presencia de ciertos iones metálicos, según la reacción de Fenton, y sobre todo por los iones ferrosos presentes en la transferrina, lactoferrina, hemoglobina y ferritina; puede por último originarse mediante la reacción de Haber-Weiss.



Las radiaciones ionizantes activan muchas moléculas y entre ellas al oxígeno, originándose singletes y tripletes excitados de oxígeno que pueden iniciar reacciones de oxidación. La activación de un átomo de oxígeno en estado basal por una determinada cantidad de energía (9), provoca el salto de un electrón apareado del orbital completo surgiendo la forma cinética singlete, que modificando su «spin» da lugar a un triplete excitado, otras de las formas de radicales libres de oxígeno.

El ácido hipocloroso (Cl OH) es otro radical libre, altamente tóxico, que se genera por la activación de la mieloperoxidasa de los granulocitos por el peróxido de hidrógeno, en presencia del ión cloro (Cl<sup>-</sup>) y que es capaz de oxidar a los grupos sulfhidrilos (-SH).



Con independencia de esta fuente leucocitaria, hay que recordar también que se generan radicales libres de oxígeno en los siguientes sistemas biológicos:

- Degradación espontánea y mediada por la monoaminoxidasa (MAO) y catecol-o-metiltransferasa (COMT) de las catecolaminas liberadas en las terminaciones sinápticas.
- Transporte mitocondrial de electrones.
- Sistema ciclo y lipooxigenasa del ácido araquidónico.
- Sistema xantina oxidasa de primordial importancia en la isquemia intestinal (10).

El proceso de formación y liberación de los RLO por los granulocitos y macrófagos, conocido en la literatura sajona como «respiratory burst», es el resultado de dos procesos biológicos: la preparación y la activación. Las células fagocitarias resultan preparadas tras la exposición a una serie de moléculas como los peptidoglicanos, proteasas, citoquinas, etc. (11). La preparación no es suficiente para la producción de radicales libres de oxígeno, aunque propicia un incremento de la concentración del calcio intracelular, entre otros efectos metabólicos. La activación, por un segundo estímulo, de las células preparadas ocasiona la liberación de aniones superóxido y los metabolitos tóxicos del oxígeno, que de él inevitablemente se derivan.

Revisando los aspectos específicos referentes a los radicales libres de oxígeno en la enfermedad inflamatoria intestinal encontramos, que ya Suematsu (12) publicó en 1987, que los monocitos aislados de la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn, producen una aumentada «explosión respiratoria» cuando eran estimulados *in vitro*. Hallazgos similares se producen al estudiar pacientes afectados de colitis ulcerosa, con la descripción de una correlación entre el grado de actividad de la enfermedad medido con los índices clínicos habituales y la preparación de los monocitos de estos pacientes.

Los estudios posteriores de Baldassano confirman estos hallazgos (13), al tiempo que descubren que el suero de pacientes afectos de la enfermedad de Crohn, capaz de preparar células fagocíticas pierde su capacidad al retirar mediante cromatografía de afinidad con polimixina B, el lipopolisacárido del E coli 0119:B14 (LPS) presente en grandes cantidades en los sueros de pacientes afectos de enfermedad inflamatoria intestinal (14).

Grisham y Granger (15) demuestran el aumento de radicales libres de oxígeno derivados de los granulocitos en la lámina propia del intestino isquémico. Los monocitos aislados del colon inflamado tienen una respuesta de «explosión respiratoria» incrementada en tanto, que ésta está disminuida en los macrófagos de la lámina propia en un colon normal; también, en la enfermedad inflamatoria intestinal los macrófagos tienen una expresión aumentada en su superficie de los receptores IL-2. Mahida, autor de estos estudios, piensa que estas células pueden ser preparadas en otros compartimentos corporales mientras circulan por la sangre periférica y luego reclutadas en la pared intestinal sin que el interferón gamma (IFN gamma) ni el LPS sean capaces de inducir en estas células receptores IL-2 (16).

El lipopolisacárido LPS, como hemos comentado, jugaría un papel primordial en la preparación de los monocitos, incluso en sangre periférica y en el desencadenamiento de la reacción inflamatoria mucosa en la enfermedad inflamatoria intestinal. También pueden tener un papel en la preparación de los macrófagos las proteasas (11), mediadores lipídicos como el LTB<sub>4</sub> (11), agregados de inmunoglobulinas (17), N-formil-metilpéptidos bacterianos como el FMLP (18), además de los muramildipéptidos (19) y de los peptidoglicanos (20).

La liberación de radicales libres de oxígeno por las células fagocitarias, mecanismo normal en la defensa antimicrobiana del organismo, pasaría aquí a ser uno de los agentes del gran daño tisular de la enfermedad inflamatoria intestinal, al tiempo que una amplia serie de potentes y específicos mediadores de la reacción inflamatoria. Los linfocitos T y B, también podrían ser liberadores de radicales libres de oxígeno tras ser preparados y activados por el LPS.

Otros péptidos bacterianos quimiotácticos pueden también mediar en esta reacción inflamatoria. Los complejos peptidoglicanos/polisacáridos derivados de la pared bacteriana, son metabolizados a muramildipéptidos por enzimas producidos en las células inflamatorias. Podrían actuar sinérgicamente en el primado y activación celular, no sólo con el LPS sino también con el interferón gamma o la interleuquina-1. El paso de peptidoglicanos a la circulación sistémica determinaría la aparición de anticuerpos IgM y los complejos antígeno/anticuerpo resultantes serían, en gran modo, responsables de manifestaciones sistémicas en la enfermedad inflamatoria intestinal del tipo de artritis, afección del polo anterior oftálmico y de las alteraciones cutáneas.

El más activo de esos péptidos bacterianos sería el formilmetilpéptido (FMLP) que se encuentra en el sobrenadante de cultivos de *E coli* y otras enterobacterias, se une a receptores altamente específicos de los leucocitos humanos, que pueden ser bloqueados por la salazopirina (21), ocasionando la liberación de radicales libres de oxígeno y enzimas lisosomales, aumentando la adhesión endotelial, la quimiotaxis así como la liberación de leucotrienos y otros mediadores lipídicos del grupo de los eicosanoides (22).

Podemos concluir con Schreiber, que el intenso compromiso de un número de diferentes compuestos de la pared bacteriana en el incremento de la regulación y en la activación crónica del sistema inmunitario en la enfermedad inflamatoria intestinal, se considera hoy día como un componente esencial en la fisiopatología de esta entidad morbosa (23).

Estos datos fisiopatológicos aparte de explicar, en parte, la actividad de fármacos empleados, desde hace años, en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (21) como la salazopirina o el ácido 5 aminosalicílico (5 ASA), abren nuevos horizontes terapéuticos como los estudios preliminares, con buenos resultados, de inactivación de los radicales libres de oxígeno, mediante la superóxido dismutasa o derivados de la vitamina E, en enfermos con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (24, 25).

Un inhibidor del calcio, el verapamilo, en concentraciones terapéuticas, reduce en un 30 % la liberación de leucotrieno B<sub>4</sub> en la mucosa inflamada (26).

Un compuesto en experimentación, el K-76, ácido monocarboxílico derivado del cultivo del hongo *Stachybotrys complementi*, inhibe la liberación de leucotrienos, inhibe el factor C5 y el factor I del complemento, controla la producción del factor de necrosis tumoral, inhibe la liberación de histamina por los mastocitos e induce células T supresoras. Estudios iniciales en pacientes parecen alteradores, en combinación con los corticoides (27).

Ensayos clínicos controlados deben ser realizados con estos u otros «scavengers» antes de recomendar su empleo en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

## BIBLIOGRAFIA

1. Elson CO. (1988), The immunology of inflammatory bowel disease. En: *Inflammatory Bowel Disease*. Dersner JB, Shorter RG (eds), 3 ed, Philadelphia, Lea & Febiger.
2. Owen RL y Jones AL. (1974), Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66: 189.
3. Mullin GE, Lazenby AJ y Harris ML. (1992), Increased interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosa lesion of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1620.
4. Fiocchi C. (1989), Lymphokines and the intestinal immune response: role in inflammatory bowel disease. *Immunol Invest* 18: 91
5. Malizia G, Calabrese A y Cottone M. (1991), Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100: 150.
6. Brawn K y Fridovich I. (1980), Superoxide radical y superoxide dismutase. Threat and defense. *Acta Physiol Scand* 492: 9.
7. Matsumara G, Herp A y Pigman IU. (1966), Depolymerisation of hyaluronic acid by antioxidants and reduction. *Radiat Res* 28: 735.
8. Takehige K, Takayanayi K y Minakami J. (1980), Reduced coenzyme Q10 an antioxidant of lipid peroxidation in bovine heart mitochondria. En: *Biomedical and clinical aspects of*

- coenzyme Q. Kmanura Y, Folkers K e Ito Y (eds), Vol 2. Amsterdam. Elsevier/ North Holland. Biomedical Press, pp 15-22.
9. Foote Ch S. (1982), Light, Oxygen and Toxicity. En: *Pathology of Oxygen*. Anne P (ed), Londres, Academic Press, pp 21-44.
  10. Guijarro JF, Moratinos P, Montero J, Gomis M, Portellano P y Alguacil R. (1996), Radicales libres en la isquemia intestinal. *Rev Asociación Castellana Aparato Digestivo* 12: 11.
  11. Forehand JR, Nauseef WM y Johnston RB Jr. (1989), Inherited disorders of phagocyte killing. En: *The Metabolic Basis of inherited disease*, Schriver CR et al. (eds), 6 ed, New York, Mac Graw Hill, pp 2779.
  12. Suematsu M, Suzuki M y Kitahora T. (1987), Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowell diseases: the analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe. *J Clin Lab Immunol* 24: 125.
  13. Baldassano RN, Schreiber S, Johnston RB, Robert D, Muraki T y Mac Dermott RP. (1993), Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxyten metabolites. *Gastroenterology* 105: 60.
  14. Palmer KR, Duerden BI y Hodsworth CD. (1980), Bacteriological and endotoxin studies in cases of ulcerative colitis submitted to surgery. *Gut* 21: 851.
  15. Grisham MB y Granger DN. (1988), Neutrophil mediated mucosal injury: role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33: 6S-15S.
  16. Mahida YR, Wu KC y Jewell DP. (1989), Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowell disease. *Gut* 30: 1362.
  17. Schreiber S, Stenson WF y Mac Dermott RP. (1991), Aggregate bovine IgG inhibits mannose receptor expression of murine bone marrow-derived macrophages via activation. *J Immunol* 147: 1377.
  18. Schiffman E, Corcoran BA y Wahl SA. (1975), N-formylmethionil peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1059.
  19. Kotani S, Tsujimoto M y Koga T. (1986), Chemical structure and biological activity relationship of bacterial cell walls and muramyl peptides. *Fed Proc* 45: 2534.
  20. Dziarski R. (1987), Binding stites for peptidoglycan mouse lymphocytes. *Cell Immunol* 1: 231.
  21. Stenson WF, Mehta J y Spilberg I (1984), Sulfasalazine inhibits the binding of formylmethionyleucylphenylalanine (FMNLP) to its receptor on human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 33: 407.
  22. Le Duc LE y Nast CC. (1990), Chemotactic peptide-induced acute colitis in rabbits. *Gastroenterology* 98: 929.
  23. Schreiber S, Raedler A, Stenson WF y Mac Dermott RP. (1992), The role of the mucosal immune system in inflammatory bowell disease. En: *Mucosal Immunology II, Clinical Applications*. Mac Dermott RP y Elson CO (eds), Philadelphia. Gastroenterology Clinics of North America 22, number 2, pp 451.
  24. Emerit J, Pelletier S y Tosoni-Verlignue D. (1989), Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase in treatment of Crohn's disease. *Free Radic Biol Med* 7: 145.
  25. Bennet JD (1986), Use of alpha-tocopherylquinone in the treatment of ulcerative colitis. *Gut* 27, 695.
  26. Gertner DJ, Rampton DS, Stevens TRJ y Lennard-Jones JE. (1992), Verapamil inhibits in vitro leukotriene B4 release by rectal mucose in active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 6: 163.
  27. Kitano A, Matsumoto T, Nakamura S, Obata A, Oshitani N, Okawa K y Kobayashi K. (1992), New treatment of ulcerative colitis with K-76. *Dis Colon Rectum* 35: 560.

# ANALISIS DEL ESTRES OXIDATIVO POR CITOMETRIA DE FLUJO

A. ALVAREZ BARRIENTOS<sup>1</sup>, ROBERT CALLAGHAN<sup>2</sup>,  
J.E. O'CONNOR BLASCO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal. Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup> Departamento de Anatomía Patológica. <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia.

## SUMARIO

---

- 1 INTRODUCCION
  - 1.1. Citometría de flujo: Concepto y bases técnicas
    - 1.1.1. Componentes de un citómetro de flujo
    - 1.1.2. Características del análisis por citometría de flujo
  - 1.2. Citometría de flujo: Aplicaciones generales
2. MOLECULAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DEL ESTRES OXIDATIVO POR CITOMETRIA DE FLUJO (CDF)
  - 2.1. Aproximación experimental
3. APLICACIONES
  - 3.1. Fisiológicas
  - 3.2. Toxicológicas
  - 3.3. Microbiología
4. ANALISIS DE DATOS Y CUANTIFICACION DE RESULTADOS
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS
6. BIBLIOGRAFIA
  - 6.1. Bibliografía específica de citometría de flujo

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. La citometría de flujo: Concepto y bases técnicas

La citometría de flujo es, básicamente, un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que desfilan, de una en una y arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente, de acuerdo a las propiedades exhibidas.

La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas.

Debido al creciente número de parámetros biológicos analizables y al desarrollo de citómetros de coste accesible, dotados de sistemas informáticos, a la vez de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa, la citometría de flujo tiene en la actualidad un amplio abanico de aplicaciones en muchos campos básicos y clínicos, donde se requiera identificar células o partículas biológicas, caracterizar sus propiedades y respuestas funcionales y, en algunos casos, separarlas físicamente.

#### 1.1.1. Componentes de un citómetro de flujo

Los componentes básicos de un citómetro de flujo, que con mayor o menor complejidad técnica, se encuentran en la mayoría de los instrumentos actuales son:

a) *Sistema hidráulico:* Rodea la suspensión celular en flujo, con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra, a veloci-

dad constante y controlada, a través de la zona de detección («cámara de flujo»), donde las células o partículas son expuestas, una a una, al haz iluminador (Figura 1).

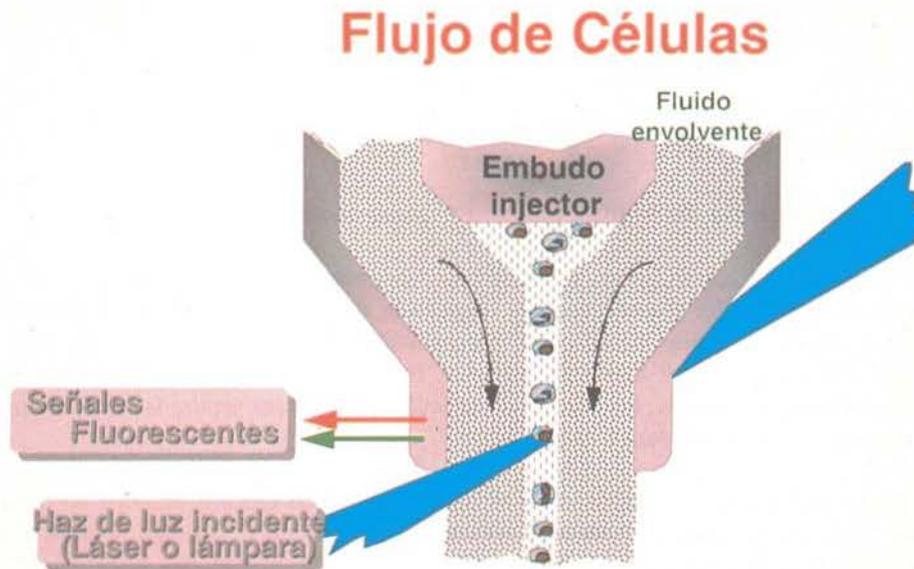


Figura 1. Detalle de una cámara de flujo típica. (Tomado y modificado de Purdue Flow Cytometry CD-ROM, vol. 1)

b) *Sistema de iluminación*: Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.

c) *Sistema óptico*: Enfoca la iluminación de las partículas de muestra, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.

d) *Sistema electrónico*: Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular («Cell Sorting»).

e) *Sistema de adquisición y análisis de datos*: En la mayor parte de los citómetros modernos, es compatible con ordenadores personales y sistemas operativos comunes (plataformas MS-DOS, Windows y Macintosh). Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista (matrices

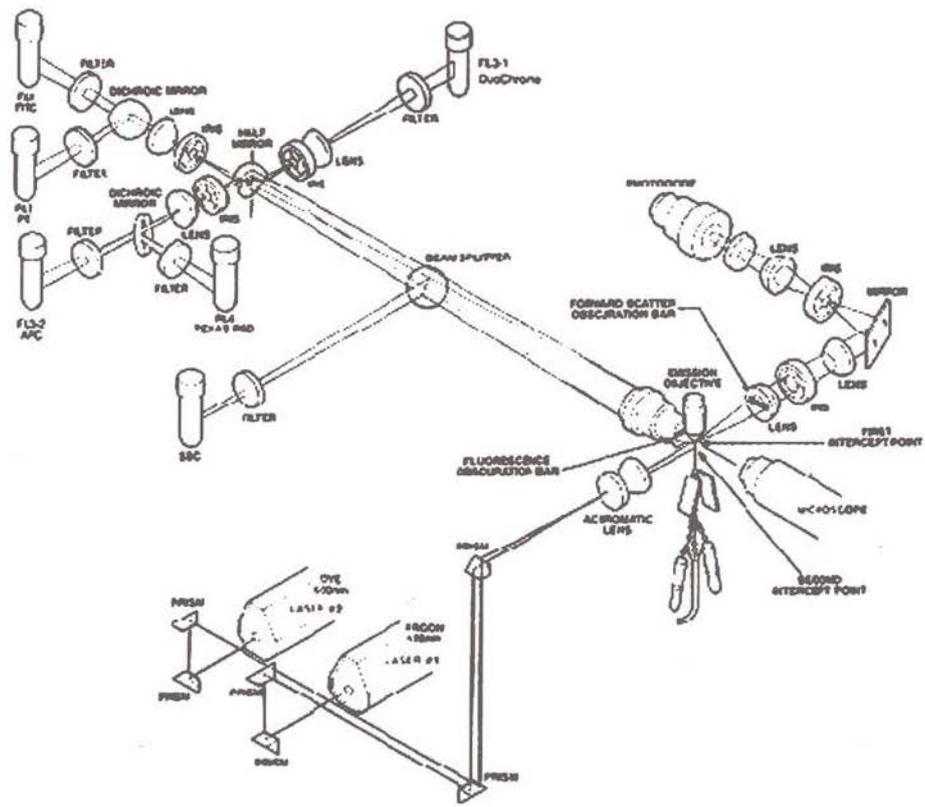


Figura 2. Esquema de un citómetro de flujo con dos láseres y capacidad de separación. FACStar PLUS (Becton-Dickinson).

de datos no correlacionados), así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas («acotamiento»). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones. Existen diferentes programas comerciales de apoyo, utilizables en ordenadores independientes y, recientemente, se dispone de interesantes programas de dominio público recuperables en Internet.

El esquema de un citómetro de flujo típico se muestra en la Figura 2.

1.1.2. Características del análisis por citometría de flujo

En sentido estricto, cualquier citómetro de flujo mide exclusivamente propiedades ópticas, es decir, luz emitida por fluorocromos o dispersada por las partículas en flujo. La conexión entre las propiedades biológicas de interés y los parámetros

ópticos detectables se establece (Figura 3) con el uso de marcadores fluorescentes adecuados, como los que aparecen clasificados, de forma amplia, en la Tabla I. Se puede obtener información extensiva acerca de las propiedades ópticas y biológicas de un elevado número de fluorocromos en los catálogos y publicaciones de las compañías que los fabrican.

Tabla I. **Tipos de marcadores fluorescentes usados en citometría de flujo.**

- 
1. Moléculas con reactividad química.
  2. Moléculas con especificidad estructural.
  3. Indicadores y quelantes fluorescentes.
  4. Substratos de enzimas.
  5. Macromoléculas y polímeros fluorescentes.
- 

Tabla II. **Parámetros biológicos analizables por citometría de flujo.**

<p>ESTRUCTURAS QUE NO REQUIEREN MARCADORES EXOGENOS</p> <p>Volumen celular Textura celular Pigmentos fluorescentes</p>	<p>FUNCIONES QUE NO REQUIEREN MARCADORES EXOGENOS</p> <p>Estado redox Viabilidad celular</p>
<p>ESTRUCTURAS QUE REQUIEREN MARCADORES EXOGENOS</p> <p>Macromoléculas Metabolitos de bajo peso Receptores específicos Regiones específicas en macromoléculas Organos subcelulares</p>	<p>FUNCIONES QUE REQUIEREN MARCADORES EXOGENOS</p> <p>Viabilidad celular Integridad de la membrana plasmática Transporte e internalización Potenciales de membrana Actividades enzimáticas específicas Síntesis de DNA Movimientos iónicos</p>

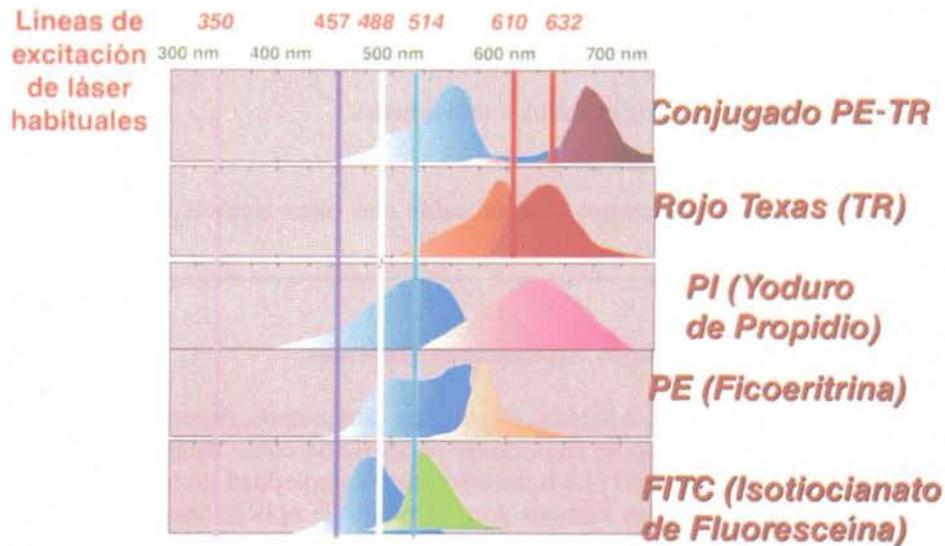


Figura 3. Características espectrométricas de algunos fluorocromos de uso frecuente en citometría de flujo. (Tomado y modificado de Purdue Flow Cytometry CD-ROM, vol. 1)

La correcta aplicación de los marcadores fluorescentes permite detectar y cuantificar sitios estructurales o seguir funciones dinámicas en las células. Sin embargo, algunas funciones o estructuras de interés biológico pueden ser estudiadas sin necesidad de incorporar marcadores fluorescentes exógenos, puesto que se pueden relacionar con la presencia de moléculas fluorescentes endógenas o con interacciones físicas específicas entre las células y la luz.

De acuerdo con las aplicaciones específicas de los fluorocromos y las propiedades de autofluorescencia, se pueden clasificar los parámetros biológicos analizables por la mayor parte de los citómetros de flujo como se muestra en la Tabla II.

Los parámetros indicados en la Tabla II pueden ser estudiados a través de otros métodos analíticos, incluso utilizando los mismos marcadores fluorescentes (p.ej., espectrofluorimetría, microscopía confocal, etc.). Sin embargo, las características técnicas especiales de la citometría permiten obtener un grado de información sobre estos parámetros que es, probablemente, único entre las técnicas actuales de análisis biológico, como se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Información generada en el análisis por citometría de flujo.

- 
1. Intensidad de expresión de parámetros en una población celular.
  2. Heterogeneidad de expresión de parámetros dentro de una población celular.
  3. Relación entre parámetros en una población celular.
  4. Relación de parámetros en células individuales.
  5. Evolución de parámetros dinámicos.
  6. Correlación con parámetros determinados con otras técnicas tras separación celular.
- 

### 1.2. La citometría de flujo: Aplicaciones generales

El desarrollo tecnológico (óptica, electrónica, anticuerpos, fluorocromos) que ha acompañado a la citometría de flujo desde su aparición como técnica accesible en los años setenta, ha supuesto una reducción en la complejidad de los instrumentos y una gran expansión en su número y en el rango de aplicaciones, tanto básicas como clínicas. De forma general, la mayor parte de las aplicaciones actuales se pueden situar entre las categorías descritas en la Tabla IV, teniendo en cuenta que muy pocas aplicaciones pertenecerían exclusivamente a un área concreta. Así, en disciplinas como la inmunología, hematología y oncología, en las que la citometría de flujo se aplica fundamentalmente a la rutina clínica, han aumentado notablemente los aspectos de investigación básica. Por otra parte, las aplicaciones desarrolladas en el laboratorio básico, especialmente en biología molecular y fisiología celular, se han adaptado a estudios clínicos y biotecnológicos.

Tabla IV. Areas actuales de aplicación de la citometría de flujo.

- 
1. Rutina clínica.
  2. Investigación clínica.
  3. Investigación básica.
  4. Biotecnología.
  5. Investigación del medio ambiente.
  6. Microbiología clínica y básica.
- 

Por último, hay que destacar el interesante desarrollo de la citometría de flujo en el estudio de microorganismos, en aplicaciones biotecnológicas, ecológicas y clínicas.

El desarrollo tecnológico ha permitido aumentar la resolución y la sensibilidad de los citómetros de flujo haciendo posible su utilización para el estudio de microorganismos.

Dentro de la Microbiología, la aplicación que ha tenido mayor aceptación es la de la detección de microorganismos en distintos medios, ya sean provenientes de alimentos o de pacientes. Esto va unido a los intentos de identificación de especies mediante citometría de flujo, aunque actualmente, no se ha podido avanzar mucho en este tema.

En estudios específicos a determinados microorganismos, sin embargo, el desarrollo de aplicaciones ha llegado a ser tan amplio como en mamíferos. Se puede estudiar el ciclo celular en levaduras y en bacterias, el estado metabólico, la presencia o ausencia de determinados enzimas, la viabilidad de los cultivos, la cantidad total de proteínas, la cantidad total de ácidos nucleicos, la expresión de determinados genes, la respuesta antes determinados agentes antimicrobianos, etc.

## 2. MOLECULAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DEL ESTRES OXIDATIVO POR CITOMETRIA DE FLUJO (CDF)

Dado que el análisis por CDF utiliza células, en este caso vivas, hay que tener en cuenta que el análisis de la actividad oxidativa puede ser complicada por la posibilidad de hallar múltiples formas de oxígeno reactivo en la misma célula. Además, el óxido nítrico puede producir los mismos cambios en las propiedades ópticas en el fluorocromo utilizado, iguales a las producidas por otras moléculas que reaccionan con el oxígeno. Agentes bloqueantes e inhibidores de enzimas pueden ayudar a dilucidar la especie responsable del cambio óptico producido en la sonda.

El análisis cuantitativo es difícil debido principalmente a tres razones:

1. La concentración variable de metales que pueden catalizar o inhibir reacciones de los radicales libres.
2. A la alta concentración intracelular de glutatión el cual puede formar radicales tiol o sulfinilo o atrapar o reducir especies de oxígeno.
3. La presencia de otros agentes colectores de radicales libres, como la espermina.

La rodamina, fluoresceína y otros fluorocromos pueden ser químicamente reducidos a formas "blancas", sin color no fluorescentes. Estos derivados reducidos son fácilmente oxidados por algunas especies de oxígeno reactivas a la forma parental fluorescente. De esta forma pueden ser utilizados como pruebas fluorogénicas para detectar actividad oxidativa en células y tejidos.

Sin embargo, su oxidación puede no ser discriminada fácilmente entre las diversas especies reactivas de oxígeno celulares (1).

Comenzaremos por describir las características de los compuestos fluorescentes comúnmente utilizados en citometría de flujo que son, el Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína (DCFH), el Dihidroetidio (HE) y la dihidrorodamina 123 (DRh123). También veremos los compuestos derivados de la rosamina y el ácido *cis*-Parinámico utilizado para estudios de peroxidación lipídica (Figura 4).

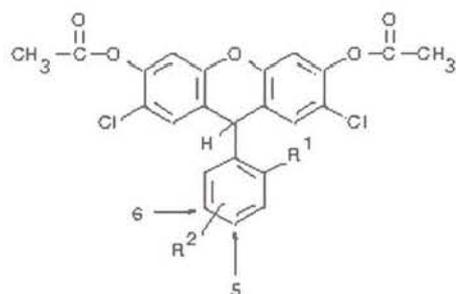
Tabla V. Características de los fluorocromos más utilizados en citometría de flujo para la detección del estrés oxidativo.

FLUOROCROMOS	Detectan (nm)	$\lambda$ excitación (nm)	$\lambda$ emisión
Rh123	Potencial de membranal mitocondrial	488	530
DCFH	Actividad peroxidasa	488	530
DRh123	Actividad peroxidasa	488	530
HE	$O_2^-$ y SOD	488	630

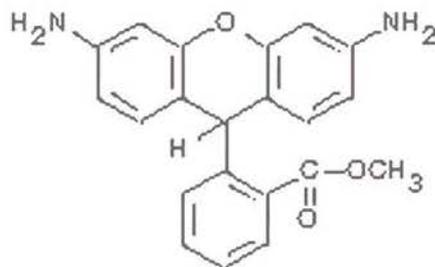
El DCFH se utiliza habitualmente para detectar las especies reactivas de oxígeno en neutrófilos y macrófagos. También se utiliza para estudiar el estrés oxidativo en fenómenos toxicológicos, así como para caracterizar estudios de estrés oxidativo dependiente de hipoxia en levaduras, y para estudiar los efectos de la isquemia y reperfusión en pulmón y tejido cardíaco. También se ha utilizado para la caracterización de mutantes termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*, efectos tóxicos en hepatocitos de rata y para seguir el efecto del TGF- $\beta$  sobre hepatocitos fetales de rata.

Como se describe en la Tabla V se puede utilizar en todos los citómetros de flujo al ser excitado a 488 nm, esta es la causa de que sea de los más utilizados.

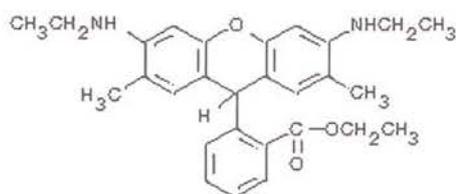
El DCFH reacciona con el peróxido de hidrógeno intracelular, esta reacción es mediada por peroxidasas, citocromo *c* o  $Fe^{2+}$ . De hecho se utiliza como sustrato fluorescente para enzimas peroxidasas.



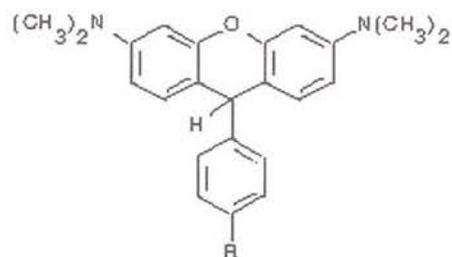
DCFH



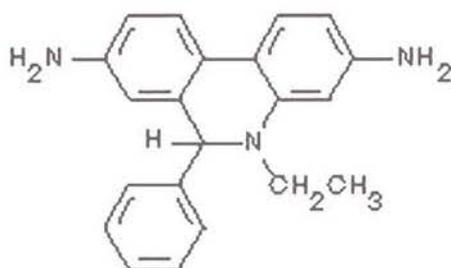
DRH123



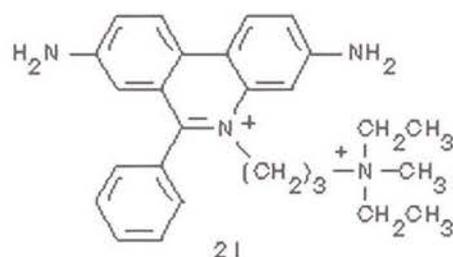
Dihidrorodamina 6G



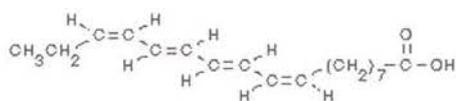
R=H Dihidrotetrametilrosamina



Dihidroetidio



Yoduro de Propidio



Acido cis-Parinárico

Figura 4. Estructura molecular de los fluorocromos más utilizados para estudiar el estrés oxidativo por citometría de flujo. El yoduro de propidio está incluido como fluorocromo discriminador de células muertas.

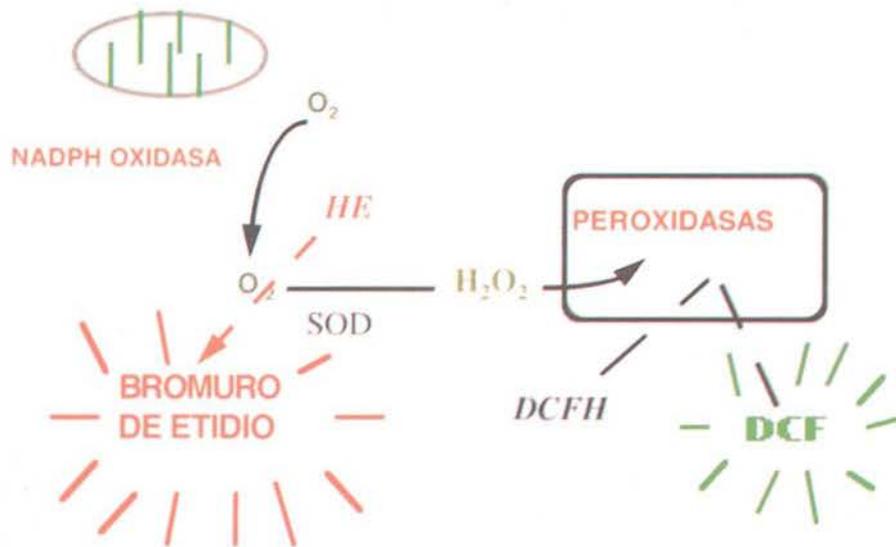


Figura 5. Mecanismo de actuación de la DCFH y del HE

La **DRh123** es el producto de la reducción del fluorocromo específico de mitocondrias Rodamina 123 (Rh123), y no es fluorescente ni está cargado. Este tinte difunde pasivamente a través de la mayoría de las membranas celulares y es oxidado a Rh123 que está cargada positivamente, que se localiza en la mitocondria. Se utiliza de igual forma que el DCFH, aunque es más sensible que éste. También se utiliza para detectar peroxinitritos (el anión formado cuando el óxido nítrico reacciona con el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno) (2, 3, 4).

El **dihidroetidio (HE)**, también conocido como hidroetidina, se utiliza habitualmente para analizar la explosión oxidativa de los macrófagos, aunque también se ha observado que se oxida significativamente en leucocitos no activados, tal vez debido al desacople de la fosforilación oxidativa. Se ha observado en células no linfoides que su fluorescencia depende de la cantidad de anión superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana de la mitocondria. Por el contrario, el DCFH y la DRh123 no pueden ser oxidadas por el anión superóxido. (Figura 5) (5, 6).

El HE citosólico fluoresce en el azul, pero una vez oxidado a etidio, se intercala en el DNA celular y fluoresce en rojo (Tabla V). Se utiliza en conjunción con DCFH para diseccionar el estrés oxidativo (5).

Los derivados reducidos de la rosamina se utilizan para aplicaciones multicolores, también cuando existen problemas de autofluorescencia con las células utilizadas, ya que emiten a mayor longitud de onda que el DCFH y la DRh123. Además se pueden citar en este apartado otras rodaminas reducidas que emiten a mayor

longitud de onda como la rodamina 6G (1). El problema que plantean es que su excitación exige láseres que no son frecuentes en los citómetros de flujo normales analizadores (Tabla VI).

Tabla VI. Características de los fluorocromos derivados de la rodamina y de la rodamina, con longitud de onda de emisión larga.

FLUOROCROMOS	EXCITACION	EMISION	UTILIZACION
<b>Dihidrorodamina 6G</b>	528 nm	551 nm	fluoresce al oxidarse
<b>Dihidrotetrametil-rodamina</b>	550 nm	574 nm	fluoresce al oxidarse
<b>CM-H<sub>2</sub>TMROS</b>	551 nm	576 nm	acumula en mitocondria
<b>CM-H<sub>2</sub>XROS</b>	578 nm	600 nm	acumula en mitocondria

El ácido *cis*-Parinámico se utiliza para detectar la peroxidación lipídica en células vivas. La gran cantidad de insaturaciones que presenta el ácido *cis*-Parinámico, le hacen fácilmente susceptible de peroxidación, disminuyendo su fluorescencia, siendo posible cuantificar la peroxidación lipídica que se produce en determinados estados (1). Su excitación necesita lámparas de Xe-Hg o láseres con emisión UV.

Las sales de tetrazolium, se utilizan para detectar el potencial redox de las células, para ensayos de viabilidad, proliferación y citotoxicidad. Algunas sales producen moléculas fluorescentes, una vez son reducidas, por lo que se pueden utilizar en citometría de flujo, tanto para conocer el estado de las células como el potencial redox en respuesta a diversos agentes (1, 7).

Otra forma de estudiar el estrés oxidativo por CDF consiste en la cuantificación de glutatión, utilizando sondas fluorescentes. Se han utilizado varias a lo largo de los últimos años, (naranja de mercurio, OPT, etc.) (8). La sonda más preferida desde hace años, es el monoclorobimano, que se excita a 325-340 nm y emite en azul. Es capaz de entrar en las células vivas y no es fluorescente hasta que se conjuga con el glutatión. Actualmente existen en el mercado otras sondas fluorescentes que se excita con láseres de Argón normales, permitiendo su uso en citómetros de flujo analizadores normales. Aunque pueden tener problemas de autofluorescencia (1, 8).

## 2.1. Aproximación experimental

Para explicar un poco más la mecánica de la detección del estrés oxidativo por CDF, vamos a exponer un caso práctico. Supongamos que queremos determinar

como afecta una concentración elevada de chocolate sobre el funcionamiento del hígado. Una vez establecido el plan de ingesta, se sacrifican los animales siguiendo el procedimiento habitual, obteniéndose una suspensión de hepatocitos, parte de los cuales son puestos en cultivo para un tratamiento posterior. El resto se tiñe con DCFH o con DRh123 (en el caso del hígado funciona mejor el DCFH, ya que su fluorescencia sólo depende de la cantidad de peróxidos y de peroxidasas. La fluorescencia final de la DRh123 depende de la actividad mitocondrial, con lo cual tenemos otro parámetro complejo). Se suele añadir una cantidad adecuada de Yoduro de Propidio (IP) para cuantificar la muerte celular (9).

Otra alícuota de hepatocitos en suspensión se puede teñir con HE para comparar su señal con la obtenida con el DCFH. En este caso no es necesaria la adición de IP, ya que ambos fluorocromos emiten en la misma longitud de onda. Observando la señal producida por cada uno de los fluorocromos podemos establecer si existe variaciones en la cantidad de peróxidos y de anión superóxido, específicamente con el HE, en los hepatocitos que provienen de animales control y los que provienen de animales con dieta rica en chocolate. Generalmente, se suele esperar un aumento de la cantidad de peróxidos en los animales tratados, ya que el chocolate suele ser un potente agente oxidante. El tratamiento de los datos lo analizaremos más adelante en el capítulo indicado (Epígrafe 4). Comparando las señales del HE con las del DCFH podemos establecer si el efecto es sólo sobre los peróxidos citoplásmicos, o es también por el aumento del anión superóxido proveniente de la actividad de la NADPH oxidasa mitocondrial (Figura 5).

Al mismo tiempo, podemos saber si alguna de las concentraciones de chocolate afecta más a la viabilidad de los hepatocitos, comparando los porcentajes de células positivas para IP, es decir, de células muertas. El IP es un fluorocromo que no es capaz de atravesar las membranas plasmáticas de células vivas, sólo de aquellas que han perdido su permeabilidad selectiva (9).

Con las células en cultivo podemos realizar otro tipo de experimentos. Tales como comprobar si los hepatocitos control son más o menos resistentes a otros agentes tóxicos, es decir, estudiar posibles efectos sinérgicos de otros compuestos (lípidos sintéticos, por ejemplo). Este tipo de estudios es más sencillo en cultivo al tener un mayor control sobre los parámetros a estudio. Además se pueden utilizar otras técnicas como la microscopía confocal (ver Capítulo específico) para visualizar los efectos de los agentes utilizados.

Otros parámetros se pueden estudiar en este caso, además del estrés oxidativo, y que pueden estar relacionados con él, como la cantidad de glutatión, variaciones en la cantidad de albúmina intracelular, mediante el uso de anticuerpos, el ciclo celular, la aparición de apoptosis, las variaciones del potencial de membrana mitocondrial, fluctuaciones del pH intracelular, etc.

La citometría de flujo permite estudiar varios parámetros a la vez, y célula a célula, con lo que la cantidad de información obtenida puede ser enorme.

### 3. APLICACIONES

#### 3.1. Fisiológicas

Uno de los usos más habituales de la CDF en el estudio del estrés oxidativo es el análisis de la explosión oxidativa de los neutrófilos y macrófagos después de fagocitar agentes infecciosos (Figura 6) (10, 11, 12, 13). Existen en el mercado productos que cuantifican el porcentaje de células que responden a la fagocitosis con la explosión oxidativa y la intensidad de la misma, en función de la cantidad de fluorescencia emitida por cada célula. Se basan en la utilización de DRh123 e HE como sustratos de las peroxidadas (11, 12). De esta forma se ha podido establecer el efecto de citoquinas anti-inflamatorias o promotoras de la inflamación sobre la explosión oxidativa en neutrófilos de pacientes con VIH y afectación de pulmón (14).

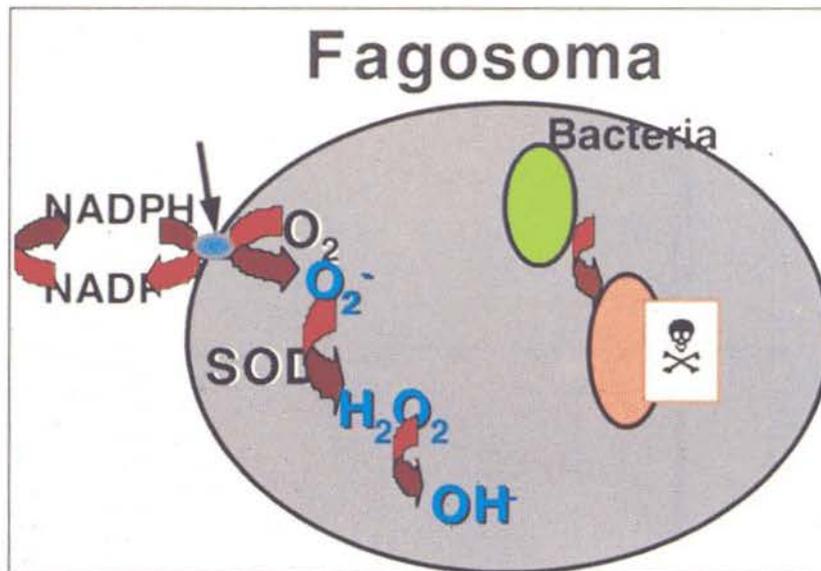


Figura 6. Producción de peróxidos durante la explosión oxidativa en los fagocitos.

Dentro de la fisiología normal de las células se ha utilizado la CDF para cuantificar los cambios en la cantidad de peróxidos en diferentes tipos celulares en función de la edad, incluso en mitocondrias (15). También se ha estudiado el efecto de sustancias naturales, como extractos de *Ginkgo biloba*, sobre el estrés oxidativo, generalmente en neuronas enfrentadas a altas cantidades de peróxido de hidrógeno (16, 17). De hecho, de estos estudios se ha establecido el poder antioxidante de estos extractos.

Otro de los campos donde la CDF ha mostrado su versatilidad ha sido en el estudio del estrés oxidativo y apoptosis (17, 18). Por cercanía y lo poco habitual del estudio, detallaremos el caso de cultivos de hepatocitos fetales de rata tratados con TGF- $\beta$  (19). El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento de estas células, pero puesto en concentraciones mayores es capaz de inducir muerte por apoptosis (Fig. 7-1). Estudios de expresión génica demuestran que el mRNA para c-fos está aumentado en las células tratadas con TGF- $\beta$ , además se comprobó que AP-1, un factor de transcripción activado durante el estrés oxidativo, en respuesta a la expresión de c-fos, también aumenta su presencia en el núcleo de estas células. Se estudió mediante la fluorescencia debida al DCFH el momento en el que aparece la inducción de especies reactivas de oxígeno y se constató que siempre preceden la muerte por apoptosis inducida por el TGF- $\beta$  (Figura 7-2). De esta forma se pueden estudiar otros efectos del estrés oxidativo sin medir directamente las especies reactivas de oxígeno, sino otro parámetro, presumiblemente afectado, como es la señal de DNA, las variaciones de calcio intracelular o el pH (20, 21, 22)

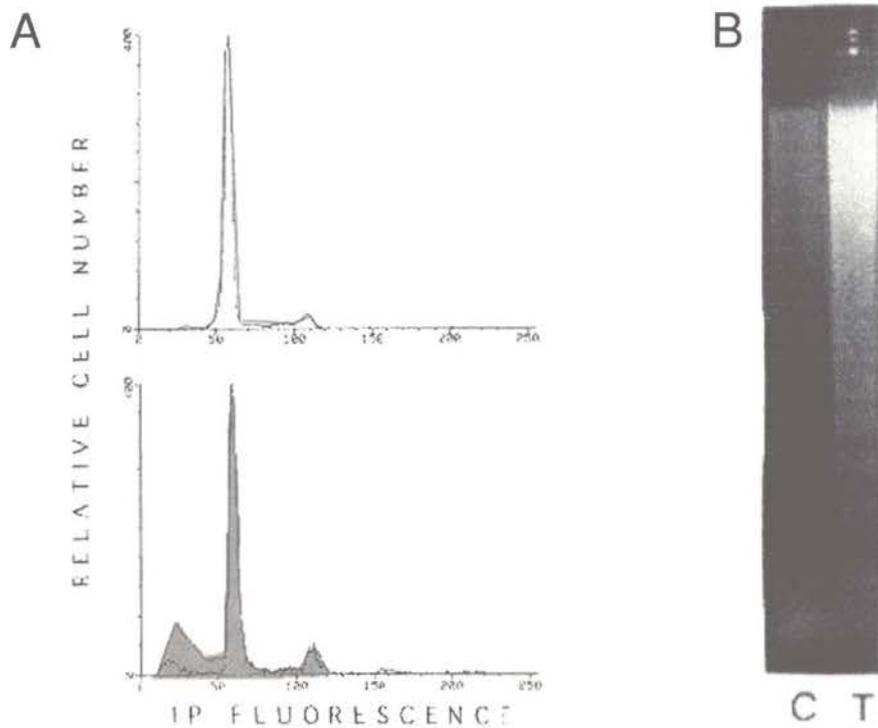


Figura 7-1. Demostración por citometría de flujo de la apoptosis producida por el TGF- $\beta$  en hepatocitos fetales de rata. En el panel A se presenta el ciclo celular de hepatocitos control (arriba) y de hepatocitos tratados con TGF- $\beta$  (abajo), donde se muestra la aparición de células hipodiploides, es decir células que han muerto por apoptosis. En el panel B se muestra la confirmación del proceso apoptótico inducido por el TGF- $\beta$  en los hepatocitos mediante un gel de agarosa que presenta la fragmentación típica del DNA de las células apoptóticas.

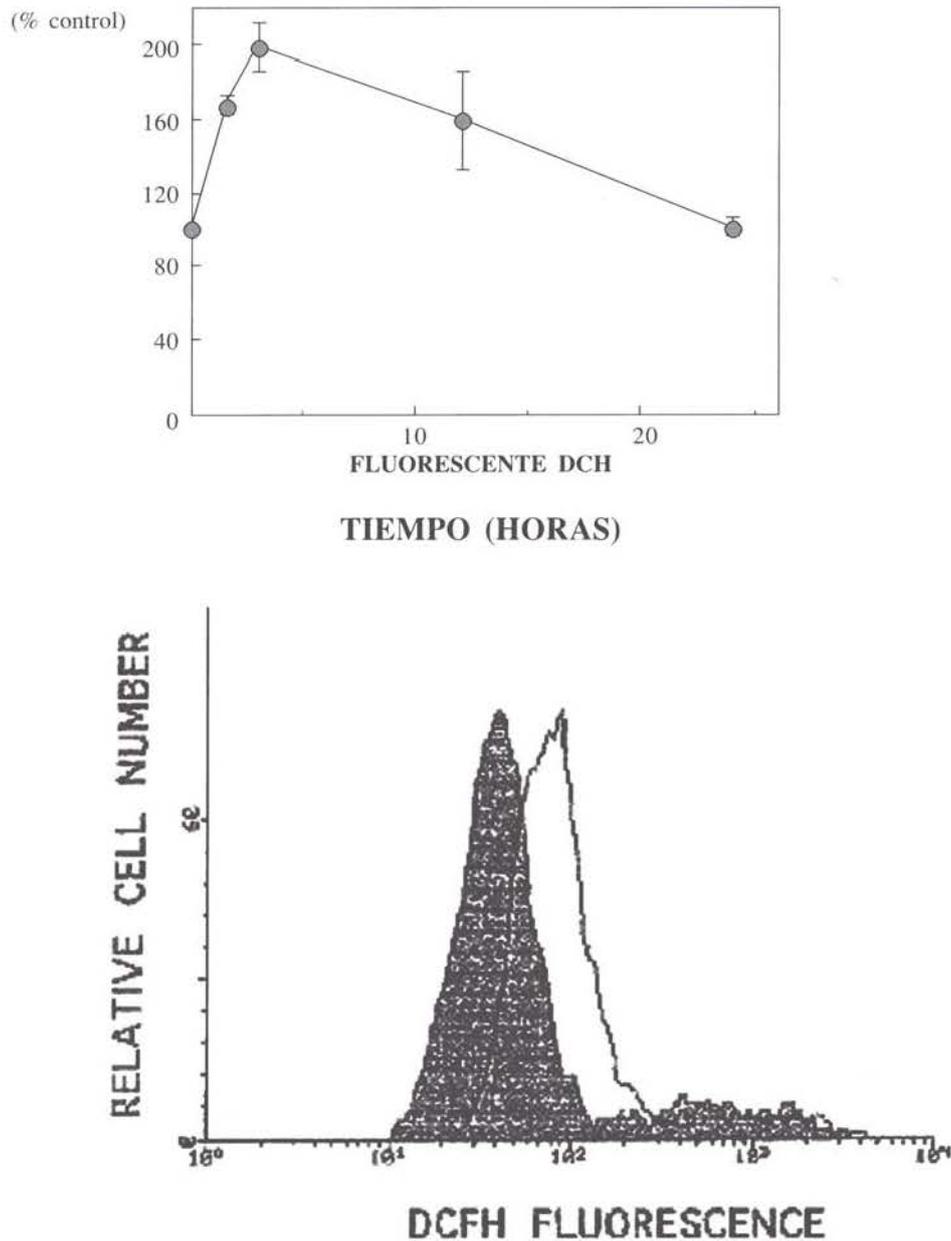


Figura 7-2. Medida del estrés oxidativo mediante tinción con DCFH, de hepatocitos fetales de rata tratados y sin tratar con TGF- $\beta$ . En el panel inferior se presenta el resultado de un experimento tipo donde la fluorescencia proveniente de las células control (perfil opaco), es menor que la fluorescencia de los hepatocitos tratados (perfil transparente). En el panel superior se representa el tiempo donde la fluorescencia de las células tratadas es mayor a las 5-8 horas del tratamiento, mientras que la apoptosis es máxima a las 8-12 horas del mismo, con lo que se demuestra que el estrés oxidativo precede al proceso apoptótico.

### 3.2. Toxicología

La CDF y la existencia de sondas fluorescentes que sean sensibles a los cambios de cantidad de peróxidos intracelulares, son muy útiles para el estudio de los efectos de agentes tóxicos sobre determinadas células, sobre todo en hepatocitos, que son las células destoxicantes por excelencia. Múltiples estudios se han realizado sobre el efecto de diversos agentes tóxicos (alcohol, cocaína, tioacetamida, etc.) en los cuales se ha utilizado DCFH para cuantificar el aumento o disminución que el agente tóxico produce en los hepatocitos, ya sea *in vivo* o en cultivo (23, 24, 25, 26).

También se ha utilizado la CDF para estudiar otros parámetros que pueden ser afectados por el agente tóxico, como el ciclo celular (midiendo la cantidad de DNA a lo largo del tiempo y estudiando la aparición de aneuploidías, o las variaciones que sufre el potencial de membrana mitocondrial durante el mismo tiempo, etc). Estas experiencias son descritas en otros capítulos de este libro, por lo que sólo son mencionadas aquí.

### 3.3. Microbiología

La utilización de la CDF y de fluorocromos para estudiar el estrés oxidativo en microorganismos, no está muy desarrollado. Se ha utilizado DCFH para estudiar el aumento de peróxido de hidrógeno en levaduras expuestas a hipoxia, durante su crecimiento (26). También se han utilizado las sales de tetrazolium para detectar actividad y viabilidad de bacterias expuestas a distintos condicionantes ambientales (28). En nuestro laboratorio se utiliza el DCFH y el HE como pruebas establecidas para estudiar el fenotipo de levaduras mutantes, de las cuales no se conoce la funcionalidad del gen afectado (Figura 8-1, 8-2, 9) (29). Según nuestras observaciones es un dato importante ya que algunos mutantes líticos en determinadas condiciones aumentan la cantidad de peróxidos, medido por CDF, antes de perder la permeabilidad selectiva de la membrana (30).

Sin embargo, la cuantificación de peróxidos es un parámetro importante cuando se estudia el efecto de antibióticos sobre microorganismos patógenos, ya que, algunas veces ocurre que el efecto del antibiótico va precedido por un aumento de peróxidos intracelulares, una especie de respuesta al estrés producido por el agente antibiótico (Figura 9). Este es uno de los campos donde se ampliará más la detección de peróxidos en Microbiología.

## 4. ANALISIS DE DATOS Y CUANTIFICACION DE RESULTADOS

Como se ha mencionado en la parte dedicada a la introducción a la CDF, existen diversos programas informáticos que realizan el análisis de los datos. Este análisis,

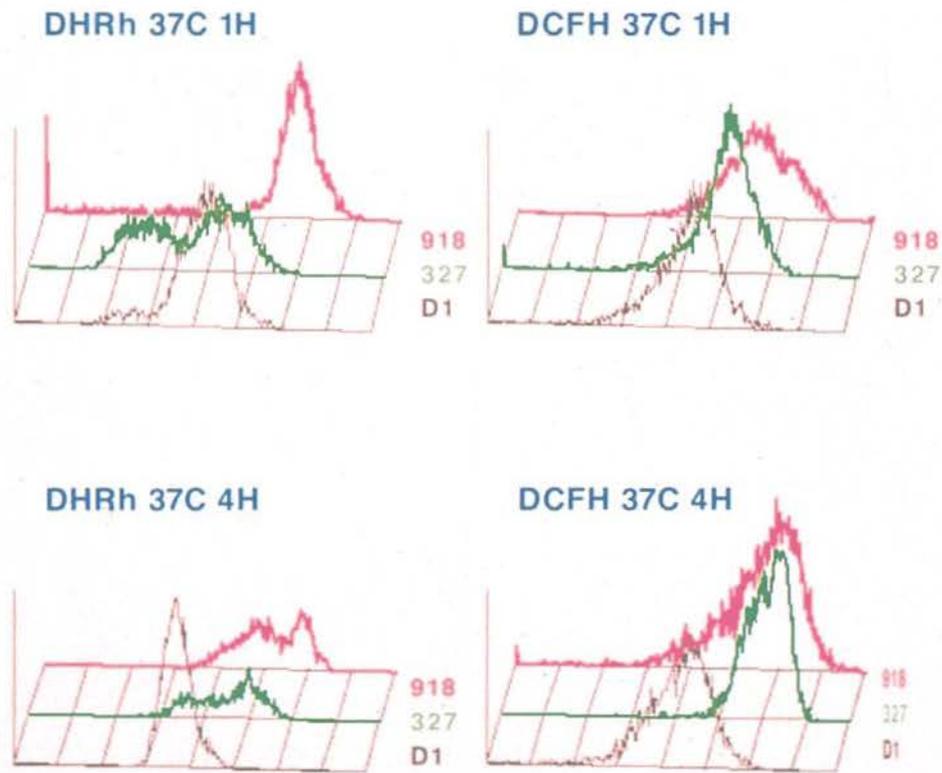


Figura 8-1. Estudio comparativo de la cantidad de peróxidos en cepas mutantes termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando DCFH, columna de la derecha y DRh123, columna de la izquierda. Se observa que a mayor tiempo puestos a la temperatura no permisiva de 37°C, mayor es la cantidad de peróxidos en las cepas 327 y 918, mientras que los controles (D1) no varía la señal fluorescente. Los resultados son similares con las dos sondas utilizadas.

generalmente, se basa en la obtención de porcentajes y de intensidad media de fluorescencia. Por lo tanto, el análisis de los resultados se basa en la comparación de los porcentajes en cada una de las situaciones y, según el estudio que se realiza, el de las medias de intensidad de fluorescencia. Para que estos resultados tengan validez estadística, es necesario la repetición de cada experimento un número determinado de veces para poder realizar algún análisis de comparaciones de medias o de comparación de distribuciones, en el caso de análisis temporales, tales como curvas de crecimiento.

Por lo general, se repiten los experimentos un mínimo de 5 veces, dependiendo un poco de la variabilidad que presentan las observaciones. De esta forma, los resultados obtenidos, al comparar las medias mediante una t de Student, por ejemplo, son lo suficientemente significativos como para no presentar problemas de

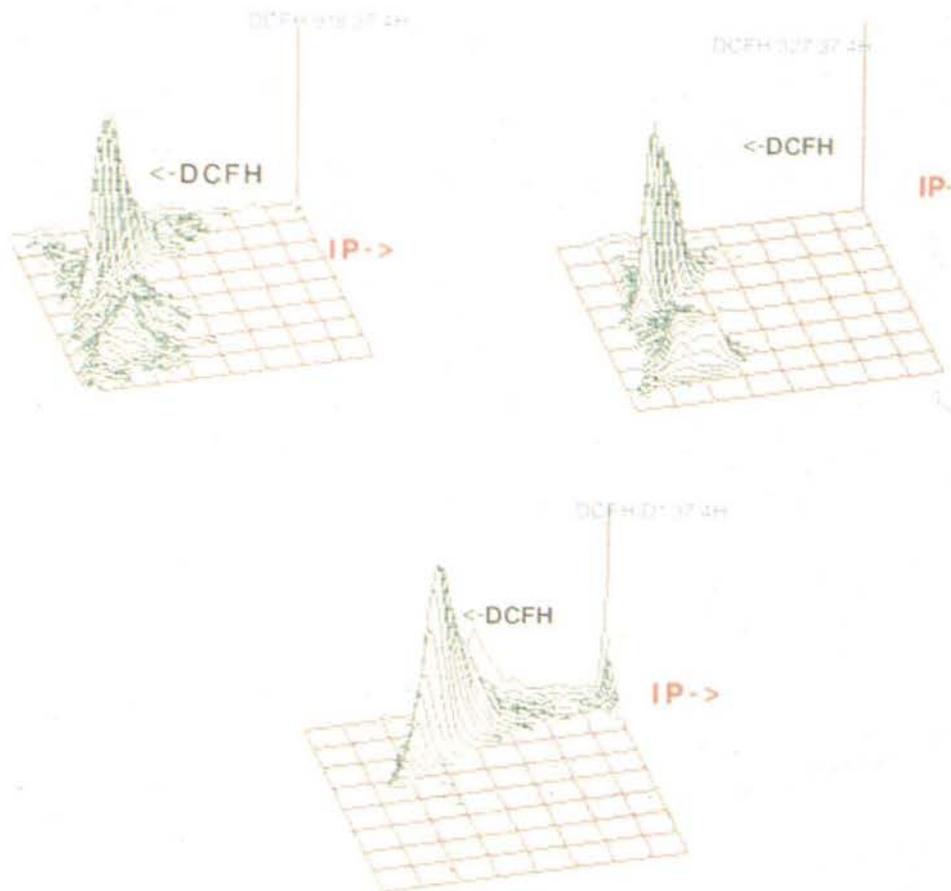


Figura 8-2. Representación tridimensional de la cantidad de peróxidos (DCFH) en abcisas, la fluorescencia debida al Yoduro de Propidio (IP) en ordenadas y del número relativo de células en el eje Z, de las dos cepas termosensibles y el control. Se puede observar como aumenta la población IP+ en las cepas termosensibles, mientras que en la cepa control no.

interpretación. Esto significa que los resultados se presentan en tablas y, dependiendo del tipo de experimentación, se añade algún gráfico representativo del comportamiento citométrico de las células (Figuras 8-2, 10, 11).

Cuando los datos provenientes de los controles presentan variaciones importantes debidas a cuestiones intrínsecas del sistema, se suele utilizar el porcentaje de variación respecto del control. De esta forma, si las variaciones absolutas entre el control y el problema, no se discriminan entre distintos experimentos, pero sí dentro

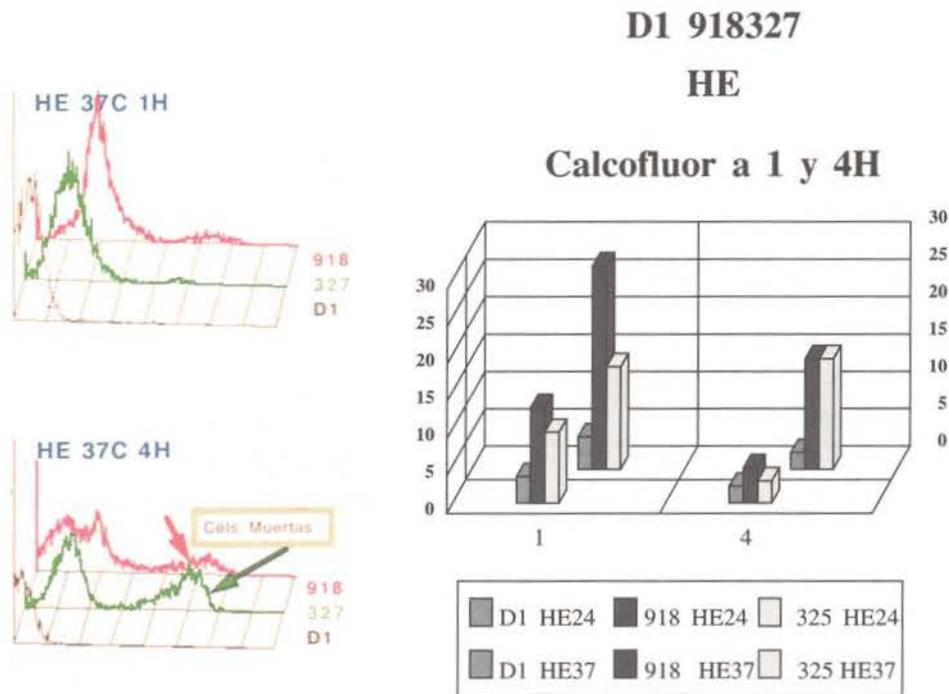


Figura 9. Demostración del efecto del calcofluor sobre las cepas termosensibles, tanto sobre la producción de peróxidos como sobre la muerte celular, al utilizar como fluorocromo Hidroetidio. En el caso de las células muertas la cantidad de fluorocromo que se incorpora es mayor, y debido a la presencia de anión superóxido en las células se oxida a etidio que se une al DNA, fluoresciendo en mayor medida que las células vivas. Dentro de estas últimas es posible distinguir el distinto comportamiento en cuanto a la peroxidación, observando como se desplaza el pico de la izquierda en cada caso. Nótese que los perfiles de la cepa control D1 no aumentan en ningún momento, demostrando que a las concentraciones utilizadas de antibiótico (siempre por debajo de la CMI) no se afecta su viabilidad, ni se produce un aumento de la cantidad de peróxidos. Panel derecho. Cuantificación de la cantidad de peróxidos producidos por las 3 cepas estudiadas a 1 y a 4 horas de incubación con calcofluor. Se representa la intensidad media de fluorescencia en cada caso, medida como unidades arbitrarias. Se obtiene de este modo, una representación semicuantitativa en la que se puede comparar el comportamiento de las cepas termosensibles con el de la cepa control y sacar las conclusiones correspondientes.

del mismo experimento, se comparan las variaciones en cada caso, pudiendo realizarse, igualmente, estudios estadísticos (Figura 11).

En el caso específico del análisis del estrés oxidativo las variaciones de un experimento suelen ser grandes, debido a las características de las moléculas a estudiar y del material utilizado (ver epígrafe 2). Sin embargo, las variaciones entre los controles y las muestras problemas suelen ser constantes dentro de cada expe-

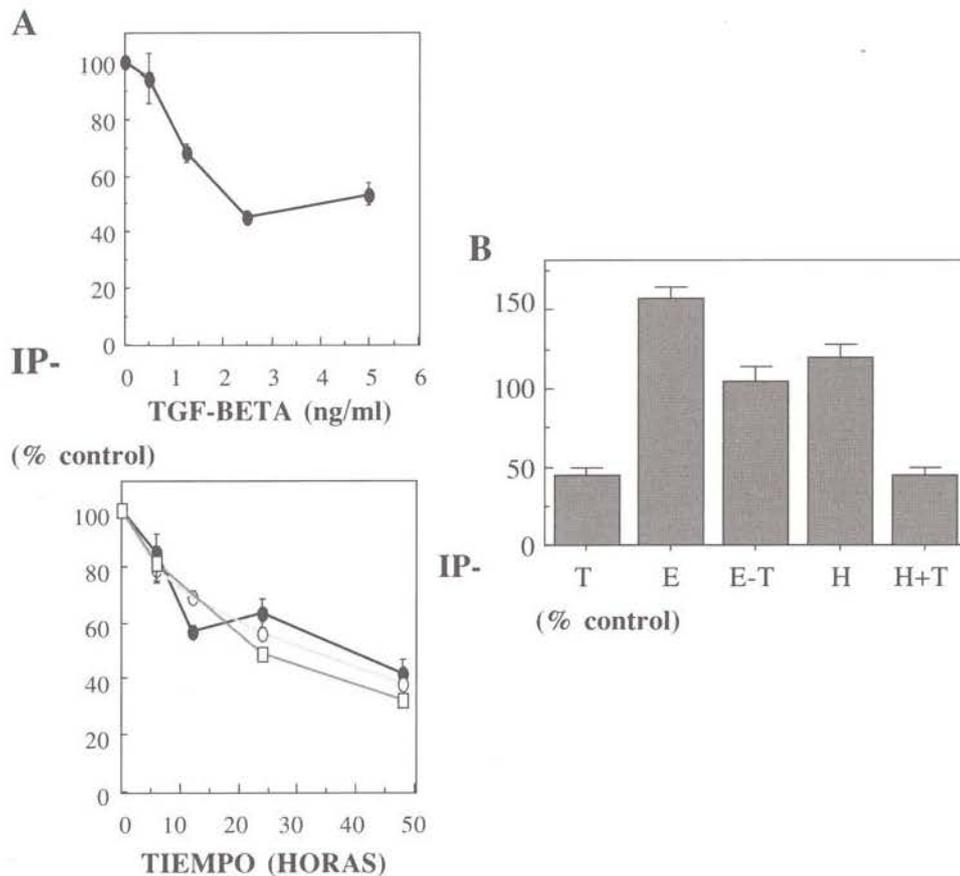


Figura 10. Cuantificación del efecto del TGF- $\beta$  sobre la viabilidad de las células en cultivo, en función de la concentración utilizada (arriba) y del tiempo de incubación para cada concentración (abajo). La cuantificación se realiza mediante el análisis por CDF del porcentaje de células positivas para IP, es decir, de células que han perdido su permeabilidad selectiva y permiten el paso de las moléculas de IP, las cuales se unen a los ácidos nucleicos de doble cadena y fluorescen al ser excitados con luz de 488 nm. Se toma el porcentaje de células IP+ del control como 100 y se representa el de los demás casos en función suya, por lo que las posibles variaciones debidas al experimento se diluyen y se observa sólo el efecto de la sustancia a estudio. B) Distinta representación de los datos obtenidos como en A) pero en este caso, las sustancias son varias, por lo que se representan los % como barras, para que no se complique en exceso la figura.

rimento, por lo que la forma habitual de presentar los resultados es en porcentajes de variación respecto del control (Figura 10).

Lo primero a tener en cuenta en este tipo de experimentos es utilizar en el análisis estadístico los datos provenientes de células vivas, por lo que importante utilizar por defecto siempre IP para discriminar células muertas. Se debe acotar la

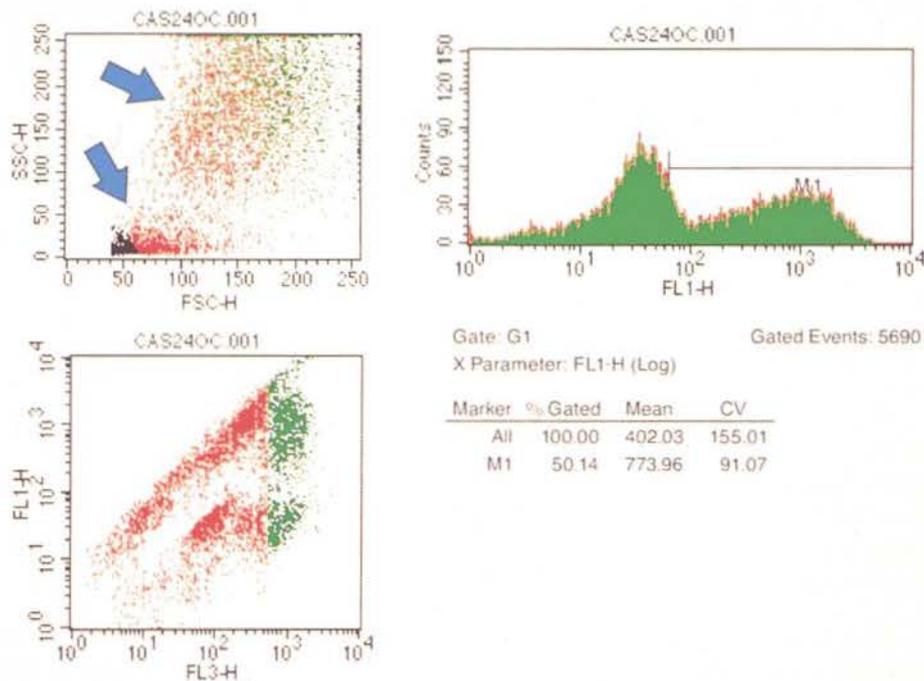


Figura 11. Representación del análisis multiparamétrico (tamaño, complejidad, fluorescencia debida al DCFH y fluorescencia debida al IP) del estrés oxidativo en hepatocitos provenientes de ratas tratadas con cocaína durante 24h. A) Histograma biparamétrico del tamaño (FSC-H, en abcisas) y de la complejidad celular (SSC-H) en ordenadas. Se observan distintas nubes de puntos (flechas) que muestran el tamaño heterogéneo que presentan los hepatocitos recién extraídos del hígado, mostrando distinto grado de maduración. B) Histograma biparamétrico de la fluorescencia debida al DCFH (FL1-H, ordenadas) y al IP (FL3-H, abcisas) de las mismas células representadas en A). En color verde se muestran las células que son positivas para el IP, es decir muertas, y en rojo las negativas para el IP, es decir, vivas. Dentro de éstas células comprobamos que existen distintas poblaciones en función de la fluorescencia que tienen debida al DCFH. C) Histograma uniparamétrico de la fluorescencia debida al DCFH de las células que están fuera de las seleccionadas como positivas para IP, es decir las de color rojo en el histograma B). De esta forma comprobamos que la heterogeneidad que presentan estos hepatocitos en cuanto a la señal de DCFH, vislumbrada en el histograma B), se puede contabilizar en el histograma C). M1 representa las células más positivas para DCFH, es decir, las que están sufriendo el estrés oxidativo. Debajo de C) se representan los datos tal cual los da el programa informático. Se obtiene el % de células que está en M1 y la intensidad media de fluorescencia. Estos datos son los que se pueden representar y los que se usan para comparar el comportamiento de las células frente a distintos estímulos, en este caso la cocaína.

población de células vivas, es decir, IP negativas. Una vez acotada esta población, el análisis de los datos puede ser más o menos automático, al disponer los histogramas de análisis acotados para esta población y obteniendo automáticamente los dos datos de importancia, que son el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia, en cada caso. Se toman estos datos y se realiza el análisis estadístico, obteniendo los datos finales en forma de tabla.

Más complicado puede presentarse el análisis de los datos provenientes de poblaciones heterogéneas, habitual cuando se trata con células obtenidas de cultivos primarios o directamente del animal. La complicación es más conceptual que del análisis, ya que hay que encontrar explicación a las distintas poblaciones. En estos casos, es necesario realizar un análisis multiparamétrico para encontrar otras posibles diferencias entre estas poblaciones. Suele ocurrir que se corresponden con células de distinto tamaño, sobre todo cuando provienen directamente del animal. Esto implica que se puede tratar de macrófagos (que suelen tener un alto nivel basal de peróxidos) y de otro tipo celular, generalmente el que se intenta estudiar. Por lo tanto, si acotamos por tamaño (31), podemos aclarar la situación.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún método para obtener datos absolutos de cantidad de peróxidos por CDF. Como se ha explicado hasta ahora, los datos que se obtienen son semicuantitativos y provienen de células individuales. Los datos cuantitativos se obtienen mediante ensayos enzimáticos de extractos (todas las células) y medido por fluorimetría o colorimetría. En el caso de poblaciones mezcladas o con distinta cantidad de peróxidos y que respondan de distinta forma a los estímulos del experimento, se obtienen datos erróneos, que no se corresponden, posteriormente, con los obtenidos por CDF.

Aunque no cuantitativos, los datos obtenidos por CDF han sido lo suficientemente útiles como para ser aceptados por la comunidad científica de forma general (ver bibliografía básica).

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como hemos tratado de exponer, la citometría de flujo es una herramienta determinante a la hora de estudiar el estrés oxidativo.

Se han comercializado productos para medir específicamente la explosión oxidativa en los neutrófilos y macrófagos por CDF, llegando a ser de uso universal. La cuantificación relativa de los peróxidos celulares de los neutrófilos, se ha convertido en una forma usual de estudiar determinadas patologías linfopoyéticas. Se ha llegado a aplicar a estudios sobre efectos inmunosupresores en pacientes anoréxicas.

En investigación básica la CDF ha sido clave para observar efectos diferenciales en distintos tipos celulares, (Datos Portolés), y para el estudio toxicológico del hígado. Además de su utilización rutinaria para el estudio de la relación entre apoptosis y el estrés oxidativo (19, 20, 21).

Esto es sólo una ínfima parte de todas las posibilidades que ofrece la citometría de flujo para el estudio del estrés oxidativo.

Los nuevos productos que se comercializan (JC-1, la familia de los CM-ROS, los nuevos fluorocromos para cuantificar glutathion y la actividad glutathion-sintetasa

que se excitan en el visible, etc.) y nuevas tecnologías (nuevas porque no se han utilizado hasta ahora en este campo), como la microscopía confocal (ver capítulo sobre estudio del estrés oxidativo por microscopía confocal) abren una nueva fase del estudio de los radicales libres. No sólo nos permiten una cuantificación más exacta y resolutive por citometría de flujo, sino que permitirán la localización de las células que más responden ante determinados estímulos en un cultivo primario, y la posible compartimentalización celular de la respuesta ante el agente productor del estrés oxidativo.

Esto lo podremos realizar utilizando la microscopía confocal con las mismas células a las cuales hemos utilizado para el estudio por CDF. Es decir, obtendremos un dato semicuantitativo por CDF y una confirmación y una localización de lo que hemos observado en el citómetro, mediante la microscopía confocal. El futuro está ya aquí.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Haugland RP. Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes Inc, 6.<sup>ª</sup> De., Oregon, 1996.
2. Trayner ID (1995), Quantitative Multiwell Myeloid Differentiation Assay Using Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (H2DCF-DA) or Dihydrorhodamine 123 (H2R123). *J Immunol Meth* 186: 275-278.
3. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H (1995), Peroxynitrite-Mediated Oxidation of Dihydrorhodamine 123 Occurs in Early Stages of Endotoxic and Hemorrhagic Shock and Ischemia-Reperfusion Injury. *FEBS Lett* 372: 229-234.
4. Ischiropoulos H, Szabo C, Salzman AL (1996), Reactions of Nitric Oxide and Peroxynitrite with Organic Molecules and Ferritorseradish Peroxidase: Interference with the Determination of Hydrogen Peroxide. *Free Rad Biol Med* 20: 373-379.
5. Rothe G, Valet G (1990), Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes with Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol* 47: 440-448
6. Miles AM (1996), Modulation of Superoxide-Dependent Oxidation and Hydroxylation Reactions by Nitric Oxide. *J Biol Chem* 271: 40-45.
7. López-Amorós R, Mason DJ y Lloyd D, Use of 2 oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry. *J. Microbiol Methods* 22: 165-176.
8. Hedley DW y Chow S (1994), Evaluation of Methods for Measuring Cellular Glutathione Content Using Flow Cytometry. *Cytometry* 15: 349-353.
9. De la Fuente JM, Alvarez AM, Nombela C y Sánchez M (1992), Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8: 39-45.
10. Rothe G, Emmendörffer A, Osser A, Roesler J y Valet G (1991), Flow Cytometric Measurement of the Respiratory Burst Activity of Phagocytes Using Dihydrorhodamine 123. *J Immunology Meth* 138: 133-135.
11. Vowells SJ (1995), Flow Cytometric Analysis of the Granulocyte Respiratory Burst: A Comparison Study of Fluorescent Probes. *J Immunology Meth* 178: 89-92.
12. Peticarari S, Presani G, E Banfi E (1994), A New Flow Cytometric Assay for the Evaluation of Phagocytosis and the Oxidative Bursts in Whole Blood. *J Immunol Meth* 170: 117-121.
13. Filatov MV, Varfolomeeva EY, Ivanov EI (1995), Flow Cytofluorometric Detection of Inflammatory Processes by Measuring Respiratory Burst Reaction of Peripheral Blood Neutrophils. *Biochem Mol Med* 55: 116-120.

14. Gougerot-Podicalo MA, Elbim C, Chollet-Martin S (1996), Modulation of the oxidative burst of human neutrophils by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathol Biol* 44: 36-41.
15. Sastre J, Plá R, Juan G, Millán A, Pallardó F, García de la Asunción J, Martín JA, O'Connor E, Droy-Lefaix MT y Viña J (1996), Prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) of age-associated impairment of Brain mitochondria.
16. Oyama Y, Chikahisa L, Ueha T, Kanemaru K, Noda K (1996), Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res* 712: 349-352.
17. Ni Y, Zhao B, Hou J, Xin W (1996), Preventive effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis in rat cerebellar neuronal cells induced by hydroxyl radicals *Neurosci. Lett* 214: 115-118.
18. Packham G, Ashmun RA, Cleveland JL (1996), Cytokines Suppress Apoptosis Independent of Increases in Reactive Oxygen Levels. *J Immunology* 156: 2792-2795.
19. Sánchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I (1996), Apoptosis induced by transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 271, 7416-7422.
20. Peled-Kamar M, Lotem J, Okon E, Sachs L, Groner Y (1995), Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *EMBO J* 14: 4985-4993.
21. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B y Kroemer G (1995), Sequential reduction of mitochondrial transmembrane Potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182, 367-377.
22. Verhaegen S, McGowan AJ, Brophy AR, Fernandes RS, Cotter TG (1995), Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem. Pharmacol* 50: 1021-1029.
23. Cascales M, Alvarez AM, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L (1994), Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* 20: 992-1001.
24. Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez AM y Cascales M (1995), Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* 16: 1585-1593.
25. Fogt F, Nanji AA (1996), Alterations in nuclear ploidy and cell phase distribution of rat liver cells in experimental alcoholic liver disease: relationship to antioxidant enzyme gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 136: 87-93.
26. Díaz-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez AM y Cascales M (1993), Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 18: 912-918.
27. Yurkow EJ y McKenzie, MA (1993) Characterization of hypoxia-dependent production in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* using flow cytometry: a model for ischemic tissue destruction. *Cytometry* 14: 287-293.
28. López-Amorós R, Comas J y Vives-Rego J (1995), Flow cytometric assesment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimorium* starvation survival in seawater using, rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Environ. Microbiol* 61: 2521-2526.
29. Alvarez Barrientos A, O'Connor Blasco JE y Sánchez Pérez M (1996), La citometría de flujo y el estudio de microorganismos de importancia industrial y clínica, *Industria Farmacéutica* 5: 87-90.
30. Gutiérrez Blázquez, D (1995), Uso de la citometría de flujo y de la microscopía confocal para la caracterización fenotípica de mutantes de levaduras. Memoria Master Biotecnología, Univ. Complutense de Madrid.
31. Portolés, MT, Arahetes, RM y Pagani, R (1994), Intracellular calcium alterations and free radical formation evaluated by flow cytometry in endotoxin-treated rat liver Kupffer and endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 65: 200-205.

### 6.1. Bibliografía básica en citometría de flujo

- Howard M. Shapiro (1995), *Practical Flow Cytometry*, 3ª ed. Wiley-Liss, New York.
- Lloyd D, ed. (1993), *Flow Cytometry in Microbiology*. Springer, London.
- Ken D. Bauer, Kenneth Ault, eds. (1993), *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- J. Paul Robinson, ed. (1993), *Handbook of Flow Cytometric Methods*. Wiley-Liss, New York.
- Alice L. Givan (1992), *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss, New York.
- Andreas Raadbruch (1992), *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer, Berlin.
- James V. Watson (1991), *Introduction to Flow Cytometry*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Myron R. Melamed et al., eds. (1990), *Flow Cytometry and Sorting*, 2ª ed., Wiley-Liss, New York.
- Michael G. Ormerod, ed. (1990), *Guide to Flow Cytometric Methods. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

---

## MICROSCOPIA CONFOCAL Y ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS

ROBERT C. CALLAGHAN<sup>1</sup>, JOSE ENRIQUE O'CONNOR<sup>2</sup>  
Y ALBERTO ALVAREZ BARRIENTOS<sup>3</sup>

Departamento de Patología<sup>1</sup> y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular<sup>2</sup>,  
Universidad de Valencia.  
Centro de Citometría y Microscopía Confocal, Universidad Complutense de Madrid<sup>3</sup>

### SUMARIO

---

1. BASES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL
2. APLICACIONES AL ESTUDIO DEL ESTRES OXIDATIVO
3. TECNICAS DE TINCIÓN E INDICADORES FLUORESCENTES
  - 3.1. Detección de radicales libres
  - 3.2. Detección del daño oxidativo
4. ESTRES OXIDATIVO INDUCIDO POR ETANOL
  - 4.1. Aplicación de la microscopía confocal
  - 4.2. Generación de radicales libres en la mitocondria
  - 4.3. Generación de radicales libres en el retículo endoplásmico
5. ESTRES OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL
  - 5.1. Aplicación de la microscopía confocal
  - 5.2. Daño neuronal excitotóxico
  - 5.3. Péptido  $\beta$ -amiloide de la enfermedad de Alzheimer
6. ESTRES OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR
  - 6.1. Aplicación de la microscopía confocal
  - 6.2. Factor de necrosis tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ )
  - 6.3. Transición de permeabilidad mitocondrial
7. BIBLIOGRAFIA

## 1. BASES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

Una extensa y detallada descripción del fundamento y metodología de la microscopía confocal puede hallarse en manuales especializados (1, 2).

La característica esencial de un sistema de imagen confocal es que la zona de iluminación y la de detección están siempre confinadas en un mismo punto del espécimen en cualquier momento. Si el punto es tan pequeño que sus límites están impuestos por la difracción, la resolución conseguida en este caso es mayor que la obtenida en un sistema convencional. La resolución lateral puede acercarse al máximo teórico, incrementando 0,7 veces la resolución convencional.

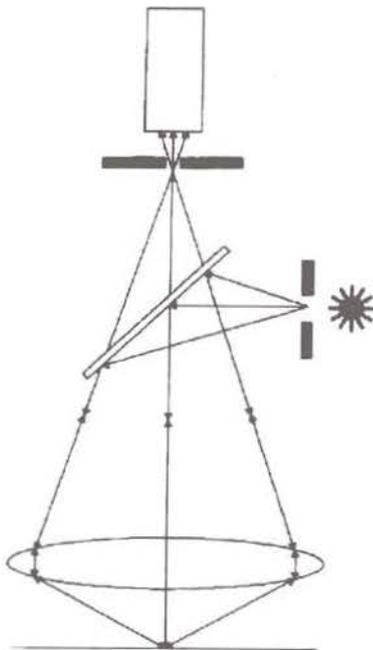


Figura 1. Sistema de imagen confocal de epi-iluminación.

Sin embargo, la propiedad fundamental y distintiva de la imagen confocal es que sólo lo que está enfocado es detectado. Las áreas de la muestra, fuera de foco, aparecen negras, y no contribuyen a la formación de la imagen.

Existen muchos diseños de sistemas de imagen confocal. Uno de los más utilizados es la epi-iluminación, que utiliza la misma lente como condensador y objetivo, obviando la necesidad de ajustar y co-orientar dos lentes. La luz proveniente de la apertura es reflejada en la zona posterior de la lente objetivo y enfocada en la muestra. La luz que retorna desde la muestra, como resultado de la refracción o de la fluorescencia, vuelve a pasar a través de la lente y es dirigida hacia una segunda apertura, lo cual permite que una porción de haz de luz pase a un detector tal como un fotomultiplicador (Figura 1).

Como es comprensible, un sistema de imagen confocal no produce una imagen óptica completa del espécimen. Para obtener una imagen completa es necesario que el punto de detección sea «pasado», o que barra, la superficie del campo de visión.

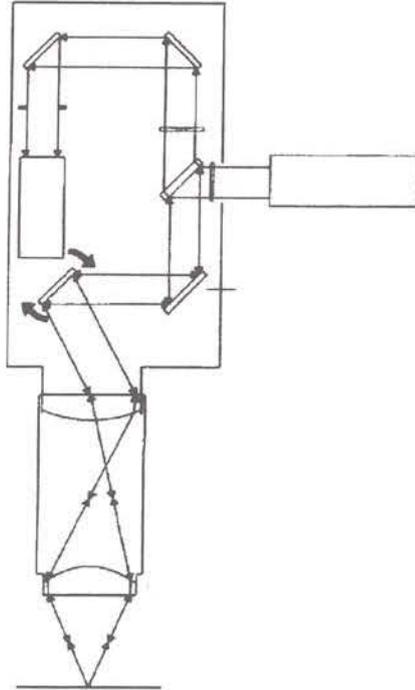


Figura 2. Sistema de imagen confocal del tipo de barrido del haz de luz.

Esto puede ser realizado haciendo pasar el espécimen a través del haz de luz (barrido de la muestra), o haciendo pasar el haz de luz sobre la muestra fija (barrido del haz). La imagen es generada electrónicamente a partir de las señales seriadas provenientes de los fotomultiplicadores (Figura 2).

La fuente de luz que se suele utilizar es un haz de láser, ya que permite obtener imágenes de alta resolución y sensibilidad cuando se trabaja con sondas fluorescentes. Permite una fuente de luz estable, uniforme y de una longitud de onda determinada. Esto es, a su vez, la principal limitación, ya que, no permite trabajar con todo tipo de fluorocromos, sino sólo con aquéllos que son capaces de excitarse a la longitud de onda del láser. Otra limitación impuesta por los láseres es el precio, ya que láseres potentes necesarios para trabajar con excitación ultravioleta son caros y, generalmente, refrigerados por agua. El importante desarrollo de láseres de estado sólido de baja potencia permitirá, en un futuro próximo, eliminar estas limitaciones.

Las aplicaciones de la microscopía confocal son las mismas que las de la microscopía de fluorescencia o la de campo claro o la de contraste de fases, con las ventajas del aumento de resolución y la capacidad de aumentar los contrastes sin disminuir la resolución. Al trabajar con imágenes electrónicas se pueden realizar reconstrucciones tridimensionales o, dependiendo del programa, realizar estudios de análisis de imagen. Permite, en el caso de la fluorescencia, trabajar con varias fluorescencias a la vez, dependiendo del número de fotomultiplicadores que posea el sistema.

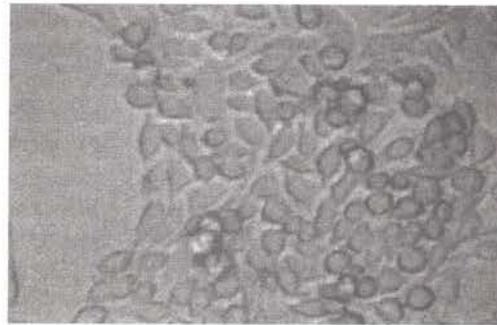


Figura 3. Imagen transmitida de barrido de un cultivo de células epiteliales.

Si trabajamos en un sistema de imagen confocal de epi-iluminación, unido a un microscopio invertido, se pueden aplicar las ventajas de la microscopía confocal al estudio de cultivos celulares *in situ*. Esta aplicación requiere objetivos de una aper-

tura numérica alta y que tengan una distancia focal que permita enfocar a través del plástico de los soportes de cultivo sin pérdida de resolución y emisión de fluorescencia (Figura 3).

## 2. APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL AL ANALISIS DEL ESTRES OXIDATIVO

La aplicación de la microscopía confocal al estudio del estrés oxidativo tiene dos vertientes distintas. Por un lado, se aplica a la visualización directa de la producción de radicales libres mediante la utilización de fluorocromos que reaccionan de forma más o menos específica con los distintos tipos de radicales generados dentro de la célula. Por otra parte, pueden detectarse las alteraciones celulares producidas por la acción de estos radicales libres utilizando una gama de estrategias que permiten el marcaje intracelular de estas alteraciones con moléculas fluorescentes. Como hemos mencionado antes, la principal ventaja de la microscopía confocal frente a la microscopía de fluorescencia convencional es la detección de la fluorescencia generada en un solo plano de la muestra estudiada, eliminando por tanto la fluorescencia procedente de planos distintos al plano focal. Esta propiedad permite la detección y reconstrucción tridimensional de los sitios intracelulares donde se genera el estrés oxidativo, y el análisis de las alteraciones específicas producidas por los radicales libres en la célula. A este hecho se le une la capacidad, compartida con la microscopía de fluorescencia convencional, de poder analizar células individuales posibilitando el estudio de la heterogeneidad celular con respecto a la generación y respuesta al estrés oxidativo en una población celular. Además, el empleo de una combinación adecuada de distintos fluorocromos permite el análisis multiparamétrico de las células individuales seleccionadas. A pesar del indudable valor de la aplicación de la microscopía confocal al estudio del estrés oxidativo, es muy reducido el número de trabajos que han utilizado esta metodología. Ello se debe, sin duda, a la falta de técnicas específicas y fluorocromos adecuados para el análisis de este fenómeno. La aparición de nuevos procedimientos de tinción y fluorocromos más adecuados, con una menor difusibilidad y una mayor fotoestabilidad, permiten augurar un empleo creciente de esta técnica en el estudio del estrés oxidativo.

## 3. TECNICAS DE TINCION E INDICADORES FLUORESCENTES

### 3.1. Detección de radicales libres

La detección específica de radicales libres es problemática debido a la coexistencia de múltiples formas de oxígeno reactivo dentro de una célula individual.

Como marcadores se utilizan generalmente dihidro derivados de compuestos fluorescentes, tales como la fluoresceína, la rodamina o el etidio (ver capítulo sobre Citometría de flujo y estrés oxidativo). Esta modificación química convierte a estas

moléculas en compuestos no fluorescentes o con distintas características espectrales, que pueden revertir a los compuestos fluorescentes originales por la acción de las especies reactivas permitiendo la detección de la actividad oxidativa en células y tejidos (3-5). La oxidación de estos compuestos no permite diferenciar claramente las distintas especies reactivas. Se ha descrito que tanto la diclorodihidrofluoresceína como la dihidrorodamina 123 no son capaces de reaccionar directamente con el radical superóxido, pero son capaces de reaccionar con el peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa, citocromo c o iones  $Fe^{2+}$  (6, 7). El dihidroetidio (también conocido comercialmente como hidroetidina), a diferencia de los anteriores, es además capaz de reaccionar directamente con radicales superóxido (7, 8). El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) ha sido el fluorocromo más utilizado en los estudios de microscopía confocal. Este compuesto apolar se incorpora a las células donde es convertido en diclorodihidrofluoresceína (H2DCF) por acción de las esterasas intracelulares. La H2DCF, que no presenta fluorescencia, se convierte rápidamente por la acción de los radicales libres en diclorofluoresceína, altamente fluorescente. La H2DCF es oxidada por radicales peróxido pero no por radicales superóxido ni hidróxilo, aunque puede reaccionar también con otras especies reactivas como el óxido nítrico. La principal desventaja de este compuesto es que el producto de la oxidación, la diclorofluoresceína, no se retiene adecuadamente en el interior de la célula, hecho que dificulta la detección o cuantificación de procesos oxidativos lentos. Para evitar este problema se ha propuesto la utilización de ésteres derivados de la H2DCFDA, que presentan una mejor retención dentro de la célula, como el carboxiéster o el recientemente introducido clorometiléster. La dihidrorodamina 123 es producto de la reducción de un fluorocromo específico para las mitocondrias, el catión lipofílico rodamina 123. Este compuesto apolar y no fluorescente atraviesa libremente la membrana plasmática, siendo reducido a rodamina 123, que se concentra en las mitocondrias por acción de los radicales libres. Como en el caso de la H2DCFDA reacciona directamente con el peróxido de hidrógeno, pero no reacciona directamente con los radicales superóxido. La dihidrorodamina 123 es más sensible que la H2DCFDA para algunas aplicaciones (9) y se ha utilizado preferentemente en algunos estudios de microscopía confocal (6) (Figuras 4A, B y C) por su mayor retención dentro de la célula, ya que el producto de su oxidación, la rodamina 123, permanece fuertemente unida a la membrana interna de las mitocondrias (10). Recientemente se ha descrito que la dihidrorodamina 123 también detecta el anión peroxinitrito (11), producido por la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido o con el peróxido de hidrógeno (12). El anión peroxinitrito que parece estar involucrado en distintos tipos de patología reacciona con grupos sulfhidrilo (13), con el ADN y con los fosfolípidos de las membranas celulares (14), así como con la tirosina (15) y otros compuestos fenólicos (16). El dihidroetidio (hidroetidina) es capaz de reaccionar directamente con los radicales superóxido oxidándose a etidio. Este compuesto que presenta una fluorescencia azul pasa a tener la fluorescencia roja del etidio tras su oxidación. El etidio se acumula en el núcleo, donde se intercala en la molécula de ADN, y en los lisosomas (17,18) (Figura 4D). Sin embargo, en algunos casos puede depositarse también en las localizaciones intracelulares de generación de estrés oxidativo (como

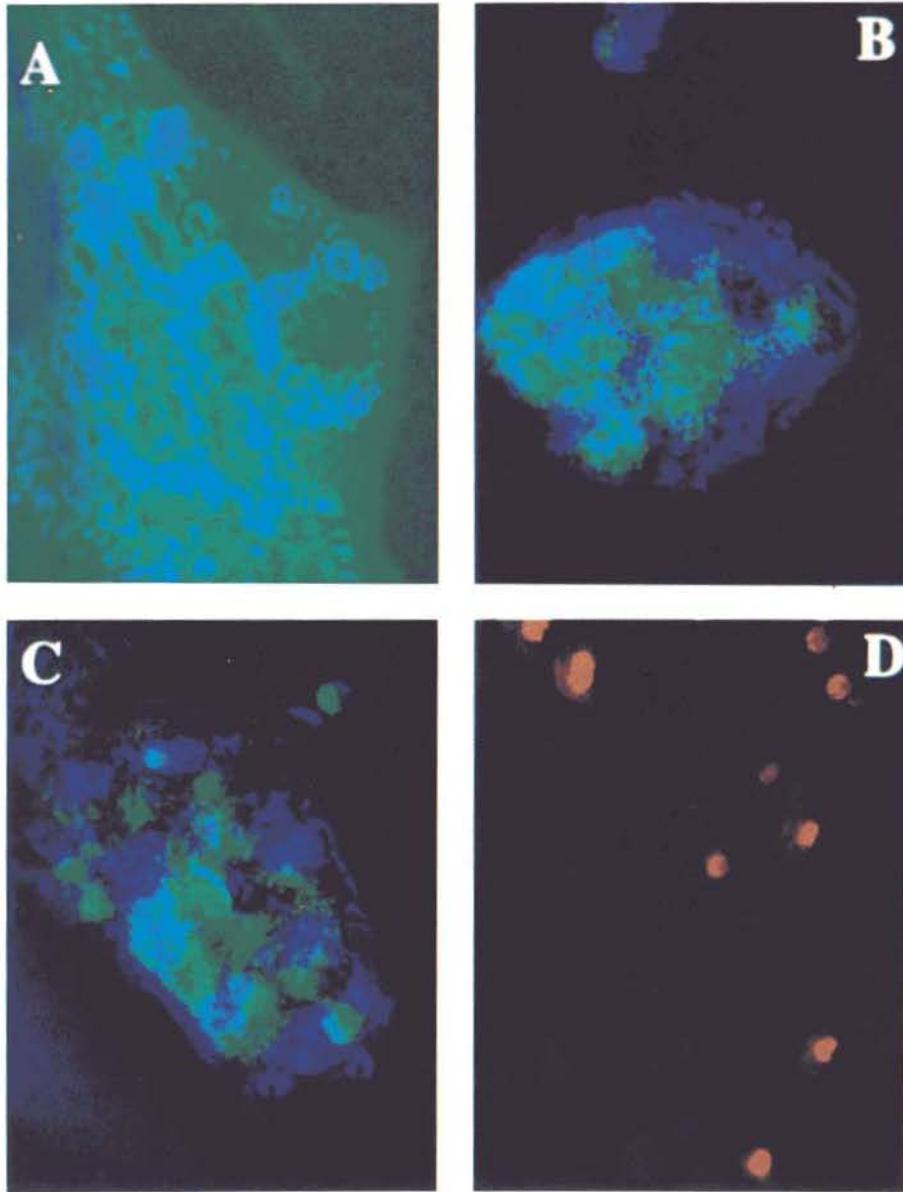


Figura 4. Detección del estrés oxidativo por microscopía confocal, mediante el uso de H2DCFDA e Hidroetidio. A) Parénquima hepático correspondiente a un cultivo de hepatocitos adultos control teñido con H2DCFDA. El color azul muestra el contorno de las células. B) y C) Idem pero de un cultivo tratado con agentes hepatotóxicos a concentraciones que inhiben la producción de peróxidos. Como se observa, la intensidad del color verde es mucho menor que en A. D) Células provenientes de un cultivo de hepatocitos adultos tratados con cocaína y teñidos con hidroetidio. Se observa cómo están teñidos los núcleos en aquellas células comprometidas, mientras que en el resto se tiñe el citoplasma y algunos orgánulos.

es el caso de las mitocondrias) presentando una alta especificidad en la detección de radicales superóxido (8). Para el estudio del estrés oxidativo producido a nivel mitocondrial son de gran interés algunos de los fluorocromos recientemente desarrollados de la serie Mito Tracker™ (19) que son rosaminas reducidas que se unen específicamente a las mitocondrias (20). Estos compuestos no fluorescentes adquieren una fluorescencia naranja o roja, tras su oxidación por especies reactivas de oxígeno y son muy fotoestables. Tienen la gran ventaja, con respecto a los anteriores, de mantenerse unidos a la mitocondria tras su fijación. Este hecho permite su estudio combinado con reacciones inmunocitoquímicas, habiéndose comprobado de este modo su colocalización con la subunidad I de citocromo c oxidasa mitocondrial, utilizando microscopía confocal (20). Todas las características espectrales de estos fluorocromos están descritas en el capítulo de citometría de flujo y estrés oxidativo.

### 3.2. Detección del daño oxidativo

El estrés oxidativo produce en las células y tejidos la acumulación de funciones carbonilo, que tiene lugar en primer término por la acción directa de las especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, produciendo la oxidación de los residuos de aminoácidos (21). En segundo lugar, cuando tiene lugar la peroxidación de lípidos, aparecen carbonilos sobre los fosfolípidos de las membranas celulares, originándose al mismo tiempo fragmentos carbonilo reactivos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, capaces de unirse a los grupos tiol y amino de las proteínas. La unión a tioles de estos aldehídos reactivos ocurre mediante una reacción de adición, que deja libre la función carbonilo para subsiguientes reacciones (22). Las funciones carbonilo originadas en este proceso lipoperoxidativo pueden ponerse de relieve mediante el reactivo fluorescente hidrazida del ácido 2-OH-3 naftoico (NAH) para su observación al microscopio confocal (23). Recientemente, se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas para visualizar a nivel celular el 4-hidroxinonenal unido a proteínas, siendo este un producto específico de la peroxidación de membranas, junto con la oxidación de proteínas detectada con un anticuerpo frente a grupos dinitrofenilo, tras la reacción de los carbonilos de las proteínas con 2, 4-dinitrofenil-hidrazina (24). Muy recientemente se ha descrito un método aplicado a citometría de flujo, con una posible aplicación a la microscopía confocal, para la determinación directa de la peroxidación lipídica utilizando derivados lipofílicos de la fluoresceína que se insertan en las membranas celulares (25). Otro de los efectos del estrés oxidativo es la alteración de los sistemas antioxidantes de la célula. El contenido celular de glutatión puede determinarse mediante microscopía confocal, utilizando el monoclorobimano (MCBL) que se une a las moléculas de glutatión adquiriendo fluorescencia (26).

## 4. ESTRES OXIDATIVO INDUCIDO POR ETANOL

### 4.1. Aplicación de la microscopía confocal

La implicación del etanol en la generación de radicales libres data de los estudios de DiLuzio en 1963 (27), en los cuales señalaba que la administración de antioxidantes a las ratas evitaba la aparición de hígado graso, tras una intoxicación aguda con alcohol. Posteriormente, demostró que se produce un aumento de la peroxidación lipídica en homogenados de hígado tras la administración de etanol, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que el etanol o sus metabolitos producen la oxidación en el hígado actuando como prooxidantes, reduciendo el nivel de antioxidantes o ejerciendo ambas funciones (28). La microscopía confocal se ha utilizado en los estudios sobre el estrés inducido por etanol para demostrar y cuantificar la formación de radicales libres a nivel de las células individuales, así como la implicación de los distintos compartimentos intracelulares en su generación (26, 29). Dos orgánulos celulares se muestran como máximos generadores de radicales libres por la acción del etanol, la mitocondria y el retículo endoplásmico.

### 4.2. Generación de radicales libres en la mitocondria

La cadena respiratoria situada en la membrana interna de la mitocondria es la fuente principal de radicales superóxido dentro de la célula. La superóxido dismutasa mitocondrial cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, que es destruido por la acción de la glutatión peroxidasa mitocondrial. Sin embargo, en presencia de hierro, parte de este peróxido puede dar lugar a radicales agresivos que produzcan alteraciones estructurales y funcionales de la mitocondria. Se ha comprobado que la intoxicación aguda por etanol produce un aumento de la generación de radicales superóxido en la mitocondria de los hepatocitos (30). Por otra parte, la disminución del cociente  $NAD^+/NADH$  inducida por la administración aguda de etanol (31) puede acrecentar esta producción de radicales superóxido, al estimular el flujo a lo largo de la cadena de transporte. La medición por microscopía confocal del potencial de membrana mitocondrial, utilizando rodamina 123 como sonda fluorescente, muestra una disminución significativa treinta minutos después de la administración de etanol 50mM a hepatocitos aislados. Esta disminución se atenúa en gran medida en presencia de N,N'-dimetilgliourea, indicando que la acción excesiva de especies reactivas de oxígeno lleva a la disfunción mitocondrial (26).

### 4.3. Generación de radicales libres en el retículo endoplásmico

La intoxicación crónica con alcohol estimula la producción microsomal de especies de oxígeno reactivas (radicales superóxido e hidróxilo, y peróxido de hidrógeno) en ratas (32-34). La mayoría de los derivados del oxígeno producidos en

exceso en el retículo endoplásmico de los animales tratados crónicamente con etanol parecen generarse con la intervención del citocromo P450. Este citocromo representa una familia extensa de hemoproteínas que participan en la transformación de compuestos endógenos y exógenos a la célula (35). En mamíferos se han identificado al menos 12 familias y 22 subfamilias distintas del citocromo P450 (36). Una de estas isoformas es el citocromo P450 inducible por etanol (CYP2E1), que parece jugar un papel importante en el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno en los microsomas aislados de animales tratados con etanol, donde se observa una correlación entre la producción de derivados del oxígeno y el contenido en CYP2E1 (33). Se ha demostrado además, utilizando anticuerpos específicos, la participación del CYP2E1 en la formación microsomal de peróxido de hidrógeno dependiente de NADPH (33). Aunque esta enzima se presenta predominantemente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, se ha descrito también su presencia en el cerebro (37,38), demostrándose además su inducción por el alcohol en este órgano (38-40). Existe también una correlación entre la inducción de CYP2E1 y el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno en el cerebro de ratas intoxicadas crónicamente con etanol (38). Se ha utilizado microscopía confocal para analizar esta correlación en una población específica de células cerebrales, los astrocitos. Estas células son las más abundantes del cerebro, ocupando un tercio del volumen del cortex cerebral. Involucradas en múltiples actividades, estas células son necesarias para el desarrollo y función del cerebro (41). Además, sistemas enzimáticos específicos permiten a los astrocitos metabolizar radicales libres, además de amonio, glutamato, xenobióticos y metales, protegiendo al cerebro de la toxicidad de estos agentes (42). La identificación de los astrocitos se realiza, utilizando microscopía confocal, mediante la positividad a un anticuerpo monoclonal frente a la proteína fibrilar glial ácida (GFAP). La utilización de un anticuerpo policlonal frente a la CYP2E1 permite la detección y cuantificación simultánea de esta proteína en los astrocitos, utilizando una técnica de doble marcaje con anticuerpos secundarios marcados con distintos fluorocromos, el isocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) y el isocianato de fluoresceína (FITC) que presentan espectros de emisión distintos (38). El análisis mediante microscopía confocal muestra la presencia citoplasmática de CYP2E1 en astrocitos, distribuido preferentemente en la región perinuclear. El tratamiento de astrocitos en cultivo con etanol 25mM induce un aumento en la expresión de esta proteína en las células analizadas. Este aumento en CYP2E1 se correlaciona con el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (de 2,6 a 3,5 veces mayor que el control) en las células tratadas con etanol, determinada con microscopía confocal por la oxidación de H<sub>2</sub>DCEFDA (38). La implicación del CYP2E1 en la generación de radicales libres se pudo demostrar, ya que la incorporación a las células de un anticuerpo frente a esta proteína evitaba en gran medida el aumento de radicales libres inducido por el etanol.

## 5. ESTRES OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL

### 5.1. Aplicación de la microscopía confocal

Es cada vez mayor la evidencia experimental de que el estrés oxidativo se halla implicado en la patogenia de enfermedades agudas y crónicas del sistema nervioso central (43, 44). El desarrollo de técnicas adecuadas de obtención y cultivo *in vitro* de neuronas (45), ha permitido la aplicación de la microscopía confocal al análisis de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el daño neuronal. La metodología para la detección de radicales libres, función mitocondrial y concentración de calcio intracelular, junto con la detección de componentes del citoesqueleto en este modelo celular, utilizando microscopía confocal, se hallan detallados en una revisión de Mattson *et al.* (46).

### 5.2. Daño neuronal excitotóxico

Aunque son múltiples los factores que pueden producir estrés oxidativo en las neuronas, el neurotransmisor glutamato es el principal causante de este proceso en el cerebro, especialmente a través de sus receptores ionotrópicos (44). Esta producción de radicales libres inducidos por el glutamato se ha comprobado por microscopía confocal, utilizando H2DCFDA como indicador fluorescente (46). El origen del estrés oxidativo originado por la activación de uno de los receptores ionotrópicos, el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) ha sido estudiado por microscopía confocal (47). La estimulación de este receptor por NMDA produce un aumento de especies reactivas de oxígeno, que tiene un origen mitocondrial, como se pudo comprobar realizando el seccionamiento óptico de las células mediante microscopía confocal, utilizando como sonda fluorescente la dihidro-rodamina 123. La intervención de otros sistemas celulares de generación de radicales libres, como la óxido nítrico sintasa o las actividades lipooxigenasa y ciclooxigenasa, se descartó utilizando inhibidores específicos de estas enzimas (47). Además, se comprobó que la utilización de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial eran capaces de inhibir la respuesta oxidativa inducida por el NMDA en estos cultivos celulares.

### 5.3. Péptido $\beta$ -amiloide de la enfermedad de Alzheimer

Entre los factores no excitotóxicos que estimulan la producción de radicales libres en las neuronas se ha implicado al péptido  $\beta$ -amiloide, que es el principal constituyente de las placas amiloides que aparecen en el cerebro de los enfermos que padecen la enfermedad de Alzheimer (48). El efecto de este péptido sobre células neuronales en cultivo se ha estudiado utilizando técnicas de microscopía confocal (49). La inclusión de este péptido en los cultivos produce un incremento significativo de la generación de radicales libres (3,5 veces más que las células control) después de 24 horas, utilizando H2DCFDA como sonda fluorescente. La

detección de grupos carbonilo por microscopía confocal, para cuantificar el nivel de daño oxidativo, también mostró un aumento significativo dos horas después de añadir el péptido amiloide a los cultivos (tres veces mayor que el control). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que el daño oxidativo inducido por el péptido amiloide, por medio de radicales libres, contribuye a la neurodegeneración observada en la enfermedad de Alzheimer (49).

## 6. ESTRES OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR

### 6.1. Aplicación de la microscopía confocal

El daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno se halla involucrado en la inducción de la muerte celular en muy diversas condiciones experimentales y fisiopatológicas (43,44,46,50,51). La utilización de la microscopía confocal permite detectar y analizar células individuales durante el proceso de muerte celular, y evaluar la contribución del estrés oxidativo a este proceso. Esta técnica permite también, con la utilización de procedimientos de tinción adecuados, distinguir entre los dos tipos básicos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis (51-54). Las células vivas pueden observarse utilizando fluorocromos como la calceína-AM y la BCECF-AM que atraviesan la membrana plasmática y se convierten en compuestos fluorescentes, por acción de las esterasas intracelulares, que son retenidos dentro de las células con membrana intacta (46,55). En la necrosis se produce una pérdida de la integridad de la membrana plasmática, que puede detectarse por la entrada de colorantes fluorescentes que no atraviesan las membranas intactas como, por ejemplo, el yoduro de propidio o el bromuro de etidio (46,55). Durante la apoptosis la membrana plasmática se mantiene intacta, aunque puede ser permeable en etapas tardías de este proceso (56). La apoptosis puede detectarse por la condensación y fragmentación de la cromatina, puesta en evidencia por fluorocromos que se unen al ADN y que difunden pasivamente a través de las membranas intactas, como son el Hoechst 33342 y los colorantes de la serie SYTO (51,57,58), por la exposición de fosfatidilserina en la capa lipídica externa de la membrana detectada con anexina-FITC (58) y por el marcaje fluorescente de la fragmentación oligonucleosómica del ADN con deoxinucleótido transferasa terminal (51).

### 6.2. Factor de necrosis tumoral- $\beta$ (TNF- $\beta$ )

El TNF- $\beta$  es una citocina pleiotrópica, producida principalmente por los macrófagos activados, con una amplia gama de actividades inflamatorias e inmunomoduladoras. Además, la TNF- $\beta$  produce la muerte selectiva de células tumorales *in vitro* y tiene una actividad antitumoral *in vivo*. Dependiendo del tipo celular sobre el que actúa, el TNF- $\beta$  puede producir necrosis o apoptosis (59). Los mecanismos moleculares por los cuales el TNF- $\beta$  ejerce su función citotóxica han sido muy estudiados e incluyen la activación de proteínas G, la activación del factor de transcripción

NF- $\kappa$ B, la fosforilación de proteínas, la activación de fosfolipasas y la producción de especies reactivas de oxígeno (59). El estudio de la participación de las especies reactivas de oxígeno se ha realizado utilizando microscopía confocal (6). La detección de radicales libres utilizando dihidrorodamina 123 y la evaluación simultánea de la viabilidad celular con yoduro de propidio en la línea celular de fibrosarcoma murino L929, muestra que la respuesta citotóxica mediada por la TNF- $\beta$  es asincrónica dentro de la población celular. La mitocondria es el orgánulo donde se generan estos radicales libres, cuya producción se incrementa poco antes de la muerte celular, concluyéndose que ambos fenómenos se hallan estrechamente relacionados (6). La producción acelerada de radicales libres en esta línea celular se correlaciona con una disminución de los niveles de glutation mitocondrial (6). Esta relación entre la respuesta a la inducción por TNF- $\beta$  y los niveles de glutation se ha observado también mediante microscopía confocal, analizando la acción del TNF- $\beta$  sobre la expresión génica en células endoteliales (60).

### 6.3. Transición de permeabilidad mitocondrial

La acción citotóxica del TNF- $\beta$  se ha relacionado con la transición de permeabilidad mitocondrial (61). Este fenómeno se produce por apertura de poros de alta conductividad en la membrana interna de la mitocondria y se ha relacionado con el proceso de muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis (62). La apertura del poro se ha relacionado con una despolarización de la membrana interna mitocondrial y se ha implicado, entre los factores patofisiológicos inductores, al estrés oxidativo (62). La microscopía confocal permite visualizar este proceso mediante la utilización del fluorocromo calceína que se acumula en el citoplasma, pero no entra en las mitocondrias en condiciones normales, y la visualización simultánea del compartimento mitocondrial con la sonda fluorescente metiléster de tetrametilrodamina (63). La inducción de estrés oxidativo con el oxidante tert-butilhidroperóxido produce la entrada de calceína en el compartimento mitocondrial debido a inducción de la transición de permeabilidad, antes de producirse la muerte celular, detectada por la pérdida de integridad de la membrana plasmática (63). Se comprueba que esta transición no depende solamente de la despolarización de la membrana interna mitocondrial, ya que la utilización de desacoplantes de la cadena respiratoria produce la despolarización de la membrana interna, pero no induce la transición de permeabilidad ni la muerte en el modelo celular estudiado (63).

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Wilson T, Ed. (1990), *Confocal Microscopy*, Academic Press, London.
2. Pawley JB. Ed. (1995), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press, New York.
3. Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P y Shertzer HG (1994), Oxidation pathways for the intracellular probe 2', 7'-dichlorofluorescein. *Arch Toxicol* 68: 582-587.

4. Oyama Y, Hayashi A, Ueha T y Maekawak K (1994), Characterization of 2', 7'-dichloro-fluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res* 635: 113-117.
5. Le Bel CP, Ischiropoulos H y Bondy SC (1992), Evaluation of the probe 2', 7'-dichloro-fluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.
6. Goossens V, Grooten J, De Vos K y Fiers W (1995), Direct evidence for tumor necrosis factor-induce mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8115-8119.
7. Henderson LM y Chapell JB (1993), Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 217: 973-980.
8. Bindokas VP, Jordan J, Lee CC y Miller RJ (1996), Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-1336.
9. Rothe G, Oser A y Valet G (1988), Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75, 354-355.
10. Royall JA y Ischiropoulos H (1993), Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.
11. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H y Beckman JS (1994), Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Rad Biol Med* 16: 149-156.
12. Crow JP, Beckman JS y Mc Cord JM (1995), Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* 34: 3544-3552.
13. Radi R, Beckman JS, Bush KM y Freeman BA (1991), Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244-4250.
14. Radi R, Beckman JS, Bush KM y Freeman BA (1991), Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-487.
15. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen H, Tsai M, Martin JC, Smith CD y Beckman JS (1992), Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298: 431-437.
16. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin JC y Tsai M (1992), Kinetics of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 298: 438-445.
17. Bucana C, Saiki Y y Nayar R (1986), Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J Histochem Cytochem* 34: 1109-1115.
18. Horobin RW y Rashid F (1990), Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals making use of a simplistic Chinese box model. *Histochemistry* 94: 205-209.
19. Haugland RP, Spence MTZ y Johnson ID (1996), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6.<sup>a</sup> Ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. pp. 266-274.
20. Poot M, Zhang YZ, Kramer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, Lugade AG, Singer VL y Haugland RP (1996) Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem* 44, 1363-1372.
21. Amici A, Levine RL, Tsai L y Stadtman ER (1989) Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. *J Biol Chem* 264, 3341-3346.
22. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 11, 81-128.
23. Pompella A y Comporti M (1993), Imaging of oxidative stress at subcellular level by confocal laser scanning microscopy after fluorescent derivatization of cellular carbonyls. *Am J Pathol* 142: 1353-1357.

24. Pompeya A, Cambiaggi C, Dominici S, Paolicchi A, Tongiani R y Comporti M (1996), Single-cell investigation by laser scanning confocal microscopy of cytochemical alterations resulting from extracellular oxidant challenge. *Histochem Cell Biol* 105: 173-178.
25. Makrigiorgos GM, Kassis AI, Mahmood A, Bump EA y Savvides P (1997), Novel fluorescein-based flow-cytometric method for detection of lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 22: 93-100.
26. Kurose I, Higushi H, Kato S, Miura S y Ishii H (1996), Ethanol-induced oxidative stress in the liver. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 77A-85A.
27. DiLuzio NR (1963), Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. *Physiologist* 6: 169-173.
28. DiLuzio NR, Hartman AD (1967), Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. *Fed Proc* 26: 1436-1442.
29. Montoliu C, Sancho-Tello M, Azorín A, Burgal M, Vallés S, Renau-Piqueras J y Guerri C (1995), Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem* 65: 2561-2570.
30. Sinaceur J, Ribière C, Sabourault D, Nordmann R (1985), Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication. Possible role in alcohol hepatotoxicity. En: *Free radicals in Liver Injury* (Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF, eds.), IRL Press, Oxford, pp. 175-177.
31. Slater TF, Sawyer BC, Straüli UD (1964), Changes in liver nucleotide concentrations in experimental liver injury. 2. Acute ethanol poisoning. *Biochem J* 93, 267-270.
32. Boveris A, Fraga GC, Varsavsky AL y Koch OR (1983), Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 227: 534-541.
33. Ekström G, Ingelman-Sundberg M (1989), At liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P450 IIE1), *Biochem Pharmacol* 38: 1313-1319.
34. Dicker E, Cederbaum AI (1987), Hydroxyl radical generation by microsomes after chronic ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 11: 309-314.
35. Ortiz de Montellano PR (1986) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Plenum Press, New York.
36. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, González FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K y Nebert DW (1993), The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51.
37. Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M y Köhler C (1990), Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience* 34: 451-463.
38. Montoliu C, Vallés S, Renau-Piqueras J y Guerri C (1994), Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem* 63: 1855-1862.
39. Anandatheerthavarada HK, Shankar SK, Bhamre S, Boyd MR, Song BJ y Ravindranath V (1993), Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res* 601: 279-285.
40. Warner M y Gustafsson JA (1994), Effect of ethanol on cytochrome P450 in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1019-1023.
41. Norenberg MD (1994), Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 213-220.
42. Copin JC, Ledig M y Tholey G (1992), Free radical scavenging systems of rat astroglial cells in primary culture: effects of anoxia and drug treatments. *Neurochem Res* 17: 677-682.
43. Halliwell B (1992), Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-1623.
44. Coyle JT y Puttfarcken P (1993), Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.

45. Mattson MP y Kater SB (1988), Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long term culture: development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA. *Int J Dev Neurosci* 6: 439-452.
46. Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ (1995), Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol* 46: 187-216.
47. Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Hadran SD, Rothman SM, Lin TS, Coldberg MP y Choi DW (1995), Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15: 6377-6388.
48. Selkoe DJ (1991), The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498.
49. Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA y Carney JM (1995), Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampus neurons. *Exp Neurol* 131: 193-202.
50. Halliwell B (1987), Oxidants and human disease. *FASEB J* 1: 359-364.
51. Higuchi H, Kurose Y, Kato S, Miura S y Ishii H (1996), Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 340A-346A.
52. Kerr JFR, Willie AH y Currie AR (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
53. Kerr JFR, Gobé GC, Winterford CM y Harmon BV (1995), Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46: 1-27.
54. Cummings MC, Winterford CM y Walker NI (1997), Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 21: 88-101.
55. Haughland RP, Spence MTZ y Johnson ID (1996), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6.<sup>a</sup> Ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, pp. 365-398.
56. Vitale M, Zamai L, Mazzottie G, Cataldi A y Falcieri E (1993), Differential kinetics of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry* 100, 223-229.
57. Frey T (1995), Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* 21, 265-274.
58. Haughland RP, Spence MTZ y Johnson ID (1996), Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6.<sup>a</sup> Ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, pp. 143-178.
59. Beyaert R y Fiers W (1994), Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* 340: 9-16.
60. Egawa, K., Yoshiwara M y Nose K (1994), Effect of radical scavengers of TNF-mediated activation of uPA in cultured cells. *Experientia* 50: 958-962.
61. Pastorino JG, Simbula G, Yamamoto K, Glascott Pa, Rothman RJ y Farber JL (1996), The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends of the mitochondrial permeability transition. *J Cell Biol* 271: 29792-29798.
62. Bernardi P (1996), The permeability transition pore. Control points of cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1275: 5-9.
63. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B y Lemasters JJ (1995), Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 307: 99-106.