

## Tesis de Posgrado

# Estudio del proceso de activación del tetracloruro de carbono y consecuencias de la unión irreversible del mismo a componentes celulares

Diaz Gomez, María Isabel

1974

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Diaz Gomez, María Isabel. (1974). Estudio del proceso de activación del tetracloruro de carbono y consecuencias de la unión irreversible del mismo a componentes celulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1497\\_DiazGomez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1497_DiazGomez.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Diaz Gomez, María Isabel. "Estudio del proceso de activación del tetracloruro de carbono y consecuencias de la unión irreversible del mismo a componentes celulares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1974.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1497\\_DiazGomez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1497_DiazGomez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DEL PROCESO DE ACTIVACION DEL TETRACLORURO DE CARBONO Y  
CONSECUENCIAS DE LA UNION IRREVERSIBLE DEL MISMO A COMPONENTES  
CELULARES

MARIA ISABEL DIAZ GOMEZ

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas

1974

Agradezco al Dr José A. Castro, director de esta tesis, sus enseñanzas y la dedicación constante que me dispensó durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también:

A la Sra Carmen R. de Castro, la ejecución de los gráficos que acompañan esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Bio-Toxicológica, CITEFA, por su cordial amistad.

A mis padres

Indice:

Introducción	Pag. 1
Parte Experimental	9
Resultados	22
Discusión	72
Bibliografía	88

## INTRODUCCION

Los estudios bioquímicos e histopatológicos dirigidos a tratar de interpretar los mecanismos que culminan en la necrosis han sido numerosos. En general, la atención se ha concentrado en la respuesta de los animales de experimentación (especialmente la rata) a un pequeño grupo de sustancias de estructura sencilla y que producen un daño consistente. Una de estas sustancias ampliamente estudiadas ha sido el tetracloruro de carbono (1).

La administración de una dosis adecuada de  $\text{CCl}_4$  a ratas (y a muchas otras especies, excluida la rata recién nacida y la gallina) trae como consecuencia una severa necrosis centrolobulillar y degeneración grasa del hígado, (2).

La razón del estudio in extenso hecho con el  $\text{CCl}_4$  radica en que el efecto de este tóxico sobre el hígado, constituye un sistema "modelo" para el entendimiento de cuales podrían ser las alteraciones tempranas que puede causar un compuesto sobre este órgano que conduzcan a la necrosis y a la infiltración grasa. De resolverse el problema acerca de como un compuesto de estructura sencilla como el  $\text{CCl}_4$  causa necrosis e infiltración grasa, los esquemas generales de interpretación podrían extenderse a una gran cantidad de compuestos que producen efectos similares.

Uno de los avances fundamentales en el conocimiento acerca del daño hepático producido por el  $\text{CCl}_4$ , lo constituyó el hecho de haberse reconocido la necesidad de que ocurra un proceso de "activación" o transformación del  $\text{CCl}_4$  para que éste ejerza sus efectos. Esta

conclusión surgió de la necesidad de explicar las características del daño hepático producido por este tóxico, algunas de las cuales se detallan a continuación. El efecto dañino fundamental del  $\text{CCl}_4$  se ejerce sobre el hígado y no (o mucho menos) en otros órganos, en tanto que las concentraciones del tóxico en otros tejidos como la médula ósea, el cerebro y el tejido adiposo son mayores. Además la necrosis tiene una localización centrolobulillar en tanto que las concentraciones más altas a las que se halla expuesto el hígado deberían encontrarse en la región portal y más aún, la localización centrolobulillar de la necrosis se mantiene en hígados perfundidos, independientemente de que el flujo de perfusión se haga con entrada portal o central (3).

El examen ultraestructural del hígado también conduce a pensar que el efecto del  $\text{CCl}_4$  no puede explicarse simplemente por una acción solvente directa sobre los componentes subcelulares, ya que las alteraciones más tempranas se observan en el retículo endoplásmico y no en las mitocondrias o lisosomas (organoides estos en los que los daños se observan a tiempos más largos después de la administración del tóxico), en tanto que el  $\text{CCl}_4$  llega a todas las subestructuras (4, 5, 6, 7). Los estudios bioquímicos han demostrado también que las alteraciones más tempranas tienen lugar en la fracción microsomal. Cambios apreciables en la población ribosomal tienen lugar 30-60 minutos después de la administración del  $\text{CCl}_4$  (8, 9).

Otra característica que lleva a pensar en la necesidad de un proceso de activación es el hecho de que el hígado de la rata recién nacida (aproximadamente menor de 6 días) y de la gallina, son muy resistentes al daño por  $\text{CCl}_4$  a pesar de que las concentraciones del



tóxico en el hígado de esos animales son similares a las que causan efecto en el hígado de la rata adulta (10).

Esto parece indicar que el hígado de la rata recién nacida es deficiente en alguna propiedad vital para la toxicidad del  $\text{CCl}_4$  y apunta nuevamente a la conclusión de que la mera presencia física del  $\text{CCl}_4$  no es suficiente para provocar necrosis. La falta de toxicidad podría ser debida a la falta de un sistema enzimático activante que conduciría a una falla en la formación de un metabolito del  $\text{CCl}_4$ , que sería la estructura responsable de la producción de la necrosis.

Existen considerables precedentes para apoyar tal supuesto. Muchas enzimas faltan o a lo sumo están presentes en cantidad muy limitada durante los primeros días de vida y en muchos casos la actividad enzimática aumenta rápidamente entre los 2-10 días después del nacimiento. Parece por tanto probable que la producción de la necrosis causada por el  $\text{CCl}_4$  esté relacionada con la rápida aparición de una actividad enzimática que provoque su activación.

Dado que las alteraciones más tempranas producidas por el  $\text{CCl}_4$  en las células hepáticas ocurren en la fracción microsomal, y evidenciada la necesidad de un proceso de activación del compuesto, es razonable suponer que éste ocurra en el retículo endoplásmico y es probable que el sistema enzimático involucrado sea alguno de los que metabolizan tóxicos y fármacos en la fracción microsomal y que necesita NADPH como cofactor y oxígeno del aire, (11).

Con anterioridad a la hipótesis de la activación se sabía que el  $\text{CCl}_4$  se metaboliza en el hígado a  $\text{Cl}_3\text{CH}$  y  $\text{CO}_2$  (12, 13), pero fue Butler (14) el primero que para explicar la formación de  $\text{Cl}_3\text{CH}$  por un proceso metabólico a partir del  $\text{CCl}_4$ , postuló la necesidad de un

proceso de ruptura homolítica que produjera radicales libres  $\cdot\text{Cl}_3\text{C}$  y  $\cdot\text{Cl}$ . En la actualidad, la mayor parte de los investigadores en este tema piensan que como resultado de la activación se producen los radicales libres  $\cdot\text{Cl}_3\text{C}$  y  $\cdot\text{Cl}$ . Sin embargo, toda la evidencia que se posee es de naturaleza indirecta y se basa en el hallazgo de que el hexacloro-etano es un producto del metabolismo del  $\text{CCl}_4$  (15) y en el hecho de que la marcación radioactiva proveniente de  $^{14}\text{C}$   $^{36}\text{Cl}_4$  se incorpora a los componentes de los ácidos grasos de los fosfolípidos microsomales en la proporción de un átomo de  $^{14}\text{C}$  y cuatro de  $^{36}\text{Cl}$  tal como sería de esperar para una adición de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  a las dobles ligaduras (16). La otra evidencia (17) se basa en la similitud encontrada entre los productos aislados de muestras in vivo (ácidos grasos a los que se unió irreversiblemente  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$ , in vivo) y los productos provenientes de una adición química del  $^{14}\text{CCl}_4$  in vitro, a dobles ligaduras (de los mismos ácidos grasos) usando peróxido de benzoflo como catalizador, reacción en la que se sabe que los radicales libres actúan como intermediarios.

En 1965 Comporti et al. (18, 19, 20, 21) y Recknagel et al. (22, 23, 24) encontraron que el  $\text{CCl}_4$  in vitro aumentaba la peroxidación de lípidos en homogeneizados de hígado, proceso éste que requiere una activación por radicales libres. Esta peroxidación se supuso responsable del proceso que finalmente lleva a la necrosis.

Esta teoría encontró apoyo adicional cuando otros autores encontraron que durante procesos de peroxidación de lípidos, producidos por diferentes medios se generaba daño en mitocondrias (25), lisosomas (26) y retículo endoplásmico (27). Estos hechos y la circunstancia adicional de que se encontrara que el contenido de ácido

araquidónico disminuye en los lípidos microsomales durante la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  (28) y que el espectro ultravioleta de los lípidos microsomales mostrara una banda de absorción característica a 243  $\mu$ , que es típica de procesos de peroxidación llevaron a Recknagel (6) a postular que los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  producidos como consecuencia de la activación del  $\text{CCl}_4$  por la acción de las enzimas hidroxilantes de microsomas, activarían a su vez a los ácidos grasos polinsaturados como linoleico, linolénico y araquidónico, dando lugar a radicales libres peroxilo e hidroperóxido, muy reactivos, que serían los responsables de los daños que conducen a la necrosis. Sin embargo, esta teoría al suponer que la peroxidación de lípidos es el agente fundamental de daño celular en los procesos de intoxicación por  $\text{CCl}_4$ , no tiene en cuenta la posibilidad teórica de que los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  pueden también producir daño directo no mediado por la peroxidación.

En 1967, Castro et al. (29) encontraron que la destrucción del citocromo P-450 por  $\text{CCl}_4$ , anteriormente descrita por otros autores (30), no era causada por el proceso de peroxidación de lípidos. Estudios posteriores de Sasame et al. (31) permitieron postular que el citocromo P-450 se destruye por acción directa de los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$ . La importancia de estos hallazgos reside en el hecho de que se postulaba por primera vez que una alteración temprana causada por el  $\text{CCl}_4$  no era producida ni por una acción solvente del  $\text{CCl}_4$  ni por la peroxidación de lípidos que desencadena, sino directamente por los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$ .

El estudio realizado hasta el presente de los componentes del

sistema enzimático que hidroxila tóxicos y fármacos, ha demostrado la participación en el mismo de dos componentes fundamentales, el citocromo P-450 y la citocromo P-450 reductasa, actualmente considerada idéntica a la NADPH citocromo c reductasa (32, 33). También se ha establecido que los tóxicos y fármacos que son sustratos de este sistema, dan cambios espectrales característicos al interaccionar con el citocromo P-450 presente en las suspensiones microsomales (34, 35). Estos cambios espectrales son de dos tipos, tipo I y tipo II y los compuestos se clasifican según el tipo de cambio espectral a que dan lugar, en compuestos tipo I y compuestos tipo II.

En 1967, Mc Lean (36) y Castro et al. (37) encontraron que el  $\text{CCl}_4$  daba cambios espectrales tipo I por interacción con el citocromo P-450 microsomal demostrando así que el  $\text{CCl}_4$  es capaz de interaccionar con un componente de uno de los sistemas enzimáticos anteriormente postulados como posiblemente involucrados en su activación.

Otros trabajos importantes fueron los de Reynolds (38) y Reynolds y Yee (39) quienes encontraron que el  $^{14}\text{C}$  y el  $^{36}\text{Cl}$  provenientes de  $^{14}\text{C } ^{36}\text{Cl}_4$  se unían de una manera químicamente irreversible a los componentes subcelulares hepáticos, siendo particularmente importante que la unión a lípidos microsomales fuera mayor que la unión a lípidos de otros organoides.

Estos hallazgos aportan nuevas evidencias en favor del retículo endoplásmico como sitio de activación del  $\text{CCl}_4$  y a la vez primer blanco de los daños causados por las especies químicas producidas como consecuencia de su transformación metabólica.

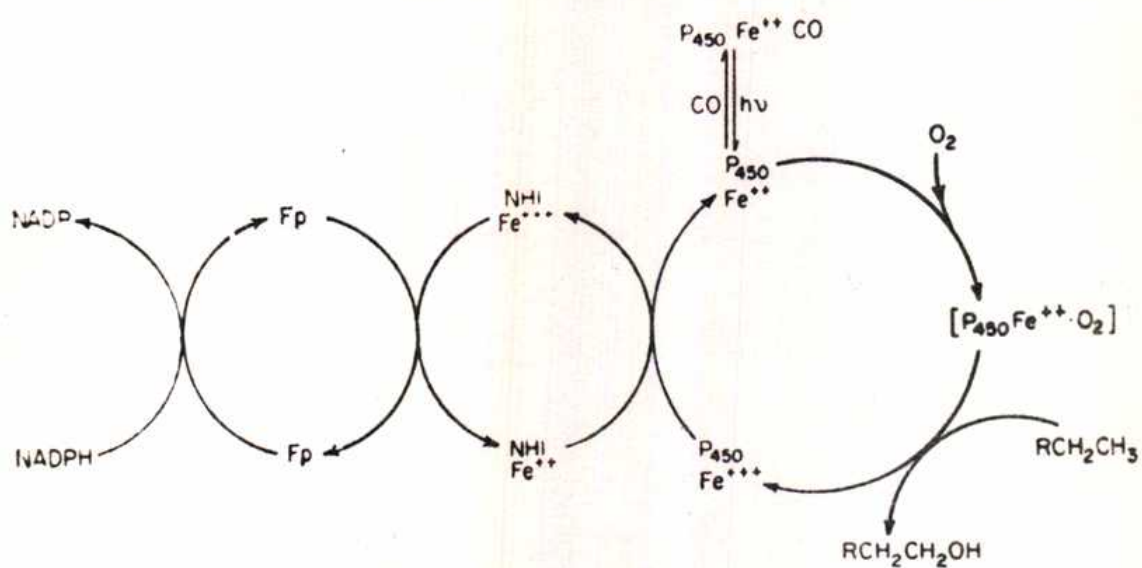
El examen ultraestructural del hígado en ratas tratadas con el tóxico, muestra hinchazón, desorganización y desgranulación, tempranas,

del retículo endoplásmico (8, 9, 40). Asimismo se observan daños bioquímicos como la destrucción de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (41) y de los sistemas enzimáticos hidroxilantes (42), que son los mismos que se postula que participan en su activación, como así también ruptura de polisomas en monómeros y subunidades (43).

Nuestro interés en lo que respecta al daño hepático inducido por el  $\text{CCl}_4$  se concentra en el estudio de la transformación que da lugar a las especies químicas reactivas causantes de las alteraciones.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Estudiar la naturaleza del proceso enzimático mediante el cual el  $\text{CCl}_4$  se activa a radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$ .
- 2) Proveer algún tipo de evidencia experimental que permita dilucidar si la reacción de los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  con componentes subcelulares es capaz de por sí de explicar algunas de las alteraciones bioquímicas y ultraestructurales, tales como la ruptura de polisomas, causadas por el  $\text{CCl}_4$ .



Sistema transportador de electrones, hidroxilante de tóxicos y fármacos, presente en microsomas hepáticos. Fp: flavoenzima, NHI: hierro-proteína no hemática, R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>: cadena lateral de un sustrato.

## PARTE EXPERIMENTAL

Compuestos usados: El tetracloruro de carbono radioactivo ( $^{14}\text{CCl}_4$ , actividad específica 27,5 mCi/mM) fue adquirido a Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra. El dihidroclorhidrato de cistamina y el pirazol fueron comprados a T. Schuchardt, Alemania. El 3-metilcolantreno (3-MC), el acetato de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ T) y la cicloheximida a Sigma Chemical Co., USA. El clorhidrato de 2-dietilamino-etil 2,2-difenilvalerato (SKF 525A), el bromhidrato de etil N-(2-dietilaminoetil) 2-fenil 2-etil malonato (Sch 5706), el clorhidrato de 2,4 dicloro 6-fenilfenoxietilamina (DPEA) y la metopirona fueron provistos sin cargo por Smith Kline & French Laboratories, USA; Societá Italiana Prodotti Schering, Milán, Italia; Ely Lilly Co., USA y CIBA Geigy Corp., USA, respectivamente. El clorhidrato de 10-(3-dimetilaminoisopropil fenotiazina (prometazina) fue adquirido a Wyeth Laboratories.

La dimetilnitrosamina (DMNA), la tioacetamida (TAC), el ácido tánico y el dimetilamino-azobenceno (DMAB) fueron comprados a Aldrich Chemical Co, USA; Fisher Scientific Co., USA; Merck-Darmstad, Alemania y G. Grubel and Co., Alemania respectivamente.

La N,N-difenil-p-fenilendiamina (DPPD), grado técnico, comprada a Eastman Kodak, fue purificada mediante tratamiento con carbono activado y recristalizada dos veces con cloroformo (P.F. 153-154°C).

La nicotinamida, la aminopirina y el fenobarbital sódico (PB) fueron de grado farmacéutico. Todos los demás compuestos usados fueron de grado reactivo.

Animales y su tratamiento: En todos los experimentos se usaron ratas macho cepa Sprague-Dawley (190-250 g) con excepciones que serán citadas. En los experimentos de inducción con fenobarbital y 3-MC se usaron ratas macho cuyos pesos oscilaban entre 95 y 120 g. El alimento se les retiró en todos los casos entre 12 y 14 horas (excepto en los casos que oportunamente se indicarán) antes de la administración del  $\text{CCl}_4$ , pero se les proveyó agua a voluntad.

El  $\text{CCl}_4$  fue administrado por vía intraperitoneal en solución al 20 % (v/v), (excepto en los casos que se indicarán), en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml/kg. A los animales controles se les administró aceite de oliva. El  $^{14}\text{CCl}_4$  fue disuelto en aceite de oliva en una concentración de  $1,5 \times 10^6$  dpm/ml y fue administrado por la misma vía y en la misma dosis ya indicadas para el  $\text{CCl}_4$  no marcado. Los animales controles recibieron asimismo aceite de oliva. En dos experimentos se usaron soluciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  más concentradas, a saber  $5,6 \times 10^6$  dpm/ml y  $23,5 \times 10^6$  dpm/ml. Los animales fueron sacrificados por decapitación 3 horas después de la administración de  $\text{CCl}_4$  ó  $^{14}\text{CCl}_4$ . Se les dejó desangrar por unos momentos y luego se extrajo con rapidez el hígado (y en los casos que se indicarán los riñones y las glándulas suprarrenales) los cuales fueron pesados y procesados.

El SKF 525A, el Sch 5706 disueltos en solución de ClNa al 0,9 % y el DPEA disuelto en agua destilada, fueron administrados por vía intraperitoneal en una dosis de 50 mg/kg. La aminopirina, la nicotinamida, el pirazol y la metopirona disueltos en solución de ClNa al 0,9 % fueron administrados por vía intraperitoneal en una dosis de 100 mg/kg, 500 mg/kg, 150 mg/kg y 60 mg/kg respectivamente.

La cistamina fue dada por vía oral en solución acuosa (240 mg/ml)



en una dosis de 600 mg/kg.

Todos los compuestos fueron administrados 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$  ó del  $^{14}\text{CCl}_4$ . A los animales controles se les administró una cantidad equivalente de solución fisiológica o agua.

La prometazina y la cicloheximida, ambas en solución de ClNa al 0,9 %, fueron administradas por vía intraperitoneal 10 minutos antes del  $\text{CCl}_4$  ó del  $^{14}\text{CCl}_4$ , en una dosis de 25 mg/kg y 1 mg/kg respectivamente. El  $\alpha$ -tocoferol en solución de aceite de oliva fue dado por vía intraperitoneal en una dosis de 750 mg/kg, 24 horas antes del  $\text{CCl}_4$  ó del  $^{14}\text{CCl}_4$ . El DPPD suspendido en aceite de oliva, fue administrado por vía intraperitoneal en tres dosis de 600 mg/kg cada una, 48 hr, 24 hr y 10 minutos antes del  $\text{CCl}_4$  ó del  $^{14}\text{CCl}_4$ . Los animales controles recibieron la cantidad equivalente de solución fisiológica o aceite.

El fenobarbital en una dosis de 80 mg/kg disuelto en solución fisiológica y el 3-MC en una dosis de 35 mg/kg disuelto en aceite de oliva fueron dados por vía intraperitoneal una vez al día durante 3 días. El  $\text{CCl}_4$  ó el  $^{14}\text{CCl}_4$  fueron administrados en la mañana del cuarto día. Las ratas usadas como control recibieron una cantidad equivalente de solución fisiológica o de aceite por vía intraperitoneal.

La dimetilnitrosamina, la tioacetamida y el ácido tánico disueltos en solución fisiológica, fueron administrados por vía intraperitoneal en una dosis de 50 mg/kg, 200 mg/kg y 700 mg/kg respectivamente. El dimetilamino-azobenceno disuelto en aceite de oliva, fue administrado por vía intraperitoneal en una dosis de 150 mg/kg.

Adrenalectomía: En los casos en que se usaron animales adrenalectomizados, se les practicó la adrenalectomía bilateral según el método de D'Amour et al. (44). Las glándulas, una vez extraídas fueron sometidas a una cuidadosa inspección visual para asegurar que la operación se realizó correctamente. A las ratas adrenalectomizadas se les dió a beber solución fisiológica. Simultáneamente se llevó a cabo una operación de adrenalectomía simulada en otro grupo de ratas para usarlas como control. Ambos grupos fueron usados 7 días después de la operación.

Castración: Cuando se usaron animales castrados, la operación se llevó a cabo de acuerdo con el método de D'Amour et al. (45). También se realizó una operación de castración simulada con otro grupo de ratas para ser usado como control. Los animales fueron usados 7 días después de la operación.

Procesamiento de los órganos:

Todas las manipulaciones de tejidos y las operaciones subsiguientes, se llevaron a cabo a 0-4°C.

Separación de microsomas: Las fracciones microsomales para la determinación de unión irreversible a lípidos y proteínas fueron separadas por el siguiente procedimiento: El hígado una vez extraído del animal fue homogeneizado en un volumen igual a dos veces su peso de una solución de sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM con un homogeneizador de Teflon-vidrio Potter-Elvehjem. El hígado, una vez homogeneizado fue centrifugado a 9.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante fue luego centrifugada durante una hora a 105.000 x g en una ultracentrífuga preparativa Spinco modelo L. Los microsomas así separados fueron suspendidos luego en 2 ml de la misma solución de sacarosa/EDTA usada para la homogeneización. Con esta suspensión se determinó la unión irreversible

a lípidos y proteínas según se describe más adelante.

Las fracciones microsomales para la determinación de la peroxidación de lípidos, glucosa-6-fosfatasa y etilmorfina N-demetilasa se separaron mediante un procedimiento igual al anterior.

La fracción microsomal para la determinación de citocromo P-450, citocromo P-450 reductasa y cambios espectrales (entre el  $\text{CCl}_4$  y los microsomas hepáticos), fue separada por la misma técnica ya descrita para unión irreversible excepto que el hígado una vez sacado del animal se homogeneizó con un volumen igual a 4 veces su peso de una solución de ClK 1,15 %. Los microsomas una vez separados se resuspendieron en 13 ml de solución de ClK 1,15 % - 0,02 M Tris-ClH (pH 7,4). En esta suspensión se determinaron citocromo P-450, citocromo P-450 reductasa y cambios espectrales según se describe luego.

La separación de mitocondrias y microsomas de hígado, riñón y glándulas suprarrenales para los estudios comparativos de unión irreversible a lípidos y proteínas, peroxidación de lípidos y cambios espectrales, fueron llevadas a cabo según la técnica descrita por Schneider y Hogeboom (46), pero agregando EDTA 3 mM al medio de homogeneización para los estudios sobre unión irreversible y peroxidación. Los microsomas (provenientes de cada hígado) fueron suspendidos en 2 ml de sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM y se realizaron las determinaciones según se describe luego.

Separación de fracción rica en lisosomas: La fracción enriquecida en lisosomas fue aislada según el método indicado por Appelmans et al. (47) y consiste esencialmente en lo siguiente: los hígados o las glándulas suprarrenales fueron homogeneizados en sacarosa (1 g de hígado o suprarrenales por 6 ml) usando un homogeneizador de Teflon-

vidrio Potter-Elvehjem. Los núcleos y desechos celulares fueron separados por centrifugación a 600 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue luego centrifugado a 3.300 x g durante 10 minutos para separarlo de la fracción mitocondrial pesada. El sobrenadante de 3.300 x g fue centrifugado finalmente a 12.500 x g durante 20 minutos. El sedimento que corresponde a la fracción rica en lisosomas fue suspendido en sacarosa 0,25 M hasta una concentración de aproximadamente 2,5 mg de proteína/ml para los estudios de fosfatasa ácida.

Separación de retículo endoplásmico granular y agranular: Se realizó mediante el método de Dallner según el procedimiento descrito por Holtzman et al. (48), como sigue: El hígado una vez extraído del animal se homogeneizó con 4 veces su peso de sacarosa 0,25 M y se centrifugó 20 minutos a 10.000 x g. Una porción del sobrenadante (9,85) se mezcló con ClCs 1 M (0,15 ml) y 7,5 ml de esta mezcla se depositaron sobre 4,5 ml de sacarosa 1,30 M-ClCs 0,015 M. Los gradientes se centrifugaron a 105.000 xg durante 143 minutos en una ultracentrífuga Spinco modelo L (rotor N° 40). La fracción que sedimenta es la que corresponde al retículo endoplásmico granular. Se descartó la parte superior y se recogió la interfase. Se pasó a otro tubo, se completó el volumen con sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 105.000 x g durante 60 minutos. Sedimenta el retículo endoplásmico agranular. Ambos sedimentos se suspendieron en 2 ml de sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM y se realizaron las mediciones que se describirán oportunamente.

Separación de polisomas libres y unidos a membrana: Fueron aislados según el método descrito por Ragnotti et al. (49); El hígado se homogeneizó con 2,5 veces su peso de sacarosa 0,25 M en TKM (Tris 0,05 M; ClK 0,025 M; SO<sub>4</sub>Mg 0,005 M; pH 7,8). Se centrifugó 20

minutos a 12.000 x g. El sobrenadante es la fracción postmitocondrial. Una porción de esta fracción se depositó sobre un gradiente discontinuo constituido por una capa inferior (4 ml) de sacarosa 1,6 M en TKM y una capa superior (3 ml) de sacarosa 0,5 M en TKM y se centrifugó 2,5 horas a 270.000 x g. El sedimento corresponde a los polisomas libres y ribosomas monómeros. La interfase se recogió, se diluyó con TKM y se centrifugó a 270.000 x g durante 60 minutos, para obtener los polisomas unidos a membrana. Ambos sedimentos se suspendieron en 2 ml de sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM y se realizaron las determinaciones que oportunamente se indicarán.

Distribución de polisomas: se realizó por el procedimiento siguiente: Los hígados fueron procesados hasta obtener la fracción postmitocondrial como se describió en el método anterior. A una porción de esta fracción se le agregó desoxicolato de sodio hasta obtener una concentración final de 1,3 %, con el objeto de que todos los polisomas queden libres de membrana. 30 Unidades de absorbancia, medida a 260 mμ, en celda de 1 cm de espesor (aproximadamente 0,6 ml) de la muestra así obtenida fueron depositados sobre un gradiente lineal 15 % - 30 % de sacarosa preparado según Noll (50). Los gradientes fueron luego centrifugados a 25.000 rpm durante 7 horas en una ultracentrífuga Beckman L2-65B (rotor SW 25.2). Luego de la centrifugación el análisis de los gradientes se llevó a cabo mediante un Buchler Densi-Flow-Analyzer, a una velocidad de 1 ml/minuto y el efluente fue leído a 260 milimicrones en un espectrofotómetro Gilford 240.

Determinaciones enzimáticas y ensayos:

Fosfatasa ácida: Fue determinada usando como sustrato p-nitrofenilfosfato, según la técnica descrita por Linhardt y Walter (51). La actividad se expresó en milimicromoles de p-nitrofenol liberado en 30 minutos a 37°C por 50 microlitros de un sobrenadante de 20.000 x g obtenido a partir de una suspensión lisosomal conteniendo 1 mg de proteína/ml.

Glucosa-6-fosfatasa (G6P-asa): Fue determinada por el método de Harper (52). La actividad se expresó en microgramos de fósforo inorgánico producido en 15 minutos a 37°C, por mg de proteína.

Etilmorfina N-demetilasa; (EM-asa): Fue medida de acuerdo con el procedimiento descrito por Castro y Gillette (53), excepto que la concentración de la etilmorfina en la mezcla de incubación fue 10 mM. La actividad se expresó en milimicromoles de formaldehído producido en 15 minutos a 37°C por mg de proteína.

Determinación de citocromo P-450 (P-450): El contenido de P-450 se determinó en un espectrofotómetro Aminco-Chance, según el método descrito por Schenkman et al. (34), que se basa en la absorción a 450 milimicrones del complejo formado por el citocromo P-450 reducido con el monóxido de carbono. Se consideró como extinción debida al P-450 la diferencia  $E_{450} - E_{490}$  antes de la adición de reductor (ditionito de sodio) sustraída de la diferencia después de la adición. El resultado se expresó en milimicromoles de P-450/mg de proteína.

Citocromo P-450 reductasa; (P-450 reductasa): La velocidad de reducción del citocromo P-450 por el NADPH fue determinada en un espectrofotómetro Aminco-Chance según el método descrito por Gigon et al. (54).

Se utilizó una celda anaeróbica Aminco (Al-65085) para trabajar en atmósfera de O<sub>2</sub>. La velocidad de reducción del citocromo P-450 por el NADPH se calculó a partir de la velocidad inicial de incremento en absorbancia a 450 milimicrones y se expresó en milimicromoles de P-450 reducido a 25°C por mg de proteína/minuto.

Determinación de los cambios espectrales producidos por interacción del CCl<sub>4</sub> con el P-450 de microsomas de hígado o con microsomas y mitocondrias de glándulas suprarrenales: Fueron determinados según el método descrito por Schenkman et al. (34). Los microsomas hepáticos o los microsomas y mitocondrias de suprarrenales suspendidos en solución bufer Tris 0,025 M - ClH - ClK 0,15 M (pH 7,5) se agregaron a ambas cubetas de un espectrofotómetro Aminco-Chance y se registró la línea de base correspondiente a igual absorbancia de luz. La línea de base se restó del cambio en absorbancia producido por la adición de CCl<sub>4</sub> a una de las cubetas y posteriormente se graficó el espectro diferencial.

Determinación de la unión irreversible del <sup>14</sup>C de <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> a lípidos microsomales, in vivo: Para medir la incorporación in vivo del <sup>14</sup>C de <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> a los lípidos microsomales, se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión preparada según se describió en la sección correspondiente a procesamiento de órganos, y se agregó a 19 ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se agitó y luego de 2 ó 3 minutos se centrifugó a 3.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga graduado y se llevó a un volumen de 20 ml con la solución de cloroformo-metanol (2:1). Se agregaron 4 ml de agua destilada y se agitó para que se mezclen bien las dos fases y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos. La fase superior acuosa

fue aspirada y desechada. La fase clorofórmica inferior fue lavada 2 veces con 1 ml de la fase superior de una mezcla obtenida agregando a 25 ml de agua, 95 ml de la solución de cloroformo-metanol (2:1) y agitada. La fase clorofórmica inferior ya lavada fue evaporada en un frasco de centelleo previamente tarado, en atmósfera de nitrógeno a 40°C. Después de agregar al residuo algunas gotas de  $\text{CCl}_4$  no marcado, la muestra fue secada nuevamente a 40°C y pesada. Luego el residuo se disolvió en 10 ml de una solución al 0,5 % de 2,5-difeniloxazol (PPO) en tolueno y medida su radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-133. Al número de cuentas obtenido en cada caso se le hizo la corrección que corresponde debido a la atenuación (quenching), mediante el método que usa el cociente de canales y también se le restó el valor correspondiente a la solución de PPO solo. Los resultados se expresaron en descomposiciones por minuto (dpm)/ mg de lípidos microsomales.

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales, in vitro:

Fue medida por el siguiente procedimiento: Los microsomas de hígado separados según se describió anteriormente, fueron suspendidos en solución de ClK 1,15 % - 0,02 M Tris-ClH (pH 7,4), (10 ml por cada hígado) y luego se tomaron alícuotas de 2 ml y se les agregó 1 ml de sistema generador de NADPH (en los casos en que no se usó NADPH se agregó 1 ml del bufer Tris-ClH pH 7,4) y 5 microlitros de una solución hidroalcohólica de  $^{14}\text{CCl}_4$  (conc.  $2 \times 10^7$  dpm/ml) y se incubó con agitación simultánea durante 15 minutos a 37°C, en frascos provistos con tapón de goma y sellados y previamente gaseados con nitrógeno desoxigenado durante 5 minutos (y en los casos que se indicarán con OC también previamente desoxigenado). Terminada la incubación, se enfrió a 0°C,



y en 2 ml de la mezcla de incubación se extrajeron los lípidos y se midió la radioactividad según se describió en la técnica anterior, para unión irreversible in vivo.

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales, in vivo; Para medir la incorporación in vivo de  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales (55), se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión microsomal preparada según se describió en la sección correspondiente a procesamiento de órganos, se le agregaron 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se centrifugó a 9.000 x g, 10 minutos a 0°C. Se lavó luego 3 veces por resuspensión y posterior centrifugación con 5 ml de TCA al 5 %. Posteriormente se lavó de la misma forma con etanol-éter-cloroformo (2:2:1), con acetona y finalmente con éter. Luego de secado en estufa a 40°C, se tomaron 10 mg de proteína y se le agregaron 1 ml de ácido fórmico, 5 ml de butilcelosolve 48 % en tolueno y 15 ml de 2,5-difeniloxazol (PPO) 8 g/l en tolueno/butilcelosolve (3:1) y se midió la radioactividad según el procedimiento descrito anteriormente para lípidos.

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a ácido ribonucleico (RNA) ribosomal; El RNA ribosomal fue aislado de acuerdo con el método N° 2 descrito por Kirby (56), que utiliza para la extracción una mezcla de fenol-cresol. El ácido desoxiribonucleico (DNA), el glucógeno y el RNA soluble, se eliminaron extrayendo 2 veces con acetato de sodio 3 M. El RNA fue luego purificado precipitándolo 2 veces como sal del bromuro de cetiltrimetilamonio (Bellamy y Ralph (57)). Finalmente se reconvirtió en sal sódica con acetato de sodio y fue secado. Para medir radioactividad se tomaron 10 mg del RNA seco y se le agregaron 0,15 ml de agua y 1 ml de NCS Solubilizer (Amersham-Searle Co), se

completó el volumen a 10 ml con solución de PPO 0,5 % en tolueno y se midió la radioactividad según se describió en los procedimientos anteriores para lípidos y proteínas.

Determinación de las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  y de  $^{14}\text{CCl}_4$  : Las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado fueron realizadas de acuerdo con el procedimiento descrito por Recknagel y Litteria (58). Para la determinación de las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  (en hígado, riñón y suprarrenales, se siguió el procedimiento anterior sólo hasta la etapa de microdifusión, luego el  $^{14}\text{CCl}_4$  recogido en el tolueno del compartimiento central de la celda de microdifusión fue transferido a un frasco de centelleo conteniendo 10 ml de una solución al 0,5 % de PPO en tolueno y medida su radioactividad según se describió antes. Los resultados fueron corregidos por pérdida según se describe en el método.

Peroxidación de lípidos: La estimación cuantitativa de la peroxidación de lípidos in vivo, fue realizada por el método basado en la absorción ultravioleta de los dienos conjugados provenientes de extractos lipídicos (obtenidos según se describió antes) de las fracciones microsomales, según la técnica descrita por Klaasen y Plaa (59).

Los resultados se expresaron como el cambio de absorbancia a 243 milimicrones  $\times$  1.000 para una solución que contiene 1 mg de lípidos microsomales/ml.

Liberación de enzimas lisosomales, in vitro, inducida por  $\text{CCl}_4$  en hígado y glándulas suprarrenales: La determinación se realizó tomando alícuotas de 3 ml de la suspensión lisosomal ya sea proveniente de hígado (2,5 mg de proteína/ml) o de suprarrenales (2,1 mg de proteína por ml) e incubándolas con agitación simultánea durante 30 minutos a

37°C en frascos de Warburg con o sin 4 microlitros de  $\text{CCl}_4$  puro en el brazo lateral. El contenido de los frascos fue centrifugado luego a 20.000 x g y el sobrenadante se usó para las determinaciones de actividad enzimática (fosfatasa ácida).

Determinación de proteínas: Las concentraciones de proteínas en las distintas fracciones subcelulares fueron estimadas por el método del biuret o por el de Folin-Ciocalteu, usando albúmina de suero de bovino fracción V como patrón (60).

Análisis estadístico: La significación de la diferencia entre dos valores promedio se determinó por el Test de t (61). En los casos en que el cociente F entre dos variancias indicó que las variancias eran significativamente diferentes, la significación entre dos valores medios se estableció mediante el Test de U de Mann-Whitney según el método descrito por Rumke y de Jonge (62). En tratamientos que comprenden la comparación entre cuatro valores medios, la significación fue determinada por análisis de variancia bimodal de acuerdo con el método de Brownlee (63). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales, in vitro:

La unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  (que denominaremos simplemente "unión irreversible"), se midió in vitro, bajo distintas condiciones experimentales, de acuerdo con el procedimiento que se describió en la Parte Experimental.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Condición Experimental	$^{14}\text{C}$ unido irreversiblemente dpm/mg lípidos microsomales
sin NADPH	32,8
con NADPH	1.805,9
con ditionito de Na (10 mM)	113,3
con NADPH + aire	260,3
con NADPH + OC	132,2

Las incubaciones fueron realizadas en atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno, excepto en los experimentos con aire y con monóxido de carbono (en este último caso la atmósfera fue 100 % OC libre de oxígeno). Los resultados son representativos de por lo menos 4 experimentos similares.

Los valores indican que la unión irreversible requiere NADPH como cofactor y se verifica en atmósfera de nitrógeno, en tanto que se inhibe casi totalmente en aire o en atmósfera de OC.

El ditionito de sodio, que es capaz de reducir al citocromo P-450 con mayor eficacia que el NADPH, no es buen reemplazante del NADPH en este sistema.

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos de distintas fracciones subcelulares de hígado, riñón y glándulas suprarrenales: La unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a componentes lipídicos ultraestructurales es mayor en hígado que en suprarrenales y en suprarrenales mayor que en riñón (Tabla 1). En el hígado la unión irreversible a microsomas es mayor que en mitocondrias o que en sobrenadante de 105.000 x g. Ello es particularmente notable cuando los valores se refieren al contenido total de lípidos en cada fracción subcelular (Tabla 1). En suprarrenales los valores de unión irreversible en microsomas y mitocondrias son iguales (Tabla 1) y particularmente elevados cuando se los refiere al contenido en proteínas correspondiente al volumen de la muestra en que se midió la unión a lípidos, con lo cual se evita el efecto de enmascaramiento sobre los valores que produce el alto contenido en suprarrenales de lípidos no reactivos con el  $^{14}\text{CCl}_4$  (colesterol y otros esteroides). Por ejemplo, los valores son para hígado: microsomas,  $17 \pm 3$  dpm/mg de proteína; mitocondrias,  $9 \pm 1$  dpm/mg proteína; y para suprarrenales: microsomas,  $24 \pm 11$  dpm/mg proteína; mitocondrias,  $15 \pm 10$  dpm/mg proteína.

Como puede verse los valores de unión irreversible llegan aún a superar a los que se encuentran en hígado.

Unión irreversible a lípidos microsomales en ratas tratadas con distintos compuestos: El pretratamiento con distintos compuestos que son sustratos, inhibidores o inductores del sistema enzimático hidroxilante de tóxicos y fármacos presente en microsomas hepáticos, produjo efectos variados. Por ejemplo, el SKF 525A y el fenobarbital, aumentaron su intensidad, en tanto que la nicotinamida, el DPEA, la cistamina, el

TABLA 1  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS DE DISTINTAS FRACCIONES  
SUBCELULARES DE HIGADO, RIÑON Y SUPRARRENALES

Fracción subcelular <sup>1</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos <sup>2</sup>	
	dpm/mg lípidos Valor medio $\pm$ DS	dpm totales en lípidos <sup>3</sup> Valor medio $\pm$ DS
<b>Hígado</b>		
microsomas	56,2 $\pm$ 3,6	3.572 $\pm$ 34
mitocondrias	36,1 $\pm$ 3,4	635 $\pm$ 16
sobrenadante 105.000 g	39,4 $\pm$ 12,8	722 $\pm$ 108
<b>Riñón</b>		
microsomas	8,0 $\pm$ 1,8	
mitocondrias	6,9 $\pm$ 1,5	
<b>Suprarrenales</b>		
microsomas	18,1 $\pm$ 12,3	
mitocondrias	19,8 $\pm$ 12,1	

<sup>1</sup>Ratas macho ayunadas durante 12-14 hr, fueron inyectadas por vía intraperitoneal con una solución de  $^{14}\text{CCl}_4$  (27,5 mCi/mM) en aceite de oliva ( $1,4 \times 10^6$  dpm/ml de solución) en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$ . Los hígados, riñones y suprarrenales se extrajeron y procesaron rápidamente. Las fracciones subcelulares se separaron y se determinó el  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a los lípidos como se describe en la Parte Experimental.

<sup>2</sup>En los experimentos sobre la distribución de  $^{14}\text{C}$  en los lípidos de las fracciones subcelulares de hígado y riñón se utilizaron 5 animales por grupo. Los resultados de suprarrenales son el promedio de 3 experimentos distintos obtenidos reuniendo las suprarrenales de 12, 21 y 41 animales respectivamente.

Continuación de la leyenda de la Tabla 1

<sup>3</sup>Los resultados están expresados en dpm obtenidos en todos los lípidos contenidos en la fracción subcelular correspondiente al órgano entero.

pirazol, la metopirona, la cicloheximida y el 3-MC la disminuyeron, y el Sch 5706 y la aminopirina no la modificaron (Tabla 2).

Unión irreversible a lípidos microsomales de hígado de ratas en distintas condiciones experimentales: El ayuno prolongado (de 72 hr) no modificó la intensidad de la unión irreversible, en tanto que la adrenalectomía produjo cambios notables en la misma, ya sea cuando el animal se halla en su natural hipotermia o cuando se lo mantiene en un ambiente con temperatura de 37°C (Tabla 3). La castración de los machos no cambió la intensidad de la unión irreversible a lípidos microsomales en tanto que la unión irreversible en hembras es menor (81 %) que la encontrada en los machos (Tabla 3). La administración de sobredosis de  $^{14}\text{CCl}_4$  demostró que existe cierto grado de proporcionalidad entre la dosis de  $^{14}\text{CCl}_4$  y la unión irreversible que se obtiene, e indica asimismo que no hay una limitación de los sitios reactivos, dentro de los rangos usados, para unirse irreversiblemente con el  $^{14}\text{CCl}_4$  (Tabla 3).

Unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas de distintas fracciones subcelulares de hígado, riñón y suprarrenales: La unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas de las distintas fracciones subcelulares de hígado, es mayor que la que ocurre en cualquier fracción de riñón o suprarrenales. Más aún, no existe una marcada diferencia en el marcado específico entre las distintas fracciones de riñón o suprarrenales (Tabla 4).

En el hígado, el  $^{14}\text{CCl}_4$  se une preferentemente a las proteínas de la fracción sobrenadante de 105.000 x g; ello es más notable aún cuando los resultados se expresan en términos del contenido hepático total de proteínas en cada fracción subcelular (Tabla 4).



TABLA 2  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS MICROSOMALES DE HIGADO  
EN RATAS TRATADAS PREVIAMENTE CON DISTINTOS COMPUESTOS

Tratamiento <sup>1</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos		
	dpm/mg lípidos Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>2</sup>	Valor de p
Control	32,4 $\pm$ 3,2		
SKF 525A	47,9 $\pm$ 5,3	148	< 0,001
Control	44,5 $\pm$ 2,3		
Sch 5706	44,3 $\pm$ 7,4	99	> 0,9
Control	49,8 $\pm$ 7,5		
Aminopirina	49,2 $\pm$ 11,0	98	> 0,9
Control	49,8 $\pm$ 7,5		
Nicotinamida	37,9 $\pm$ 6,7	76	< 0,01
Control	41,8 $\pm$ 3,5		
DPEA	30,6 $\pm$ 10,7	73	< 0,01
Control	58,2 $\pm$ 8,1		
Fenobarbital	81,3 $\pm$ 19,2	140	< 0,001
Control	48,0 $\pm$ 11,2		
Cistamina	27,7 $\pm$ 5,8	58	< 0,01
Control	50,3 $\pm$ 4,4		
Pirazol	20,9 $\pm$ 1,9	42	< 0,001
Control	68,9 $\pm$ 10,1		
Metopirona	57,6 $\pm$ 12,4	83	< 0,02
Control	43,1 $\pm$ 3,1		
3-MC	30,8 $\pm$ 3,1	71	< 0,001
Control	42,1 $\pm$ 5,7		
Cicloheximida	27,8 $\pm$ 3,8	66	< 0,001

Leyenda de la Tabla 2.

<sup>1</sup>La administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  se realizó en las condiciones descriptas en la Tabla 1. El SKF 525A, Sch 5706, aminopirina, nicotinamida, pirazol, metopirona y cicloheximida disueltos en solución fisiológica y el DPEA disuelto en agua destilada, fueron administrados por vía intraperitoneal 30 minutos antes del  $^{14}\text{CCl}_4$ .

El SKF 525A, Sch 5706 y DPEA fueron administrados en una dosis de 50 mg/kg. La aminopirina, nicotinamida, pirazol, metopirona y cicloheximida en una dosis de 100 mg/kg; 500 mg/kg; 150 mg/kg; 60 mg/kg y 1 mg/kg respectivamente.

El fenobarbital (80 mg/kg) disuelto en solución fisiológica y el 3-metilcolantreno (3-MC) (35 mg/kg) disuelto en aceite de oliva fueron administrados por vía intraperitoneal una vez por día durante 3 días. El  $^{14}\text{CCl}_4$  fue administrado en la mañana del cuarto día.

La cistamina se administró oralmente disuelta en agua destilada, en una dosis de 600 mg/kg, 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución fisiológica o agua destilada. Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  y se determinó el  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a los lípidos como se describe en la Parte Experimental.

Se utilizaron en cada experimento 10 animales por grupo.

<sup>2</sup>El valor de la unión irreversible de los respectivos controles se tomó como 100 %.

TABLA 3  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS MICROSOMALES DE HIGADO  
RATAS EN DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Condiciones experimentales <sup>1</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos		
	dpm/mg lípidos Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>2</sup>	Valor de p
Control	39,2 $\pm$ 5,4		
Ayunados 72 hr	40,0 $\pm$ 3,8	102	> 0,6
Adrenalectomizados simulados	67,1 $\pm$ 8,7		
Adrenalectomizados 26°C	126,7 $\pm$ 33,8	189	< 0,001
Adrenalectomizados 37°C	156,0 $\pm$ 42,9	273	< 0,001
Castrados simulados	64,0 $\pm$ 8,4		
Castrados	61,1 $\pm$ 11,2	95	> 0,9
Machos	70,3 $\pm$ 9,0		
Hembras	57,3 $\pm$ 4,2	81	< 0,001
Control	39,2 $\pm$ 5,5		
Sobredosis (4x)	225,8 $\pm$ 27,6	576	< 0,001
Control	39,2 $\pm$ 5,5		
Sobredosis (16,8x)	947,2 $\pm$ 115,9	2.417	< 0,001

<sup>1</sup>Se usaron ratas ayunadas durante 12-14 hr, excepto para el experimento de ayuno prolongado de 72 hr. Las ratas castradas y las adrenalectomizadas así como sus respectivos controles de castración y adrenalectomía simulada, se usaron 7 días después de la operación. Se usaron machos y hembras del mismo peso.

Las condiciones experimentales para la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  son las descritas en la Tabla 1, excepto para los experimentos en que se usó sobredosis, caso en el que se usó una solución de  $^{14}\text{CCl}_4$  en aceite de oliva de  $5,6 \times 10^6$  dpm/ml para el experimento de 4x dosis y  $23,5 \times 10^6$  dpm/ml para el experimento de 16,8 x dosis.

Continuación de la leyenda de la Tabla 3

Se usaron en cada experimento 10 animales por grupo. Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  y se determinó el  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a las proteínas microsomales como se describe en la Parte Experimental.

<sup>2</sup>El valor de la unión irreversible de los respectivos controles se tomó como 100 %.

TABLA 4  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A PROTEINAS DE DISTINTAS FRACCIONES  
SUBCELULARES DE HIGADO, RIÑON Y SUPRARRENALES

Fracción subcelular <sup>1</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a proteínas <sup>2</sup>	
	dpm/mg proteína Valor medio $\pm$ DS	dpm totales en proteínas <sup>3</sup> Valor medio $\pm$ DS
<b>Hígado</b>		
microsomas	32,2 $\pm$ 1,5	7.181 $\pm$ 335
mitocondrias	27,9 $\pm$ 1,5	3.041 $\pm$ 164
sobrenadante 105.000 g	55,3 $\pm$ 6,4	26.268 $\pm$ 3.040
<b>Riñón</b>		
microsomas	10,8 $\pm$ 0,3	
mitocondrias	10,7 $\pm$ 1,2	
<b>Suprarrenales</b>		
microsomas	11,7 $\pm$ 1,3	
mitocondrias	7,2 $\pm$ 2,5	

<sup>1</sup>La administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  se realizó en las condiciones descritas en la Tabla 1 y la determinación del  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a proteínas se efectuó como se describe en la Parte Experimental.

<sup>2</sup>En los experimentos sobre la distribución del  $^{14}\text{C}$  en las proteínas de las fracciones subcelulares de hígado y riñón se usaron 5 animales por grupo. Los resultados de suprarrenales son el promedio de 3 experimentos distintos que se llevaron a cabo reuniendo las suprarrenales de 12, 21 y 41 animales respectivamente.

<sup>3</sup>Los resultados están expresados en dpm obtenidas en todas las proteínas contenidas en la fracción subcelular correspondiente al órgano entero.

Unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales de hígado en ratas tratadas previamente con distintos compuestos: La administración previa de cistamina, pirazol o 3-MC, disminuyó la intensidad de la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas. El pretratamiento con SKF 525A, fenobarbital, metopirona o el hecho de usar hembras no modificó significativamente la intensidad de la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas (Tabla 5).

La administración de una dosis de  $^{14}\text{CCl}_4$  cuatro veces mayor que la usual, produjo un aumento equivalente en la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales (Tabla 5).

Duración del tiempo de sueño producido por pentobarbital en ratas bajo distintas condiciones experimentales: Tomando la duración del tiempo de sueño como un índice indirecto de la capacidad general del animal de metabolizar drogas por hidroxilación bajo distintas condiciones experimentales, en la Tabla 6 puede observarse que la administración de diversos sustratos o inhibidores del sistema enzimático que metaboliza el pentobarbital, produce un marcado aumento en el tiempo de sueño comparado con sus respectivos controles. El efecto inhibitor fue: SKF 525A > DPEA > aminopirina > Sch 5706 > nicotinamida (Tabla 6).

Diferentes condiciones experimentales, como el empleo de ratas hembra o el uso de animales ayunados por 72 horas, adrenalectomizados o castrados, también aumentó el tiempo de sueño producido por pentobarbital siendo la intensidad del efecto: Hembras > adrenalectomía > castración > ayuno prolongado > controles (Tabla 6).

Concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígado 3 horas después de su administración a ratas tratadas previamente con distintos compuestos o en distintas condiciones experimentales: El tratamiento previo con SKF 525A, Sch 5706,

TABLA 5  
UNIÓN IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A PROTEINAS MICROSOMALES DE HIGADO  
EN RATAS BAJO DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Condiciones experimentales <sup>1</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a proteínas		
	dpm/mg proteína Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>2</sup>	Valor de p
Control	33,3 $\pm$ 2,5		
SKF 525A	38,2 $\pm$ 12,3	115	>0,2
Control	22,9 $\pm$ 3,2		
Fenobarbital	22,1 $\pm$ 1,3	97	>0,9
Control	31,3 $\pm$ 1,6		
Cistamina	8,4 $\pm$ 1,1	28	< 0,001
Control	33,0 $\pm$ 2,5		
Pirazol	9,2 $\pm$ 0,7	28	<0,001
Control	35,1 $\pm$ 2,1		
Metopirona	33,6 $\pm$ 5,8	96	> 0,4
Control	29,5 $\pm$ 3,5		
3-MC	21,2 $\pm$ 2,3	72	< 0,001
Control	21,9 $\pm$ 3,0		
Sobredosis (4x)	101,6 $\pm$ 11,7	464	< 0,001
Machos	30,8 $\pm$ 2,2		
Hembras	28,7 $\pm$ 3,8	93	>0,2

<sup>1</sup>La administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  se realizó en las condiciones descritas en la Tabla 1, la sobredosis (4x) de  $^{14}\text{CCl}_4$  de acuerdo con lo detallado en la Tabla 3 y la administración de los compuestos de acuerdo con lo descrito en la Tabla 2. La determinación del  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a las proteínas se realizó según se describe en la Parte Experimental. Se utilizaron en cada experimento 10 animales por grupo.

<sup>2</sup>El valor de la unión irreversible de los respectivos controles se tomó como 100 %.

TABLA 6

DURACION DEL TIEMPO DE SUEÑO PRODUCIDO POR PENTOBARBITAL EN RATAS BAJO  
DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Condiciones experimentales <sup>1</sup>	Tiempo de sueño Valor medio $\pm$ DS minutos	% con respecto al control <sup>2</sup>	Valor de p
Control	79 $\pm$ 23 (12) <sup>3</sup>		
SKF 525A	435 $\pm$ 68 (5)	550	< 0,001
Seh 5706	170 $\pm$ 24 (6)	215	< 0,001
DPEA	205 $\pm$ 47 (8)	259	< 0,001
Control	113 $\pm$ 11 (5)		
Aminopirina	254 $\pm$ 63 (6)	224	< 0,001
Nicotinamida	170 $\pm$ 43 (5)	141	< 0,02
Machos	82 $\pm$ 18 (11)		
Hembras	248 $\pm$ 65 (10)	302	< 0,001
Control	98 $\pm$ 28 (5)		
Ayunados 72 hr	115 $\pm$ 36 (15)	117	> 0,3
Adrenalectomizados simulados	105 $\pm$ 32 (8)		
Adrenalectomizados	244 $\pm$ 56 (7)	232	< 0,001
Castrados simulados	116 $\pm$ 15 (8)		
Castrados	164 $\pm$ 37 (8)	141	< 0,01

<sup>1</sup>El pentobarbital sódico se administró por vía intraperitoneal en una dosis de 40 mg/kg a ratas ayunadas durante 12-14 hr. Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución fisiológica. Se usaron ratas macho, excepto en el caso indicado. Los compuestos se administraron según se describe en la Tabla 2; 30 minutos antes del pentobarbital y las condiciones experimentales son las descriptas en la Tabla 3.

<sup>2</sup>Los números entre paréntesis indican el número de animales usado en cada grupo.

<sup>3</sup>El tiempo de sueño de los controles se tomó como 100 %.



nicotinamida, cicloheximida o aminopirina, no alteró significativamente las concentraciones hepáticas de  $^{14}\text{CCl}_4$  tres horas después de su administración (Tabla 7). En contraste el pretratamiento con fenobarbital o con metopirona disminuyó los niveles de  $^{14}\text{CCl}_4$  y la administración previa de cistamina, pirazol o 3-MC los aumentó (Tabla 7).

El ayuno prolongado o la castración previa de los animales no cambió las concentraciones hepáticas de  $^{14}\text{CCl}_4$ , no obstante las hembras tienen concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígado significativamente menores que los machos (Tabla 8).

En los animales adrenalectomizados las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  son menores que las que se encuentran en los hígados de los respectivos controles (Tabla 8).

Tal como era de esperar, dosis mayores de  $^{14}\text{CCl}_4$  producen concentraciones hepáticas más elevadas del mismo. Las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  en riñón son más del doble de aquellas encontradas en el hígado, en tanto que las que hay en suprarrenales son del mismo orden (Tabla 8).

Unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales en relación con sus concentraciones en el hígado en diferentes condiciones experimentales: Dado que como se vio en las Tablas anteriores, la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales depende de la dosis y consecuentemente de las concentraciones hepáticas de  $^{14}\text{CCl}_4$ , es crítico considerar sus valores en relación con estos niveles para cada situación experimental. Hecho esto, se puede afirmar que la capacidad intrínseca para activar el  $^{14}\text{CCl}_4$  en el hígado está aumentada en los animales pretratados con SKF 525A, fenobarbital o en los adrenalectomizados, ya que la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  está

TABLA 7  
 CONCENTRACIONES DE  $^{14}\text{CCl}_4$  EN HIGADO 3 HR DESPUES DE SU ADMINISTRACION  
 A RATAS TRATADAS PREVIAMENTE CON DISTINTOS COMPUESTOS

Tratamiento <sup>1</sup>	Concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado <sup>2</sup> Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>3</sup>	Valor de p
Control	295 $\pm$ 24		
SKF 525A	292 $\pm$ 54	99	> 0,9
Control	368 $\pm$ 39		
Sch 5706	342 $\pm$ 36	93	> 0,2
Control	295 $\pm$ 24		
Aminopirina	302 $\pm$ 42	102	> 0,7
Control	295 $\pm$ 24		
Nicotinamida	291 $\pm$ 53	99	> 0,6
Control	294 $\pm$ 38		
Fenobarbital	198 $\pm$ 30	67	< 0,001
Control	488 $\pm$ 161		
Cistamina	663 $\pm$ 54	136	< 0,05
Control	536 $\pm$ 71		
Pirazol	755 $\pm$ 114	141	< 0,001
Control	536 $\pm$ 71		
Metopirona	388 $\pm$ 47	72	< 0,001
Control	585 $\pm$ 147		
3-MC	825 $\pm$ 123	141	< 0,01
Control	426 $\pm$ 132		
Cicloheximida	491 $\pm$ 121	115	> 0,2

<sup>1</sup>La administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  se realizó en las condiciones descritas en la Tabla 1 y la de los distintos compuestos de acuerdo con lo

Continuación de la leyenda de la Tabla 7

detallado en la Tabla 2. Se utilizaron 10 animales por grupo en cada experimento.

<sup>2</sup>Las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  se determinaron recogiendo el  $^{14}\text{CCl}_4$  proveniente de los homogeneizados de hígado, en tolueno colocado en el compartimiento central de una celda de microdifusión. Los resultados se expresan en dpm/gramo de hígado.

<sup>3</sup>El valor de los respectivos controles se tomó como 100 %.

TABLA 8  
 CONCENTRACIONES DE  $^{14}\text{CCl}_4$  EN HIGADO 3 HR DESPUES DE SU ADMINISTRACION  
 A RATAS EN DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Tratamiento <sup>1</sup>	Concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado <sup>2</sup> Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>3</sup>	Valor de p
Control	326 $\pm$ 42		
Ayunados 72 hr	279 $\pm$ 70	86	> 0,3
Adrenalectomizados simulados	316 $\pm$ 38		
Adrenalectomizados	262 $\pm$ 53	83	< 0,05
Castrados simulados	349 $\pm$ 52		
Castrados	294 $\pm$ 54	84	< 0,05
Control	353 $\pm$ 40		
Sobredosis (4x)	936 $\pm$ 189	265	< 0,001
Control	353 $\pm$ 40		
Sobredosis (16,8 x)	3.923 $\pm$ 794	1.111	< 0,001
Machos	368 $\pm$ 39		
Hembras	295 $\pm$ 64	80	< 0,02
Hígado	368 $\pm$ 39		
Riñón	856 $\pm$ 103	233	< 0,001
Suprarrenales	462	125	

<sup>1</sup>Las condiciones experimentales para la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  son las descritas en la Tabla 1, excepto para los experimentos en que se usó sobredosis de  $^{14}\text{CCl}_4$ , caso en que las condiciones son similares a las descritas en la Tabla 3. Se usaron 10 animales por grupo en cada experimento.

<sup>2</sup>Las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  se determinaron según se describe en la Tabla 7. Los resultados se expresan en dpm por gramo de hígado.

<sup>3</sup>El valor de los respectivos controles se tomó como 100 %. Para riñón y suprarrenales se tomó como valor control el del hígado.

aumentada a pesar de que las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  están disminuidas o iguales. Una situación parecida ocurre con la cistamina, pirazol, 3-MC, nicotinamida, cicloheximida y con los animales castrados, ya que se obtiene una disminución en la intensidad de la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos o a proteínas microsomales a pesar de que las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en hígado están aumentadas o son iguales con respecto a sus controles. En el caso de la administración de metopirona o en el de las ratas hembra puede concluirse que la activación intrínseca del  $^{14}\text{CCl}_4$  en el hígado probablemente no se modifica, dado que las disminuciones observadas en ambos casos son del mismo orden que las disminuciones en las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre hepático. En el caso del DPEA no tuvimos suficiente compuesto como para verificar su efecto sobre las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígado y por lo tanto esos resultados deben considerarse solo tentativos.

Cuando se relacionan los resultados de unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  con sus concentraciones tisulares, las diferencias en la capacidad intrínseca para activar el  $^{14}\text{CCl}_4$  entre hígado o suprarrenales y riñón se hace más notable.

Cambios espectrales producidos por interacción del  $\text{CCl}_4$  con microsomas de hígado y con microsomas y mitocondrias de glándulas suprarrenales:

En la Figura 1 puede observarse que el  $\text{CCl}_4$  interacciona con el citocromo P-450 de microsomas y mitocondrias de suprarrenales para dar cambios espectrales tipo II en el caso de los microsomas (a diferencia del cambio tipo I que se observa en el hígado) y un cambio espectral tipo I muy pequeño pero observable en el caso de las mitocondrias. En este último caso, la interacción no es observable cuando la concentración de proteína en la suspensión es de 2 mg/ml, pero se hace evidente

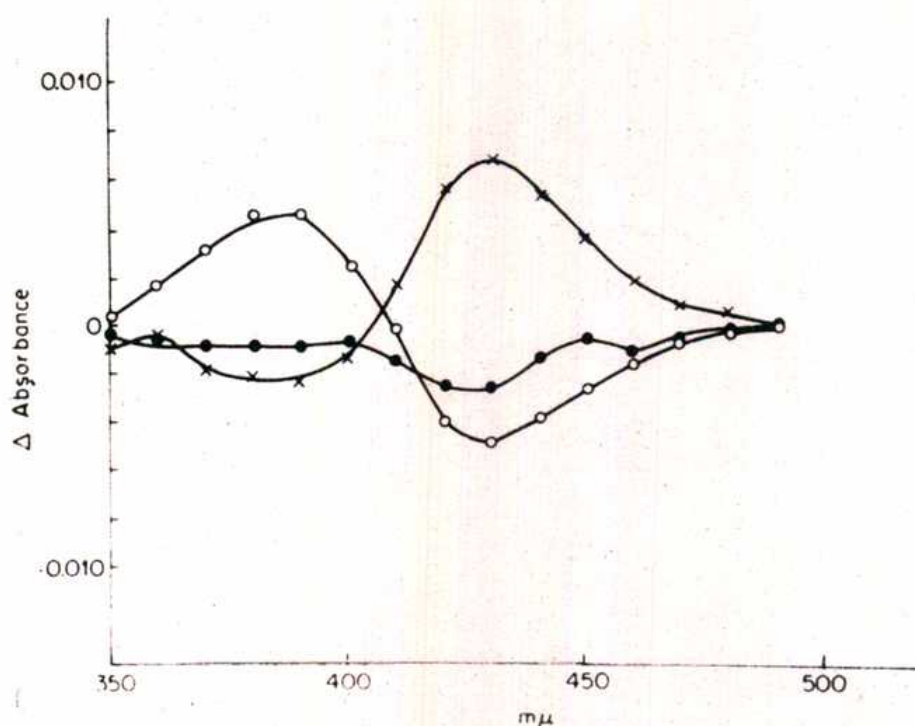


Figura 1.— Cambios espectrales causados por interacción del  $\text{CCl}_4$  con (o—o) microsomas de hígado (2 mg/ml), (x—x) microsomas de suprarrenales (2 mg/ml) y (•—•) mitocondrias de suprarrenales (0,4 mg/ml). No se observaron cambios espectrales con mitocondrias suprarrenales a concentraciones mayores (2 mg/ml) o menores (0,1 mg/ml) que 0,4 mg/ml. La concentración final de  $\text{CCl}_4$  fue 27 milimolar.

cuando se diluye a 0,4 mg/ml.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre el contenido de P-450 en microsomas y mitocondrias de hígado y suprarrenales: Los resultados en la Tabla 9 muestran que la destrucción de P-450 en suprarrenales, que se produce a diferentes tiempos después de la administración de  $\text{CCl}_4$ , solo ocurre en microsomas y en menor grado que el observado en el caso de los microsomas de hígado.

Peroxidación de lípidos inducida por  $\text{CCl}_4$  en fracciones subcelulares de hígado y suprarrenales: La peroxidación de lípidos es observable en microsomas suprarrenales pero en menor grado que en el hígado, mientras que en las mitocondrias suprarrenales los resultados indican que la peroxidación de lípidos carece en ellas de importancia, al igual que en el hígado (Tabla 10).

Liberación de enzimas lisosomales, inducida por  $\text{CCl}_4$  in vitro, en hígado y suprarrenales: La comparación de los valores obtenidos indica que la capacidad del  $\text{CCl}_4$  para producir in vitro la liberación de enzimas de lisosomas en ambos órganos es similar (Tabla 11).

Actividad de EM-asa, contenido de P-450 y actividad de NADPH P-450 reductasa en retículo endoplásmico granular y agranular: En la Tabla 12 puede observarse que la actividad de la etilmorfina N-demetilasa y de la P-450 reductasa así como el contenido de P-450 es mayor en el retículo endoplásmico agranular que en el granular. Los cocientes agranular/granular son: 2,13; 1,83 y 2,34 respectivamente.

Unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos y proteínas del retículo endoplásmico granular y agranular: El  $^{14}\text{CCl}_4$  es capaz de unirse irreversiblemente a los componentes lipídicos y proteicos del retículo endoplásmico granular y agranular. La intensidad con que se une a ambos

TABLA 9

EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CCl<sub>4</sub> SOBRE EL CONTENIDO DE CITOCROMO P-450

Fracción subcelular	Tiempo, después del CCl <sub>4</sub> (hr)	Citocromo P-450 (muMoles/mg protefna)	
		mitocondrias	microsomas
<b>Suprarrenales</b>			
Control	6	0,41 ± 0,06	0,39 ± 0,06
CCl <sub>4</sub>	6	0,46 ± 0,04	0,33 ± 0,01
Control	10	0,42 ± 0,08	0,31 ± 0,05
CCl <sub>4</sub>	10	0,47 ± 0,01	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>
Control	24	0,39 ± 0,12	0,37 ± 0,13
CCl <sub>4</sub>	24	0,44 ± 0,01	0,17 ± 0,06 <sup>b</sup>
Control	48	0,46 ± 0,14	0,55 ± 0,01
CCl <sub>4</sub>	48	0,47 ± 0,15	0,52 ± 0,04
Control	72	0,48 ± 0,15	0,42 ± 0,06
CCl <sub>4</sub>	72	0,35 ± 0,03	0,47 ± 0,03
<b>Hígado</b>			
Control	6	---	0,47 ± 0,10
CCl <sub>4</sub>	6	---	0,23 ± 0,08 <sup>a</sup>
Control	10	---	0,56 ± 0,11
CCl <sub>4</sub>	10	---	0,15 ± 0,07 <sup>c</sup>
Control	24	---	0,64 ± 0,11
CCl <sub>4</sub>	24	---	0,08 ± 0,06 <sup>c</sup>

El CCl<sub>4</sub> fue administrado por vía intraperitoneal en solución al 20 % (v/v), en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva.

Los resultados de suprarrenales son el promedio de 3 experimentos distintos realizados reuniendo las suprarrenales provenientes de 12 animales en cada caso.

<sup>a</sup> p < 0,01.    <sup>b</sup> p < 0,05.    <sup>c</sup> p < 0,001.



TABLA 10  
 PEROXIDACION DE LIPIDOS INDUCIDA POR CCl<sub>4</sub> EN FRACCIONES SUBCELULARES  
 DE HIGADO Y SUPRARRENALES<sup>1</sup>

Fracción subcelular	Tiempo, después del CCl <sub>4</sub> (hr)	Absorbancia a 243 mμ/mg lipidos	
		mitocondrias	microsomas
<b>Suprarrenales</b>			
Control	3	271	303
Tratados	3	291	341
Control	6	359	318
Tratados	6	372	393
<b>Hígado</b>			
Control	3	336	353
Tratados	3	348	463 <sup>a</sup>
Control	6	312	252 <sup>a</sup>
Tratados	6	332	401 <sup>a</sup>

El CCl<sub>4</sub> fue administrado según se indica en la Tabla 9.

<sup>1</sup> Los valores correspondientes a la peroxidación de lípidos están expresados como Δ de absorbancia a 243 mμ x 1.000 para una solución que contiene 1 mg de lípidos/ml. En los experimentos con hígado se usaron 5 animales por grupo y la DS de los valores fue de ± 10 % como máximo. Los resultados de suprarrenales fueron obtenidos reuniendo las glándulas de 36 ratas por cada grupo.

<sup>a</sup> p < 0,01 .

TABLA 11

LIBERACION DE ENZIMAS LISOSOMALES IN VITRO INDUCIDA POR EL  $\text{CCl}_4$   
EN HIGADO Y SUPRARRENALES<sup>1</sup>

	Actividad de fosfatasa ácida <sup>2</sup>	% del control
<b>Hígado</b>		
Control	32,0	
$\text{CCl}_4$	66,0	206
<b>Suprarrenales</b>		
Control	8,8	
$\text{CCl}_4$	22,0	250

<sup>1</sup>Tres alícuotas de la suspensión lisosomal de hígado (2,5 mg de proteína/ml) o suprarrenales (2,1 mg de proteína/ml) fueron incubados con agitación durante 30 minutos a 37°C en frascos de Warburg con o sin 4 microlitros de  $\text{CCl}_4$  puro en el brazo lateral. El contenido de los frascos fue luego centrifugado 20 minutos a 2.000 x g y el sobrenadante se usó para medir actividad enzimática.

<sup>2</sup>La actividad de la fosfatasa ácida está expresada en milimicro-moles de p-nitrofenol liberados en 30 minutos a 37°C por 50 microlitros del sobrenadante de 20.000 x g de una suspensión lisosomal que contiene 1 mg de proteína/ml.

TABLA 12

ACTIVIDAD DE EM-asa, CONTENIDO DE P-450 Y ACTIVIDAD DE P-450 REDUCTASA  
EN RETICULO ENDOPLASMICO GRANULAR Y AGRANULAR DE HIGADO DE RATA

	Agranular	Granular
EM-asa	51 ± 6	24 ± 3
P-450	0,57 ± 0,05	0,35 ± 0,10
P-450 reductasa	0,89 ± 0,30	0,38 ± 0,18

Las preparaciones y ensayos fueron indicados en la parte experimental. La actividad de la etilmorfina N-demetilasa (EM-asa) está expresada en milimicromoles de formaldehido formado en 15 minutos por mg de protefna a 37°C; el contenido de citocromo P-450 (P-450) está expresado en milimicromoles por mg de protefna y la actividad de la citocromo P-450 reductasa (P-450 reductasa) está expresada en milimicromoles de P-450 reducido a 25°C por minuto por mg de protefna.

Los valores están expresados como el valor medio ± DS de los resultados obtenidos con 10 animales por grupo. Los valores correspondientes al retículo endoplásmico agranular fueron significativamente mayores que los correspondientes al granular, para los 3 parámetros ( $p < 0,001$ ).

componentes es significativamente mayor en el retículo endoplásmico agranular que en el granular (Tabla 13).

Peroxidación de lípidos inducida por  $\text{CCl}_4$  y destrucción de P-450 y G6P-asa en el retículo endoplásmico granular y agranular:

Los datos en la Tabla 14 muestran que la destrucción del P-450 por  $\text{CCl}_4$  es más intensa en el retículo endoplásmico agranular que en el granular ya que 52,6 % de destrucción fue observada en el granular y solo 25,8 % en el agranular.

A la inversa, en el caso de la destrucción de la actividad de la G6P-asa por  $\text{CCl}_4$ , se observa que es levemente más pronunciada en el granular que en el agranular, ya que se obtuvo 49 % de destrucción en el primero y 40 % en el último.

En cuanto a la peroxidación de lípidos inducida por  $\text{CCl}_4$ , es tan intensa en el agranular como en el granular.

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos y proteínas de los polisomas libres y unidos a membrana: Los valores en la Tabla 15 muestran que el  $^{14}\text{CCl}_4$  se une irreversiblemente en grado considerable a los componentes proteicos de los polisomas libres y unidos a membrana, como así también a los componentes lipídicos de los polisomas unidos a membrana.

Ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$ , cloroformo o cloruro de metileno: El  $\text{CCl}_4$  causa una ruptura casi total de los polisomas a los 40 minutos después de su administración (Figura 2).

En cambio una dosis similar de cloroformo, solo produce un proceso de ruptura parcial, mientras que el cloruro de metileno, bajo condiciones similares tiene efecto mucho menor o casi nulo (Figura 2).

TABLA 13  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS Y PROTEINAS DEL RETICULO  
ENDOPLASMICO GRANULAR Y AGRANULAR

Retículo endoplásmico	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos y proteínas			
	dpm/mg lípidos media $\pm$ DS	agranular <u>granular</u>	dpm/mg proteínas media $\pm$ DS	agranular <u>granular</u>
Agranular	341,8 $\pm$ 25,1		139,5 $\pm$ 14,8	
		1,3		1,2
Granular	264,6 $\pm$ 29,3		114,1 $\pm$ 13,5	

Se inyectaron ratas macho ayunadas (12-14 hr) con una solución de  $^{14}\text{CCl}_4$  (27,5 mCi/mM) en aceite de oliva ( $1,4 \times 10^6$  dpm/ml) en una dosis de 5 ml /kg. Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$ . Las dos fracciones reticulares fueron separadas y analizadas según se describe en la Parte Experimental. En el experimento se usaron 16 animales y se reunieron los hígados de a dos para su análisis.

El valor de p fue  $p < 0,01$  para la diferencia entre los valores obtenidos para ambas fracciones reticulares.

TABLA 14

PEROXIDACION DE LIPIDOS INDUCIDA POR  $\text{CCl}_4$ , Y DESTRUCCION DE P-450 Y G6P-asa EN RETICULO ENDOPLASMICO GRANULAR Y AGRANULAR DE HIGADO

	Agranular	Granular
P-450 <sup>a</sup>		
Control	0,57 ± 0,05	0,31 ± 0,10
$\text{CCl}_4$	0,27 ± 0,04	0,23 ± 0,03
G6P-asa <sup>a</sup>		
Control	45 ± 7	53 ± 5
$\text{CCl}_4$	27 ± 5	27 ± 5
Peroxidación de lípidos		
Control	173 ± 22	170 ± 23
$\text{CCl}_4$	231 ± 17	263 ± 18

Las preparaciones y ensayos son los descritos en la Parte Experimental. Los valores están expresados como el valor medio ± DS de los resultados obtenidos con 8 animales (P-450); 10 animales (G6P-asa) y 5 animales (peroxidación de lípidos) por grupo. El efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre todos los parámetros en una fracción dada fue estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ; excepto para el efecto sobre P-450 en retículo endoplásmico granular, caso en que  $p < 0,05$ ).

<sup>a</sup>El efecto del  $\text{CCl}_4$  en el retículo endoplásmico agranular fue significativamente distinto del correspondiente al retículo endoplásmico granular ( $p < 0,05$  para G6P-asa y  $p < 0,001$  para P-450).

TABLA 15  
UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DEL  $^{14}\text{CCl}_4$  A POLISOMAS UNIDOS A MEMBRANA  
Y LIBRES

Polisomas	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos y proteínas	
	dpm/mg lípidos Valor medio $\pm$ DS	dpm/mg proteínas Valor medio $\pm$ DS
Unidos a membrana	174 $\pm$ 17	160 $\pm$ 77
Libres		59 $\pm$ 9

El tratamiento de los animales se efectuó como se explica en la Tabla 13. Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración del  $^{14}\text{CCl}_4$ ; las distintas fracciones de polisomas fueron separadas y analizadas según se describe en la Parte Experimental.

Se usaron 8 animales por grupo.

El valor de p fue  $p < 0,01$  para la diferencia entre los valores obtenidos para las proteínas de ambas fracciones.

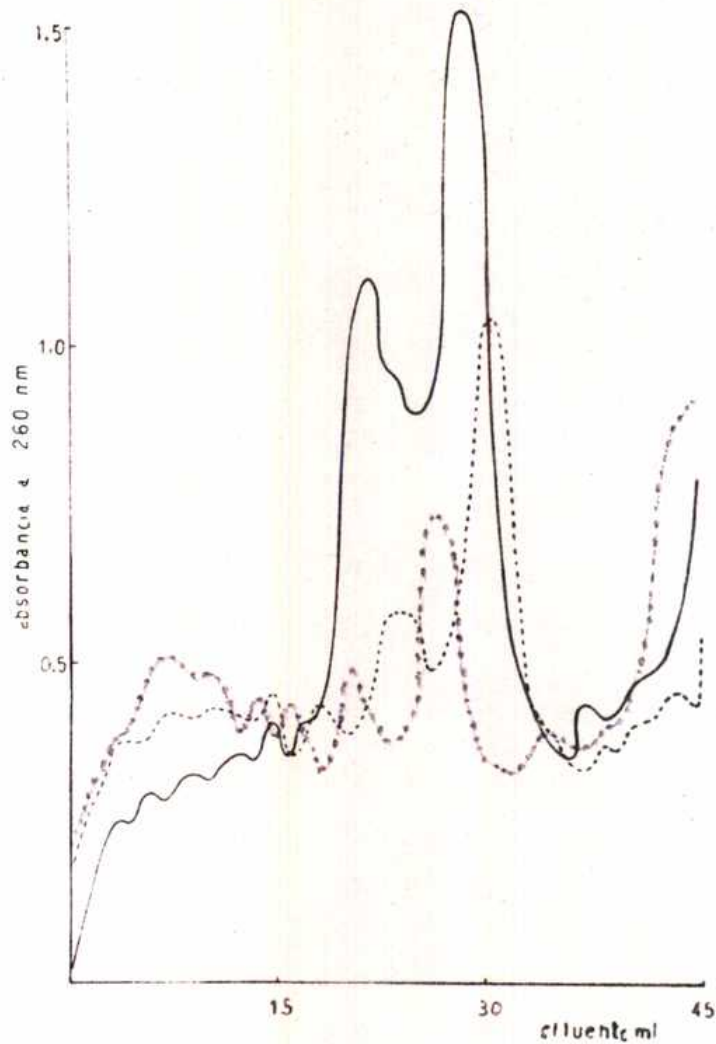


Figura 2.- Distribución de polisomas de hígado de ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  (—),  $\text{CHCl}_3$  (- - -) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (...). Los compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal en solución al 20 % (v/v) en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml/kg, cada uno. Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración de cada compuesto. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.



Efecto de compuestos antioxidantes sobre la ruptura de polisomas causada por CCl<sub>4</sub> : La prometazina, que es inhibidor in vitro de la peroxidación de lípidos inducida por CCl<sub>4</sub> , evitó parcialmente la ruptura de polisomas a monómeros, in vivo (Figura 3). La administración de otros dos compuestos, que son potentes antioxidantes in vitro, como el DPPD y el  $\alpha$ -tocoferol no impidió, en la mayor parte de los experimentos realizados, la ruptura de polisomas inducida por CCl<sub>4</sub> in vivo, si bien en el caso de los animales tratados con DPPD, se observó en algunas ocasiones un pequeño efecto de inhibición (Figura 4).

Efecto del Sch 5706 y del SKF 525A sobre la ruptura de polisomas causada por CCl<sub>4</sub> : El Sch 5706 , que al igual que el SKF 525A, produce cambios espectrales tipo I, no tuvo efecto sobre la ruptura de polisomas, en tanto que el SKF 525A produjo un ligero aumento de la ruptura inducida por el CCl<sub>4</sub> (Figura 5).

Efecto del pirazol, nicotinamida, cicloheximida y cistamina sobre la ruptura de polisomas causada por CCl<sub>4</sub> : El pirazol y la nicotinamida, que al igual que la cicloheximida y la cistamina, producen cambios espectrales tipo II, no impidieron la ruptura de polisomas inducida por CCl<sub>4</sub> en tanto que la cicloheximida la impidió parcialmente (Figura 6).

En cuanto a la cistamina, administrada 30 minutos antes del CCl<sub>4</sub>, no fue capaz de impedir la ruptura de polisomas medida a los 40 minutos después de la administración de CCl<sub>4</sub> , como en los casos anteriores.

En cambio fue capaz de impedirla parcialmente cuando se midió la ruptura de polisomas 3 horas después de administrado el CCl<sub>4</sub> (Figura 7). Además, si la cistamina es administrada 3 horas antes del CCl<sub>4</sub> se observa un impedimento parcial de la ruptura de polisomas medida 40

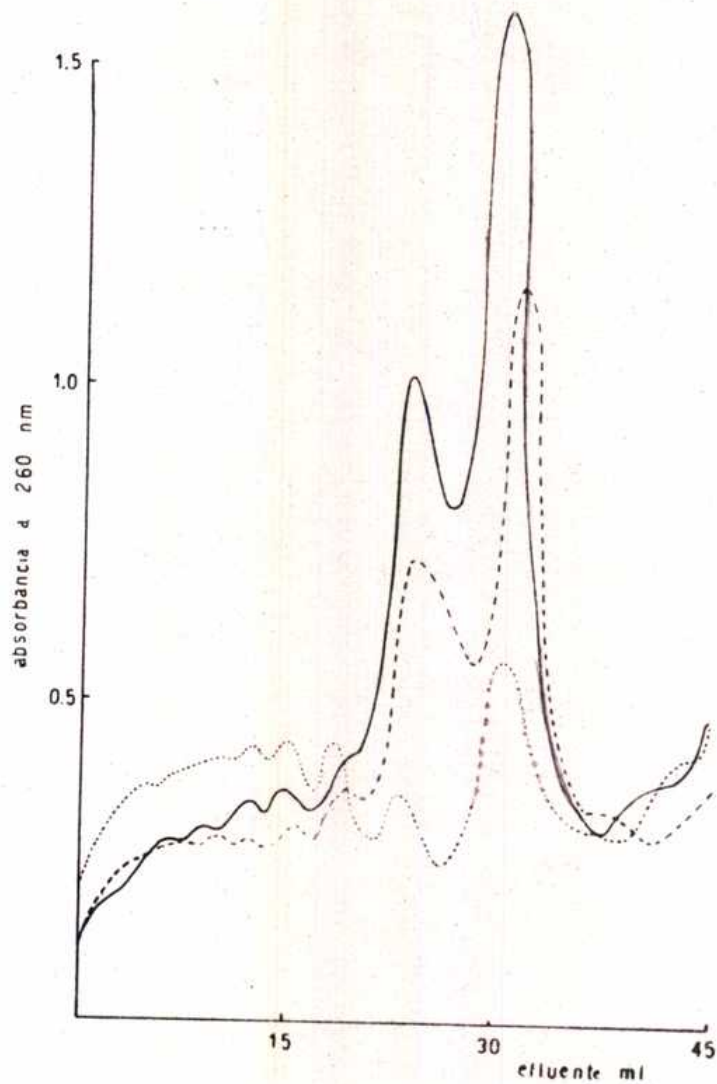
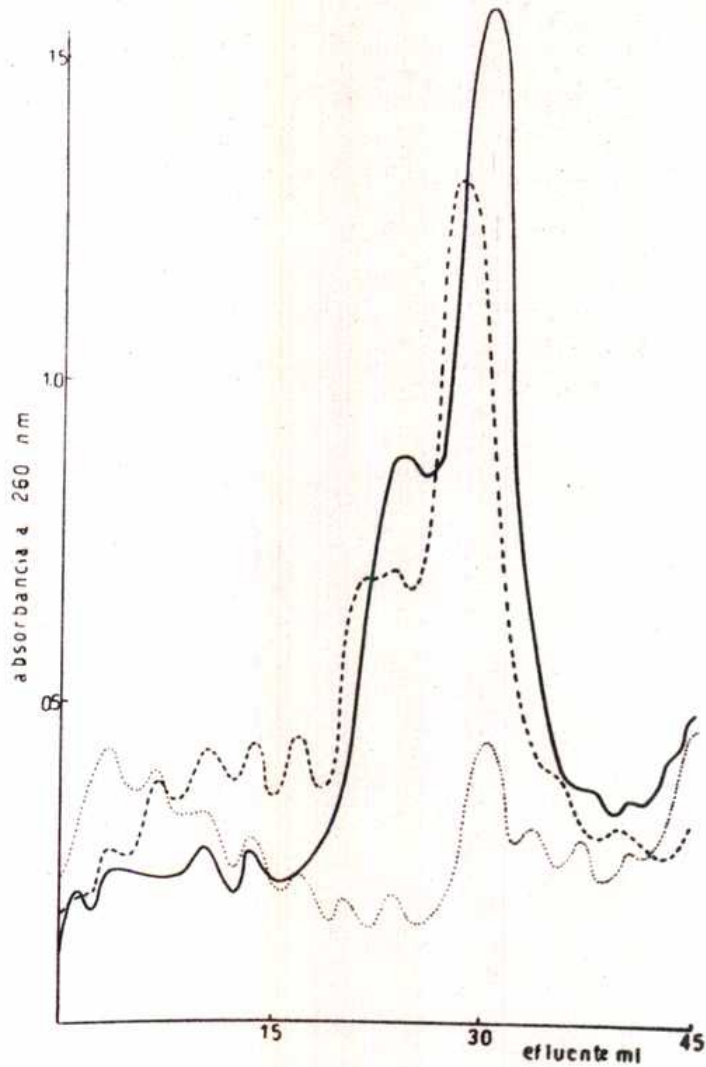


Figura 3.- Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con prometazina sola (···), ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> solo (—) y ratas tratadas con prometazina + CCl<sub>4</sub> (- - -). La prometazina fue administrada 10 minutos antes del CCl<sub>4</sub>. Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del CCl<sub>4</sub>. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.



**Figura 4.-** Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con DPPD solo (···), ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  solo (—) y ratas tratadas con DPPD +  $\text{CCl}_4$  (- - -). El DPPD fue administrado 48 hr, 24 hr y 10 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del  $\text{CCl}_4$ . Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

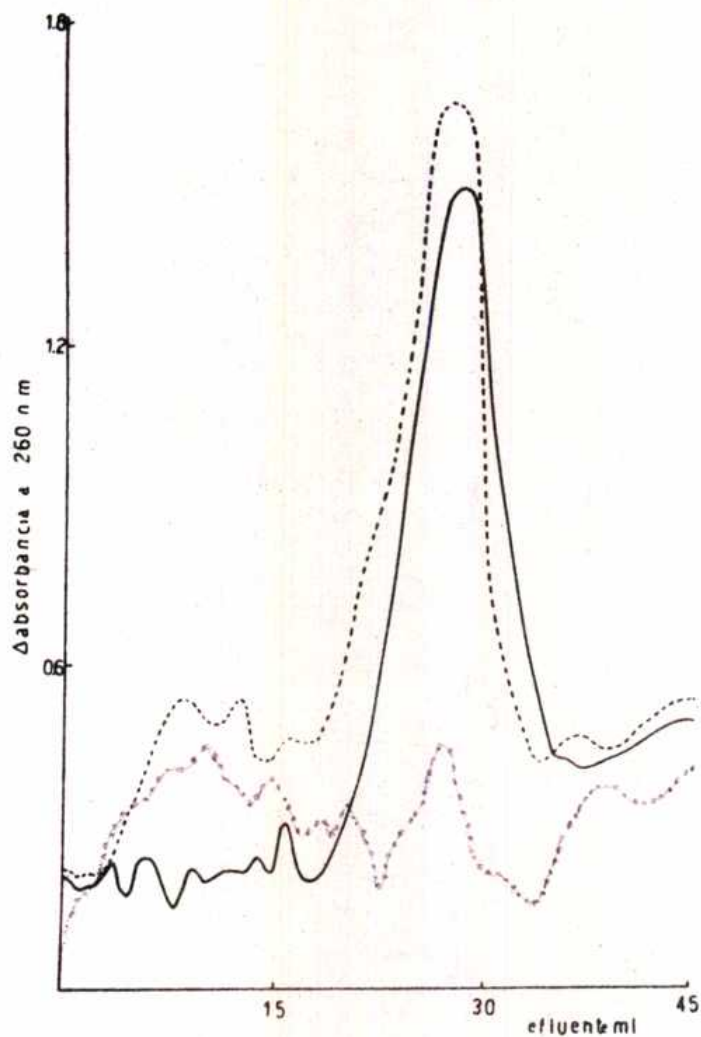
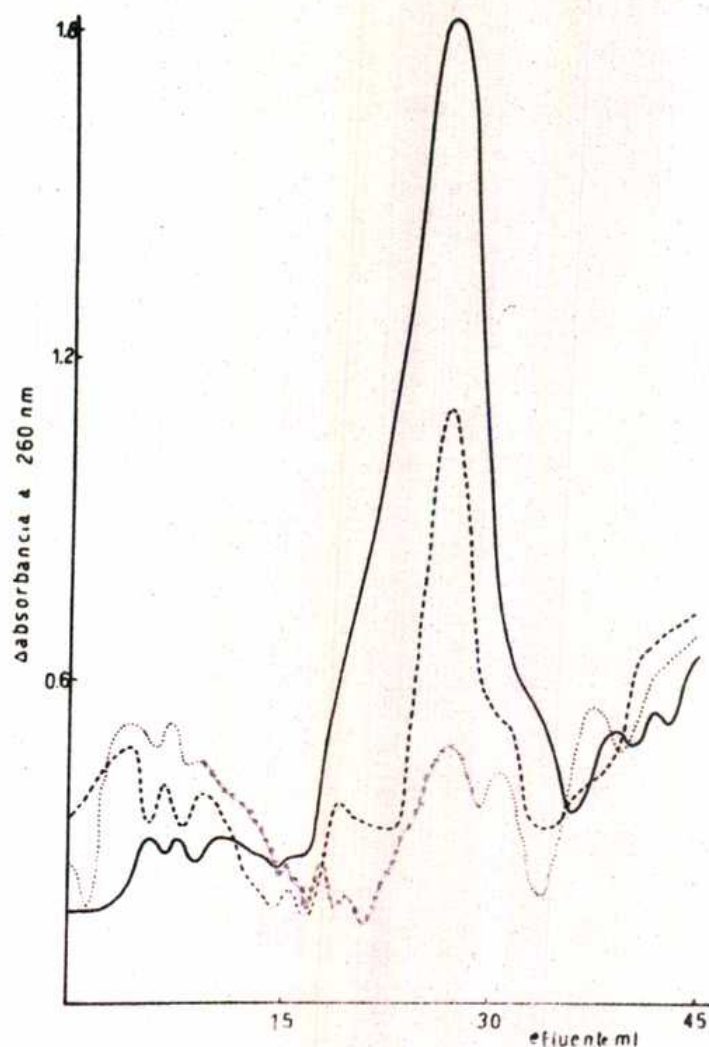


Figura 5.- Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con SKF 525A solo (···), ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  solo (—), y ratas tratadas con SKF 525A +  $\text{CCl}_4$  (- - -). El SKF 525A fue administrado 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del  $\text{CCl}_4$ . Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.



**Figura 6.-** Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con cicloheximida sola (...), ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  solo (—) y ratas tratadas con cicloheximida +  $\text{CCl}_4$  (- - -). La cicloheximida fue administrada 10 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del  $\text{CCl}_4$ . Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

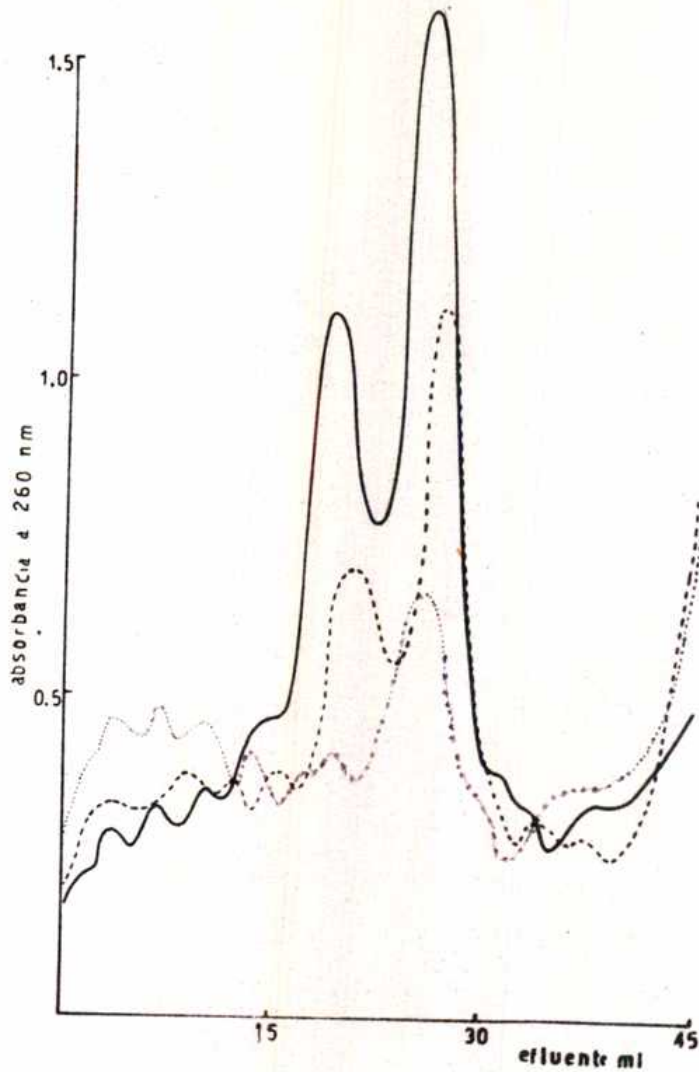


Figura 7.- Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con cistamina sola (···), ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> solo (—) y ratas tratadas con cistamina + CCl<sub>4</sub> (- - -). La cistamina fue administrada 30 minutos antes del CCl<sub>4</sub>. Los animales fueron sacrificados 3 horas después de la administración del CCl<sub>4</sub>. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

minutos después de la administración del  $\text{CCl}_4$  (Figura 8).

Efecto del fenobarbital y el 3-metilcolantreno sobre la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  : Los dos inductores del sistema hidroxilante de microsomas actuaron de diferente manera. El 3-metilcolantreno no tuvo efecto sobre la ruptura de polisomas producida por  $\text{CCl}_4$  en tanto que el fenobarbital la aumentó considerablemente (Figura 9).

Ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  , en ratas de distintas edades:

La ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  se estudió en ratas de diferentes edades: 7 días, 14 días, 20 días y 30 días de vida.

En los animales de 7 días (Figura 10) se observa que la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  es de una magnitud menor que en la rata adulta pero la proporción de monómeros en los animales controles es más alta que en la rata adulta.

En los animales de 14; 20 y 30 días de vida (Figura 11) se encontró que la proporción de monómeros en las ratas no tratadas es de una magnitud similar a la de la rata adulta y la ruptura de polisomas es también de magnitud similar al animal adulto.

Efecto de los antioxidantes sobre la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales: Los resultados obtenidos indican que la prometazina y el  $\alpha$ -tocoferol, no tienen efecto sobre la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales en tanto que el DPPD la disminuyó en forma estadísticamente significativa (Tabla 16).

También puede observarse en la Tabla 16 que la prometazina y el  $\alpha$ -tocoferol no afectan la concentración de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en hígado, en tanto que el DPPD la aumentó considerablemente, hecho este que

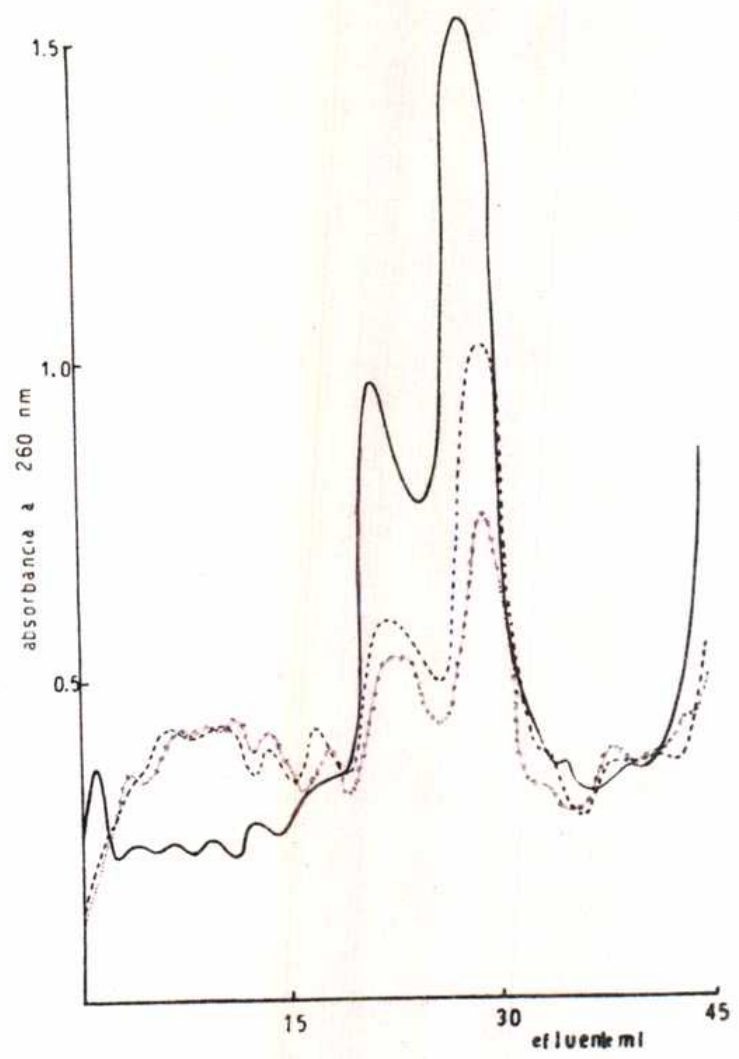


Figura 8.- Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con cistamina sola (···), ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> solo (—) y ratas tratadas con cistamina + CCl<sub>4</sub> (- - -). La cistamina fue administrada 3 horas antes del CCl<sub>4</sub>. Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del CCl<sub>4</sub>. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.



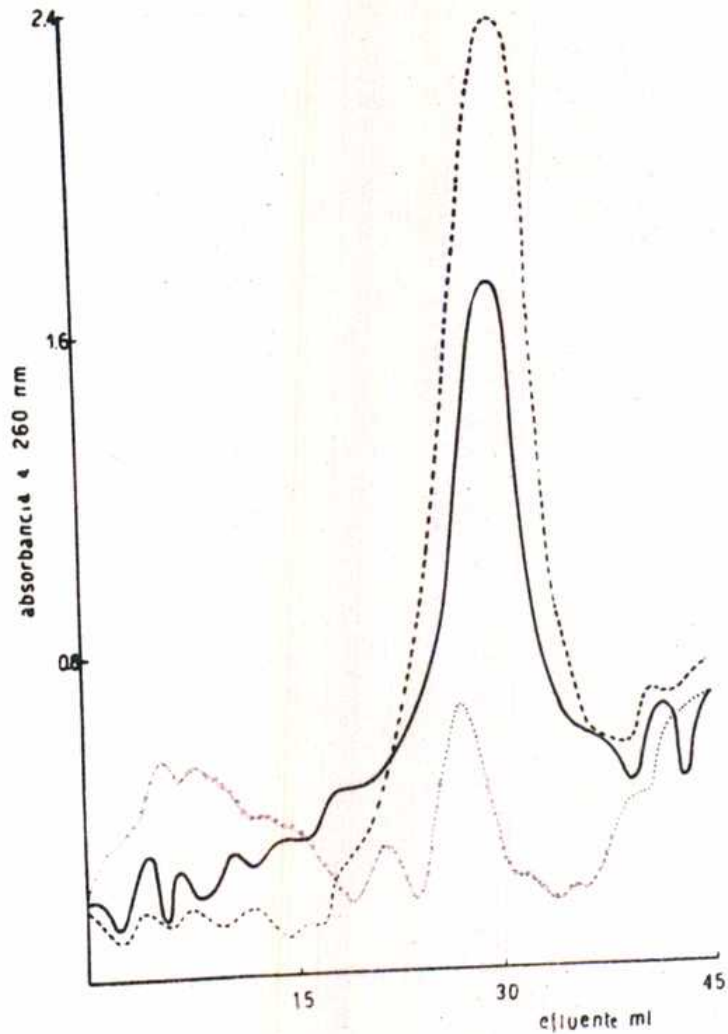


Figura 9.- Distribución de polisomas de hígado de ratas controles o tratadas con fenobarbital solo (...), ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  solo (—) y ratas tratadas con fenobarbital +  $\text{CCl}_4$  (- - -). El fenobarbital fue administrado 72; 48 y 24 horas antes del  $\text{CCl}_4$ . Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de administrado el  $\text{CCl}_4$ . Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

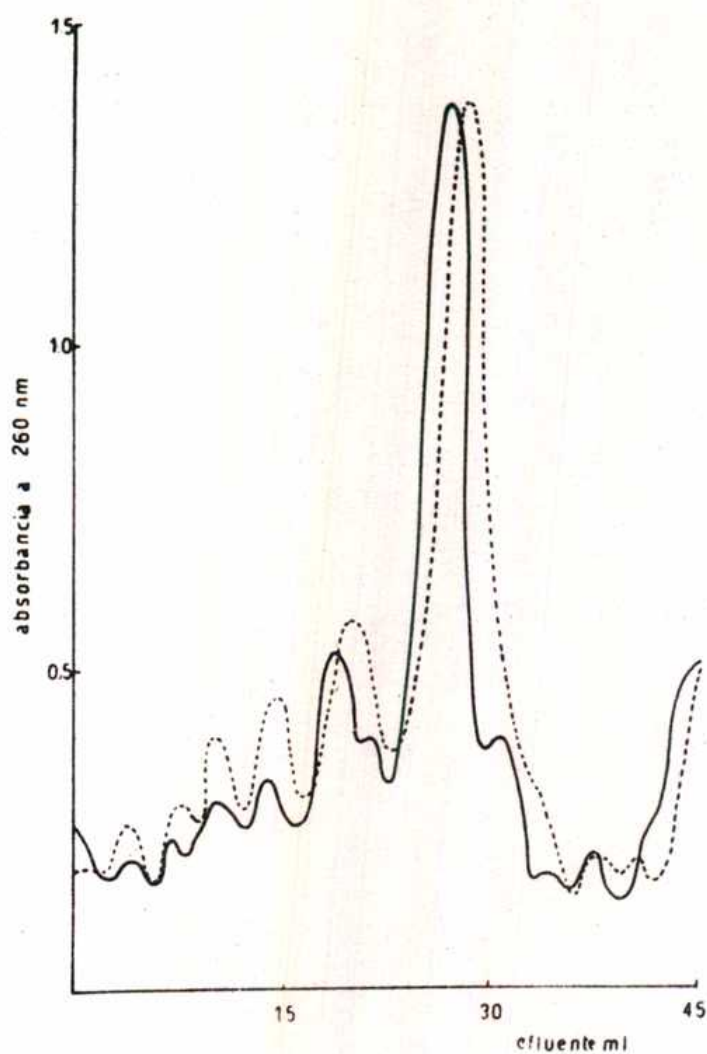


Figura 10.- Distribución de polisomas de hígado de ratas de 7 días de vida, controles (- - -) y tratadas con CCl<sub>4</sub> (—). Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del CCl<sub>4</sub>. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

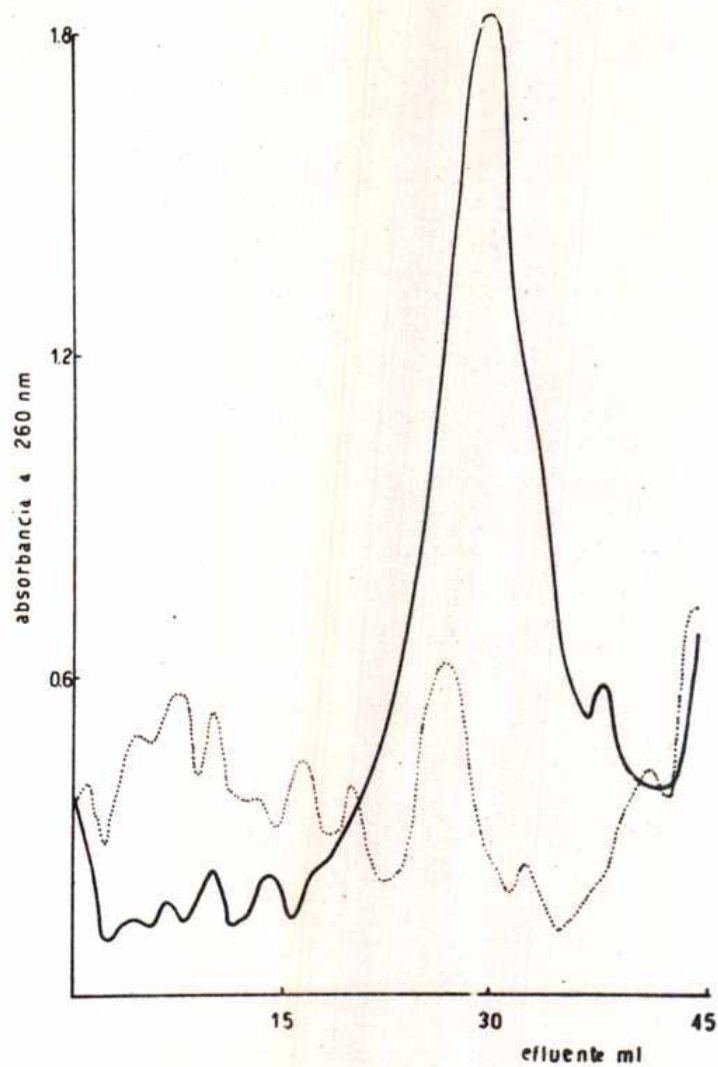


Figura 11.- Distribución de polisomas de hígado de ratas de 14; 20 ó 30 días de vida o de ratas adultas, controles (···) y tratadas con CCl<sub>4</sub> (—). Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración del CCl<sub>4</sub>. Los procedimientos usados se describieron en la Parte Experimental. La parte superior del gradiente corresponde a la derecha de la Figura.

TABLA 16  
EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES SOBRE LA UNION IRREVERSIBLE  
DEL  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS MICROSOMALES

Tratamiento <sup>1</sup>	$^{14}\text{CCl}_4$ unido irreversib. a lípidos microsomales dpm/mg lípidos $\pm$ DS	Concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado dpm/g hígado
Control	82,8 $\pm$ 23,3	341,0 $\pm$ 67,6
Prometazina	72,0 $\pm$ 9,4	364,8 $\pm$ 126,5
Control	79,6 $\pm$ 18,0	1.116,5 $\pm$ 408,0
$\alpha$ -tocoferol	78,6 $\pm$ 16,6	843,8 $\pm$ 293,6
Control	124,1 $\pm$ 18,8	396,0 $\pm$ 91,8
DPPD	81,0 $\pm$ 19,5 <sup>a</sup>	1.422,2 $\pm$ 366,0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>La administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  se realizó en las condiciones descritas en la Tabla 1.

La prometazina disuelta en solución fisiológica, fue administrada por vía intraperitoneal en una dosis de 25 mg/kg, 10 minutos antes del  $^{14}\text{CCl}_4$ . El  $\alpha$ -tocoferol, disuelto en aceite de oliva, fue administrado por vía intraperitoneal en una dosis de 750 mg/kg, 24 horas antes del  $^{14}\text{CCl}_4$ . El DPPD suspendido en aceite de oliva, fue administrado por vía intraperitoneal, en una dosis de 600 mg/kg cada vez, 48 hr, 24 hr y 10 minutos antes del  $^{14}\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución fisiológica o aceite.

Los animales fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$  y se determinó el  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a lípidos, y la concentración en hígado según se describió en la Parte Experimental.

<sup>a</sup>  $p < 0,001$ .

hace más notable aún la disminución observada en la unión irreversible.

Efecto de los antioxidantes sobre la peroxidación de lípidos in vivo inducida por CCl<sub>4</sub> : Se encontró que, en las condiciones experimentales usadas, ni la prometazina, ni el DPPD, ni el  $\alpha$ -tocoferol fueron capaces de impedir la peroxidación de lípidos in vivo, inducida por CCl<sub>4</sub> (Tabla 17).

Efecto del pirazol, nicotinamida, cicloheximida y cistamina sobre la peroxidación de lípidos microsomales, in vivo, inducida por CCl<sub>4</sub> :

Los resultados en la Tabla 18 muestran que el pirazol y la nicotinamida no tuvieron efecto sobre la peroxidación, medida 40 minutos después de la administración de CCl<sub>4</sub>, en tanto que la cicloheximida la disminuyó significativamente.

En cuanto a la cistamina, caso en que la peroxidación fue medida 3 horas después de la administración de CCl<sub>4</sub>, los resultados en la Tabla 18 indican que no tiene efecto sobre la peroxidación inducida por CCl<sub>4</sub>.

Efecto del CCl<sub>4</sub> y otros hepatocarcinógenos sobre la peroxidación de lípidos microsomales, in vivo: Los resultados obtenidos (Tabla 19) indican que solo el CCl<sub>4</sub> fue capaz de inducir peroxidación de lípidos microsomales, en tanto que los otros hepatocarcinógenos (tioacetamida, dimetilnitrosamina, ácido tánico y dimetilamino-azobenceno) no indujeron peroxidación de lípidos a ningún tiempo después de su administración.

TABLA 17

EFFECTO DE DISTINTOS ANTIOXIDANTES SOBRE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS  
MICROSOMALES, IN VIVO INDUCIDA POR CCl<sub>4</sub>

Tratamiento <sup>1</sup> (5 ratas/grupo)	Absorbancia a 243 mμ/mg lípidos ± DS <sup>2</sup>		
	DPPD	α-Tocoferol	Prometazina
Control	95 ± 12	122 ± 18	193 ± 9
CCl <sub>4</sub>	162 ± 33	270 ± 53	312 ± 39
Compuesto	121 ± 9	171 ± 122	237 ± 10
Compuesto + CCl <sub>4</sub>	178 ± 10	259 ± 40	374 ± 23

<sup>1</sup>El CCl<sub>4</sub> fue administrado por vía intraperitoneal en solución al 20 % en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml/kg.

Los antioxidantes fueron administrados según se describe en la Tabla 16 .

<sup>2</sup>El valor de p para el efecto total de cada compuesto sobre la peroxidación de lípidos inducida por CCl<sub>4</sub> , obtenido por análisis de variancia fue p > 0,1 para todos los compuestos ensayados.

TABLA 18

EFEECTO DEL PRETRATAMIENTO CON PIRAZOL, NICOTINAMIDA, CICLOHEXIMIDA O CISTAMINA SOBRE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS INDUCIDA POR  $\text{CCl}_4$  IN VIVO

Tratamiento <sup>1</sup> (5 ratas/grupo)	Absorbancia a 243 $\mu\text{m}$ /mg lípidos $\pm$ DS <sup>2</sup>			
	Pirazol	Nicotinamida	Cicloheximida	Cistamina
Control	191 $\pm$ 13	259 $\pm$ 65	112 $\pm$ 15	353 $\pm$ 23
$\text{CCl}_4$	278 $\pm$ 25	390 $\pm$ 23	205 $\pm$ 39	463 $\pm$ 24
Compuesto	199 $\pm$ 6	250 $\pm$ 50	111 $\pm$ 12	377 $\pm$ 35
Compuesto + $\text{CCl}_4$	267 $\pm$ 17	399 $\pm$ 31	152 $\pm$ 33	462 $\pm$ 33

<sup>1</sup>El  $\text{CCl}_4$  fue administrado según se describe en la Tabla 17.

El pirazol, nicotinamida, cicloheximida y cistamina fueron administrados 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$  según se describe en la Tabla 2.

Los animales fueron sacrificados 40 minutos después de la administración de  $\text{CCl}_4$ , excepto en el caso de la cistamina en que fueron sacrificados 3 horas después del  $\text{CCl}_4$ . La peroxidación de lípidos fue determinada según se describe en la Parte Experimental.

<sup>2</sup>El valor de p para el efecto total de cada compuesto sobre la peroxidación de lípidos inducida por  $\text{CCl}_4$ , obtenido por análisis de variancia, fue  $p > 0,05$  para pirazol, nicotinamida y cistamina y  $p < 0,001$  para cicloheximida.

TABLA 19

EFECTO DEL  $\text{CCl}_4$  O HEPATOCARCINOGENOS, A DISTINTOS TIEMPOS DESPUES DE SU ADMINISTRACION, SOBRE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS MICROSOMALES, IN VIVO

Tratamiento <sup>1</sup> (5 ratas/grupo)	Absorbancia a 243 mu/mg lípidos $\pm$ DS			
	3 hr	6 hr	10 hr	24 hr
Control	176 $\pm$ 12	126 $\pm$ 11	174 $\pm$ 28	124 $\pm$ 25
$\text{CCl}_4$	231 $\pm$ 12	200 $\pm$ 24	296 $\pm$ 44	225 $\pm$ 58
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Control		157 $\pm$ 17	225 $\pm$ 15	224 $\pm$ 25
TAC		117 $\pm$ 18	241 $\pm$ 11	229 $\pm$ 21
p		<0,001	<0,05	>0,7
Control	271 $\pm$ 39			231 $\pm$ 37
DMNA	246 $\pm$ 20			243 $\pm$ 34
p	<0,05			>0,4
Control	180 $\pm$ 18			308 $\pm$ 85
Acido tánico	142 $\pm$ 16			250 $\pm$ 81
p	<0,001			>0,3
Control				470 $\pm$ 107
DMAB				447 $\pm$ 63
p				>0,5

<sup>1</sup>El  $\text{CCl}_4$  fue administrado según se describe en la Tabla 17 .

La tioacetamida (TAC), la dimetilnitrosamina (DMNA) y el ácido tánico, disueltos en solución fisiológica y el dimetilaminoazobenceno (DMAB) disuelto en aceite de oliva, fueron administrados por vía intraperitoneal en una dosis de 200 mg/kg, 50 mg/kg, 700 mg/kg y 150 mg/kg respectivamente.

El valor de p para el efecto de cada compuesto sobre la peroxidación de lípidos fue obtenido mediante el Test de t.



Concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado de ratas pretratadas con distintos compuestos: En la Tabla 20 puede observarse el efecto de distinto tipo de compuestos sobre las concentraciones hepáticas de  $\text{CCl}_4$ , medidas 40 minutos después de su administración. Los valores indican que los antioxidantes (prometazina, DPPD y  $\alpha$ -tocoferol) no tuvieron efecto significativo sobre la concentración de  $\text{CCl}_4$ . En lo que respecta a los compuestos tipo II, la nicotinamida, la cicloheximida y la cistamina no tuvieron efecto estadísticamente significativo en tanto que el pirazol aumenta significativamente la concentración de  $\text{CCl}_4$ .

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a RNA ribosomal, in vivo:

Las muestras de RNA ribosomal, provenientes de hígado de ratas tratadas con  $^{14}\text{CCl}_4$ , fueron extraídas por el método de Kirby, que usa fenol-cresol, según se describió en la Parte Experimental. El  $^{14}\text{CCl}_4$  disuelto en aceite de oliva hasta una concentración de  $96 \times 10^6$  dpm/ml fue administrado en una dosis de 5 ml/kg y los animales fueron sacrificados 3 horas después de la administración.

La incorporación radioactiva medida fue de 4.250 dpm/100 mg de RNA. El grado de marcación fue reducido a 500 dpm/100 mg de RNA cuando el RNA fue purificado una vez, mediante el método que usa su conversión a sal de cetiltrimetilamonio. La marcación radioactiva se redujo aún más, hasta un nivel del orden del blanco (solución del centelleador sin muestra) cuando el mismo procedimiento de purificación fue repetido. Los altos valores iniciales pueden atribuirse a la contaminación con proteínas hepáticas, las cuales se marcan en grado notable en las condiciones experimentales usadas (95.830 dpm/100 mg de proteínas hepáticas totales).

TABLA 20  
 CONCENTRACIONES DE CCl<sub>4</sub> EN HIGADO 40 MINUTOS DESPUES DE SU  
 ADMINISTRACION A RATAS PREVIAMENTE TRATADAS CON DISTINTOS COMPUESTOS

Tratamiento <sup>1</sup>	Concentración de CCl <sub>4</sub> en hígado <sup>2</sup> Valor medio $\pm$ DS	% con respecto al control <sup>3</sup>	Valor de p
Control	458 $\pm$ 133		
Pirazol	529 $\pm$ 142	113	< 0,05
Control	884 $\pm$ 208		
Nicotinamida	878 $\pm$ 160	99	> 0,1
Control	875 $\pm$ 232		
Cicloheximida	955 $\pm$ 84	109	> 0,1
Control	765 $\pm$ 276		
Prometazina	729 $\pm$ 303	104	> 0,1
Control	524 $\pm$ 84		
$\alpha$ -Tocoferol	609 $\pm$ 151	116	> 0,1
Control	766 $\pm$ 235		
DPPD	702 $\pm$ 147	109	> 0,3
Control	805 $\pm$ 180		
Cistamina	775 $\pm$ 150	103	> 0,5

<sup>1</sup> El CCl<sub>4</sub> fue administrado en solución al 20 % (v/v), en una dosis de 5 ml/kg, por vía intraperitoneal. La concentración de CCl<sub>4</sub> se determinó según se describe en la Parte Experimental. Se usaron 10 animales por grupo.

<sup>2</sup> Los resultados se expresan en dpm/gramo de hígado.

<sup>3</sup> El valor de los respectivos controles se tomó como 100 % .

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales y concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en el hígado de rata y gallina:

Los valores obtenidos (Tabla 21), considerando la unión irreversible en relación con la concentración de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en el hígado (valor de R) indican que hay una diferencia notable en los valores correspondientes a las dos especies ensayadas.

Contenido de P-450 y actividad de P-450 reductasa en rata y gallina:

Los valores en la Tabla 22 muestran que tanto el contenido de citocromo P-450 como la actividad de la citocromo P-450 reductasa son notablemente más bajos en la gallina que en la rata.

TABLA 21

UNION IRREVERSIBLE DEL  $^{14}\text{C}$  DE  $^{14}\text{CCl}_4$  A LIPIDOS MICROSOMALES, Y  
CONCENTRACIONES DE  $^{14}\text{CCl}_4$  LIBRE EN RATA Y GALLINA

Espece <sup>a</sup>	$^{14}\text{C}$ unido irrev. a lípidos dpm/mg $\pm$ DS	Conc. de $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado dpm/g hígado $\pm$ DS	R <sup>b</sup>
Rata	71 $\pm$ 5	396 $\pm$ 117	202 $\pm$ 69
Gallina	34 $\pm$ 9	649 $\pm$ 217	55 $\pm$ 14

<sup>a</sup>Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con una solución de  $^{14}\text{CCl}_4$  en aceite de oliva (conc.  $1,5 \times 10^6$  dpm/ml), en una dosis de 5 ml/kg y fueron sacrificados 3 hr después de la administración de  $^{14}\text{CCl}_4$ .

Las determinaciones se efectuaron según se describe en la Parte Experimental.

<sup>b</sup>R es el cociente entre los valores de unión irreversible  $\times 1.000$  y las respectivas concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$ .

TABLA 22

CONTENIDO DE P-450 Y ACTIVIDAD DE P-450 REDUCTASA EN MICROSOMAS  
HEPATICOS DE RATA Y GALLINA

Especie <sup>1</sup>	Contenido de P-450 Media $\pm$ DS	Actividad de P-450 reductasa Media $\pm$ DS
Rata	0,70 $\pm$ 0,09	0,80 $\pm$ 0,18
Gallina	0,13 $\pm$ 0,40	0,21 $\pm$ 0,12

<sup>1</sup>Las preparaciones y ensayos fueron indicados en la Parte Experimental.

El contenido de citocromo P-450 está expresado en milimicromoles por mg de protefna y la actividad de la citocromo P-450 reductasa está expresada en milimicromoles de P-450 reducido a 25°C por minuto por mg de protefna.

Los valores son el resultado obtenido con 10 animales de cada especie.

## DISCUSION

Estudios destinados a aclarar la naturaleza del paso de activación.

Los estudios realizados en el presente trabajo, destinados a aclarar la naturaleza del paso de activación indican que no existe una correlación estricta entre la capacidad para metabolizar tóxicos y fármacos por hidroxilación (tal como se la mide indirectamente por el tiempo de sueño inducido por el pentobarbital) y la capacidad para activar al  $\text{CCl}_4$ . Existe una buena correlación en ciertos casos, por ejemplo, esa capacidad es mayor en hígado que en riñón, en microsomas que en mitocondrias o sobrenadante de  $105.000 \times g$  y está aumentada en los animales tratados con fenobarbital o sometidos a ayuno prolongado, condiciones ambas en que la actividad hidroxilante está aumentada. Sin embargo, aún en estos casos. la correlación cuantitativa no es muy buena, por ejemplo, en las ratas inducidas con fenobarbital se verifica un aumento de tres veces en la actividad enzimática (31), en tanto que la activación del  $\text{CCl}_4$  no llega a aumentar dos veces.

También existe una buena correlación cualitativa en algunos casos en que la actividad hidroxilante está disminuída como sucede en el caso del tratamiento con cistamina, pirazol, DPEA y nicotinamida, condiciones en las que también se encuentra disminuída la capacidad activante del  $\text{CCl}_4$ .

En algunas condiciones experimentales, la falta de correlación es absoluta, por ejemplo, en las ratas hembra, en las cuales la actividad enzimática global es un quinto de la del macho (53, 64, 65), la capacidad activante del  $\text{CCl}_4$  es igual. Otros casos de falta de correlación

son los de la adrenalectomía, la castración y la de los animales tratados con SKF 525A, Sch 5706 o aminopirina. En estos casos la actividad hidroxilante está disminuida, en tanto que la capacidad de activar al  $\text{CCl}_4$  no está alterada o está aumentada.

En lo que respecta a la posibilidad de que exista una correlación entre la intensidad de la unión irreversible a lípidos y la concentración de algún componente de la cadena transportadora de electrones que interviene en la hidroxilación de tóxicos y fármacos, tales como el P-450 y la P-450 reductasa (32, 33), en los experimentos in vivo se encontró que existe relación cualitativa pero no cuantitativa, entre la capacidad para activar al  $\text{CCl}_4$  y el contenido de P-450 en varias condiciones experimentales. Por ejemplo, se encontró aumentada dicha capacidad en las siguientes condiciones experimentales en las que hay un mayor contenido de P-450 en microsomas (31, 64, 32, 66): hígado > riñón, inducidos con fenobarbital > controles, ayunados durante 72 horas > ayunados 12-14 horas. La castración, la diferencia de sexo o el tratamiento con Sch 5706, casos en los cuales no se modifican los niveles de P-450 microsomal (67, 68), tampoco causan cambios en la capacidad para activar al  $\text{CCl}_4$ . Los experimentos sobre la unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos de microsomas y mitocondrias de suprarrenales también apoyan esta posibilidad. En efecto, las glándulas suprarrenales tienen una característica única en su distribución del contenido de P-450, éste se encuentra en altas concentraciones no solo en microsomas sino también en mitocondrias (32) y en correlación con esto encontramos alta capacidad para activar al  $\text{CCl}_4$  no solo en microsomas, como en el caso del hígado, sino también en mitocondrias. Otro argumento que apoya la posibilidad

de una vinculación entre el contenido de P-450 y la capacidad de activación del  $\text{CCl}_4$  reside en el hecho de que se ha demostrado previamente que el  $\text{CCl}_4$  es capaz de interaccionar con el P-450 para dar cambios espectrales tipo I, que sugieren una acción sobre el P-450 en un sitio distinto del hierro-hemo (36, 37). No obstante estas correlaciones evidentes, también es cierto que existen otros experimentos difíciles de conciliar con esta hipótesis. Por ejemplo, el SKF 525A, la cistamina, el pirazol y el DPEA no cambian el contenido de P-450 (69, 70) y en cambio aumentan la capacidad de activación del  $\text{CCl}_4$  (en el caso del SKF 525A) o la disminuyen notablemente (los otros compuestos).

Estos resultados aparentemente contradictorios no son sin embargo sorprendentes, si consideramos que ya otros autores (54) hicieron notar que existen muchas condiciones experimentales en las cuales la actividad hidroxilante total no es proporcional al contenido de P-450. Más aún, Davies et al. (64) encontraron que no era posible explicar la diferencia en actividad de la etilmorfina N-demetilasa que se encuentra en el macho y en la hembra en términos de sus respectivos contenidos de P-450, P-450 reductasa, citocromo c reductasa o a la magnitud de los cambios espectrales que produce la etilmorfina por interacción con el P-450. Gigon et al. (54) explicaron esta diferencia en la actividad en términos de una diferencia en el efecto de estimulación del sustrato sobre la reducción del P-450 (sustrato tipo I, para este caso de la etilmorfina). Otro hallazgo importante fue el de Sasame y Gillette (71), quienes encontraron que las sustancias que dan cambios espectrales tipo II y que por tanto también desaceleran la reducción del P-450 por la P-450 reductasa (54) disminuyen la reducción del p-nitrobenzoato, en



cambio no la modificaban los compuestos que dan cambios espectrales tipo I y que estimulan la reducción del P-450. Estos hechos nos permiten ahora ver con mayor claridad cual es la interacción que puede ocurrir entre el P-450 y el  $\text{CCl}_4$  y como ella se modifica por acción de los compuestos administrados. Así es como observamos que los compuestos que disminuyen la capacidad de activación del  $\text{CCl}_4$  como pirazol, cistamina, DPEA y nicotinamida son todos compuestos que dan cambios espectrales tipo II (34) en tanto que los que la aumentan, como el SKF 525A o los que no la modifican como el Sch 5706 o la aminopirina son compuestos que dan cambios espectrales tipo I (34).

Estos resultados sugieren que la activación del  $\text{CCl}_4$  ocurre cuando se reduce el complejo  $\text{CCl}_4/\text{P-450}$  por acción de la P-450 reductasa.

En apoyo de esta hipótesis que acabamos de formular, están también los experimentos realizados in vitro, en que se encontró que la unión irreversible está casi totalmente inhibida en atmósfera de monóxido de carbono. Dado que el OC se combina con el citocromo P-450 reducido para dar un complejo que lo inactiva (72, 73, 74), los resultados obtenidos evidencian que el P-450 es necesario para que la unión irreversible se realice. En lo que respecta a la necesidad de un proceso reductivo, los experimentos in vitro también proveen evidencia adicional ya que la unión irreversible se verificó más eficazmente en atmósfera de nitrógeno que en aire. Asimismo se evidenció la necesidad de NADPH como cofactor ya que la reacción no ocurre en ausencia del mismo. Además, el proceso reductivo mostró no estar destinado a reducir al P-450 ya que el ditionito de sodio que se sabe que reduce con eficacia al citocromo (34), no fue capaz de reemplazar al NADPH en la reacción.

Esto indicaría que el NADPH es necesario para transformar a la flavoenzima P-450 reductasa en una forma capaz de producir los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  a partir del complejo  $\text{CCl}_4/\text{P-450}$ .

Una consecuencia importante surge de la hipótesis expuesta acerca de como ocurre el proceso de activación y del análisis de los experimentos sobre activación comparada en animales preinducidos con fenobarbital o 3-metilcolantreno. En este experimento se observa que el proceso de activación es significativamente estimulado por el pretratamiento con fenobarbital en tanto que el 3-metilcolantreno no produce efecto alguno. Es sabido que el fenobarbital aumenta la síntesis del tipo normal de citocromo P-450, presente en el hígado de rata (32), en tanto que el 3-metilcolantreno da lugar al incremento de la síntesis de un tipo anormal de citocromo llamado P<sub>1</sub>-450 ó P-448 (75). Teniendo en cuenta el requerimiento de P-450 para el proceso de activación que aquí evidenciamos, los resultados obtenidos muestran que la forma anómala del citocromo no es capaz de actuar en el proceso de activación del  $\text{CCl}_4$ .

Es la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales consecuencia de un único paso de activación?

Además de la unión irreversible a lípidos, también se realizaron en el presente trabajo, estudios acerca de la unión irreversible a proteínas microsomales. A este respecto corresponde considerar si ambos procesos de unión irreversible son consecuencia de un único paso de activación. Los resultados en lo concerniente a este interrogante no son concluyentes. En efecto, por una parte los experimentos con cistamina, pirazol y 3-metilcolantreno mostraron un comportamiento similar de ambos

tipos de unión irreversible, lo cual sugeriría un paso de activación común a ambos, pero por otra parte los cambios después de administrar fenobarbital o SKF 525A muestran una diferente respuesta en ambos. Otro experimento difícil de conciliar con la idea de un paso de activación común es el que se refiere a la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a las diferentes fracciones subcelulares de hígado. En efecto, mientras que la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos presenta una clara preferencia por los microsomas (particularmente cuando se considera la radioactividad asociada a cada fracción en todo el hígado), la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas está notablemente localizada en la fracción sobrenadante de 105.000 x g. Por tanto, la distribución del  $^{14}\text{CCl}_4$  unido a lípidos es más cercana a la que debiera esperarse si se supone que el sistema hidroxilante de microsomas está involucrado en la activación tal cual se cree. No obstante, el hecho de que la intensidad de la unión irreversible a proteínas varíe en algunas condiciones experimentales junto con la unión irreversible a lípidos hace suponer que es posible que parte de ella derive de un paso común de activación y que otra parte también importante de la misma provenga de algún tipo de unión no específica entre el  $^{14}\text{CCl}_4$  y las proteínas. Esta unión irreversible no específica podría ser parecida a la que ocurre en el sobrenadante de 105.000 x g.

#### Efecto del $\text{CCl}_4$ sobre el retículo endoplásmico granular y agranular.

Es conocida la naturaleza heterogénea de la distribución enzimática entre las formas granular y agranular del retículo endoplásmico.

Por ejemplo las enzimas microsomales que requieren NADPH y  $\text{O}_2$ , utilizan citocromo P-450 y catalizan el metabolismo de sustancias extrañas

al organismo (tóxicos y fármacos) están concentradas en el retículo endoplásmico agranular, mientras que la actividad de glucosa-6-fosfatasa es mayor en el granular que en el agranular.

Si la hipótesis enunciada, acerca de la naturaleza del paso de activación del  $\text{CCl}_4$ , fuera correcta, debería esperarse un efecto heterogéneo del  $\text{CCl}_4$  sobre las dos formas de retículo endoplásmico de manera de producir un daño más intenso en el agranular que en el granular. En efecto, los resultados obtenidos indican que la activación del  $\text{CCl}_4$  a radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  (medida a través de la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales) es más intensa en el retículo endoplásmico agranular que en el granular. Asimismo, de acuerdo con la hipótesis previa formulada por Castro et al. (29) de que el P-450 es destruido por los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  provenientes de la activación del  $\text{CCl}_4$  y no por un proceso de peroxidación de lípidos, encontramos que la destrucción del P-450 es mayor en el retículo endoplásmico agranular que en el granular, en concordancia con la unión irreversible, mientras que la peroxidación de lípidos es tan intensa en el agranular como en el granular.

Respecto de la glucosa-6-fosfatasa, los resultados son contrarios a lo esperado, ya que resultó ligeramente más dañada por el  $\text{CCl}_4$  en el retículo endoplásmico granular que en el agranular. Este resultado aparentemente contradictorio puede deberse a que, como ya es sabido la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en la subfracción granular es apreciablemente más lábil a varios tratamientos que la de la subfracción agranular (76) y en consecuencia el comportamiento distinto observado frente al daño por  $\text{CCl}_4$ , puede reflejar simplemente una sensibilidad diferente respecto del  $\text{CCl}_4$  en lugar de una exposición distinta al

agente tóxico.

En los estudios acerca del daño producido por el  $\text{CCl}_4$  en el retículo endoplásmico granular y agranular, se encontró también que los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  se unen no solo a la parte membranos de ambas formas de retículo endoplásmico sino también a los componentes polisómicos del retículo endoplásmico granular. La unión de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  a las proteínas de polisomas se observa no solo en la fracción unida a membrana sino también en los polisomas libres. Es de hacer notar que si bien se encontró unión irreversible a las proteínas de ribosomas, no se encontró unión irreversible al RNA ribosomal.

Ya hemos señalado antes, que el  $\text{CCl}_4$  produce ruptura de polisomas y además los ribosomas de los animales intoxicados están disminuidos en su capacidad para sintetizar proteínas in vitro (43, 7, 77, 78). Dado que es sabido que la unión de la estreptomina a una sola proteína de la subunidad 30 S ribosomal conduce a su conocida alteración de los ribosomas con la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas (79) sería probable que la unión irreversible del  $\text{CCl}_4$  a los componentes proteicos ribosomales que se encontró fuera capaz de explicar las alteraciones ribosomales que ocurren durante la intoxicación por  $\text{CCl}_4$ . La unión adicional del  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas y lípidos del componente membranos de los polisomas unidos a membrana que aquí se encontró, agregada a la unión a proteínas del componente polisómico, bien podría explicar el despegue de polisomas unidos a membrana que se observa durante la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  (7).

Con el fin de evaluar algunas de estas posibilidades, se realizaron los estudios acerca de la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  y a

este respecto puede considerarse que se ha encontrado aceptable evidencia en apoyo de las posibilidades expuestas.

De los resultados acerca de la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$ , cloroformo y cloruro de metileno se hace evidente que el proceso de ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  no es consecuencia de un simple efecto solvente ya que el cloroformo y el cloruro de metileno (que son tan buenos solventes de lípidos como el  $\text{CCl}_4$ ) no tuvieron efectos deletéreos similares al  $\text{CCl}_4$  sobre la ruptura de polisomas.

El aumento de la ruptura de polisomas que se observa con la edad y particularmente en los animales preinducidos con fenobarbital se sitúa en la misma línea de razonamiento, ya que es sabido que el sistema enzimático que metaboliza tóxicos y fármacos aumenta gradualmente en los primeros días de vida y en cuanto al fenobarbital este es un poderoso inductor del mismo sistema enzimático, (11).

El hecho de que el cloroformo, que es el primer metabolito del  $\text{CCl}_4$  (13, 14, 80), tenga una acción menos intensa sobre la ruptura de polisomas indica que un intermediario reactivo o un producto derivado de él, (que no es el cloroformo) es el responsable de la ruptura.

Con el objeto de estimar además de la unión irreversible en relación con la ruptura de polisomas, la posible participación de la peroxidación de lípidos en la misma, se ha estudiado el efecto de los antioxidantes sobre dicha ruptura. Se encontró que dos sustancias que son potentes antioxidantes in vitro, como el DPPD y el  $\alpha$ -tocoferol (81) no fueron capaces de impedir la ruptura de polisomas por  $\text{CCl}_4$  aunque ocasionalmente la evitaron levemente. Sin embargo, es de señalar que también se encontró en las condiciones experimentales usadas, estos mismos antioxidantes no fueron capaces de impedir in vivo la peroxidación

de lípidos inducida por el  $\text{CCl}_4$ . Esta carencia de efecto inhibidor es sorprendente y agrega una dificultad extra al ya problemático debate acerca del papel de la peroxidación de lípidos en el daño hepático producido por el tóxico, (82).

Los resultados obtenidos con la prometazina, otro antioxidante que es potente inhibidor in vitro de la peroxidación inducida por  $\text{CCl}_4$  (83), muestran que tampoco inhibió la peroxidación in vivo inducida por  $\text{CCl}_4$  en las condiciones experimentales usadas, en tanto que impidió parcialmente la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$ . Las dificultades antes expuestas en lo concerniente a los experimentos con DPPD y  $\alpha$ -tocoferol y el hecho de que la prometazina evite el despegue de polisomas del retículo endoplásmico (84), un hecho que podría estar involucrado en la ruptura de polisomas, muestra que los experimentos con los antioxidantes no permiten sacar una conclusión definitiva acerca de la posible participación de la peroxidación de lípidos en la ruptura de polisomas.

Más claros son los experimentos con los compuestos tipo I y tipo II. Respecto de los compuestos tipo I ensayados, el Sch 5706 no tuvo efecto y el SKF 525A aumentó ligeramente la ruptura de polisomas inducida por  $\text{CCl}_4$ , hecho que está en concordancia cualitativa con los resultados obtenidos para el efecto de estos compuestos sobre la unión irreversible. En cuanto a los compuestos tipo II, los resultados obtenidos con pirazol, nicotinamida y cicloheximida no permiten sacar conclusiones ya que los dos primeros compuestos no tuvieron efecto sobre la ruptura de polisomas y la cicloheximida si bien la evitó parcialmente, la circunstancia de que disminuya la unión irreversible y la peroxidación no permite discriminar.

Más concluyentes son los experimentos con cistamina, otro compuesto tipo II. En efecto, este compuesto impide la ruptura de polisomas inducida por  $\text{CCl}_4$  cuando se administra ya sea 3 horas antes del  $\text{CCl}_4$  o cuando se administra 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$  y el daño se mide 3 horas después. En estas condiciones experimentales la cistamina disminuye el grado de unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales sin afectar la intensidad de la peroxidación de lípidos. En consecuencia estos resultados parecen indicar que la cistamina impide la ruptura de polisomas debido a su efecto inhibitor sobre la unión irreversible a algún componente ribosomal apoyando la suposición previamente formulada de que esta clase de interacción puede estar involucrada en la ruptura de polisomas.

El hecho de que varios hepatocarcinógenos, que es probable que tengan propiedades alquilantes in vivo, como la dimetilnitrosamina, la tioacetamida, el dimetilaminoazobenceno y el ácido tánico (85) sean capaces de causar ruptura de polisomas (86) sin inducir peroxidación de lípidos, refuerza aún más la hipótesis antes expuesta.

Otras consecuencias interesantes de los estudios realizados en este trabajo.

Tal como hemos mencionado antes en esta Discusión, la corteza suprarrenal es particularmente rica en P-450 y también presenta la característica poco común de poseer considerable cantidad de esta hemoproteína no solo en microsomas sino también en mitocondrias (32). Si las teorías expuestas acerca de la hepatotoxicidad del  $\text{CCl}_4$  fueran correctas deberían esperarse importantes alteraciones no solo en el retículo endoplásmico de suprarrenales sino también en mitocondrias. En consecuencia, se ha estudiado la existencia de esas alteraciones en microsomas,



mitocondrias y lisosomas de suprarrenales.

Se encontró que el  $\text{CCl}_4$  interacciona con el P-450 de microsomas y mitocondrias de suprarrenales para dar cambios espectrales tipo II en el caso de los microsomas y un muy pequeño pero observable cambio espectral tipo I en el caso de las mitocondrias. Ambos resultados son inesperados ya que en el caso de los microsomas de hígado la interacción con  $\text{CCl}_4$  da lugar a un cambio espectral tipo I, mientras que con microsomas de suprarrenales el cambio obtenido es tipo II; en el caso de las mitocondrias suprarrenales, se obtuvo el cambio usual tipo I pero su magnitud no está en relación con su elevado contenido en P-450. En el caso del P-450 mitocondrial de suprarrenales, la interacción no es generalmente observable cuando la concentración de proteínas en la suspensión es cercana a 2 mg/ml, pero se hace evidente cuando se diluye a 0,4 mg/ml. Este hecho puede explicarse si consideramos que es probable que el P-450 esté ya unido a un compuesto endógeno capaz de producir cambios espectrales, por ejemplo un esteroide (que se sabe que producen cambios espectrales) y este compuesto endógeno competiría ya sea con la unión del  $\text{CCl}_4$  o con la expresión como cambio espectral de esa unión.

Se encontró también que el  $\text{CCl}_4$  no solo interacciona con el P-450 de la cadena transportadora de electrones de microsomas y mitocondrias suprarrenales como era de esperar sino que también, tal como ocurre en el caso de los microsomas de hígado el  $^{14}\text{CCl}_4$  se une irreversiblemente a sus lípidos aún a los de mitocondrias, mientras que la unión a mitocondrias de hígado o riñón es mucho menor.

La destrucción del P-450 en suprarrenales solo ocurre en microsomas y en menor grado que el observado en el caso de los microsomas

hepáticos. Dado que se encontró que ocurre activación del  $\text{CCl}_4$  en mitocondrias suprarrenales (como lo demuestra la elevada unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos encontrada en este organoide) los resultados pueden indicar que el compuesto endógeno que supusimos que se une al P-450 de mitocondrias puede también estabilizar al P-450 contra el daño por los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$ .

También se encontró que la peroxidación de lípidos ocurre en microsomas suprarrenales pero en grado menor que en el hígado, mientras que en las mitocondrias suprarrenales la peroxidación de lípidos parece carecer de importancia. Si suponemos que el proceso de peroxidación de lípidos es iniciado por los radicales libres producidos como consecuencia de la activación del  $\text{CCl}_4$ , y la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos se debe a una adición de los radicales libres a los lípidos no saturados (38, 39), cabría esperar una mayor peroxidación de lípidos cuando se observa una mayor unión del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los mismos. En el caso de las suprarrenales, esta correlación no se observó ya que los niveles de unión irreversible fueron estrechamente similares a los que ocurren en hígado en tanto que la peroxidación de lípidos fue menor o casi despreciable en microsomas y mitocondrias suprarrenales. Sin embargo, estos resultados no indican que la suposición expuesta sea incorrecta ya que los resultados observados pueden ser debidos a una diferente susceptibilidad de los lípidos suprarrenales para actuar como blanco de los radicales libres o a la presencia de niveles más elevados de antioxidantes endógenos en suprarrenales que en el hígado.

Con el objeto de tener un cuadro más completo acerca de las analogías y diferencias entre el hígado y las suprarrenales en lo que respecta a su respuesta a la acción deletérea del  $\text{CCl}_4$ , estudiamos también

la capacidad del  $\text{CCl}_4$  para provocar la liberación in vitro de enzimas de lisosomas en ambos órganos y encontramos que ella es comparable.

Otra consecuencia interesante de los estudios realizados en el presente trabajo, son los experimentos comparativos realizados en rata y gallina. Es sabido que en esta última especie, el  $\text{CCl}_4$  no produce necrosis (2). De acuerdo con las hipótesis aquí presentadas debería verificarse una menor activación del  $\text{CCl}_4$  en este animal como así también un menor contenido de P-450 y P-450 reductasa, y en efecto los resultados obtenidos indican que la activación del  $\text{CCl}_4$  (medida a través de la unión irreversible a lípidos microsomales) es mucho menor que en la rata y en correspondencia el contenido de P-450 y la actividad de la P-450 reductasa también lo son.

W. J. J.

A. D. J. J. J.

→

DR. J. A. CASIKI

## RESUMEN

1) Con el fin de establecer si existe una relación entre la activación del  $\text{CCl}_4$  y la actividad de las enzimas hidroxilantes de microsomas, se estudió la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales (y en algunos casos a mitocondrias y sobrenadante de 105.000 x g) bajo diferentes condiciones experimentales, in vivo e in vitro. Los resultados obtenidos condujeron a formular la hipótesis de que la activación del  $\text{CCl}_4$  ocurre cuando se reduce el complejo  $\text{CCl}_4/\text{P-450}$  por acción de la P-450 reductasa.

2) Además de la unión irreversible a lípidos microsomales también se estudió la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales (y en algunos casos a mitocondrias y sobrenadante de 105.000 xg), bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados obtenidos indican que es posible que parte de la unión irreversible a proteínas sea consecuencia de un paso común de activación y otra parte también importante de la unión provenga de algún tipo de unión no específica entre el  $^{14}\text{CCl}_4$  y las proteínas.

3) También se estudió el efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre distintos componentes de las formas granular y agranular del retículo endoplásmico. Los resultados obtenidos están de acuerdo con las hipótesis formuladas respecto de la activación del  $\text{CCl}_4$ , excepto en el caso de la glucosa-6-fosfatasa (en que se discutieron las causas probables de esta diferencia). Además se encontró que el  $^{14}\text{CCl}_4$  se une irreversiblemente a las proteínas ribosomales.

4) Se realizaron estudios acerca de la ruptura de polisomas causada por  $\text{CCl}_4$  en diferentes condiciones experimentales. Los resultados apoyan la posibilidad de que la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los componentes proteicos ribosomales sea capaz de explicar algunas de las alteraciones ribosomales que ocurren durante la intoxicación con  $\text{CCl}_4$ . Además, se concluye que la peroxidación de lípidos no parece tener una importancia fundamental en el proceso.

5) Se estudió el efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre los microsomas, mitocondrias y lisosomas de hígado y suprarrenales, así como el proceso de activación del  $\text{CCl}_4$  en la gallina. Los resultados están de acuerdo con las hipótesis expuestas acerca de la activación del  $\text{CCl}_4$  .

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Van Oettingen, W., *The Halogenated Hydrocarbons of Industrial and Toxicological Importance*, Elsevier, Amsterdam (1964).
- 2.- Cameron, G. y Karunaratne, W., *J. Path. Bact.* 42, 1 (1963).
- 3.- Brauer, R., *The Biliary System*, 101 NATO Symposium, New Castle (1963).
- 4.- Mc Lean, A., Mc Lean, E. y Judah, J., *Intern. Rev. Exptl. Path.* 4, 127 (1965).
- 5.- Slater, T., *Nature* 209, 36 (1966).
- 6.- Recknagel, R., *Pharmacol. Rev.* 19, 145 (1967).
- 7.- Smuckler, E., *Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells*, Universitetsforlaget, Oslo (1968).
- 8.- Smuckler, E., Iseri, O. y Benditt, E., *J. Exp. Med.* 116, 55 (1962).
- 9.- Smuckler, E. y Benditt, E., *Science* 140, 308 (1963).
- 10.- Dawkins, M., *J. Path. Bact.* 85, 189 (1963).
- 11.- Gillette, J., *Progress in Drug Research* 6, 11 (1963).
- 12.- Mc Collister, D., Beamer, W. y Atchinson, G., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 102, 112 (1951).
- 13.- Paul, B. y Rubinstein, D., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 141, 141 (1963).
- 14.- Butler, T., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 134, 311 (1961).
- 15.- Fowler, J., *Br. J. Pharmac.* 37, 733 (1969).
- 16.- Gordis, E., *J. Clin. Invest.* 48, 203 (1969).
- 17.- Villarruel, M. y Castro, J., *Res. Comm. Chem. Path.*, en prensa.
- 18.- Comporti, M., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 41, 222 (1965).

- 19.- Comporti, M., Rita, G. y Della Corte, A., *Bol. Soc. Ital. Biol. Sper.* 41, 678 (1965).
- 20.- Comporti, M., Sacconi, C. y Dianzani, M., *Enzymology* 29, 185 (1965).
- 21.- Dianzani, M., Baccino, F. y Comporti, M., *Lab. Invest.* 15, 149 (1966).
- 22.- Recknagel, R. y Goshal, A., *Lab. Invest.* 15, 132 (1966).
- 23.- Recknagel, R. y Goshal, A., *Nature* 210, 1162 (1966).
- 24.- Recknagel, R. y Goshal, A., *Exptl. Molec. Pathol.* 5, 108 (1966).
- 25.- Hofften, P., Hunter, F., Gebicki, J. y Weinstein, J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 7, 276 (1962).
- 26.- Hochstein, P. y Ernster, L., *Cellular Injury, CIBA Symposium*, J. y A. Churchill, Londres (1964).
- 27.- Judah, J., *British Med. Bull.* 25, 19 (1969).
- 28.- Recknagel, R. y Goshal, A., *Lab. Invest.* 15, 132 (1966).
- 29.- Castro, J., Sasame, H., Sussman, H. y Gillette, J., *Life Sci.* 7, 129 (1968).
- 30.- Smuckler, E., Arrhenius, E. y Hultin, T., *Biochem. J.* 103, 55 (1967).
- 31.- Sasame, H., Castro, J., y Gillette, J., *Biochem. Pharmacol.* 17, 1759 (1968).
- 32.- Sato, R., Omura, T. y Nishibayashi, H., *Oxidases and Related Redox Systems* (King, T., Mason, H. y Morrison, A., ed.) p. 861, J. Wiley, New York (1965).
- 33.- Estabrook, R., Schenkman, J., Cammer, W. y Remmer, H., *Biological and Chemical Aspects of Oxygenases* (Block, K. y Hayaishi, O., ed.) p. 195, Maruzen, Co., Tokyo (1966).

- 34.- Schenkman, J., Remmer, H. y Estabrook, R., *Mol. Pharmacol.* 3, 113 (1967).
- 35.- Remmer, H., Schenkman, J., Estabrook, R., Sasame, H., Gillette, J., Narashimhulu, D., Cooper, Y. y Rosenthal, O., *Mol. Pharmacol.* 2, 187 (1966).
- 36.- Mc Lean, A., *Biochem. Pharmacol.* 16, 2030 (1967).
- 37.- Castro, J., Sasame, H. y Gillette, J., *The Pharmacologist* 9, 203 (1967).
- 38.- Reynolds, E., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 155, 117 (1967).
- 39.- Reynolds, E. y Yee, A., *Lab. Invest.* 16, 591 (1967).
- 40.- Bassi, M., *Exp. Cell. Res.* 20, 313 (1960).
- 41.- Reynolds, E. S., *J. Cell. Biol.* 19, 139 (1963).
- 42.- Neubert, D. y Maibauer, D., *Arch. Exp. Pathl. Pharmacol.* 235, 291 (1959).
- 43.- Gravela, E. y Dianzani, M., *FEBS Letters* 9, 93 (1970).
- 44.- D'Amour, F., Blood, F. y Belden, D., *Manual for Laboratory Work in Mammalian Physiology*, Exp. 24. Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA (1965).
- 45.- Idem. 44, Exp. 27.
- 46.- Hogeboom, G., Schneider, W. y Palade, G., *J. Biol. Chem.* 172, 619 (1948).
- 47.- Appelmans, F., Wattiaux, R. y De Duve, C., *Biochem. J.* 59, 438 (1955).
- 48.- Holtzman, J., Gram, T., Gigon, P. y Gillette, J., *Biochem. J.* 110, 407 (1968).
- 49.- Ragnotti, G., Cajone, F. y Bernelli Zazzera, A., *Exp. Mol. Pathol.*



- 13, 295 (1970).
- 50.- Noll, H., *Techniques in Protein Biosynthesis* (P. Campbell y J. Sargent, ed.) vol. 2, p. 101, Academic Press, New York (1969).
- 51.- Linhardt, K. y Walter, K., *Methods in Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, ed.), p. 783, Academic Press, New York (1963).
- 52.- Harper, A., *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H., ed.) p. 788, Academic Press, New York (1963).
- 53.- Castro, J. y Gillette, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28,426 (1967).
- 54.- Gigon, P., Gram, T. y Gillette, J., *Mol. Pharmacol.* 5, 109 (1969).
- 55.- Rao, S. y Recknagel, R., *Exp. Mol. Pathol.* 10, 219 (1969).
- 56.- Kirby, K., *Methods in Enzymology* (L. Grossman y K. Moldave, ed.) vol. XII, p 87, Academic Press, New York (1968).
- 57.- Bellamy, A. y Ralph, R., *Methods in Enzymology* (L. Grossman y K. Moldave, Ed.) vol. XII, p. 156. Academic Press, New York (1968).
- 58.- Reknagel, K. y Litteria, R., *Amer. J. Pathol.* 36, 521 (1960).
- 59.- Klaasen, C. y Plaa, G., *Biochem. Pharmacol.* 18, 2019 (1969).
- 60.- Layne, E., *Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. Methods in Enzymology* 3, p. 450.
- 61.- Bancroft, E., *Introducción a la Bioestadística*, p. 205. Eudeba Buenos Aires.
- 62.- Rumke, C. y De Jonge, H., *Evaluation of Drug Activities. Pharmacometrics*, (D. Laurence y A. Bacharach, ed.) vol. I, p. 80, Academic Press, New York.
- 63.-Brownlee, K., *Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering*, p. 378, Wiley, New York.

- 64.- Davies, D., Gigon, P. y Gillette, J., *Life Sci.* 8, 85 (1969).
- 65.- Schenkman, J., Frey, J., Remmer, H. y Estabrook, R., *Mol. Pharmacol.* 3, 516 (1967).
- 66.- Kato, R., Onoda, K. y Lasajima, M., *Jap. J. Pharmacol.* 20, 194 (1970).
- 67.- Schenkman, J., Frey, J., Remmer, H. y Estabrook, R., *Mol. Pharmacol.* 3, 516 (1967).
- 68.- Castro, J., Gigon, P., Greene, F., Sasame, H. y Gillette, J., *Biochem. Pharmacol.* 19, 2461 (1970).
- 69.- Castro, J., Cignoli, E., Castro, C., Fenos, O., *Biochem. Pharmacol.* 21, 49 (1972).
- 70.- Castro, J., Ferreyra, E., Castro, C., Fenos, O., Sasame, H. y Gillette, J., *Biochem. Pharmacol.* 23, 295 (1974).
- 71.- Sasame, H. y Gillette, J., *Mol. Pharmacol.* 5, 123 (1969).
- 72.- Conney, A., Brown, R., Miller, J., y Miller, E., *Cancer Res.* 17, 628 (1957).
- 73.- Orrenius, S. y Ernster, L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 60 (1964).
- 74.- Cooper, D., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. y Estabrook, R., *Science* 147, 400 (1965).
- 75.- Mannering, G., Sladek, N., Parli, C. y Shoeman, D., *Microsomes and Drug Oxidations* (J. Gillette, A. Conney, G. Cosmides, R. Estabrook J. Fouts y G. Mannering, ed.) p. 303 , Academic Press, New York (1969).
- 76.- Stetten, M. y Ghosh, S., *Biochim. Biophys. Acta* 233, 163 (1971).
- 77.- Smuckler, E. y Benditt, E., *Biochemistry* 4, 671 (1965).

- 78.- Smuckler, E., Parthier, B. y Hultin, T., *Biochem. J.* 107, 151 (1968).
- 79.- Lengyel, P., Söll, A., *Bacteriological Rev.* 33, 264 (1969).
- 80.- Rubinstein, D. y Kanics, L., *Can. J. Biochem. Physiol* 42, 1577 (1964).
- 81.- Slater, T., *Biochem. J.* 123, 823 (1971).
- 82.- Green, J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 203, 29 (1972).
- 83.- Slater, T., *Biochem. J.* 106, 155 (1968).
- 84.- Serratoni, F., Schnitzer, B. y Smith, E., *Arch. Pathol.* 87, 46 (1969).
- 85.- Miller, J., *Cancer Res.* 30, 559 (1970).
- 86.- Svoboda, D. y Higginson, J. *Cancer Res.* 28, 1703 (1968).