

## Tesis de Posgrado

# Diseño de antídotos contra los daños bioquímicos y estructurales causados por el tetracloruro de carbono basados en el conocimiento de su mecanismo de acción

Cignoli de Ferreyra, Elida Virginia

1975

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:**

Cignoli de Ferreyra, Elida Virginia. (1975). Diseño de antídotos contra los daños bioquímicos y estructurales causados por el tetracloruro de carbono basados en el conocimiento de su mecanismo de acción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1498\\_CignolideFerreyra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1498_CignolideFerreyra.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cignoli de Ferreyra, Elida Virginia. "Diseño de antídotos contra los daños bioquímicos y estructurales causados por el tetracloruro de carbono basados en el conocimiento de su mecanismo de acción". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1498\\_CignolideFerreyra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1498_CignolideFerreyra.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DISEÑO DE ANTIDOTOS CONTRA LOS DAÑOS BIOQUÍMICOS Y ESTRUCTURA  
LES CAUSADOS POR EL TETRACLORURO DE CARBONO BASADOS EN EL CO-  
NOCIMIENTO DE SU MECANISMO  
DE ACCION

ELIDA VIRGINIA CIGNOLI DE FERREYRA

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas

- 1975 -

Agradezco muy especialmente al Dr. José Alberto Castro, Director de esta tesis, sus enseñanzas, el entusiasmo y la dedicación constante que me dispensó durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también:

A la Dra. Irene von Lawtsevicktz su guía y enseñanzas en la realización de los trabajos de histología.

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

A la Sta. Adriana Marta Ochoa y al Sr. Jorge Horacio ferreyra, por su colaboración en la escritura a máquina de este trabajo.

Al Sr. Antonio Boscaro, por su colaboración en el trabajo de laboratorio fotográfico de las ilustraciones que acompañan esta tesis.

A mis compañeros y demás integrantes del Laboratorio de Química Bio-Toxicológica, CITEFA, por sus múltiples atenciones y su cordial amistad.

A mis padres  
A mi esposo  
A mi hijo

INDICE

Introducción	pág. 1
Parte Experimental	pág. 24
Resultados	pág. 34
Discusión	pág. 93
Bibliografía	pág. 106

INTRODUCCION

En muchos laboratorios dedicados a la patología experimental el estudio de la intoxicación por tetracloruro de carbono ha atraído más atención que el estudio de cualquier otra hepatotóxina. Para los investigadores no dedicados a este tipo de estudios, la importancia que se le ha dado a investigar la intoxicación por tetracloruro de carbono podría resultar incomprensible, y por lo tanto, podrían considerar tanta dedicación injustificada. Sin embargo, los estudios sobre el tetracloruro de carbono llevan en sí otra finalidad: la de que la patología celular experimental sea capaz de predecir racionalmente las reacciones de las células contra los agentes dañinos. Para ello, deben estudiarse las respuestas a la acción de los mismos. Generalmente estos sustratos son tan complicados y sutiles en sus respuestas a los agentes tóxicos que el hecho de estudiar las sustancias más simples capaces de producir efectos devastadores y muerte celular a corto plazo representa una ventaja notable. En efecto, si no puede desentrañarse el desarrollo detallado de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la reacción de células vivas con respecto a un compuesto químico tóxico de estructura molecular tan simple como lo es el tetracloruro de carbono, deberían esperarse mayores dificultades para el estudio de las reacciones de células contra sustancias más complejas, puesto que cada uno de sus múltiples metabolitos puede desencadenar distintas interacciones que oscurecerían el proceso primario que se desea estudiar. Al respecto podría citarse un párrafo formulado por Claude Bernard, que dice lo siguiente: "Los tóxicos pueden ser usados como agentes para la destrucción de la vida, o como medios de producir enfermedades; pero aparte de estos dos usos enumerados, por todos bien conocidos, hay un tercero que interesa particularmente: un tóxico es un instrumento que disocia y analiza los fenómenos más sutiles de la estructura viviente, y, estudiando atentamente los mecanismos de muerte debidos a ellos, se puede comenzar a conocer

por una vía indirecta el mecanismo de la vida".

Antecedentes históricos.

El cloroformo fué primero utilizado como anestésico en 1847. Se encuentran descripciones de aquella época de héroes olvidados pertenecientes al siglo XIX, comentando sus propias reacciones al cloroformo y al tetracloruro de carbono, tomados oralmente o por inhalación. La atrofia amarilla aguda del hígado, característica de la intoxicación por cloroformo, era bien conocida hacia fines del siglo XIX. El uso del cloroformo como anestésico general se fué eliminando gradualmente. Se encontró que el tetracloruro de carbono era más tóxico y menos efectivo aún que el cloroformo. La amenaza del tetracloruro de carbono como tóxico industrial se hizo sentir hacia el final del siglo XIX y comienzos del XX. Por el año 1921 se conocieron las propiedades antihelmínticas del tetracloruro de carbono administrado oralmente, y en los años siguientes se reafirmó la toxicidad de este compuesto.

Antecedentes de investigaciones realizadas en el tema.

En los primeros veinticinco años de nuestro siglo, el trabajo de investigación realizado se dirigió principalmente hacia el estudio de las dietas que aumentasen o disminuyesen los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono. El trabajo dirigido directamente al entendimiento de los mecanismos involucrados en la intoxicación fué mínimo. Sin embargo, los interrogantes más importantes del problema surgieron en aquella época: a) Las propiedades tóxicas del tetracloruro de carbono sobre el hígado de rata son debidas al tetracloruro de carbono por sí mismo o son los agentes activos el o los metabolitos de este tóxico? (1). b) La acción en la rata es directa sobre el hígado o hay efectos en sitios distantes de este órgano que tienen influencia significativa? c) Por qué la necrosis hepática es centrolobulillar? d) Si el efecto del tetracloruro de carbono en el hígado es una acción directa sobre las células del parénquima hepático, cuál es el lugar intracelular donde se produce la alteración prima-



ria? Es esta alteración difusa, incluyendo varios componentes intracelulares concurrentemente, o está directamente localizada en un componente celular? e) Por qué las ratas recién nacidas y algunas especies animales (por ejemplo gallinas) son mucho menos sensibles al tetracloruro de carbono que las ratas adultas (2)? f) Cuáles son los mecanismos involucrados en la acción protectora de una amplia variedad de sustancias y tratamientos que demuestran ser eficaces en disminuir la extensión de la necrosis producida por la administración de tetracloruro de carbono (3, 4)?

Muchas dificultades se presentaron en un comienzo cuando se trató de contestar a todas estas preguntas basándose en la hipótesis de que la acción del tetracloruro de carbono depende solamente de sus propiedades como solvente de lípidos; por ejemplo, no podía explicarse que: I) la localización de la necrosis fuese centrolobulillar, en tanto que las concentraciones de tetracloruro de carbono son mayores en la sangre que llega al hígado por la región portal (5); II) el daño mayor durante las primeras horas de intoxicación ocurre en el retículo endoplásmico, en tanto que otras estructuras intracelulares, que también contienen membranas lipídicas, aparentemente sufren daños mucho menores (6, 7, 8, 9, 10); III) la resistencia de la rata recién nacida, a pesar de que se comprobó que el tetracloruro de carbono llega a su hígado en concentraciones iguales que al de la rata adulta (2, 11); IV) la localización de necrosis intensa en el hígado, en tanto que en otros órganos tales como médula ósea, cerebro y también el tejido adiposo, se acumulan concentraciones de tetracloruro de carbono mayores sin causar daño alguno (1); V) la disociación de la producción de necrosis y la acumulación grasa obtenida a través de varias condiciones experimentales diferentes (10, 12). Todas estas dificultades podrían ser salvadas proponiendo un mecanismo basado en el concepto de que antes que el tetracloruro de carbono pueda manifestar sus propiedades necrogénicas, debería sufrir un proceso de activación.

### Metabolismo del tetracloruro de carbono.

En los últimos años varios trabajos han demostrado que, después de su administración a ratas, el tetracloruro de carbono se metaboliza en una determinada proporción (13, 14). Después de la administración del  $^{14}\text{C}$ -tetracloruro de carbono, se detecta  $^{14}\text{C}$  en el aire expirado como  $^{14}\text{C}$ -dióxido de carbono y  $^{14}\text{C}$ -cloroformo. Se comprobó que el tetracloruro de carbono (o sus metabolitos) se unen rápidamente a las estructuras hepáticas. Después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -tetracloruro de carbono a las ratas, se encuentra  $^{14}\text{C}$  marcado unido a proteínas. Esto sugiere que el tetracloruro de carbono no se encuentra presente en el hígado solamente como un solvente de grasas, sino que hay una combinación con los componentes de las células hepáticas.

Sin embargo, ninguno de estos datos provee información acerca de si el metabolismo del tetracloruro de carbono es importante para su rol como toxina hepática, o si es solamente una reacción lateral de poca importancia. Por supuesto, esta es una pregunta clave, que debe ser contestada antes de que puedan empezar a desentrañarse las reacciones involucradas en la actividad necrogénica de dicho tóxico. Una manera indirecta de investigar este problema es considerar las actividades necrogénicas relativas de la serie de metanos halogenados en relación con su facilidad de descomposición química, que, en una especie animal particular, podría esperarse que estuviera relacionada con un comportamiento similar de su metabolismo in vivo.

La unión C-F en los hidrocarburos alifáticos tiene una energía de disociación mayor que la unión C-Cl presente en una estructura similar. En el trifluorclorometano, la energía de disociación de la unión C-Cl sufre un aumento sustancial comparado con el tetracloruro de carbono. Debería esperarse que, aún aquí, la unión C-Cl sea más difícil de romper que en el tetracloruro de carbono; como una consecuencia, debería esperarse que el triclorofluorometano fuese más dificultosamente metabolizado in vivo que el tetracloruro de carbono.

El triclorofluormetano no es apreciablemente tóxico para las ratas. Se encontró que una dosis grande no produce disminución del contenido hepático de NADPH y no aumenta la actividad de ciertas enzimas séricas (3, 4), que son cambios característicos de la intoxicación por tetracloruro de carbono. La estabilidad aumentada de la molécula de triclorofluormetano pareciera impedir la ruptura de la molécula.

Qué significado tienen estas observaciones en relación con el mecanismo de acción del tetracloruro de carbono? Una interpretación sería que al menos algo del tetracloruro de carbono administrado debe sufrir una transformación química antes de que pueda evidenciarse su potencial necrogénico. Por supuesto, la necesidad de un paso de activación no significa que el daño producido no sea modificado de alguna manera por la presencia del mismo tetracloruro de carbono no metabolizado.

La idea de que es necesario algún tipo de transformación del tetracloruro de carbono para explicar su hepatotoxicidad fué sugerida independientemente por varios investigadores, pero fué mérito de Butler (15) el haber postulado que para explicar la formación de cloroformo por metabolismo del tetracloruro de carbono debía requerirse un proceso de ruptura homolítica que tuviera como intermediarios los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ . De hecho, si se produjese la activación en una membrana de las células rica en lípidos, en conjunción con un proceso endógeno productor de radicales libres, la más favorecida sería una ruptura homolítica no iónica, cuyo producto es un radical libre.

En conexión con el estado de activación sugerido, es importante notar que muy poco después de la administración del tetracloruro de carbono a ratas, se detectan altas concentraciones del tóxico en órganos como médula ósea, cerebro y tejido adiposo; se encuentran cantidades menores en hígado, riñón y músculo (1), a pesar de que en la rata se produce necrosis extensa solamente en el hígado. Si las

propiedades tóxicas del tetracloruro de carbono fuesen solamente debidas a su naturaleza lipofílica, y como una consecuencia, produjese daño no específico a estructuras ricas en lípidos, resultaría extraño que aquellos tejidos que lo acumulan rápidamente y en mayor medida no sufriesen daños más severos. Esto demuestra claramente que son necesarias algunas interacciones más específicas para el desarrollo de la necrosis. La explicación más simple sería que el tetracloruro de carbono se convierte en una forma activa solamente en aquellos tejidos en los cuales luego aparece la necrosis.

Acción directa del tetracloruro de carbono sobre el hígado.

Son los efectos sobre el hígado debidos a una acción primaria del tetracloruro de carbono sobre este órgano, o el tetracloruro de carbono provoca una respuesta en otros tejidos que después induce los cambios hepáticos observados?

El desarrollo de técnicas satisfactorias de perfusión de hígado aislado permitió el concretar experiencias para analizar los efectos directos del tetracloruro de carbono y cloroformo sobre el hígado (otra vez la relación entre estructura química y propiedades, y la estrecha similitud de las lesiones hepáticas sugieren que el tetracloruro de carbono y el cloroformo deberían actuar por medio de mecanismos primarios sino idénticos, al menos muy similares). A pesar de que los experimentos no pudieron prolongarse suficientemente después de perfundir el tetracloruro de carbono o cloroformo para demostrar la necrosis centrolobulillar, se encontró evidencia de que en el hígado aislado se producen cambios similares a aquéllos que ocurren en el animal vivo (5). Se encontró disminución de la basofilia citoplasmática, desorganización del retículo endoplásmico, perturbaciones en la secreción de lipoproteínas y en la síntesis de proteínas. Parecería injustificado concluir que muchos de los efectos del tetracloruro de carbono en el hígado reflejan una acción primaria del tóxico sobre el órgano.

Distribución centrolobulillar de la necrosis.

La localización central de la necrosis trataba de explicarse como una consecuencia del rápido desarrollo de una anoxia central producida por isquemia (7). Sin embargo, a pesar de que esta atractiva hipótesis es probablemente de relevancia considerable en estadios posteriores del daño hepático, mediciones directas del flujo sanguíneo hepático en las primeras horas después de la intoxicación no detectaron cambios significativos en la concentración del tóxico. Más aún, en un elegante experimento, Brauer y colaboradores (5) mostraron que la reversión de la dirección del flujo sanguíneo a través de un hígado aislado de rata (en lugar de entrar la sangre por la vena portal y salir del órgano por la vena central, que es la dirección del flujo normal hepático, la circulación se hizo tomando como sitio aferente la vena central y como sitio eferente la vena portal) no afectó la localización centrolobulillar de la necrosis. Este último hallazgo es de considerable importancia, y más aún, indica que la acción protectora de condiciones hiperóxicas (y el efecto agravante de la hipoxia) sobre la necrosis producida por cloroformo y tetracloruro de carbono deben estar relacionadas más con la estructura electrónica del oxígeno (por ejemplo su estructura birradical) que con su porción parcial en la vena aferente. En una discusión sobre el rol de los cambios vasculares en la primer fase del daño hepático producido por el tetracloruro de carbono, Brauer (5) escribió: "Tomados juntos, los experimentos sobre circulación, los datos bioquímicos y los experimentos utilizando órganos aislados, indican claramente que la lesión hepática primaria resultante de la exposición al cloroformo o al tetracloruro de carbono es independiente de cualquier cambio vascular y además, precede a los cambios vasculares en varias horas".

Muchos otros factores pueden contribuir a la localización centrolobulillar de la necrosis. Dosificando con  $^{14}\text{C}$ -tetracloruro de carbono y usando luego autorradiografía, Roqué y Fedorko (7) demostraron que ocurre acumulación preferencial del tetracloruro de carbono en la zona central del lobulillo hepá-

tico. Se había sugerido ya que una parte importante de las reacciones que producen necrosis sería una activación o transformación del tetracloruro de carbono. Si esta reacción estuviese concentrada también en la región centrolobulillar, los efectos en términos de daño celular serían sinérgicos con una localización central preferencial del tóxico. Hay numerosos ejemplos en la literatura de la presencia de una heterogeneidad lobulillar de la actividad enzimática obtenida por técnicas histoquímicas y de microdissección. Como un ejemplo particular, las reacciones ligadas a flavinas parecen estar concentradas en la región central del lobulillo hepático. Se sabe que durante la dehidrogenación catalizada por enzimas, las coenzimas de las flavinas pasan por estados de radicales libres, y por lo tanto podrían actuar como puntos favorables para la ruptura homolítica de la unión C-Cl.

#### Localización intracelular del daño inicial.

Los estudios realizados utilizando  $^{14}\text{C}$ -tetracloruro de carbono mostraron que el  $^{14}\text{C}$  marcado alcanza rápidamente una concentración elevada en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico (6, 7, 8, 9). Por lo tanto, hay evidencia de una acumulación temprana del tóxico en los sistemas membranosos celulares ricos en lipoproteínas.

El examen por microscopía electrónica de secciones de hígado de ratas intoxicadas reveló una dilatación, desorganización y degranulación temprana del retículo endoplásmico, pero no se detectó daño equivalente en mitocondrias, particularmente en zona central (7). Estudios bioquímicos también demostraron que en la fracción microsomal se producen alteraciones tempranas. Durante este período, hay una gran disminución de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa y de los sistemas enzimáticos que metabolizan drogas (12). Se encontraron también cambios tempranos en las actividades de las reductasas NADPH dependientes y en la pirofosfatasa. No se han encontrado cambios bioquímicos tempranos similares en componentes mitocondriales (excepto una entrada de calcio temporaria) a pesar de la presencia de concentraciones apre-

ciables de tetracloruro de carbono en estas organelas. Aparentemente los cambios más tempranos producidos por el tetracloruro de carbono en células hepáticas ocurren en la fracción microsomal.

Si la activación del tetracloruro de carbono fuese condición necesaria para que produzca daño, entonces parecería lógico suponer que este proceso ocurre en el retículo endoplásmico. Si el paso de activación fuese una ruptura homolítica de la unión C-Cl, entonces los sistemas enzimáticos presentes en la membrana que involucran la producción y utilización controlada de los radicales libres podrían actuar como iniciadores de una cadena de radicales libres no controlable y potencialmente dañina.

#### Resistencia de las ratas recién nacidas.

El tetracloruro de carbono aparentemente no produce necrosis cuando se lo administra a ratas menores de seis días de vida (2). Esto sugiere que el hígado de la rata recién nacida es deficiente en alguna propiedad vital para la toxicidad del tetracloruro de carbono, y apunta a la conclusión de que la mera presencia física del tóxico no es suficiente para provocar necrosis. Sobre la base de las discusiones previas, la falta de toxicidad podría ser debida a una falta de enzima activante, resultando en la falta de formación del metabolito del tetracloruro de carbono que es la estructura activa responsable de la ausencia de necrosis. Hay antecedentes considerables para esta sugerencia, dado que muchas enzimas faltan o al menos están presentes en muy pequeña proporción durante los primeros días de vida; en muchos casos la actividad enzimática aumenta rápidamente entre los dos y los diez días de vida. Es probable que la aparición de las propiedades necrogénicas del tetracloruro de carbono esté conectada con la rápida aparición de una actividad enzimática que produce su activación.

#### Existencia de un proceso de peroxidación de lípidos.

Hay varios procesos naturales que se cree que ocurren

en los microsomas por intermedio de un radical libre y que actuaría de esta manera (por ejemplo, el sistema NAD ascorbato, reacciones de enzimas que involucran flavinas y la peroxidación de lípidos catalizada por NADPH-ADP-hierro, supuestamente íntimamente relacionada con los sistemas de desintoxicación enzimáticos del retículo endoplásmico (12)). La importancia de haber establecido la posibilidad de la existencia de una reacción por radicales libres resultó fundamental para los hallazgos de Comporti y colaboradores (16, 17, 18, 19) y Recknagel y colaboradores (20, 21, 22) que descubrieron que el tetracloruro de carbono in vitro aumentaba la peroxidación de lípidos en homogenatos de hígado, fenómeno éste que requiere una activación por radicales libres. Esta peroxidación se supuso responsable del proceso que finalmente terminaba en necrosis (23). Ello parecería bastante probable a la luz de hallazgos de otros autores, que encontraron que durante procesos de peroxidación de lípidos producidos por diferentes medios se verificaba daño en mitocondrias (24), en lisosomas (25) y en el retículo endoplásmico (26).

Es sugestivo el hallazgo de que varios inhibidores de reacciones por radicales libres también reducen la extensión de la necrosis central y/u otras manifestaciones tóxicas después de la administración del tetracloruro de carbono, por ejemplo, la difenil p-fenilene diamina, el SKF 525A, la vitamina E. Más aún, el sistema de peroxidación de lípidos NADPH dependiente es muy poco activo en el hígado de ratas recién nacidas (2) que son marcadamente resistentes al daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono. Estos hechos y además la circunstancia de que se encontrara que el contenido de ácido araquidónico disminuye en los lípidos microsomales durante la intoxicación por tetracloruro de carbono (27) y que el espectro ultravioleta de los lípidos microsomales mostrara una banda de absorción característica a 233 milimicrones que es típica de procesos de peroxidación, llevaron a postular a Recknagel (8) que este proceso era decisivo para que se produzca necrosis.



Sintetizando lo analizado en los puntos precedentes, en la Fig. 1 se describe el mecanismo postulado para la acción del tetracloruro de carbono tal cual se lo concebía para el conocimiento disponible en 1967.

Se suponía que la peroxidación de lípidos era el agente de daño celular fundamental en los procesos de intoxicación por tetracloruro de carbono, aunque no se descartaba la posibilidad teórica de que los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  pudieran también producir un daño directo no mediado por la peroxidación.

La secuencia de alteraciones que conducía a la necrosis se concebía que era la siguiente:

- 1) El tetracloruro de carbono se activaría a  $\cdot\text{CCl}_3$  mediante la acción de las enzimas hidroxilantes de microsomas de un modo no aclarado.
- 2) Estos radicales libres activarían a los ácidos poli-insaturados como el linolénico, linoleico y araquidónico, desatando así un proceso de peroxidación del modo ejemplificado en la Fig. 2.
- 3) La peroxidación de los lípidos de las membranas del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, produciría por un lado alteraciones bioquímicas importantes, como la destrucción de la glucosa 6-fosfatasa (G6P-asa) y por otro lado alteraría las propiedades de la membrana interrumpiendo su continuidad y/o cambiando su polaridad (28). Ello haría que se viese afectada su permeabilidad iónica, con lo cual las mitocondrias perderían  $\text{K}^+$  y entraría  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ .
- 4) La acumulación de  $\text{Ca}^{++}$  se sabe que es muy dañina para las mitocondrias causando en ellas tumefacción, pérdida de capacidad para oxidar sustratos del ciclo de Krebs y desacople de la fosforilación oxidativa con la consecuente disminución del contenido de ATP (29).
- 5) Esta falla energética surgida por una total disfunción mitocondrial sería la causa fundamental que lleva a la necrosis hepática (30), aunque el rol de otros procesos laterales como la liberación de enzimas lisosomales también podría cooperar (31).

MECANISMO DE LA NECROSIS POR CCl<sub>4</sub>

(como se postulaba en 1967)

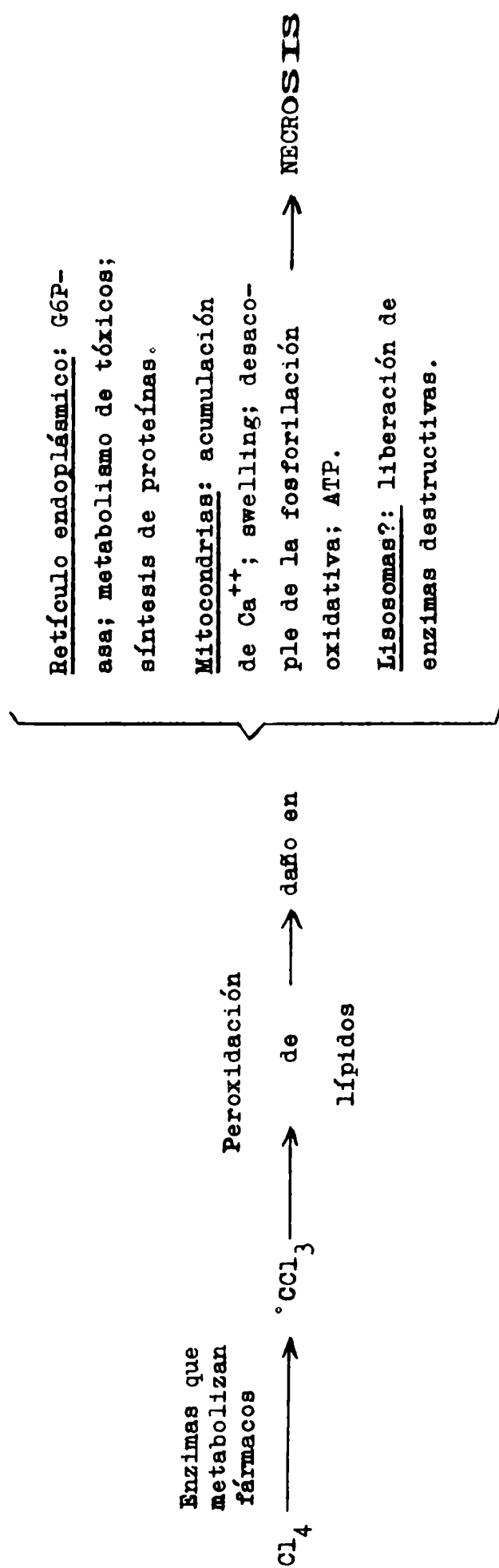


Fig. 1

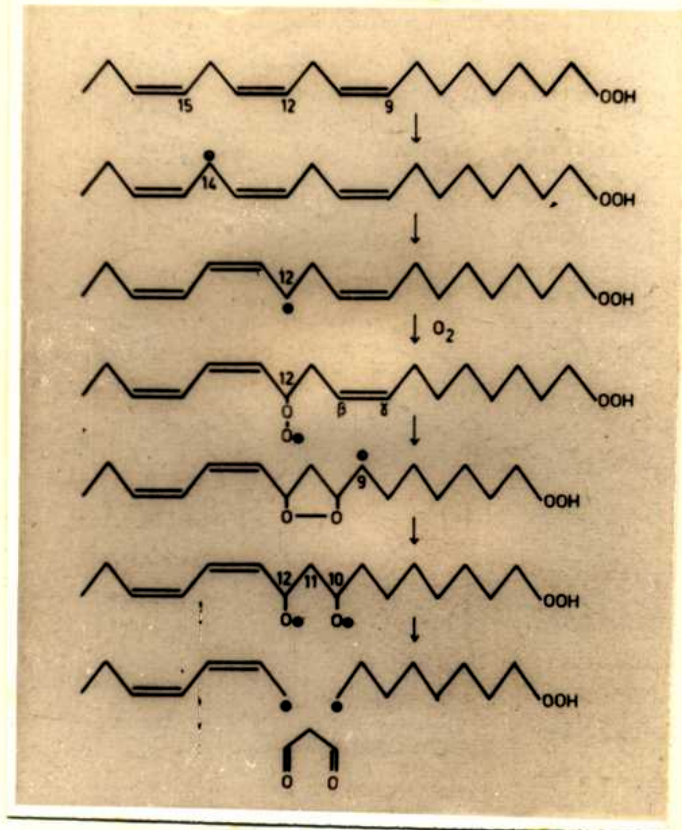


Fig. 2 - Esquema de la secuencia peroxidativa de un ácido graso no-saturado con producción de malondialdehído, ejemplificada con ácido linolénico.

Sistema enzimático involucrado en la activación del tetracloruro de carbono.

El estudio de los componentes del sistema enzimático que hidroxila tóxicos y fármacos ha estado realizándose con gran intensidad; se considera que es un sistema oxidasa mixto, donde el NADPH reduce un componente de los microsomas que reacciona con el oxígeno molecular para formar un intermediario oxígeno activo. El oxígeno activo es luego transferido a la droga. Los componentes claves en el proceso son la NADPH-citocromo c-reductasa (NADPH-citocromo P-450 reductasa), la flavina involucrada en la oxidación del NADPH y el citocromo P-450 (Fig. 3a), que funciona reduciendo al citocromo P-450 oxidado (32, 33).

También se descubrió que los fármacos como los barbituratos y otros compuestos como la anilina y otras aminas modificaban la velocidad de oxidación del NADPH, en tanto que otros compuestos no la afectaban. El hecho de que una droga actúe estimulando o deprimiendo la oxidación del NADPH depende de que estimule o deprima la actividad de la citocromo P-450 reductasa, y ésto a su vez parece que depende de la interacción de la droga con el citocromo P-450 dando cambios espectrales característicos de dos tipos generales: tipo I y tipo II (34, 35). Los compuestos que dan cambios espectrales tipo I ó II con los microsomas hepáticos se los conoce como compuestos o drogas tipo I ó tipo II. Los compuestos tipo I dan un espectro diferencial con un máximo en el rango de 385-390 milimicrones y un mínimo en el rango de 418-427 milimicrones; los máximos y mínimos de los compuestos tipo II son 425- 435 milimicrones y 390-405 milimicrones respectivamente. Por lo tanto, oponiendo las longitudes de onda máxima y mínima, los espectros tipo I y tipo II son aproximadamente imágenes especulares uno de otro. Los cambios espectrales tipo I y tipo II producidos por un compuesto típico tipo I (hexobarbital) y tipo II (anilina) se encuentran en la figura 3b. La razón de los espectros diferenciales característicos obtenidos cuando se añaden drogas tipo I ó tipo II a los microsomas puede observarse cuando se

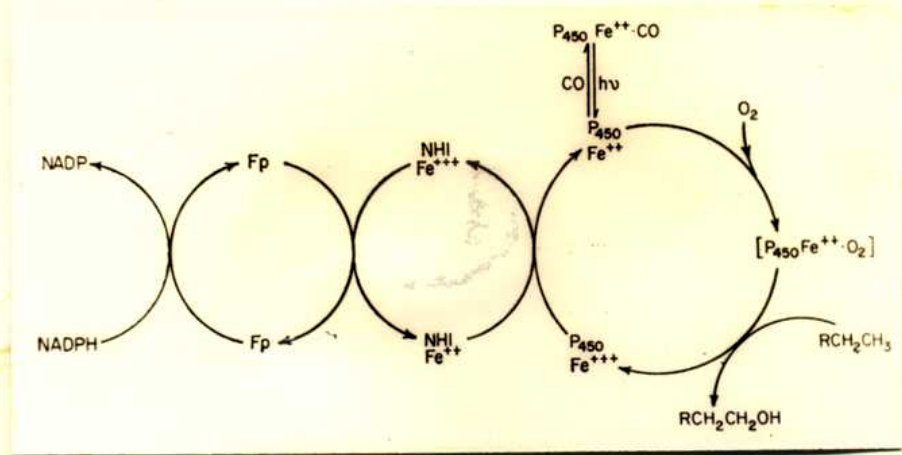


Fig. 3a - Sistema transportador de electrones hidroxilante de tóxicos y fármacos presente en microsomas hepáticos y de suprarrenales. Fp=flavoenzima; NHI=hierro proteína no hemática (presente solamente en suprarrenales); H-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>=cadena lateral de un sustrato.

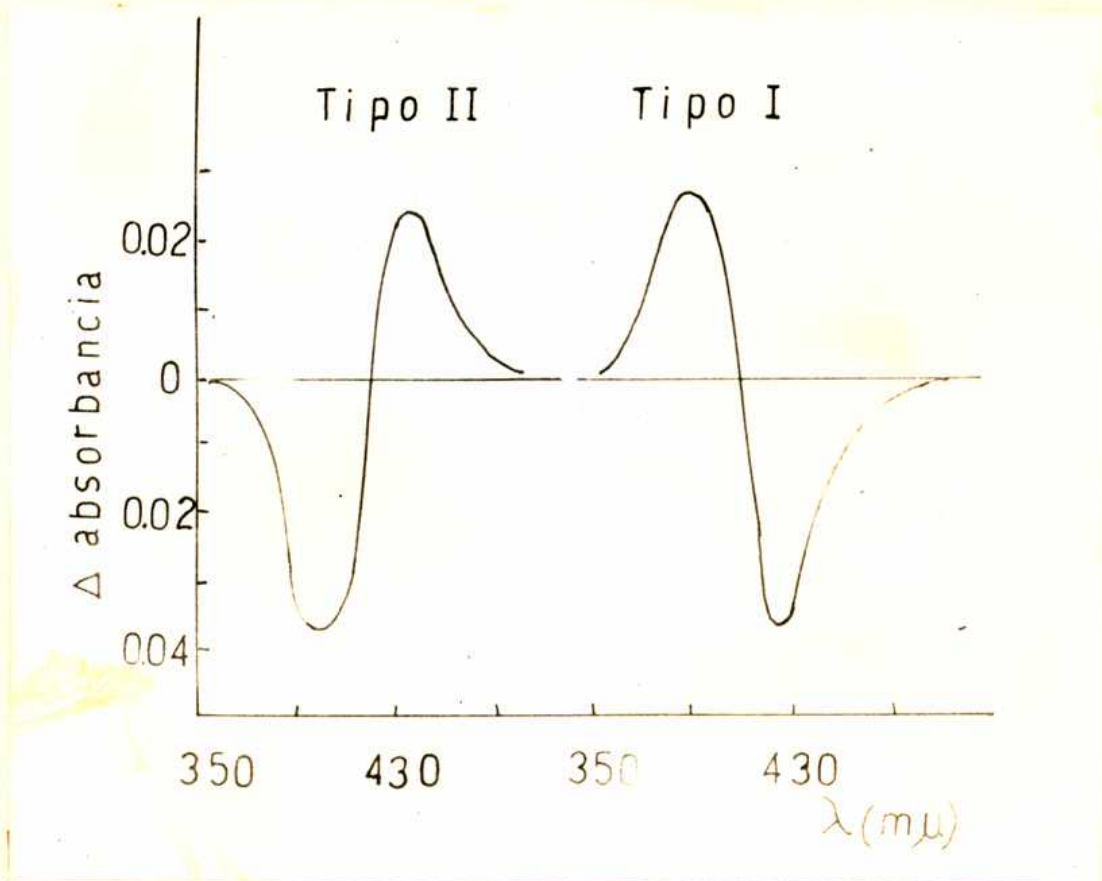


Fig. 3b - Cambios espectrales tipo I y tipo II producidos por interacción de suspensiones microsomales (2 mg de proteína/ml) con compuestos típicos tipo I (hexobarbital  $1,0 \times 10^{-3}M$ ) y tipo II (anilina  $6,0 \times 10^{-3}M$ ).

obtiene el espectro absoluto del citocromo P-450, el del citocromo P-450 más hexobarbital y el del citocromo P-450 más anilina. El hexobarbital causó una disminución del espectro absoluto en la dirección de longitudes de onda menores con el máximo corrido de 420 milimicrones a 415 milimicrones. La adición de anilina produjo una caída del espectro absoluto en la dirección de longitudes de onda mayores, con el máximo corrido de 420 milimicrones a 425 milimicrones. Cuando las diferencias entre los espectros absolutos con y sin drogas fueron graficadas, se obtuvo una curva prácticamente idéntica al espectro diferencial obtenido experimentalmente cuando se utilizó hexobarbital o anilina.

En el año 1967, Mc Lean (36) y Castro, Sasame y Gillette (37) encontraron que el tetracloruro de carbono daba cambios espectrales tipo I por interacción con el citocromo P-450 microsomal, indicando así que el tetracloruro de carbono era capaz de interactuar con un componente del sistema enzimático anteriormente postulado como involucrado en su activación. Posteriormente Castro, Sasame, Sussman y Gillette (38) encontraron que la destrucción del citocromo P-450 por el tetracloruro de carbono anteriormente descrita por otros autores (39) no era causada por el proceso de peroxidación de lípidos. Estudios posteriores de Sasame, Castro y Gillette (40) permitieron postular que el citocromo P-450 se destruía por acción directa de los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ . El mérito de estos hallazgos reside en que por primera vez se postulaba que una alteración funcional temprana causada por el tetracloruro de carbono no era producida ni por una acción solvente del tetracloruro de carbono ni por la peroxidación de lípidos que desencadena, sino directamente por los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ .

Otros trabajos interesantes fueron los de Reynolds (41) y Reynolds y Yee (42) quienes si bien no encontraron alteraciones funcionales atribuibles a los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ , encontraron en cambio que el  $^{14}\text{C}$  y el  $^{36}\text{Cl}$  de  $^{14}\text{C}^{36}\text{Cl}_4$  se unían de un modo químicamente irreversible a los componentes subcelulares hepáticos, siendo particularmente interesante el

hecho de que la unión a lípidos microsomales fuera mayor que la de lípidos de las otras organelas.

Posteriormente Cignoli y Castro (43) postularon que además del citocromo P-450 también la glucosa 6-fosfatasa sería destruída in vivo por los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ . Una evidencia más específica de que las enzimas hidroxilantes de microsomas podrían estar involucradas en el proceso que conduce a la necrosis fue provista por los experimentos realizados por Cignoli y Castro (44), quienes demostraron que varios inhibidores de estas enzimas eran capaces de impedir la necrosis inducida por el tetracloruro de carbono y en algunos casos también la infiltración grasa.

En 1969, Gordis (45) realizó un interesante estudio sobre las características de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}^{36}\text{Cl}_4$  a lípidos microsomales, estableciendo que por molécula de lípido se incorporaban al mismo un átomo de  $^{14}\text{C}$  y cuatro de  $^{36}\text{Cl}$  y además que el ácido graso marcado tenía idénticas características de distribución en un sistema de contracorriente que un ácido linoleico, sobre el cual se había adicionado irreversiblemente  $^{14}\text{CCl}_4$  in vitro utilizando peróxido de benzoflora como catalizador. La importancia de este trabajo reside en que surge de él que la unión irreversible del tetracloruro de carbono a lípidos parece responder a una reacción que involucra radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$ .

Recientemente Villarruel y Castro (46) profundizaron estos estudios de Gordis y utilizando cromatografía gaseosa y en placa delgada lograron evidencia más precisa de que esta reacción entre el  $^{14}\text{CCl}_4$  y los lípidos microsomales está mediada por la formación de  $\cdot\text{CCl}_3$ , demostrando además que los ácidos linolénico y araquidónico de fosfolípidos microsomales son el blanco preferido de la acción de los mismos. El valor de este hallazgo es crítico, puesto que otras técnicas capaces de evidenciar la presencia de radicales libres como la resonancia paramagnética electrónica no fueron capaces de detectarlo, aparentemente debido a la corta vida media de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  (47).

Protectores contra los efectos producidos por el tetracloruro de carbono.

Se conoce desde hace mucho tiempo que varias sustancias que por sí solas son relativamente inocuas, cuando se las administra junto con el tetracloruro de carbono aumentan notablemente la severidad de la lesión o modifican el curso de la intoxicación de manera tal que la necrosis hepática resulta notablemente disminuída (7, 44). Como ejemplo, podemos enumerar una serie de agentes y condiciones que protegen contra la necrosis hepática u otras manifestaciones tóxicas inducidas por la administración del tetracloruro de carbono:

- a) cationes anfipáticos; fenotiazinas, cetiltrimetil amonio bromuro, nupercaína.
- b) anti inflamatorios no específicos: inyecciones subcutáneas de carbón, xantina, etc.
- c) procedimientos que disminuyen la temperatura: cordotomía, adrenalectomía.
- d) antioxidantes, atrapadores de terminales de cadena: vitamina E, dimetil p-fenilene diamina, dióxido de selenio, oxígeno.
- e) inhibición del paso de activación microsomal: fenotiazinas, SKF 525A.

Puede verse que las sustancias protectoras pueden clasificarse en varios grupos, con distintas propiedades y características. La conclusión que claramente se obtiene es que si todas estas sustancias con estructura y propiedades químicas tan dispares realmente inhiben el desarrollo de la necrosis por otros mecanismos distintos de una acción secundaria como la disminución de la temperatura corporal (7), entonces ellos no estarían actuando de una manera dada, sino que deberían operar por medio de distintos mecanismos de protección. Por ejemplo, si la necrosis dependiese de la acción cooperativa de una mayor captación del tetracloruro de carbono unida a una activación central, la inhibición de cualquiera de los dos procesos podría dar alguna medida de protección. Más aún, dado que cada proceso es probablemente la suma de muchos acon-



tecimientos, sería posible interferir con cada uno de más de una manera.

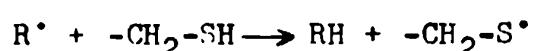
Basándose en la Figura 1 antes mencionada, la protección contra el proceso necrótico total podría obtenerse bloqueando el sistema de radicales libres endógeno; por remoción de los radicales libres preferencialmente por combinación con exceso de aceptor añadido (por ejemplo, la acción protectora de los antioxidantes), proveyendo un competidor para la reacción del tetracloruro de carbono con la cadena de radicales libres endógena dando un producto menos tóxico; promoviendo la captura de radicales libres a través del aumento en la velocidad de reacción endógena, o por una reacción no específica como en el caso de la cordotomía, donde una disminución general de la temperatura del cuerpo disminuye la velocidad de todo el metabolismo.

Las propiedades requeridas por las sustancias en estos cinco tipos distintos de interacción deben ser claramente distintas.

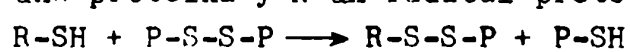
Debe tenerse en cuenta que la aceptación de un estado de activación como un hecho necesario para el desarrollo de la necrosis después de la administración del tetracloruro de carbono establece un esquema en el cual la pluralidad de mecanismos puede ser evidenciada por agentes protectores. Mientras se creyó que el tetracloruro de carbono ejercía sus efectos por medio de una acción lipofílica no específica, fué difícil visualizar cómo un grupo de agentes protectores tan amplio podía ser tan efectivo. La activación proveyó la clave para entender una secuencia de acontecimientos tan compleja.

El hecho de que la toxicidad del tetracloruro de carbono estuviese mediada por su previa transformación a radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  planteó de hecho una similitud con otro caso clásico de patología mediado por radicales libres, como es el de las radiaciones ionizantes (8) y ello abrió la posibilidad de que antídotos eficaces contra la acción de las mismas también lo fueran para el caso del tetracloruro de carbono.

Por varias razones (importancia cuantitativa del efecto; relación con constituyentes normales de las células vivas; gran reactividad química y variedad de efectos farmacológicos) los radioprotectores que contienen grupos sulfuro en su molécula han sido los más extensamente estudiados en todos los tipos de sistemas (48). Gracias a la precisión y versatilidad de los aparatos de resonancia paramagnética, pudo comprobarse que la reacción por radicales libres transcurre de la siguiente manera:



Se comprobó que las sustancias radioprotectoras con grupos -SH y -S-S- forman rápidamente disulfuros mixtos con proteínas o péptidos de acuerdo con la siguiente ecuación, donde P representa una proteína y R un radical protector:

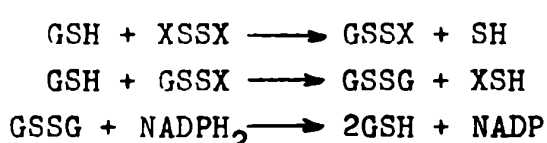


Esta reacción es no enzimática y se completa en un minuto *in vitro* a temperatura ambiente (49). Dado que esta reacción no se produce con tioles y sulfuros no radioprotectores, se suponía que esta formación de disulfuros mixtos era el mecanismo más importante de radioprotección.

Estudios posteriores más detallados demostraron que al menos en el mamífero viviente, no ha sido posible hasta el presente explicar totalmente sus efectos benéficos contra el daño por radicales libres sólo en esos términos (50). Esta conclusión está basada en el hecho de que los protectores con grupos -SH ó -S-S- inducen en mamíferos cambios bioquímicos y ultraestructurales profundos, observables por microscopía electrónica; una característica peculiar de los efectos de estos protectores es que estas lesiones ultraestructurales no son específicas, apareciendo 5 ó 10 minutos después de la administración del compuesto, y con completa reversibilidad en aproximadamente tres horas.

Entre los radioprotectores con grupo sulfuro más conocido y estudiado, se encuentra la cistamina (disulfuro de la mercaptoetilamina) (48). En el organismo, la cistamina sufre una rápida reducción a cisteamina (mercaptoetilamina) que es su principal metabolito, también utilizado por su efecto.

to protector contra radiaciones. La reacción de reducción procede vía reacciones de intercambio espontáneo con el glutatión reducido (GSH); el glutatión oxidado resultante se reduce por la glutatión reductasa, en un esquema como el siguiente:



La efectividad de la vía oral para los radioprotectores más activos ha sido ensayada en ratas y ratones. El interés por esta vía es muy importante por varias razones: para disminuir la toxicidad, para prolongar la duración del efecto radioprotector, para dar una mejor protección a la mucosa intestinal y al hígado.

La cistamina dada por sonda gástrica es muy activa en ratas y ratones, teniendo la precaución de que hay que esperar cerca de media hora para asegurarse que se ha producido absorción y saturación del hígado; pero ya se obtiene un alto grado de protección después de 15 minutos de la administración. La cistamina dada oralmente es muy bien tolerada; en dosis de 450 a 600 mg/kg protege ya a los 15 minutos, siendo la protección algo mejor a la media hora; su efecto como antidoto es muy prolongado por esta vía, dado que permanece varias horas en el cuerpo (48). Se elimina por orina como cistamina ó como su metabolito cisteamina, y también en la forma de otros metabolitos secundarios como taurina, hipotaurina, sulfato y los disulfóxidos de cistamina y cisteamina.

#### Objetivos generales y plan de trabajo.

El objetivo general de este trabajo es verificar si la cistamina, cuya actividad como radioprotector es bien conocida, es capaz de prevenir los efectos tóxicos del tetracloruro de carbono tal cual sería de esperar si este tóxico actuase como sustancia radiomimética tal como las teorías en vigencia acerca de su mecanismo de acción lo sugieren.

También se intentará establecer en el caso de que la cistamina protegiese, si efectivamente esa acción protectora se

debe a una capacidad atrapadora de radicales libres como algunos autores postulan que lo hace en el caso del daño por radiaciones.

Se intentará también verificar si otra sustancia radioprotectora de naturaleza poco tóxica como la cisteína, es capaz también de actuar como protectora contra el daño por tetracloruro de carbono y si lo hace valiéndose de un mecanismo similar al de la cistamina.

El plan de trabajo propuesto abarcó dos etapas. En la primera de ellas, se estudiaron los efectos que produce la cistamina en la intoxicación por tetracloruro de carbono. Los experimentos que se plantearon fueron los siguientes:

- Ver si la cistamina modifica la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales y si afecta la peroxidación de lípidos que produce el tetracloruro de carbono.
- Ver si la cistamina afecta a las enzimas que metabolizan sustancias extrañas al organismo, por medida del tiempo de sueño producido por pentobarbital; si interacciona con componentes de dicho sistema enzimático tal como el citocromo P-450, y si afecta la actividad de ciertas enzimas hepáticas como la citocromo P-450 reductasa, la etilmorfina N-demetilasa y la glucosa 6-fosfatasa.
- Ver si la cistamina protege contra la necrosis y el hígado graso producidos por el tetracloruro de carbono, y si produce otros efectos tales como modificación de la temperatura corporal, alteración de la estabilidad lisosomal y modificación de la absorción del tetracloruro de carbono.

En una etapa posterior, se estudiaron los efectos de la cisteína en la intoxicación por el tetracloruro de carbono, y para ello se propusieron los siguientes experimentos:

- Ver si la cisteína modifica la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales y si afecta la peroxidación de lípidos que produce el tetracloruro de carbono.
- Ver si la cisteína interacciona con el citocromo P-450 y si afecta la actividad de ciertas enzimas como la glucosa 6-fosfatasa.

- Ver si la cisteína protege contra la necrosis y el hígado graso producidos por el tetracloruro de carbono.
- Verificar si la cisteína, dado su menor poder tóxico que la cistamina, protege contra la necrosis producida por el tetracloruro de carbono cuando se la administra terapéuticamente.
- Correlacionar los datos obtenidos con estos posibles protectores de la acción tóxica producida por el tetracloruro de carbono con el mecanismo de acción de este último.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Compuestos usados.

El tetracloruro de carbono radiactivo ( $^{14}\text{CCl}_4$ , actividad específica 6,05 dpm/ $\mu\text{M}$ ) fue adquirido a Radiochemical Centre, Amersham, (Inglaterra). El dihidroclorhidrato de cistamina (cistamina) y el clorhidrato de l-cisteína (cisteína) fueron adquiridos a T. Schuchardt (Alemania) y el dihidroclorhidrato de cisteamina (cisteamina) a Sigma Chemical Co. (USA). El pentobarbital sódico fue de grado farmacéutico.

Todos los demás compuestos empleados fueron de grado reactivo.

### Animales y su tratamiento

En todos los experimentos se usaron ratas albinas macho cepa Sprague-Dawley (170-260 g). El alimento se les retiró entre 12 y 14 horas antes de la administración del  $\text{CCl}_4$  o del compuesto utilizado en el experimento correspondiente, pero se les proveyó agua a voluntad.

El  $\text{CCl}_4$  se administró intraperitonealmente en solución al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución por kg de peso de rata (1/ml de  $\text{CCl}_4$  puro/kg). Las ratas control recibieron cantidades equivalentes de aceite de oliva intraperitonealmente.

El  $^{14}\text{CCl}_4$  fue disuelto en aceite de oliva en una concentración de  $1,4 \times 10^6$  dpm/ml (23  $\mu\text{moles/ml}$ ) y fue administrado por vía intraperitoneal en una dosis de 5 ml de solución por kg de peso (5  $\mu\text{moles } ^{14}\text{CCl}_4/\text{kg}$ ). En un experimento se usaron soluciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  más concentradas, de  $5,6 \times 10^6$  dpm/ml (3,6 x dosis standard). Los animales control recibieron aceite de oliva.

La cistamina fue dada por vía oral en solución en agua destilada (240 mg/ml) en una dosis de 600 mg/kg, y la cisteína por vía oral en solución acuosa (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , excepto en los experimentos de tratamiento terapéutico con cisteína en donde ésta se administró 1 hora después del  $\text{CCl}_4$ . Los animales control recibieron cantidades equivalentes de agua destilada. Todas las administraciones se efectua-

ron a las 8 horas.

Los animales fueron sacrificados por decapitación a distintos tiempos después de la administración del  $\text{CCl}_4$  o del compuesto correspondiente. Se los dejó desangrar y posteriormente se extrajo con rapidez el hígado, el cual fue pesado y procesado. En los casos en que se tomaron muestras de sangre, los animales fueron sometidos a anestesia superficial con éter y la sangre fue extraída de la vena cava inferior con una jeringa heparinizada.

Para determinar el tiempo de sueño producido por pentobarbital en animales tratados previamente con cistamina, el pentobarbital sódico disuelto en  $\text{ClNa}$  al 0,9% fue administrado en una dosis de 40 mg/kg a ratas que habían sido tratadas con cistamina hasta 24 horas antes y se midió su tiempo de sueño. Los controles recibieron cantidades equivalentes de agua destilada por vía oral en lugar de la solución de cistamina.

#### Procesamiento de los órganos

Todas las manipulaciones del hígado y las operaciones subsiguientes se llevaron a cabo a  $0-4^{\circ}\text{C}$ . En todos los casos, la expresión de los resultados está dada empleando las unidades propuestas por los autores de los respectivos métodos.

Separación de microsomas: la aislación de las fracciones microsomas para la determinación de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa (G6P-asa), peroxidación de lípidos y unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomas fue realizada por el siguiente procedimiento (52): 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 homogenato se centrifugó a 9.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante fue luego centrifugada durante 1 hora a 105.000 x g en una ultracentrífuga preparativa Spinco Modelo L. El pellet microsomal se suspendió en 2 ml de la misma solución de sacarosa/EDTA usada para la homogeneización. En esta suspensión se determinaron la G6P-asa, peroxidación de lípidos y unión irreversible de  $^{14}\text{CCl}_4$ , según se describe luego.

La fracción microsomal para la determinación del metabolismo de la etilmorfina N-demetilasa (EM-asa), citocromo P-450 (P-450), citocromo P-450 reductasa (P-450 reductasa) y cambios espectrales producidos por interacción de compuestos con el P-450 de suspensiones microsomales (cambios espectrales) fue separada por la misma técnica ya descrita excepto que el hígado se homogeneizó con un volumen igual a 4 veces su peso de una solución de CLK 1,15%. El homogenato se centrifugó a 9.000 x g durante 20 minutos y la fracción sobrenadante a 105.000 x g durante una hora. Los microsomas así separados se resuspendieron en 13 ml de solución de CLK 1,15% - Tris-ClH 0,02 M (pH 7,4). En esta suspensión se determinaron la EM-asa, P-450, P-450 reductasa y cambios espectrales según se describe luego.

Separación de la fracción rica en lisosomas: la fracción enriquecida en lisosomas fue aislada según el método indicado por Appelmanns y colaboradores (53) y consiste esencialmente en lo siguiente: los hígados fueron homogeneizados en sacarosa 0,25 M (1 g de hígado 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 y de aproximadamente 25 mg de proteína/ml para los ensayos de ribonucleasa.

#### Determinaciones enzimáticas y ensayos

Fosfatasa ácida: fue determinada a 37°C usando como sustrato p-nitrofenilfosfato, según la técnica descrita por Linhardt y Walter (54). La actividad está expresada en micromoles de p-nitrofenol liberados por minuto a 37°C por mg de proteína de un sobrenadante obtenido centrifugando 20 minutos a 20.000 x g la suspensión lisosomal.



Ribonucleasa: fue determinada a 37°C usando como medio de incubación buffer acetato 0,1 M, pH 5,0, conteniendo 1,6 mg de RNA de levadura/ml, según la técnica de Kalnitsky y colaboradores (55). La reacción enzimática fue detenida con acetato de uranilo 0.75% en ácido perclórico al 25% y la mezcla centrifugada a 3.000 x g durante 10 minutos en frío. El sobrenadante se diluyó cinco veces y las lecturas se efectuaron a 260 milimicrones. La actividad está expresada en unidades por minuto a 37°C por mg de proteína de un sobrenadante obtenido centrifugando 20 minutos a 20.000 g la suspensión lisosomal. Una unidad es equivalente a la cantidad de oligonucleótido ácido-soluble que causa un aumento de absorbancia a 260 milimicrones de 1,0.

Glucosa 6-fosfatasa (G6P-asa): fue determinada en suspensiones microsomales de acuerdo al procedimiento descrito por Harper (56). La actividad está expresada en micromoles de fósforo inorgánico producido por minuto por miligramo de proteína a 37°C.

Para estudiar el efecto de la dilución en la inhibición de la actividad de la G6P-asa por cistamina, alícuotas de las suspensiones microsomales en sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM (40 mg de proteína microsomal/ml) se diluyeron a la mitad con sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM o con una solución de cistamina en sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM y se ajustó el pH al de la suspensión microsomal (pH 7,4; concentración final de cistamina 5mM). Ambas mezclas se incubaron a 37°C durante 15 minutos; se tomaron alícuotas de cada mezcla y se determinó la actividad de la G6P-asa. El resto de ambas mezclas se enfrió y centrifugó 1 hora a 105.000 x g. Los pellets microsomales resultantes se llevaron a su volumen inicial por resuspensión con sacarosa 0,3 M/EDTA 3 mM y se midió la actividad de la G6P-asa. El grado de dilución final después de todos estos pasos fue de 60 veces.

Etil morfina N-demetilasa (EM-asa): fue medida en suspensiones microsomales de acuerdo con el procedimiento descrito por Castro y Gillette (52), excepto que la concentración de la etilmorfina en la mezcla de incubación fue 10 mM, que es 20-40 veces el Km de la etil morfina N-demetilasa en microsomas de hígado de ratas macho cepa Sprague-Dawley. La composición final de la mezcla de incubación es la siguiente: buffer Tris 50 mM pH 7,4; Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM; isoci-

trato de sodio 8 mM; NADP 0,33 mM; isocítrico dehidrogenasa 0,36 unidades/ml; etilmorfina 10 mM y alrededor de 2 mg/ml de proteína microsomal. La actividad está expresada en milimicromoles de formaldehído producido en 1 minuto a 37°C por miligramo 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 y colaboradores (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 midió la diferencia de absorbancia entre 450 y 490 mμ antes y después de la adición del reductor (ditionito de sodio). El resultado se expresó en milimicromoles de P-450 por mg de proteína.

Determinación de 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 y colaboradores (57). Se utilizó una celda anaeróbica Aminco (A1-65085) para trabajar en atmósfera de O<sub>2</sub>. La suspensión de microsomas hepáticos de rata se obtuvo como se detalla en Procesamiento de los órganos. Tres ml de dicha suspensión microsomal saturada con O<sub>2</sub> fueron reducidos con un sistema generador de NADPH compuesto por: 0,2 ml de buffer Tris 0,3 M pH 7,4; 0,2 ml de Cl<sub>2</sub>Mg 1 M; 124 mg de isocitrato de sodio; 20 mg de TPN y 0,6 ml de ICDh en glicerol. 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 milimicrones de P-450 reducido a 25°C por mg de proteína por minuto.

Determinación de los cambios espectrales y constantes espectrales producidos por interacción del CCl<sub>4</sub>, cistamina o cisteamina con el P-450 de microsomas de hígado: fueron determinados según el método descrito por Schenkman y colaboradores (34). Los microsomas hepáticos obtenidos según lo descrito en la Parte Experimental se suspendieron en buffer Tris 0,025 M/HCl/ClK 0,15 M (pH 7,5) en concentración de 2 mg de proteína/ml y se añadió cistamina o cisteamina 1,6 mM ó CCl<sub>4</sub> 16 mM a una cuveta, añadiendo a la cuveta

de referencia buffer en volúmenes equivalentes, y se determinó el cambio espectral. Para determinar el efecto de la cistamina 1,6 mM en la constante espectral del  $\text{CCl}_4$ , el compuesto se agregó a la suspensión microsomal antes de dividirla entre las dos cuvetas. Para obtener las constantes espectrales, se registraron los espectros después de cada adición y se graficaron las inversas de las diferencias en absorbancia a 430 milimicrones menos la absorbancia a 490 milimicrones en función de la inversa de la concentración y se calcularon las constantes espectrales (34) de acuerdo con el método de Lineweaver y Burk (58).

Isocítrico dehidrogenasa (ICDh): Su actividad en plasma fue medida según la técnica de Sterkel y colaboradores (59). La actividad está expresada en unidades; cada unidad representa la cantidad de enzima que produce 1 milimicromol de NADPH por ml de plasma por hora a 25°C.

Determinación de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales: Para medir la incorporación del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales, se obtuvieron las suspensiones microsomales según se describe en Separación de microsomas a partir de animales tratados con  $^{14}\text{CCl}_4$  como se detalla en Animales y su tratamiento. A 1 ml de las suspensiones microsomales así obtenidas se le agregaron 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, se mezclaron las dos fases por agitación y luego se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos. La fase superior acuosa fue aspirada y desechada; la fase clorofórmica inferior remanente fue lavada 2 veces con 1 ml de una solución lavadora. (Para efectuar los lavados, se utilizó como solución lavadora la fase superior de una mezcla obtenida agitando 25 ml de agua destilada con 95 ml de la solución de cloroformo-metanol (2:1) y dejándola reposar). La fase clorofórmica 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 para favorecer la elimina

ción del  $^{14}\text{CCl}_4$  remanente no irreversiblemente unido a los lípidos, la muestra fue secada nuevamente a  $40^\circ\text{C}$  y pesada. Luego el residuo se disolvió en 10 ml de una solución al 0,5% de 2,5-difeniloxazol (PPO) en tolueno y se midió su radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-133. Los resultados obtenidos fueron corregidos por la atenuación (quenching) mediante el método que usa el cociente de canales, y se les descontó el valor del blanco (solución de PPO solo). Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto (dpm) por g de lípidos microsomales.

Determinación de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales: Para medir la incorporación del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a las proteínas microsomales se obtuvieron las suspensiones microsomales según se describe en Separación de microsomas, a partir de animales tratados con  $^{14}\text{CCl}_4$  como se detalla en Animales y su tratamiento. A 1 ml de las suspensiones microsomales así obtenidas se le agregaron 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugó a  $9.000 \times g$  durante 10 minutos a  $0^\circ\text{C}$ . 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  $40^\circ\text{C}$ , 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 por litro en tolueno/butilcelosolve (3:1) y se midió la radioactividad según el procedimiento descrito anteriormente para lípidos. Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto (dpm) por g de proteínas microsomales.

Determinación de las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado: Para medir las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado, se utilizaron animales tratados con  $\text{CCl}_4$  como se detalla en Animales y su tratamiento; las determinaciones fueron realizadas de acuerdo con el procedimiento descrito por Recknagel y Litteria (60) y consiste esencialmente en lo siguiente: 3 g de hígado fueron homogeneizados en 15 ml de agua destilada a  $0-2^\circ\text{C}$  con un homogeneizador de Teflon-vidrio Potter Elvehjem. Se utilizó una celda de microdifusión de 12 cm de diámetro externo y 2 cm de diámetro interno; en el compartimento central se colocó 1 ml de tolueno y en el exterior 5 ml del homogenato de

hígado y se dejó difundir durante 24 horas a temperatura ambiente. El  $\text{CCl}_4$  recogido en el tolueno del compartimento central de la celda de microdifusión se determinó por calentamiento con piridina en medio alcalino y lectura a 530 milimicrones con un espectrofotómetro Gilford 240. Los resultados se expresan en microgramos de  $\text{CCl}_4$  por g de hígado.

Determinación del contenido de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígado: Para medir el contenido de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígado se utilizaron animales tratados con  $^{14}\text{CCl}_4$  como se detalla en Animales y su tratamiento. Las determinaciones fueron realizadas siguiendo el procedimiento anterior descrito por Recknagel y Litteria (60) sólo hasta la etapa de microdifusión; luego el  $^{14}\text{CCl}_4$  recogido en el tolueno del compartimento 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 radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-133. Los resultados obtenidos fueron corregidos por la atenuación (quenching) mediante el método que usa el cociente de canales, descontándosele también el valor del blanco solo (solución de PPO solo). Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto (dpm) por g de hígado.

Peroxidación de lípidos: La estimación cuantitativa de la peroxidación de lípidos fue determinada por el método basado en la absorción ultravioleta de los dienos conjugados provenientes de extractos lipídicos de las fracciones microsomales, según la técnica descrita por Klaassen y Plaa (61). Se utilizaron ratas tratadas como se detalla en Animales y su tratamiento; los extractos lipídicos de las fracciones microsomales se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento empleado para la determinación de la unión irreversible a lípidos microsomales. Los resultados están expresados como el cambio de absorbancia a 243 milimicrones x 1.000 para una solución que contiene 1 mg de lípidos microsomales por ml.

Efectos de la cistamina y cisteamina en la permeabilidad lisosomal y sobre el daño lisosomal producido por el  $\text{CCl}_4$ : Los diversos efectos sobre la permeabilidad de los lisosomas hepáticos in vitro fueron estudiados por un procedimiento parcialmente similar al des-

cripto por Baccino y col. (62). Alícuotas de 2,7 ml de suspensiones lisosomales de hígado (2,5 mg de proteína/ml) fueron agregadas al compartimiento principal de frascos de Warburg; estos frascos tomaron temperatura durante 5 minutos a 37°C en un aparato Warburg. Luego se agregaron 0,3 ml de la solución de cistamina o cisteamina en sacarosa 0,25 M (previamente llevada al valor de pH de la suspensión lisosomal que fue 7,2). En los casos en que se midieron los efectos de la cistamina o cisteamina sobre el daño lisosomal inducido por el CCl<sub>4</sub>, se agregaron 4 µl de CCl<sub>4</sub> puro al brazo lateral; los frascos fueron incubados con agitación a 37°C durante 30 minutos para los estudios sobre fosfatasa ácida y durante 3 horas para los estudios sobre ribonucleasa. Se incluyeron los correspondientes controles sin cistamina, cisteamina o CCl<sub>4</sub>, y teniendo solamente CCl<sub>4</sub>. El contenido de cada frasco fue sacado a distintos tiempos y centrifugado a 20.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante a 20.000 x g fue separado y usado para las determinaciones de actividad enzimática de fosfatasa ácida y ribonucleasa.

Determinación de proteínas: Las concentraciones proteicas en las distintas fracciones subcelulares fueron estimadas por el método descrito por Lowry y col. (63) o por el método del Biuret (64).

Medición de la temperatura corporal: La temperatura rectal de las ratas fue registrada con un pequeño sensor a termistores para animales (Tele-Thermometers, Nikon-Köhden).

Técnicas histológicas: Se utilizaron animales tratados con CCl<sub>4</sub> o con el compuesto correspondiente como se detalla en Animales y su tratamiento (en todos los casos se utilizaron 5 ratas por grupo). Después de extraer el hígado, se tomaron pequeñas porciones de los lóbulos izquierdo y central y se fijaron inmediatamente en solución de Bouin (70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formaldehído 40% y 5 ml de ácido acético glacial) durante 24 hs; se recortaron y luego se sometieron a un proceso de deshidratación utilizando alcoholes de graduación creciente: 75%, 96% y 100%, efectuando 3 lavados de 30 minutos con cada uno de ellos. Se los sometió a 3 lavados de 30 minutos cada uno con benceno, se embebieron en parafina a 60°C durante 24 hs y por último se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de 20-30 micrones uti

lizando un micrótopo para cortes en parafina Reichert y se tñieron con hematoxilina-eosina.

Para las coloraciones específicas de grasa, los trozos de hígado fueron fijados y conservados con formalina-calcio (100 ml de formol 40%, 100 ml de  $Cl_2Ca$  10% y 800 ml de agua destilada). Se obtuvieron cortes por congelación utilizando un Micrótopo Criostato Internacional modelo CTI y fueron coloreados con Sudán Negro B.

Análisis estadístico: La significación de la diferencia entre dos valores promedio se determinó por el Test de t (65); 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 (66). 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 Rümke y De Jonge (67).

Para calcular los valores de las constantes de Michaelis o las constantes espectrales se usó el método de los cuadrados mínimos con el objeto de determinar la línea recta correspondiente a los datos obtenidos y el valor del error standard de la estimación fue usado para obtener la desviación de la constante (68).

Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Unión irreversible de $^{14}\text{C}$ del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales en ratas pretratadas con cistamina (Tablas 1 y 2).

La administración previa de cistamina disminuyó la intensidad de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales a las 3, 6, 10 y 24 horas después de inyectado; el efecto es particularmente intenso después de las 3 horas. Este efecto protector de la cistamina no se vió disminuído en su intensidad a pesar de que la dosis de  $^{14}\text{CCl}_4$  se aumentó 3,6 veces y de que los niveles de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre hepáticos que produjo la cistamina son mayores en los animales tratados con la dosis 3,6 veces la dosis standard.

### Efecto de la cistamina en la duración del tiempo de sueño producido por pentobarbital (Tabla 3).

La cistamina prolonga el tiempo de sueño producido por pentobarbital cuando se la administra en forma simultánea con éste último (tiempo cero) y su efecto aumenta mucho más al incrementar el lapso transcurrido entre la administración de cistamina y la de pentobarbital (3, 6, 10 y 24 horas). Su efecto es particularmente notable cuando se inyecta el pentobarbital 6 horas después de la cistamina, dado que de los cinco animales utilizados, dos de ellos despertaron a las 17 horas aproximadamente, en tanto que los tres restantes murieron después de un período de sueño aún mayor.

### Cambios espectrales por interacción con suspensiones microsomales y cálculo de sus constantes (fig. 4 y Tabla 4)

El  $\text{CCl}_4$  interacciona con el P-450 para dar cambios espectrales tipo I que se caracterizan por presentar un mínimo alrededor de 420-430  $\text{m}\mu$  y un máximo alrededor de 390  $\text{m}\mu$ . La cistamina y la cisteamina, que es su metabolito, por el contrario producen cambios espectrales tipo II que tienen un máximo alrededor de 430  $\text{m}\mu$  y un mínimo a 390  $\text{m}\mu$ .

El cálculo de las constantes espectrales y los cambios máximos espectrales de los tres compuestos y los del  $\text{CCl}_4$  en presencia de



TABLA 1

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales a diferentes tiempos después de su administración en ratas previamente tratadas con cistamina.

$^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  irreversiblemente unido a lípidos microsomales<sup>b,c</sup>  
 Valor medio  $\pm$  D.S.

Tratamiento<sup>a</sup>

	3 hr	% del control	6 hr	% del control	10 hr	% del control	24 hr	% del control
$^{14}\text{CCl}_4$	38.840 $\pm$ 409	66	64.200 $\pm$ 8.290	36	49.940 $\pm$ 9.450	55	64.160 $\pm$ 20.350	35
$^{14}\text{CCl}_4$ + cist.	25.500 $\pm$ 372		23.230 $\pm$ 3.500		27.320 $\pm$ 8.780		22.630 $\pm$ 6.450	

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $^{14}\text{CCl}_4$  (6,05 x  $10^5$  dpm/mul) en aceite de oliva (1,4 x  $10^5$  dpm/ml de solución) en una dosis de 5 ml de solución/kg. La cistamina fue dada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del  $^{14}\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron a las 3, 6, 10 ó 24 horas después de la administración del  $^{14}\text{CCl}_4$ .

Continuación leyenda de la Tabla 1.

<sup>D</sup> La determinación de la unión irreversible de  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomaes se efectuó como se describe en Parte Experimental; los resultados se expresan como apm por g de lípidos microsomaes.

<sup>C</sup> El valor de p por el test de t es  $p < 0,01$  para todos los tiempos analizados.

TABLA 2

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales de hígado y niveles de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en hígado en ratas tratadas previamente con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a lípidos microsomales. (dpm/g lípidos) Valor medio $\pm$ D.S.	$^{14}\text{CCl}_4$ libre (dpm/g hígado) Valor medio $\pm$ D.S.	R <sup>b</sup>
Dosis standard de $^{14}\text{CCl}_4$	48.000 $\pm$ 11.200	488 $\pm$ 161	98 $\pm$ 32
Dosis standard de $^{14}\text{CCl}_4$ + cistamina	27.700 $\pm$ 5.900 <sup>c</sup>	663 $\pm$ 54 <sup>c</sup>	42 $\pm$ 22
3,6 x dosis standard de $^{14}\text{CCl}_4$	266.400 $\pm$ 46.000	1.917 $\pm$ 359	132 $\pm$ 35
3,6 x dosis standard de $^{14}\text{CCl}_4$ + cistamina	138.200 $\pm$ 18.000 <sup>c</sup>	3.108 $\pm$ 400 <sup>c</sup>	45 $\pm$ 24

Continuación leyenda de la Tabla 2.

- <sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente para la dosis standard de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  con una solución de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  ( $6,05 \times 10^5$  dpm/mM) en aceite de oliva ( $1,4 \times 10^6$  dpm/ml de solución) en una solución de 5 ml de solución/kg; para la dosis 3,6 x standard, se utilizó una solución de  $5,04 \times 10^6$  dpm/ml en una dosis de 5 ml/kg. La cistamina fue dada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Los animales se sacrificaron 3 horas después de la administración de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ , se aislaron las fracciones microsomales de hígado y se determinó el  $^{14}\text{C}$  unido irreversiblemente a los lípidos como se describe en la Parte Experimental. Se utilizaron en cada experimento 5 ratas por grupo.
- <sup>b</sup> R es el cociente entre los valores de  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  irreversiblemente unido a lípidos microsomales y sus respectivos niveles de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  libre en hígado.
- <sup>c</sup> El valor de p por el test de t es  $p < 0,01$ .

TABLA 3

Efecto de la administración de cistamina en la duración del tiempo de sueño producido en ratas por pentobarbital.

Tratamiento <sup>a</sup>	Adminis- tración de cista- mina an- tes del pentobar- bital (horas)	Tiempo de sueño producido por pen- tobarbital Valor medio $\pm$ D.S. (minutos)	% con respecto al control <sup>b</sup>	Valor de p
Control Cistamina	0	91 $\pm$ 12 178 $\pm$ 55	196	0,05
Control Cistamina	3	105 $\pm$ 30 251 $\pm$ 130	239	0,05
Control Cistamina	6	99 $\pm$ 16 1020	1120	0,001
Control Cistamina	10	89 $\pm$ 18 552 $\pm$ 130	620	0,001
Control Cistamina	24	124 $\pm$ 27 395 $\pm$ 36	319	0,001

<sup>a</sup> La cistamina se administró oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg a ratas macho ayunadas durante 12-14 horas. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. El pentobarbital sódico disuelto en ClNa al 0,9% fue administrado intraperitonealmente en una dosis de 40 mg/kg a ratas tratadas con cistamina 0, 3, 6, 10 ó 24 horas antes y a sus controles respectivos, y se midió su tiempo de sueño. Se utilizaron en cada experimento 5 ratas por grupo.

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

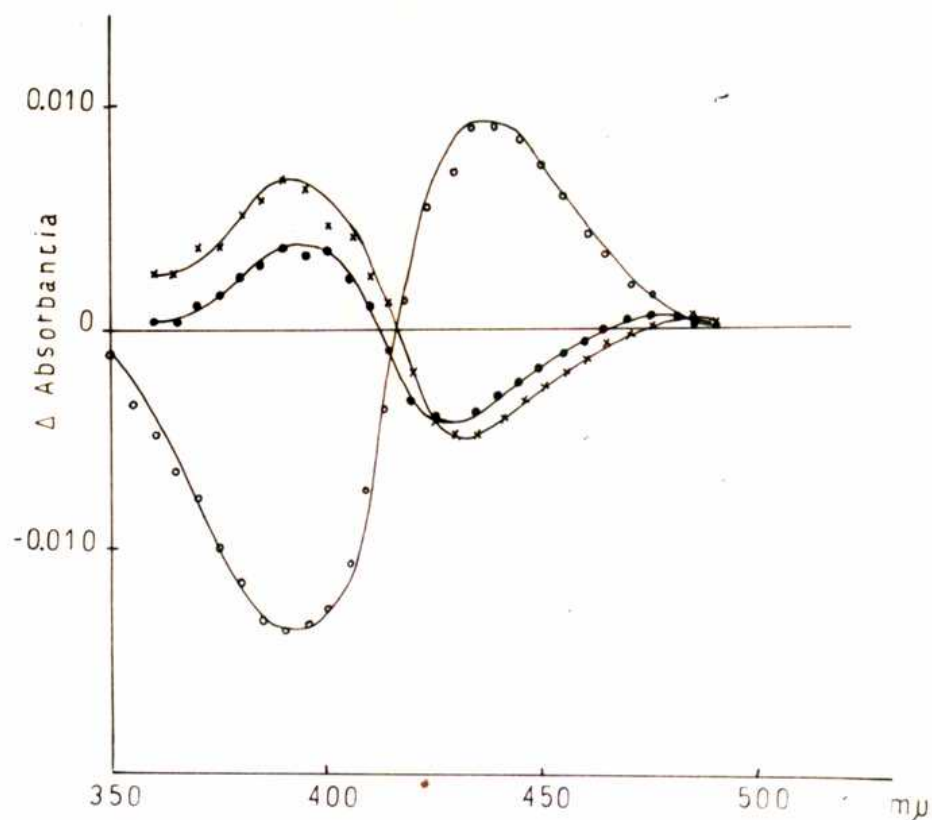


Fig. 4 - Cambios espectrales producidos por interacción de compuestos con el P-450 de suspensiones microsomales. Cambio espectral producido por adición de  $\text{CCl}_4$  16 mM ( $\bullet$ — $\bullet$ ), cistamina o cisteamina 1,6 mM ( $o$ — $o$ ) a suspensiones de microsomas hepáticos (2 mg de proteína/ml). Saturación de microsomas con cistamina o cisteamina no previene el cambio espectral producido por  $\text{CCl}_4$  16 mM ( $x$ — $x$ ).

TABLA 4

Constantes espectrales de la cistamina, cisteamina y el  $\text{CCl}_4$  y efecto de la saturación con cistamina o cisteamina en las constantes espectrales del  $\text{CCl}_4$ .<sup>a</sup>

Compuesto	Constantes espectrales de unión $K_s$ (mM) Valor medio $\pm$ D.S.	Cambio espectral máximo ( $\Delta$ Abs./mg proteína).
Cistamina 1,6 mM	0,43 $\pm$ 0,04	0,0063
Cisteamina 1,6 mM	0,30 $\pm$ 0,03	0,0021
$\text{CCl}_4$ 16mM	0,17 $\pm$ 0,01	0,0037
$\text{CCl}_4$ 16 mM (cistamina 1,6 mM)	0,15 $\pm$ 0,04	0,0046
$\text{CCl}_4$ 16 mM (cisteamina 1,6 mM)	0,16 $\pm$ 0,06	0,0036

<sup>a</sup> Los microsomas de hígado obtenidos según lo descrito en la Parte Experimental se suspendieron en buffer Tris 0,025 M/HCl/ClK 0,15 M (pH 7,5) en concentración de 2 mg de proteína/ml y se añadió cistamina, cisteamina o  $\text{CCl}_4$  (solución saturada en Tris/ClE) a una cuveta, añadiendo a la cuveta de referencia buffer en volúmenes equivalentes. El volumen total añadido para la solución de  $\text{CCl}_4$  fue de 100  $\mu$ l. Para determinar el efecto de la cistamina 1,6 mM o de la cisteamina 1,6 mM en la constante espectral del  $\text{CCl}_4$ , el compuesto se agregó a la suspensión microsomal antes de dividirla entre las dos cuvetas. Para obtener las constantes espectrales, se registraron los espectros después de cada adición y se graficaron las inversas de las diferencias en absorbancia a 430 m $\mu$  menos la absorbancia a 490 m $\mu$  en función de la inversa de la concentración y se calcularon las constantes espectrales.

cualquiera de los otros dos muestran que la cistamina y la cisteamina se unen al P-450 en un sitio distinto del  $\text{CCl}_4$ , y que la previa saturación del P-450 con cualquiera de los dos compuestos no altera significativamente el valor de la constante espectral del  $\text{CCl}_4$ , lo cual evidencia que sus acciones no son competitivas con la del  $\text{CCl}_4$ .

Efectos in vitro de la cistamina y la cisteamina sobre el P-450 y la P-450 reductasa (Tabla 5).

In vitro, tanto la cistamina como la cisteamina producen una pequeña disminución en el contenido de P-450 por transformación de parte del mismo en su forma inactiva P-420. Ese efecto es sólo observable a concentraciones relativamente elevadas. En concentraciones más pequeñas que las anteriores, tanto la cistamina como la cisteamina, inhiben la reducción del P-450 por la P-450 reductasa.

Efecto de la administración de cistamina sobre el contenido de P-450 y P-450 reductasa (Tabla 6).

El tratamiento con cistamina no alteró significativamente el contenido de P-450 durante las primeras 6 horas después de su inyección, pero lo disminuyó significativamente a las 24 horas. La actividad de la P-450 reductasa en cambio ya estaba disminuída 6 horas después de administrada la cistamina y continuó disminuída a las 24 horas. Esos cambios parecerían deberse a una disminución irreversible del contenido de su sustrato endógeno P-450, dado que la relación P-450 reductasa/P-450 no difería en controles y en tratados con cistamina. Aparentemente la inhibición que la cistamina es capaz de producir (ver Tabla 5) es reversible y desaparece totalmente debido a la dilución que ocurre durante el proceso de homogeneización y resuspensión del pellet microsomal.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración en el contenido de P-450 en ratas pretratadas con cistamina (Tabla 7).

La cistamina previene parcialmente la destrucción del P-450 causada por el  $\text{CCl}_4$  durante el curso de la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  hasta las 24 horas.



TABLA 5

Efectos in vitro de la cistamina y la cisteamina sobre el P-450 y la P-450 reductasa

Compuesto (mM)	% de destrucción <sup>a</sup> de P-450	% de inhibición de <sup>b</sup> la P-450 reductasa
Cistamina 0,3	----	19
0,6	----	22
1,6	3,9	47
3,2	5,8	64
6,4	9,6	----
12,8	18,0	----
Cisteamina 0,3	0,9	18
0,6	----	28
1,6	2,2	43
3,2	6,2	67
6,4	8,6	----
12,8	17,3	----

<sup>a</sup> La obtención de microsomas de ratas ayunadas 12-14 hr. se realizó de acuerdo a lo descrito en Parte Experimental. Se obtuvo el espectro diferencial entre dos suspensiones microsomales; una reducida con ditionito y burbujada con CO y otra reducida con ditionito solamente. Se observaron los efectos de concentraciones diferentes de cistamina o cisteamina. Reducciones en la diferencia en absorbancia entre 450-490 mμ acompañada por la aparición de un pico en 420 mμ se consideró como destrucción. Los resultados se expresan en milimicromoles de P-450 por mg de proteína.

<sup>b</sup> Tres ml de una suspensión microsomal saturada con OC fueron reducidos con un sistema generador de NADPH compuesto por: 0,2 ml buffer Tris 0,3 M pH 7,4; 0,2 ml de Cl<sub>2</sub>Mg 1 M; 124 mg de isocitrato de sodio; 20 mg de TPN y 0,6 ml de ICDh en glicerol. Los resultados se expresaron en milimicromol. de P-450 reducido a 25°C por mg de proteína por minuto.

TABLA 6

Efecto de la administración de cistamina sobre el contenido de citocromo P-450 (P-450) y actividad de la citocromo P-450 reductasa (P-450 reductasa) en hígado de rata.

Trata- miento <sup>a</sup>	Tiempo después de la administ. de cistamina (hr)	P-450 <sup>b</sup>	% Dis.	P-450 <sup>b</sup>	% Dis.	P-450 red.
Control	$\frac{1}{2}$	0,60 ± 0,06	10,0	0,74 ± 0,19	-6,7	1,22 ± 0,29
Cistamina		0,54 ± 0,07		0,79 ± 0,11		1,45 ± 0,21
Control	1	0,42 ± 0,03	2,4	0,66 ± 0,11	-4,5	1,54 ± 0,23
Cistamina		0,41 ± 0,02		0,69 ± 0,08		1,65 ± 0,21
Control	2	0,56 ± 0,03	10,7	0,77 ± 0,09	10,4	1,38 ± 0,20
Cistamina		0,50 ± 0,07		0,69 ± 0,08		1,40 ± 0,17
Control	6	0,47 ± 0,10	14,9	1,06 ± 0,23	24,6	2,35 ± 0,98
Cistamina		0,40 ± 0,05		0,80 ± 0,15 <sup>d</sup>		2,01 ± 0,32
Control	24	0,51 ± 0,07	37,3	0,82 ± 0,21	59,8	1,60 ± 0,35
Cistamina		0,32 ± 0,10 <sup>c</sup>		0,33 ± 0,15 <sup>e</sup>		1,20 ± 0,39

## Continuación leyenda de la Tabla 6

- <sup>a</sup> La cistamina se administró oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg a ratas macho ayunadas durante 12-14 hs. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Los animales se sacrificaron a la  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 6, y 24 hs. después de la administración de cistamina. Se utilizaron en cada experimento 6 animales por grupo.
- <sup>b</sup> La determinación del contenido de P-450 y actividad de la P-450 reductasa se efectuó como se describe en la Parte Experimental. El contenido de P-450 está expresado en milimicromoles por  $\mu$ g de proteína y la actividad de la P-450 reductasa está expresada en milimicromoles de P-450 reducido a 25°C por minuto por  $\mu$ g de proteína.
- <sup>c</sup>  $p < 0,01$ .
- <sup>d</sup>  $p < 0,05$ .
- <sup>e</sup>  $p < 0,0001$ .

TABLA 2

Efecto del CCl<sub>4</sub> a diferentes tiempos después de su administración sobre el contenido del citocromo P-450 (P-450) en ratas tratadas previamente con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	P-450 b,c Valor medio ± D.S.							
	3 hr	% del control	6 hr	% del control	10 hr	% del control	24 hr	% del control
Control	0,52±0,07	100	0,47±0,10	100	0,56±0,11	100	0,64±0,11	100
CCl <sub>4</sub>	0,30±0,02	58	0,23±0,08	49	0,15±0,07	27	0,08±0,08	13
Cistamina	0,39±0,07	75	0,41±0,04	87	0,43±0,01	77	0,38±0,14 <sup>d</sup>	59
Cistamina + CCl <sub>4</sub>	0,30±0,04	58	0,29±0,03	62	0,30±0,09	54	0,17±0,03	27

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de CCl<sub>4</sub> al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cistamina fue administrada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del CCl<sub>4</sub>. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron a las 3, 6, 10 ó 24 hs después de la administración del CCl<sub>4</sub>.

Continuación leyenda de la Tabla 7

- <sup>b</sup> La determinación del P-450 se efectuó como se describe en Parte Experimental; los resultados se expresan en milimicromoles de P-450 por mg de proteína microsomal.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cistamina sobre la disminución del contenido de P-450 producido por el CCl<sub>4</sub> obtenida por análisis de variancia bimodal fue  $p < 0,005$  para todos los tiempos analizados.
- <sup>d</sup>  $p < 0,01$  comparado con su control respectivo.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la actividad de la etilmorfina N-demetilasa (EM-asa) en ratas pretratadas con cistamina (Tabla 8).

El tratamiento previo con cistamina previno parcialmente la destrucción de la actividad de la EM-asa por el  $\text{CCl}_4$ . Ese efecto se insinúa a las 3 horas pero se volvió significativo desde las 6 horas inclusive y en adelante y es particularmente notable a las 24 horas.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la actividad de la G6P-asa en ratas pretratadas con cistamina (Tabla 9 y Fig. 5).

El tratamiento previo con cistamina impidió significativamente la destrucción de la G6P-asa causada por el  $\text{CCl}_4$ . Este efecto protector es evidente durante el período que abarca hasta 24 horas después de administrado el  $\text{CCl}_4$ .

In vitro, la cistamina pero no la cisteamina inhibe a la G6P-asa microsomal. El efecto de la glucosa 6-fosfato a concentraciones entre 1 mM y 5 mM y a una concentración fija de cistamina (5mM) dio inhibiciones tales que cuando se la representa según Lineweaver y Burk (58) se puede concluir que la inhibición es no competitiva, siendo el  $K_i=5,9$  mM. En condiciones experimentales similares, la cisteamina no inhibe a la G6P-asa en concentraciones hasta 3,5 mM y después de períodos de incubación de hasta 1 hora. Los estudios sobre el efecto de la dilución en la inhibición de la G6P-asa por cistamina dieron los siguientes porcentajes de inhibición de la actividad: 31,8% antes de la dilución y 28,5% después de la dilución. Consecuentemente, la inhibición de la actividad de la G6P-asa por cistamina no es reversible por dilución.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la peroxidación de lípidos microsomales in vivo en ratas pretratadas con cistamina (Tabla 10).

La cistamina no previene la peroxidación de lípidos inducida por el  $\text{CCl}_4$  a las 3 horas, pero sí lo hace significativamente desde las 6 horas inclusive en adelante.

**TABLA 8**

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la actividad de la etilmorfina n-demetilasa (EM-asa) en ratas tratadas previamente con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	EM-asa <sup>b,c</sup>				
	3hs	6hs	10hs	24hs	% del control
Control	4,1 ± 0,5	4,3 ± 0,7	3,5 ± 0,3	1,4 ± 0,3	100
$\text{CCl}_4$	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	34
Cistamina	4,5 ± 0,8	3,7 ± 0,4	3,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	86
Cistamina + $\text{CCl}_4$	2,5 ± 0,3	3,0 ± 0,6	1,9 ± 0,2	0,9 ± 0,6	54

Valor medio ± D.S.

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cistamina fue administrada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron a las 3, 6, 10 ó 24 horas después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

Continuación leyenda de la Tabla 3

- <sup>b</sup> La determinación de la EM-asa se efectuó como se describe en la Parte Experimental; los resultados se expresan en  $\mu$ moles de formaldehído producidos por minuto a 37°C por mg de proteína microsomal.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cistamina sobre la pérdida de la actividad de la EM-asa producida por el  $\text{CCl}_4$  obtenido por análisis de variancia bimodal fue  $p > 0,1$  a las 3 hs.;  $p < 0,01$  a las 6 hs. y 24 hs. y  $p < 0,025$  a las 10 hs.



TABLA 9

Efecto del  $CCl_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la actividad de la glucosa 6-fosfatasa (G6P-asa) en ratas tratadas previamente con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	G6P-asa D,c							
	3hr	% del control	6hr	% del control	10hr	% del control	24hr	% del control
Control	13,9 ± 1,2	100	12,4 ± 0,3	100	9,5 ± 0,7	100	15,2 ± 0,8	100
$CCl_4$	6,3 ± 1,7	45	6,6 ± 0,5	53	2,7 ± 0,4	28	4,0 ± 0,6	26
Cistamina	14,7 ± 1,5	106	12,3 ± 0,4	99	9,4 ± 0,7	99	13,0 ± 1,1	85
Cistamina + $CCl_4$	11,6 ± 0,9	83	9,0 ± 0,9	72	6,2 ± 0,4	65	6,5 ± 0,7	43

Valor medio ± D.S.  
x  $10^{-2}$

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas, fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $CCl_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva intraperitonealmente en cantidades equivalentes. La cistamina fue administrada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600mg/kg 30 minutos antes del  $CCl_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales fueron sacrificados a las 3, 6, 10 y 24 horas después de la administración del  $CCl_4$ .

Continuación leyenda de la Tabla 9

- <sup>b</sup> La determinación de la G6P-asa se efectuó como se describe en la Parte Experimental; los resultados se expresan en micromoles de fósforo inorgánico producidos por minuto por mg de proteína microsomal a 37°C.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cistamina sobre la pérdida de la actividad de la G6P-asa producida por el CCl<sub>4</sub> obtenido por análisis de variancia bimodal fue  $p < 0,001$  para todos los tiempos.

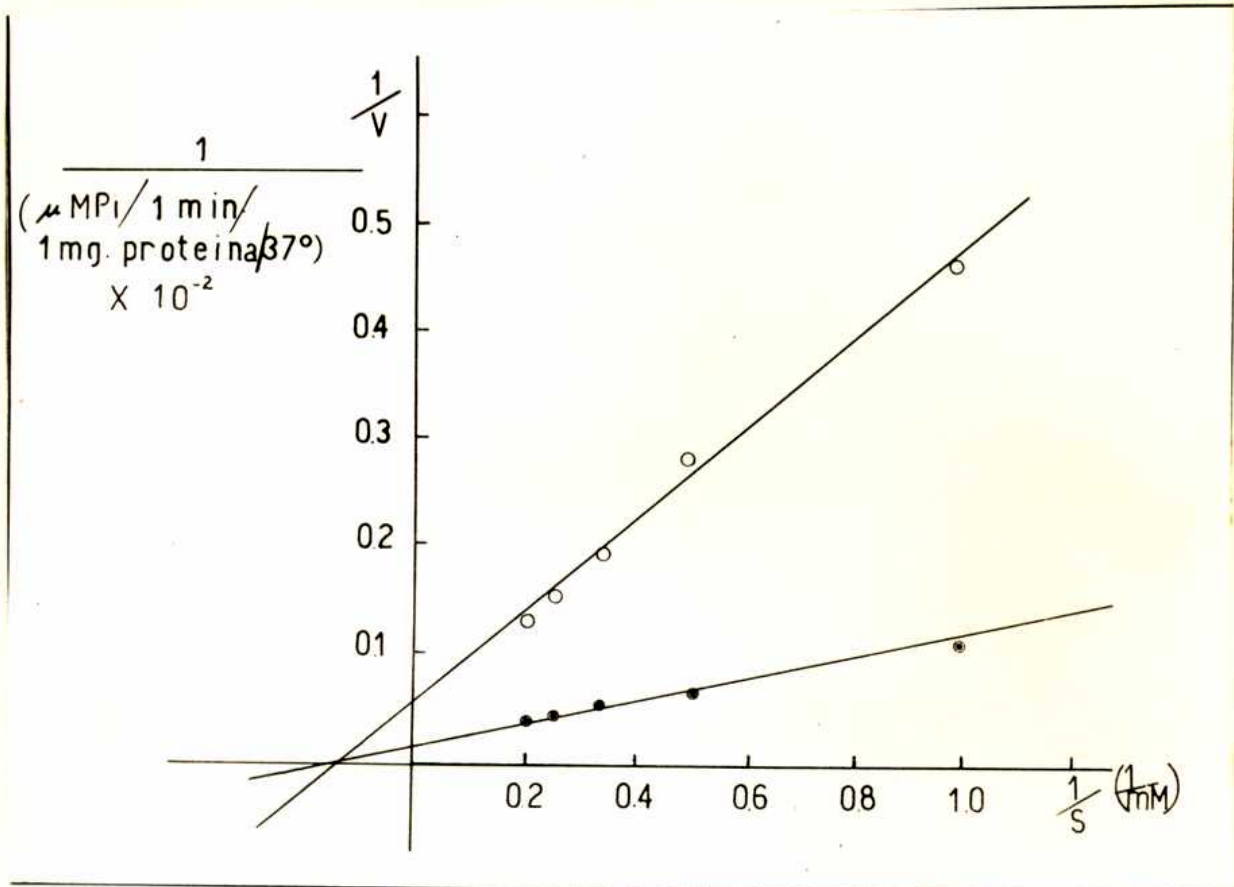


Fig. 5 - Variación de la inhibición de la G6P-asa por la cistamina a diferentes concentraciones de sustrato. Gráfico de inversas de velocidades versus inversas de concentraciones de sustrato. La determinación de la actividad de la G6P-asa se realizó como se describe en la Parte Experimental. Se utilizó la glucosa 6-fosfato en concentraciones entre 1 mM y 5 mM y una concentración fija de cistamina (5mM).

TABLA 10

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la peroxidación de lípidos microsomales en ratas tratadas previamente con cistamina.

Peroxidación de lípidos microsomales<sup>b,c</sup>  
 Valor medio  $\pm$  D.S.

Tratamiento <sup>a</sup>	3 hr	% del control	6 hr	% del control	10 hr	% del control	24 hr	% del control
Control	353 $\pm$ 23	100	252 $\pm$ 21	100	348 $\pm$ 57	100	124 $\pm$ 25	100
$\text{CCl}_4$	463 $\pm$ 24	131	401 $\pm$ 48	159	593 $\pm$ 89	170	225 $\pm$ 58	181
Cistamina	377 $\pm$ 35	107	294 $\pm$ 36	117	376 $\pm$ 23	108	140 $\pm$ 13	113
Cistamina + $\text{CCl}_4$	462 $\pm$ 33	131	328 $\pm$ 35	130	468 $\pm$ 48	135	174 $\pm$ 19	140

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cistamina fue administrada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron a las 3, 6, 10 ó 24 hs después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .



Continuación leyenda de la Tabla 10.

- <sup>b</sup> La determinación de la peroxidación de lípidos microsomales se efectuó como se describe en la Parte Experimental; los resultados se expresan como absorbancia a 243  $m\mu$  x 1000 para una solución que tiene 1 mg de lípidos microsomales por ml.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cistamina sobre la peroxidación de lípidos microsomales producida por el  $CCl_4$  obtenida por análisis de variancia bimodal fue  $p > 0,1$  a las 3 hs.;  $p < 0,025$  a las 6 hs. y  $p < 0,05$  a las 10 y 24 hs.

Efecto de la cistamina sobre el contenido hepático de  $\text{CCl}_4$  después de su administración (Tabla 11).

La administración previa de cistamina no produjo alteraciones en el contenido hepático del  $\text{CCl}_4$  puesto que la diferencia entre las cantidades de  $\text{CCl}_4$  en los hígados de ratas pretratadas y no tratadas con cistamina es no significativa.

Efecto de la administración de  $\text{CCl}_4$  sobre la actividad de la isocitrico dehidrogenasa plasmática (ICDh) y sobre el peso de hígado en ratas pretratadas con cistamina (Tabla 12).

El pretratamiento con cistamina produjo una notable disminución en la elevación de los niveles de ICDh plasmática inducida por el  $\text{CCl}_4$  en 24 horas.

Este tratamiento previno significativamente los aumentos en el peso de hígado que causa el  $\text{CCl}_4$  24, 48 ó 72 horas después de inyectado.

Efecto de la cistamina sobre el daño hepático causado por el  $\text{CCl}_4$  a las 24 horas, 48 horas ó 72 horas después de su administración

El tratamiento de ratas utilizando solamente cistamina no modificó la estructura normal del hígado a las 24 horas, 48 horas o a las 72 horas después de administrada (Fig. 6). La administración de  $\text{CCl}_4$  a ratas pretratadas con agua destilada produjo a las 24 horas una necrosis centrolobulillar intensa, asociada con hemorragia y edema. Las células hepáticas en las zonas periportales estaban agrandadas y en esa área la arquitectura normal hepática no existía (fig. 7). La cistamina disminuyó notablemente la intensidad de la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 24 horas después de su administración (Fig. 8). Existen ahora sólo pequeñas áreas focalizadas de necrosis centrolobulillar; las áreas que presentan arquitectura normal son más extensas que las existentes en los animales no protegidos con cistamina aunque aún presentan congestión y edema. La administración de  $\text{CCl}_4$  a ratas tratadas previamente con agua destilada produjo a las 72 horas necrosis centrolobulillar muy avanzada, que abarcaba la mayor parte del lobulillo hepático; en la zona periportal no se observaban células con estructura aparentemente normal (Fig. 9). La

TABLA 11

Concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado a distintos tiempos después de su administración a ratas previamente tratadas con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	Tiempo (hs)	Concentraciones de $\text{CCl}_4$ en hígado <sup>b</sup> Valor medio $\pm$ D.S.	% con respecto al control <sup>c</sup>
$\text{CCl}_4$ Cistamina + $\text{CCl}_4$	1	920 $\pm$ 90 840 $\pm$ 80	91
$\text{CCl}_4$ Cistamina + $\text{CCl}_4$	3	770 $\pm$ 180 810 $\pm$ 120	105
$\text{CCl}_4$ Cistamina + $\text{CCl}_4$	6	410 $\pm$ 70 450 $\pm$ 70	110
$\text{CCl}_4$ Cistamina + $\text{CCl}_4$	12	90 $\pm$ 50 80 $\pm$ 30	89
$\text{CCl}_4$ Cistamina + $\text{CCl}_4$	24	5 $\pm$ 10 5 $\pm$ 15	100

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. La cistamina fue dada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

<sup>b</sup> La concentración de  $\text{CCl}_4$  se determinó según se describe en la Parte Experimental. Los resultados se expresan en microgramos de  $\text{CCl}_4$  por gr de hígado; el valor de p por el test de t es p 0,05 para todos los tiempos.

Continuación leyenda de la Tabla 11.

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



TABLA 12

Efecto del CCl<sub>4</sub> 24 horas después de su administración sobre la actividad de la isocitrato dehidrogenasa plasmática (ICDh) y a diferentes tiempos sobre el peso de hígado en ratas tratadas previamente con cistamina.

Tratamiento <sup>a</sup>	ICDh <sup>b,c</sup>		Peso de hígado (g/100 g de peso corporal) <sup>c</sup>		
	Valor medio ± D.S.		24 hs	48 hs	72 hs
Control	187 ± 96		3,10 ± 0,20	2,47 ± 0,17	2,37 ± 0,13
CCl <sub>4</sub>	111.600 ± 34.880		4,56 ± 0,19	3,89 ± 0,17	4,07 ± 0,20
Cistamina	168 ± 72		3,39 ± 0,25	3,04 ± 0,40	2,74 ± 0,27
Cistamina + CCl <sub>4</sub>	7.200 ± 6.550		4,22 ± 0,18	3,32 ± 0,38	3,03 ± 0,32

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs. fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de CCl<sub>4</sub> al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cistamina fue administrada oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg 30 minutos antes del CCl<sub>4</sub>. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron a las 24, 48 ó 72 hs. después de la administración del CCl<sub>4</sub>.

Continuación leyenda de la Tabla 12

- <sup>b</sup> La determinación de la ICDh plasmática se realizó como se describe en la Parte Experimental; la actividad está dada en unidades; una unidad es la cantidad de enzima que produce 1 μmol de NADPH por ml de plasma por hora a 37°C.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cistamina sobre el aumento de la ICDh plasmática producida por el CCl<sub>4</sub> a las 24 hs. y obtenida por análisis de variancia bimodal fue p < 0,001; para el aumento de peso de hígado producido por el CCl<sub>4</sub>, el valor de p fue p < 0,005 a las 24 hs. y p < 0,001 a las 48 y 72 hs.

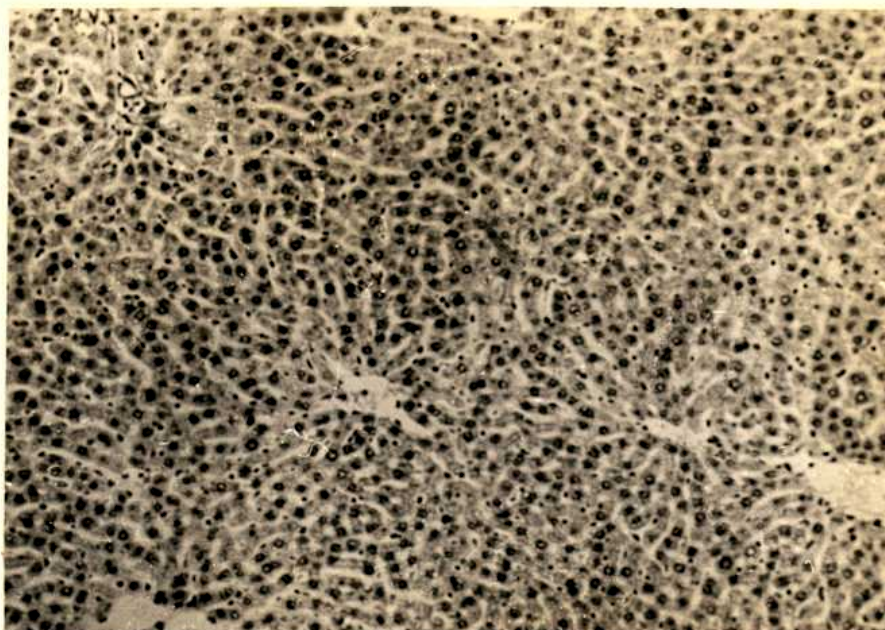


Fig. 6 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con cistamina (600mg/kg) durante 24 horas. La apariencia es semejante a la de los controles. Hematoxilina-eosina x 120.



Fig. 7 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa necrosis centrolobulillar avanzada. Hematoxilina-eosina x 120.



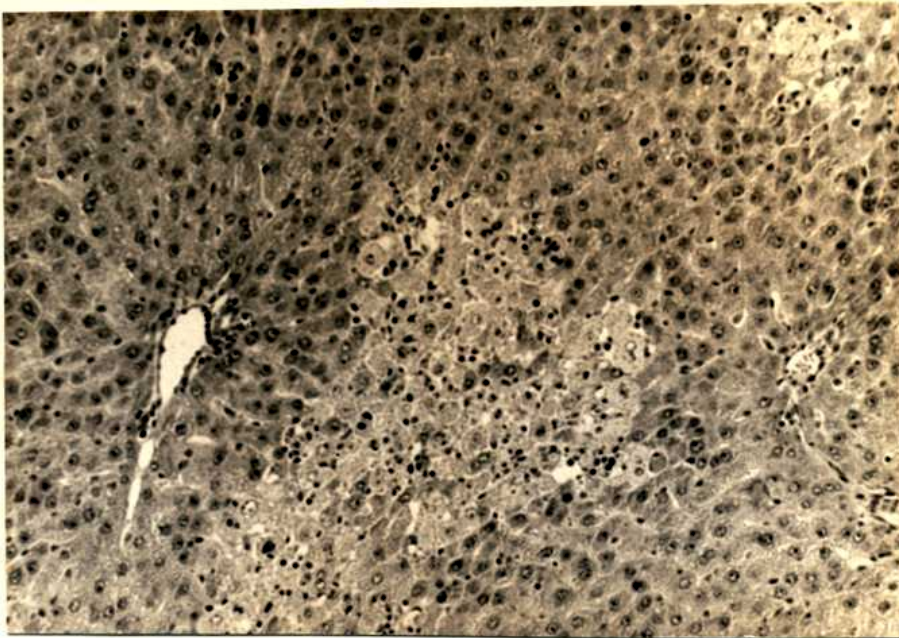


Fig. 8 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cistamina (600 mg/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Las zonas necróticas son pequeñas. Hematoxilina-eosina x 120.

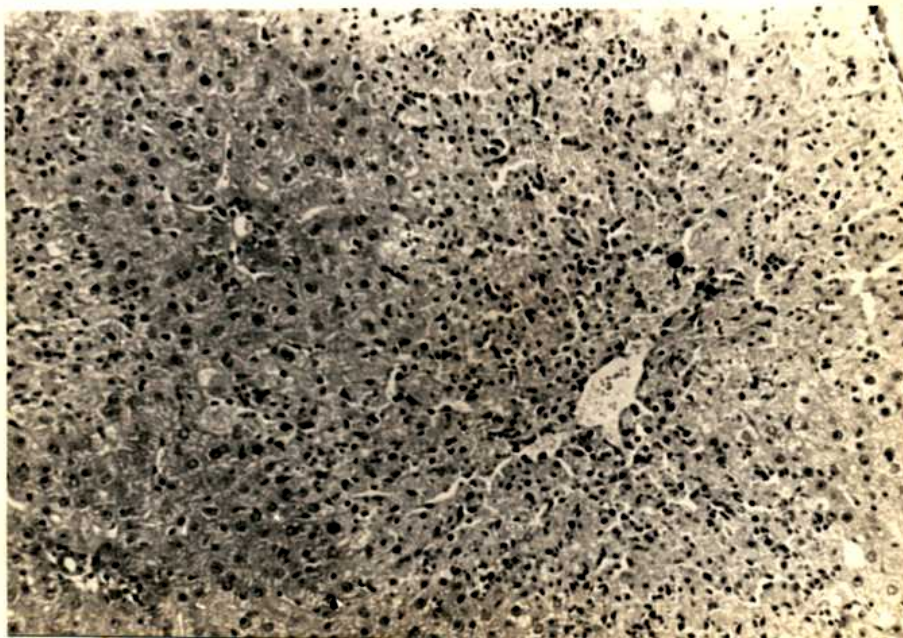


Fig. 9 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 72 horas. Se observa necrosis centrolobulillar intensa. Hematoxilina-eosina x 120.

cistamina disminuyó marcadamente la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 72 horas, circunscribiendo dicha alteración celular a la zona central del lobulillo hepático (Fig. 10). La cistamina también disminuyó marcadamente la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 48 horas después de su administración.

La cistamina no produjo por sí misma ningún efecto en el contenido graso hepático a las 24 horas, 48 horas o 72 horas después de administrada (Fig. 11). La administración de  $\text{CCl}_4$  produjo a las 24 horas una infiltración grasa intensa que se extendió a las zonas central y periportal (Fig. 12). El pretratamiento con cistamina disminuyó parcialmente la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 24 horas; éste efecto fue particularmente observable en las zonas periportales (Fig. 13). La administración de  $\text{CCl}_4$  produjo también intensa infiltración grasa a las 72 horas de intoxicación (Fig. 14), siendo su efecto disminuído por la administración previa de cistamina (Fig. 15). La cistamina también disminuyó marcadamente la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 48 horas después de su administración.

Efecto del pretratamiento con cistamina sobre la disminución de la temperatura causada por la administración del  $\text{CCl}_4$  (Fig. 16 y 17).

Tal como es conocido, la administración de  $\text{CCl}_4$  o de cistamina baja significativamente la temperatura corporal de las ratas. Este efecto de ambos compuestos se prolonga por lo menos durante 24 horas. Las ratas pretratadas con cistamina tuvieron una disminución de la temperatura corporal adicional al serle administrado el  $\text{CCl}_4$ , dado que a la 1, 2, y 3 horas después del  $\text{CCl}_4$ , las temperaturas de los grupos cistamina y cistamina +  $\text{CCl}_4$  fueron significativamente diferentes. Este efecto fue de corta duración, dado que dejó de observarse a las 6, 10 y 24 horas.

Efecto de la cistamina y la cisteamina in vitro sobre la permeabilidad lisosomal y el daño producido en los lisosomas por el  $\text{CCl}_4$  (Tabla 13).

La cistamina a altas concentraciones disminuye la liberación de fosfatasa ácida y ribonucleasa de lisosomas, o sea produce un e-



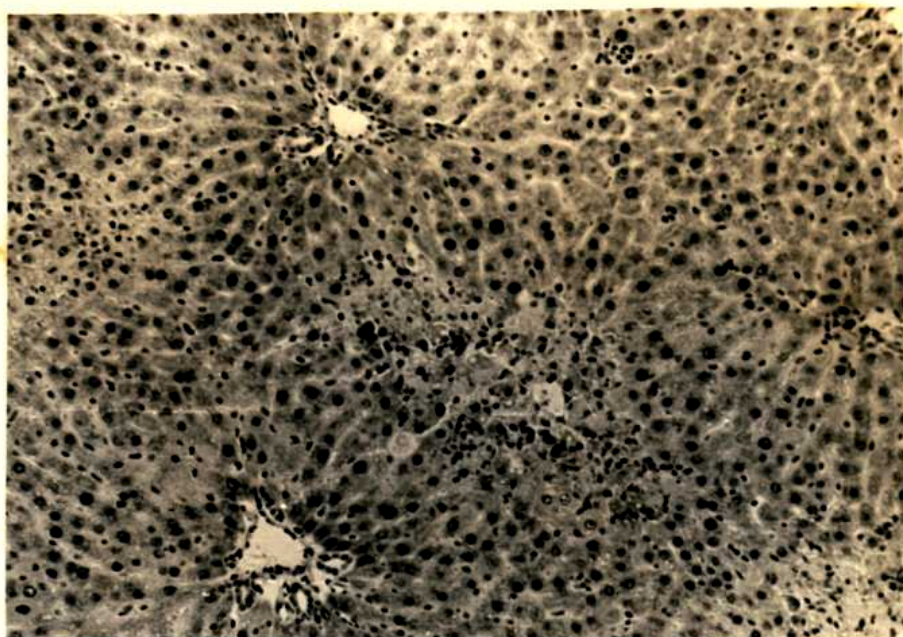


Fig. 10 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cistamina (600 mg/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 72 horas. Las zonas necróticas abarcan solamente la región centrolobulillar. Hematoxilina-eosina x 120.

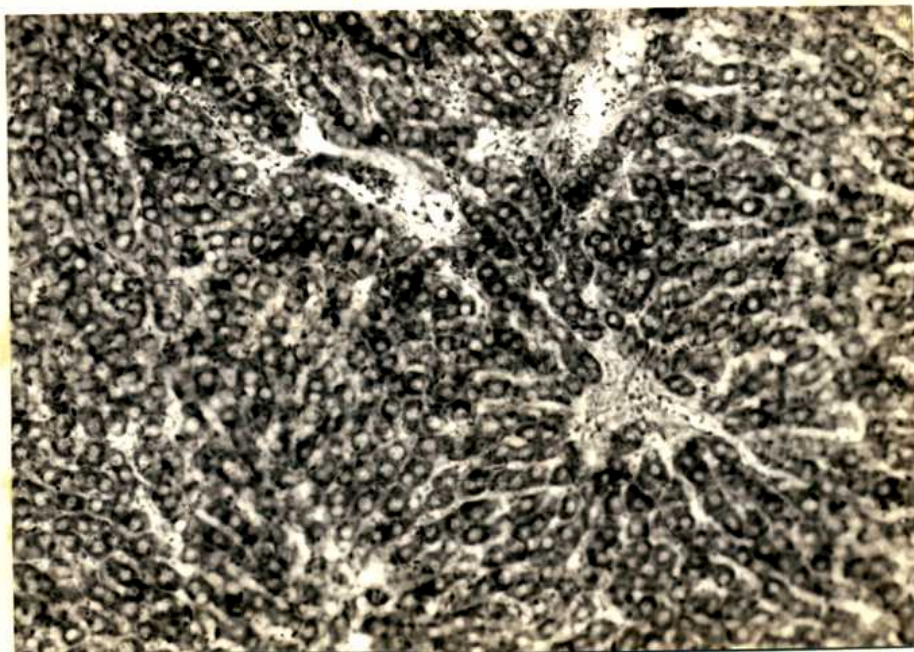


Fig. 11 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con cistamina (600 mg/kg) durante 24 horas. La apariencia es normal. Sudán Negro B. x 190.



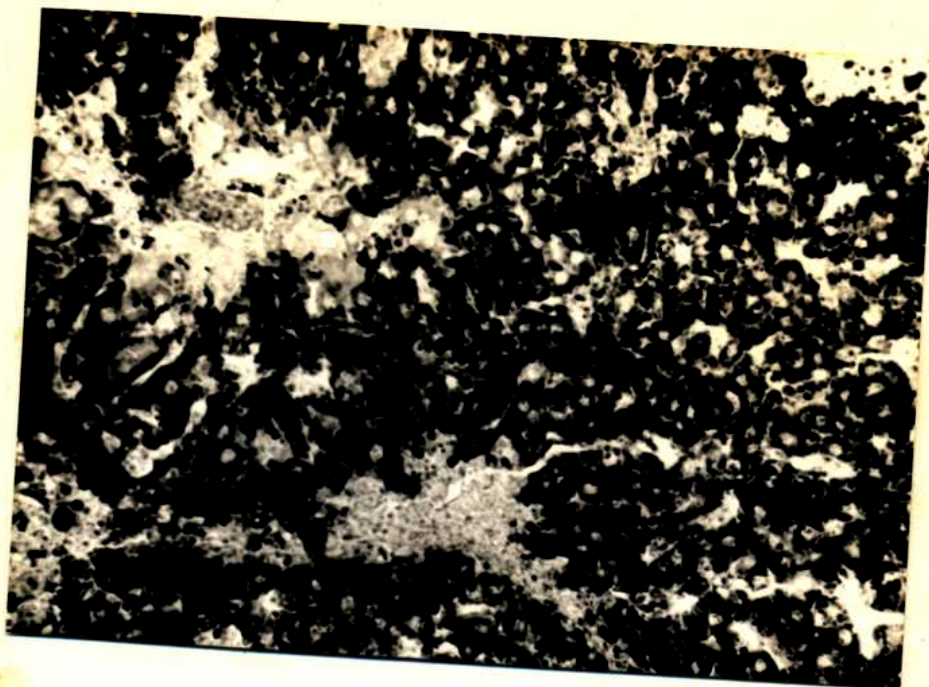


Fig. 12 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa infiltración grasa en las zonas centrolobulillar y periportal. Sudán Negro B. x 190.

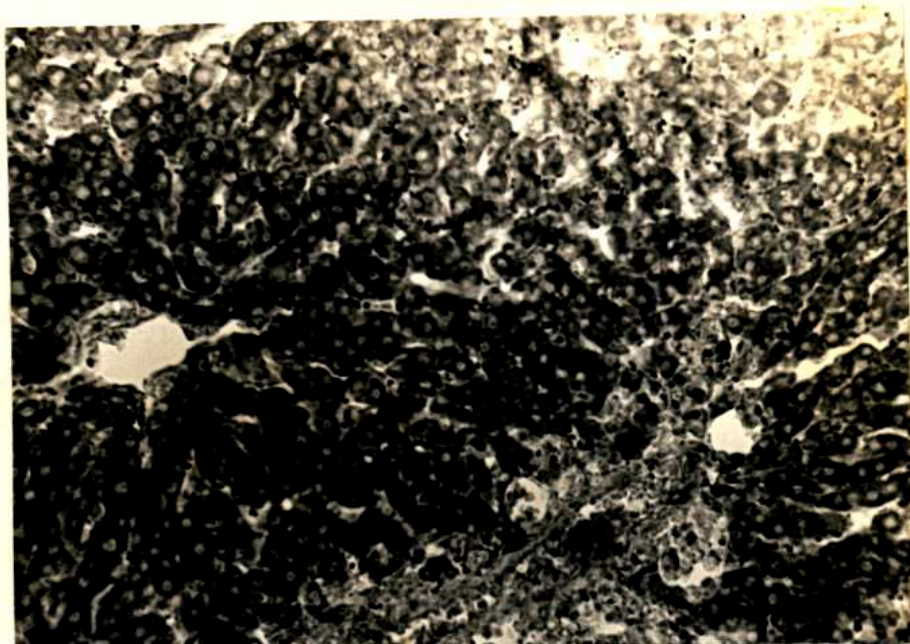


Fig. 13 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cistamina (600 mg/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa disminución de la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$ . Sudán Negro B. x 190.



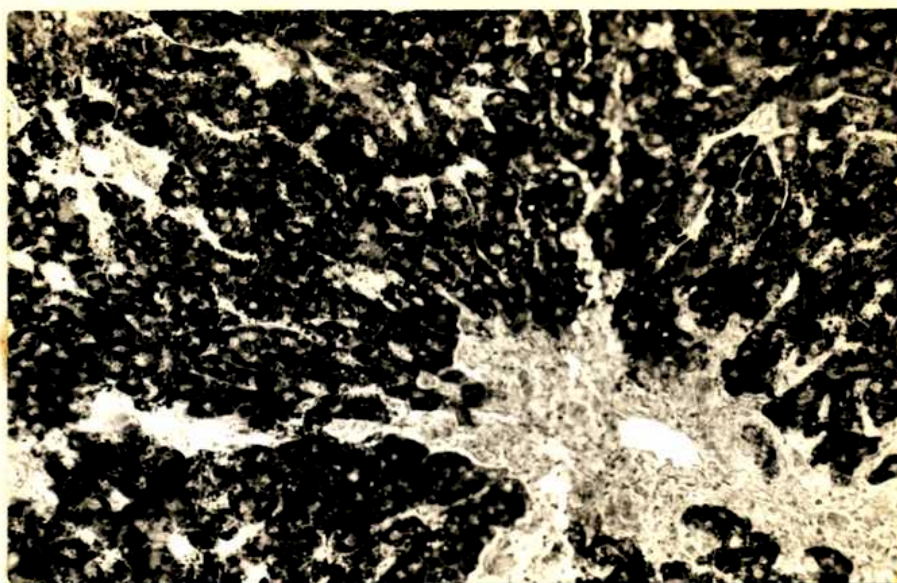


Fig. 14 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 72 horas. Se observa infiltración grasa en todo el lobulillo hepático. Sudán Negro B. x 190.

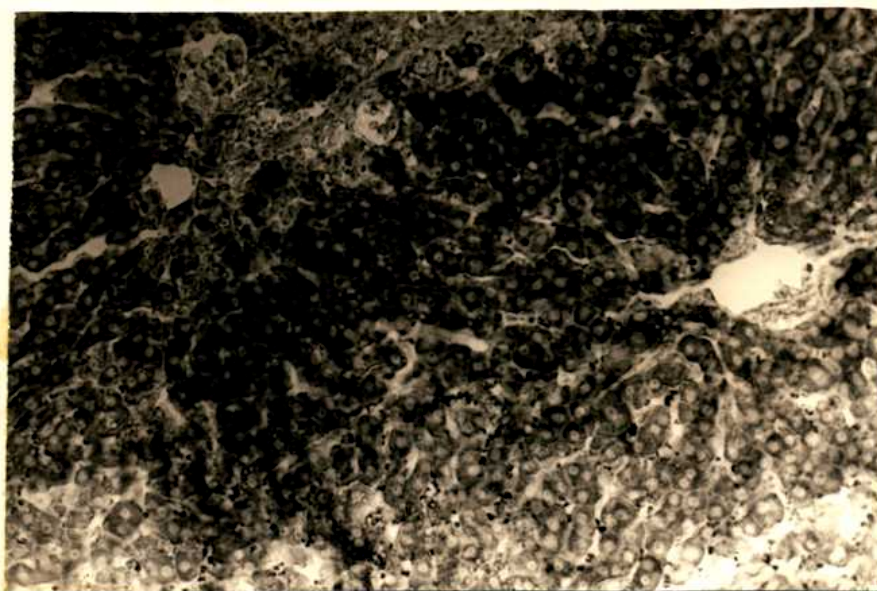


Fig. 15 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cistamina (600 mg/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 72 horas. Se observa disminución de la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$ . Sudán Negro B. x 190.

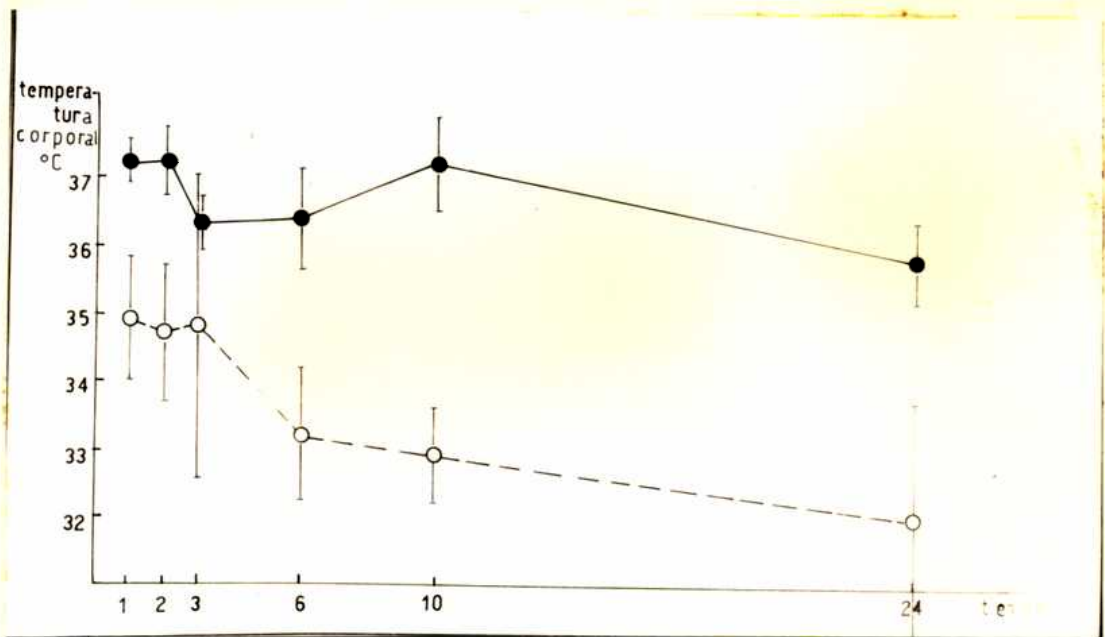


Fig. 16 - Efecto de la cistamina en la temperatura corporal de las ratas. La cistamina se administró oralmente disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg a ratas ayunadas durante 12-14 horas. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. La temperatura se midió a la 1, 2, 3, 6, 10 y 24 horas. Se utilizaron 5 animales por grupo. ● Control; ○ Cistamina. Las barras verticales representan la D.S.;  $p < 0,01$  para cistamina con respecto al control para todos los tiempos analizados.



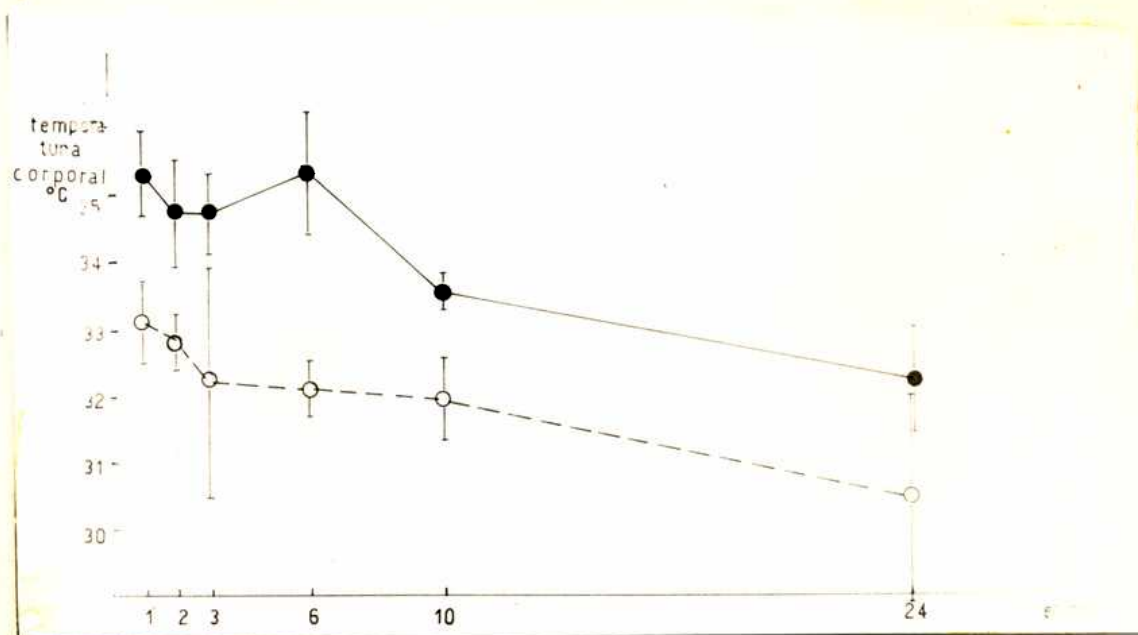


Fig. 17 - Efecto de la cistamina sobre la disminución de la temperatura corporal producida por el  $\text{CCl}_4$ . Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cistamina se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/kg) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. La temperatura se midió a la 1, 2, 3, 6, 10 y 24 horas. Se utilizaron 5 animales por grupo. ●  $\text{CCl}_4$ ; ○ Cistamina +  $\text{CCl}_4$ . Las barras verticales representan la D.S.  $p < 0,01$  para  $\text{CCl}_4$  con respecto al control y cistamina +  $\text{CCl}_4$  con respecto al control. Para cistamina +  $\text{CCl}_4$  con respecto a cistamina:  $p < 0,02$  a la 1, 2 y 3 hs y  $p > 0,05$  a las 6, 10 y 24 horas.

TABLA 13

Efecto de la cistamina y la cisteamina in vitro sobre la permeabilidad de los lisosomas y el daño producido en los lisosomas por el  $\text{CCl}_4$  in vitro.

Compuesto	Concen- tración $\mu\text{M}$	Actividad de <sup>a,b</sup> la fosfatasa ácida	% del control	Actividad de <sup>a,c</sup> la ribonucleasa Unidades $\times 10^{-3}$	% del control
Control		22,3	100	6,3	100
Cistamina	100	18,3	81	5,5	87
	10	19,0	85	6,0	92
	1	22,7	101	6,3	99
$\text{CCl}_4$		45,0	201	7,5	119
$\text{CCl}_4$ + cis- tamina	100	33,0	147	6,9	110
	10	41,7	186	7,4	117
	1	45,0	201	7,5	119
Control		26,0	100	5,8	100
Cisteamina	100	36,3	140	6,4	109
	10	28,3	109	6,0	102
	1	26,3	101	5,8	100
$\text{CCl}_4$		45,7	175	7,3	126
$\text{CCl}_4$ + cis- teamina	100	52,3	202	7,7	131
	10	47,3	182	7,4	127
	1	46,3	178	7,3	126

Continuación leyenda de la Tabla 13.

- <sup>a</sup> Alícuotas de la suspensión lisosomal de hígado de ratas macho ayunadas durante 12-14 hs. (2,5 mg de proteína/ml) obtenidas de acuerdo a lo descrito en la Parte Experimental fueron incubadas con agitación durante 30 minutos a 37°C en frascos de Warburg con o sin cistamina o cisteamina en las concentraciones finales descritas en la Tabla, en presencia o ausencia de 4 microlitros de CO<sub>2</sub> puro en el brazo lateral. El contenido de los frascos fue luego centrifugado 20 minutos a 20.000 g y el sobrenadante se usó para medir actividad enzimática.
- <sup>b</sup> La actividad de la fosfatasa ácida está expresada en  $\mu$ moles de p-nitrofenol liberados por minuto a 37°C por mg de proteína de un sobrenadante obtenido centrifugando 20 minutos a 20.000 g la suspensión lisosomal.
- <sup>c</sup> La actividad de la ribonucleasa está expresada en unidades por minuto a 37°C por mg de proteína de un sobrenadante obtenido centrifugando 20 minutos a 20.000 g la suspensión lisosomal. Una unidad es equivalente a la cantidad de oligonucleótido ácido-soluble que causa un aumento de absorbancia a 260 milimicrones de 1,0.

efecto estabilizante; también estabiliza los lisosomas contra la acción del  $\text{CCl}_4$  in vitro. En contraste, la cisteamina produce un efecto labilizante con aumento de la actividad no-sedimentable a 20.000 x g de ambas enzimas tanto actuando sola sobre los lisosomas como cuando el  $\text{CCl}_4$  está presente.

Efecto de la administración de cistamina sobre la liberación de fosfatasa ácida de lisosomas producida por el  $\text{CCl}_4$  in vitro (Tabla 14).

La administración previa de cistamina a ratas produce efectos variables sobre la estabilidad de los lisosomas provenientes de esos animales frente a la acción del  $\text{CCl}_4$  in vitro. En efecto, a pesar de que se produce un notable efecto labilizante a la primer hora, probablemente mediado por su metabolito, la cisteamina, a las 24 horas se observa un pequeño efecto estabilizante.

Efecto del tratamiento previo con cisteína sobre la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos y proteínas microsomales (Tablas 15 y 16).

La magnitud de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales fue aumentada por el tratamiento previo con cisteína a las 3 horas pero no a las 6 horas. Las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en los hígados de animales tratados previamente con cisteína son mayores que en los controles. Sabemos que existe proporcionalidad entre concentración de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en el hígado y la magnitud del  $^{14}\text{C}$  irreversiblemente unido a los lípidos microsomales (69). Los valores del cociente (R) entre la unión irreversible a lípidos y la respectiva concentración de  $^{14}\text{CCl}_4$  en hígados de ratas control no difieren de los valores provenientes de ratas tratadas con cisteína.

La unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a las proteínas hepáticas microsomales de ratas tratadas con cisteína es significativamente mayor que lo observado en ratas control a las 3 horas pero no a las 6 horas. Sin embargo, dado que las concentraciones de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en los hígados de ratas tratadas con cisteína a las 3 ó 6 horas son mayores que las encontradas en los controles, el cociente entre la magnitud de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  a proteínas microsoma-

TABLA 14

Efecto de la administración de cistamina a ratas sobre la liberación de fosfatasa ácida de lisosomas de hígado producida in vitro por el  $\text{CCl}_4$ .

Tratamiento <sup>a</sup>	Tiempo después de la administ. de cistamina (hr)	Actividad de lab. fosfatasa ácida Valor medio $\pm$ D.S.	% con respecto al control	Valor de p
Control	1	31,7 $\pm$ 2,7	178	< 0,001
Cistamina	1	56,3 $\pm$ 4,7		
Control	6	33,7 $\pm$ 5,7	106	> 0,4
Cistamina	6	35,7 $\pm$ 3,7		
Control	10	35,3 $\pm$ 5,3	116	> 0,05
Cistamina	10	41,0 $\pm$ 5,0		
Control	24	25,3 $\pm$ 2,0	83	< 0,01
Cistamina	24	21,0 $\pm$ 2,0		

Continuación leyenda de la Tabla 14.

- <sup>a</sup> La cistamina fue dada oralmente a ratas macho ayunadas durante 12-14 hs. disuelta en agua destilada en una dosis de 600 mg/kg. Los controles recibieron agua destilada en cantidades equivalentes. Se utilizaron 5 ratas por grupo, Los animales se sacrificaron a la 1, 6, 10 ó 24 hs. después de la administración de cistamina. Alícuotas de la suspensión lisosomal de hígado (2,5 mg de proteína/ml) obtenidas de acuerdo a lo descrito en la Parte Experimental fueron incubadas con agitación durante 30 minutos a 37°C en frascos de Warburg en presencia de 4 microlitros de  $\text{CCl}_4$  puro en el brazo lateral. El contenido de los frascos fue luego centrifugado 20 minutos a 20.000 g y el sobrenadante se usó para medir actividad enzimática.
- <sup>b</sup> La actividad de la fosfatasa ácida está expresada en  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberados en 1 minuto a 37°C por mg de proteína de un sobrenadante obtenido centrifugando 20 minutos a 20.000 g la suspensión lisosomal.

TABLA 15

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCL}_4$  a lípidos microsomaes hepáticos y niveles de  $^{14}\text{CCL}_4$  libre en hígado a distintos tiempos después de su administración a ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCL}_4$ irreversiblemente unido a lípidos microsomaes (dpm/g lípido) Valor medio $\pm$ D.S.	$^{14}\text{CCL}_4$ libre (dpm/g hígado) Valor medio $\pm$ D.S.	R <sup>b</sup>
3 horas			
$^{14}\text{CCL}_4$	46.200 $\pm$ 7.400	460 $\pm$ 114	100 $\pm$ 18
$^{14}\text{CCL}_4$ + cisteína	89.600 $\pm$ 37.600 <sup>c</sup>	796 $\pm$ 214 <sup>c</sup>	112 $\pm$ 38
6 horas			
$^{14}\text{CCL}_4$	42.700 $\pm$ 6.600	386 $\pm$ 56	110 $\pm$ 28
$^{14}\text{CCL}_4$ + cisteína	54.800 $\pm$ 22.500	562 $\pm$ 82 <sup>c</sup>	99 $\pm$ 38

Continuación leyenda de la Tabla 15.

- <sup>a</sup> Ratas ayunadas durante 12-14 hs., fueron inyectadas por vía intraperitoneal con una solución de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  ( $6,05 \times 10^7$  dpm/ $\mu\text{M}$ ) en aceite de oliva ( $1,4 \times 10^6$  dpm/ml de solución) en una dosis de 5 ml de solución/kg. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Los animales se sacrificaron 3 hs. ó 6 hs. después de la administración del  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ . Se utilizaron 8 ratas por grupo.
- <sup>b</sup> R es el cociente entre los valores de  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  irreversiblemente unido a lípidos microsomales y sus respectivos niveles de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  libre en hígado.
- <sup>c</sup> El valor de p por el test de t es  $p < 0,01$ .



TABLA 16

Unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a protefnas microsomas hepáticas y niveles de  $^{14}\text{CCl}_4$  libre en hígado a distintos tiempos después de su administración a ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	$^{14}\text{C}$ de $^{14}\text{CCl}_4$ irreversiblemente unido a protefnas microsomales.	$^{14}\text{CCl}_4$ libre (dpm/g hígado) Valor medio $\pm$ D.S.	R <sup>b</sup>
3 horas			
$^{14}\text{CCl}_4$	49.200 $\pm$ 3.800	379 $\pm$ 68	130 $\pm$ 41
$^{14}\text{CCl}_4$ + cisteína	70.000 $\pm$ 11.000 <sup>c</sup>	632 $\pm$ 194 <sup>c</sup>	111 $\pm$ 20
6 horas			
$^{14}\text{CCl}_4$	71.000 $\pm$ 11.600	277 $\pm$ 37	258 $\pm$ 16
$^{14}\text{CCl}_4$ + cisteína	59.400 $\pm$ 8.600	368 $\pm$ 77 <sup>c</sup>	163 $\pm$ 36 <sup>c</sup>

Continuación leyenda de la Tabla 16.

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs. fueron inyectadas por vía intraperitoneal con una solución de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  ( $6,05 \times 10^7$  dpm/ $\mu\text{M}$ ) en aceite de oliva ( $1,4 \times 10^8$  dpm/ml de solución) en una dosis de 5 ml de solución/kg. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Los animales se sacrificaron 3 hs. ó 6 hs. después de la administración del  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$ . Se utilizaron 8 ratas por grupo.

<sup>b</sup> R es el cociente entre los valores de  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  irreversiblemente unido a proteínas microsomales y sus respectivos niveles de  $^{14}\text{C}\text{Cl}_4$  libre en hígado.

<sup>c</sup> El valor de p por el test de t es  $p < 0,01$ .

les y la concentración de  $^{14}\text{CCl}_4$  disminuye en las ratas tratadas con cisteína con respecto a los controles. Este efecto es particularmente notable a las 6 horas.

Contenido de  $\text{CCl}_4$  en hígado de ratas tratadas previamente con cisteína a distintos tiempos de su administración (Tabla 17).

En contraste con los resultados observados cuando se utilizaron dosis marcadoras de  $^{14}\text{CCl}_4$ , las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en los hígados de ratas control no son significativamente diferentes de las de hígado de ratas tratadas previamente con cisteína 1, 3, 6 ó 10 horas después de la administración de dosis tóxicas de  $\text{CCl}_4$ .

Efecto de la administración de cisteína sobre la peroxidación de lípidos microsomales producida por el  $\text{CCl}_4$  in vivo (Tabla 18).

El tratamiento previo con cisteína no previno la peroxidación de lípidos inducida por el  $\text{CCl}_4$  3 ó 6 horas después de su administración.

Efecto preventivo de la cisteína sobre la destrucción de la G6P-asa producida por el  $\text{CCl}_4$  (Tabla 19).

El tratamiento previo con cisteína redujo significativamente la intensidad de la disminución de la actividad de la G6P-asa producida por el  $\text{CCl}_4$  tanto a las 3 horas como a las 6 horas después de su administración. A las 3 horas, la cisteína sola, causó una reducción pequeña pero significativa de la actividad enzimática, si bien éste efecto no fue observado a las 6 horas.

Efecto de la administración previa de cisteína sobre la destrucción del citocromo P-450 producida por el  $\text{CCl}_4$  (Tabla 20).

El tratamiento previo con cisteína no previno la destrucción del P-450 producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 3 ó 6 horas después de su administración.

Efecto del  $\text{CCl}_4$  24 horas después de su administración sobre la actividad de la isocitrato dehidrogenasa plasmática (ICDh) y a diferentes tiempos sobre el peso de hígado y la necrosis en ratas tra-

TABLA 17

Concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en hígado a distintos tiempos después de su administración a ratas previamente tratadas con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	Tiempo (hs)	Concentración de $\text{CCl}_4$ en hígado Valor medio $\pm$ D.S.	% con respecto <sup>c</sup> al control
$\text{CCl}_4$	1	920 $\pm$ 170	113
Cisteína + $\text{CCl}_4$		1040 $\pm$ 250	
$\text{CCl}_4$	3	470 $\pm$ 130	113
Cisteína + $\text{CCl}_4$		530 $\pm$ 170	
$\text{CCl}_4$	6	280 $\pm$ 130	111
Cisteína + $\text{CCl}_4$		310 $\pm$ 90	
$\text{CCl}_4$	10	230 $\pm$ 110	83
Cisteína + $\text{CCl}_4$		190 $\pm$ 70	

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron la cantidad equivalente de agua destilada. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados después de la administración de  $\text{CCl}_4$ .

<sup>b</sup> La concentración de  $\text{CCl}_4$  se determinó según se describe en la Parte Experimental. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de  $\text{CCl}_4$  por g de hígado; el valor de p por el test de t es  $p > 0,1$  para todos los tiempos.

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

TABLA 18

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la peroxidación de lípidos microsomales en ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	Peroxidación de lípidos microsomales <sup>b,c</sup>			
	Valor medio $\pm$ D.S.			
	3 hr	% del control	6 hr	% del control
Control	152 $\pm$ 15	100	166 $\pm$ 17	100
$\text{CCl}_4$	278 $\pm$ 32	183	290 $\pm$ 21	175
Cisteína	174 $\pm$ 23	114	191 $\pm$ 23	115
Cisteína + $\text{CCl}_4$	291 $\pm$ 41	191	289 $\pm$ 59	174

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron 3 ó 6 hs después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

<sup>b</sup> La determinación de la peroxidación de lípidos microsomales se efectuó como se describe en la Parte Experimental. Los resultados se expresan como  $\Delta$  absorbancia a 243 m $\mu$  x 1000 para una solución que tiene 1 mg de lípidos microsomales/ml.

<sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cisteína sobre la peroxidación de lípidos microsomales producida por el  $\text{CCl}_4$  obtenida por análisis de variancia bimodal fue  $p > 0,1$  a las 3 y 6 hs.

TABLA 19

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre la actividad de la glucosa 6-fosfatasa (G6P-asa) en ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	G6P-asa <sup>b,c</sup> Valor medio $\pm$ D.S. $\times 10^{-2}$			
	3 hr	% del control	6 hr	% del control
Control	15,6 $\pm$ 0,5	100	16,0 $\pm$ 1,6	100
$\text{CCl}_4$	8,0 $\pm$ 0,6	51	6,8 $\pm$ 0,2	42
Cisteína	12,2 $\pm$ 1,2	78	14,9 $\pm$ 1,5	93
Cisteína + $\text{CCl}_4$	9,2 $\pm$ 0,8	59	9,7 $\pm$ 1,2	60

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas interperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva interperitonealmente en cantidades equivalentes. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Se utilizaron 8 ratas por grupo; los animales se sacrificaron 3 hrs ó 6 hrs después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

<sup>b</sup> La determinación de la G6P-asa se efectuó como se describe en la Parte Experimental; los resultados se expresan en micromoles de fósforo inorgánico producidos por minuto por mg de proteína microsomal a 37° C.

<sup>c</sup> El valor de p por el test de t para el efecto de la cisteína sola a las 3 horas es de  $p < 0,05$  y el valor de p para el efecto global de la cisteína sobre la pérdida de la actividad de la G6P-asa producida por el  $\text{CCl}_4$  obtenido por análisis de variancia bimodal es  $p < 0,001$  a las 3 hs y  $p < 0,005$  a las 6 hs.

TABLA 20

Efecto del  $\text{CCl}_4$  a diferentes tiempos después de su administración sobre el contenido del citocromo P-450 en ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	P-450 <sup>b,c</sup>			
	Valor medio $\pm$ D.S.			
	3hr	% del control	6hr	% del control
Control	0,53 $\pm$ 0,04	100	0,50 $\pm$ 0,09	100
$\text{CCl}_4$	0,27 $\pm$ 0,01	51	0,21 $\pm$ 0,06	42
Cisteína	0,48 $\pm$ 0,07	91	0,45 $\pm$ 0,09	90
Cisteína + $\text{CCl}_4$	0,26 $\pm$ 0,05	49	0,27 $\pm$ 0,03	54

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 horas fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron 3 ó 6 horas después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

<sup>b</sup> La determinación del P-450 se efectuó como se describe en la Parte Experimental. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles}$  por mg de proteína microsomal.

<sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cisteína sobre la disminución del contenido de P-450 producido por el  $\text{CCl}_4$  obtenido por análisis de variancia bimodal fue  $p > 0,01$  para ambos tiempos.

tadas previamente con cisteína (Tabla 21).

Hemos analizado el efecto protector de la cisteína contra la necrosis a las 24, 48 y 72 horas después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . El pretratamiento con cisteína produjo una notable disminución en la elevación de los niveles de ICDh plasmática inducida por  $\text{CCl}_4$  a las 24 horas. En cambio, no produjo variaciones en el aumento de peso de hígado que causa el  $\text{CCl}_4$  24, 48 ó 72 horas después de inyectado.

La necrosis hepática fue estudiada por el examen histológico del hígado. El tratamiento de las ratas con sólo cisteína no modificó la estructura normal del hígado a las 24, 48 ó 72 horas después de su administración (Fig. 18). La administración de  $\text{CCl}_4$  a ratas pretratadas con agua destilada produjo a las 24 horas una necrosis centrolobulillar intensa, asociada con hemorragia y edema. Las células hepáticas en las zonas periportales estaban agrandadas y en este área la arquitectura hepática normal no existía (Fig. 19). El tratamiento previo con cisteína disminuyó notablemente la intensidad de la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  24 horas después de su administración (Fig. 20). Se observan pequeñas áreas de necrosis localizadas en la zona centrolobulillar; las áreas con arquitectura aparentemente normal son más extensas que en los animales no pretratados, aunque aún presentan congestión y edema. La cisteína también disminuyó marcadamente la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 48 y 72 horas después de su administración.

La cisteína por sí misma no produjo ningún efecto en el contenido graso hepático (Fig. 21). La administración de  $\text{CCl}_4$  produjo a las 24 horas una infiltración grasa intensa que se extiende tanto en la zona central como en la periportal (Fig. 22). El pretratamiento con cisteína produjo una disminución parcial de la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$  (Fig. 23). Un efecto similar fue observado a las 48 y 72 horas.

Tratamiento terapéutico de la cisteína sobre la variación de la actividad de la isocítrico dehidrogenasa plasmática (ICDh), el peso de hígado y la necrosis producidos por el  $\text{CCl}_4$  24 horas después de su administración (Tabla 22).



TABLA 21

Efecto del  $\text{CCl}_4$  24 horas después de su administración sobre la actividad de la isocitrato dehidrogenasa plasmática (ICDh) y a diferentes tiempos sobre el peso de hígado en ratas tratadas previamente con cisteína.

Tratamiento <sup>a</sup>	ICDh <sup>b,c</sup> Valor medio $\pm$ D.S.	Peso de hígado <sup>c</sup> (g/100g peso corp) Valor medio $\pm$ D.S.			
		24 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Control	280 $\pm$ 130	3,17 $\pm$ 0,72	2,40 $\pm$ 0,15	2,19 $\pm$ 0,23	
$\text{CCl}_4$	117.600 $\pm$ 23.200	4,08 $\pm$ 0,67	4,15 $\pm$ 0,47	3,37 $\pm$ 0,39	
Cisteína	320 $\pm$ 130	3,96 $\pm$ 0,58	2,64 $\pm$ 0,27	2,53 $\pm$ 0,32	
Cisteína + $\text{CCl}_4$	3.500 $\pm$ 1.150	3,79 $\pm$ 0,70	4,09 $\pm$ 0,39	3,94 $\pm$ 0,32	

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hs fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron 24, 48 ó 72 hs después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

Continuación leyenda de la Tabla 21.

- <sup>b</sup> La determinación de la ICDh plasmática se realizó como se describe en la Parte Experimental; la actividad está dada en unidades; una unidad es la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por ml de plasma por hora a 25°C.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cisteína sobre el aumento de la ICDh plasmática producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 24 hs. y obtenida por análisis de variancia bimodal fue  $\bar{p} < 0,001$ ; para el aumento de peso de hígado producido por el  $\text{CCl}_4$  el valor de p fue  $p > 0,1$  para todos los tiempos.

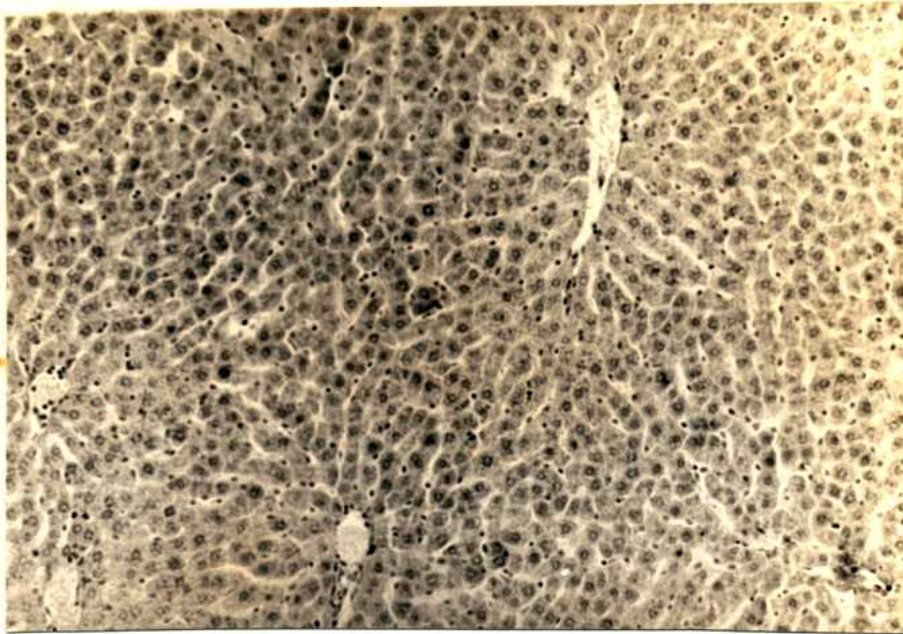


Fig. 18 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con cisteína (1,9 gr/kg) durante 24 horas. La apariencia es semejante a la de los controles. Hematoxilina-eosina. x 120.

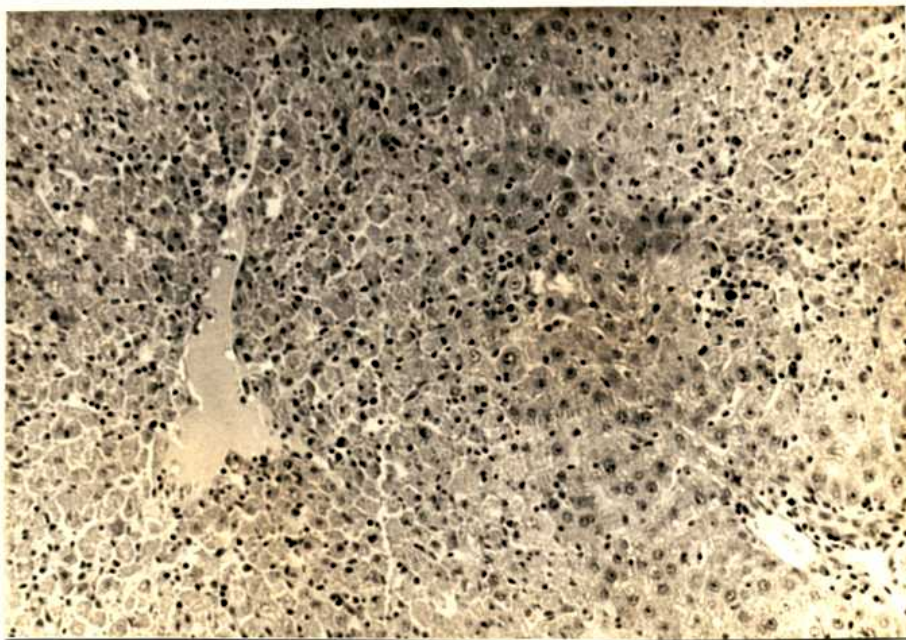


Fig. 19 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa necrosis centrolobulillar intensa. Hematoxilina-eosina. x 120.



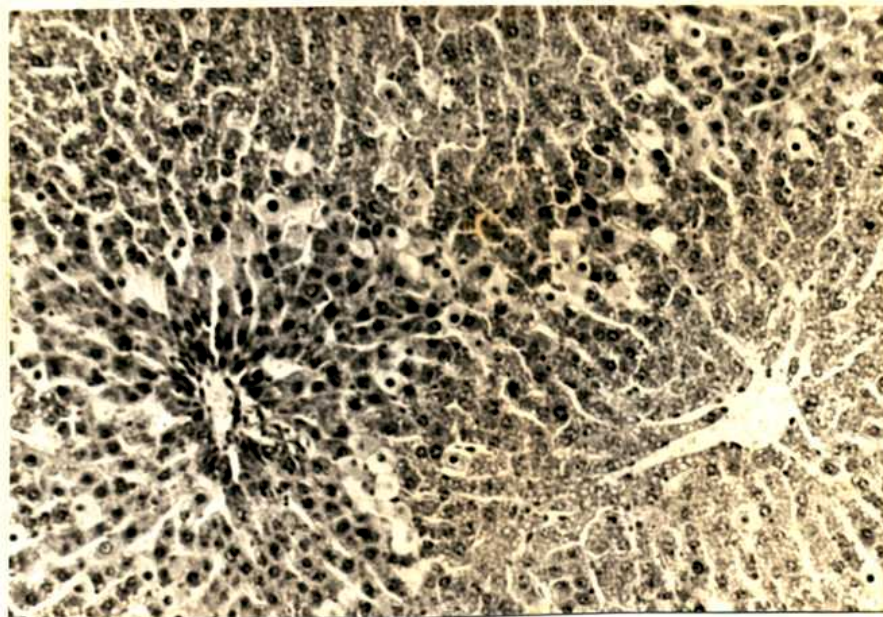


Fig. 20 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cisteína (1,9 gr/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Las zonas necróticas son pequeñas. Hematoxilina-eosina x 120.

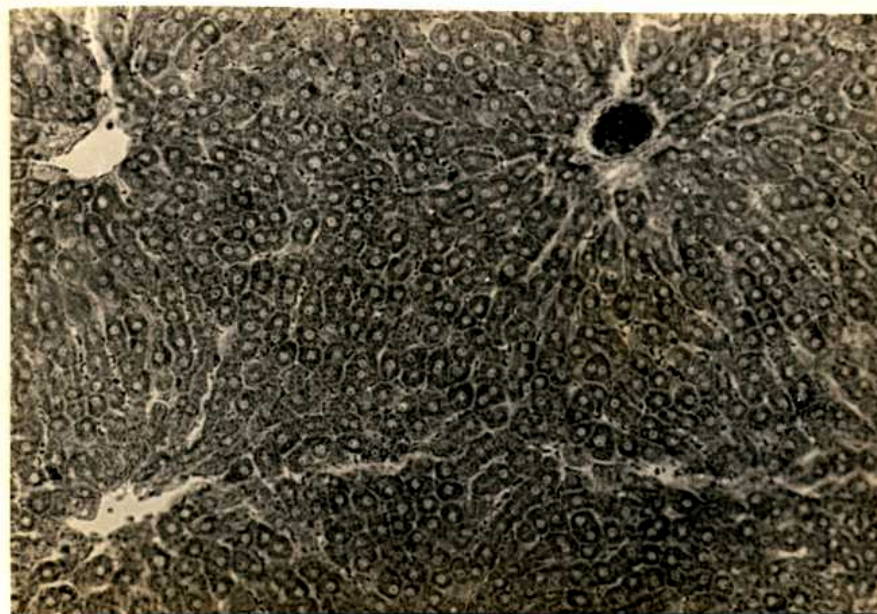


Fig. 21 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con cisteína (1,9 gr/kg) durante 24 horas. Su apariencia es normal. Sudán Negro B. x 190.



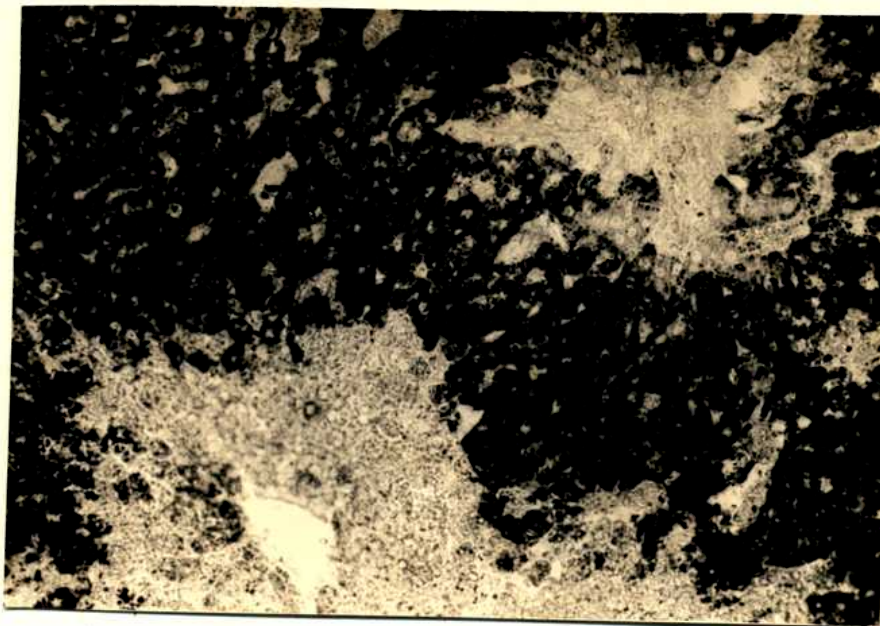


Fig. 22 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas y tratada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa infiltración grasa en las zonas centrolobulillar y periportal. Sudán Negro B. x 190.

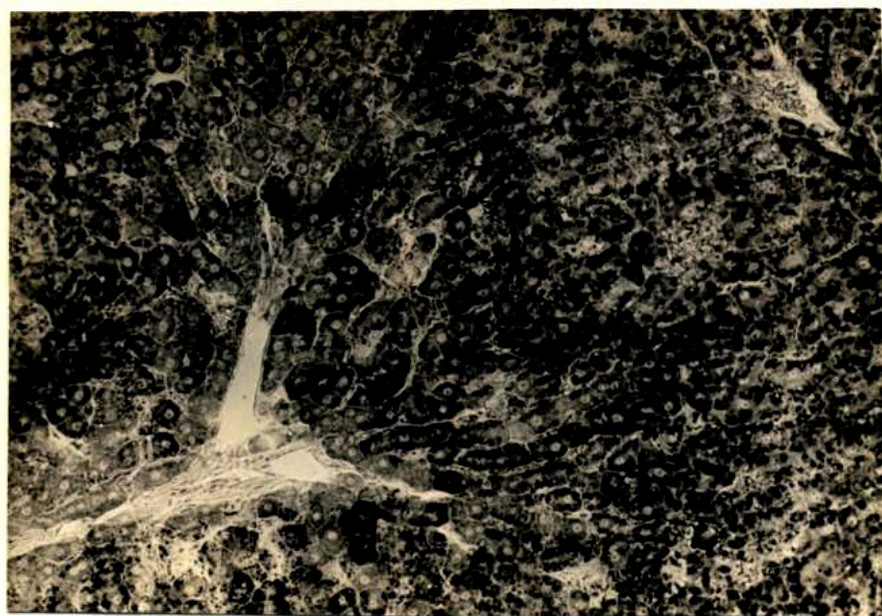


Fig. 23 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, tratada con cisteína (1,9 gr/kg) 30 minutos antes del  $\text{CCl}_4$ , e intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas. Se observa disminución de la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$ . Sudán Negro B. x 190.

TABLA 22

Tratamiento terapéutico con cisteína sobre la variación de la actividad de la isocitrato dehidrogenasa plasmática (ICDh) y el peso de hígado producido por el  $\text{CCl}_4$  24 horas después de su administración.

Tratamiento <sup>a</sup>	ICDh <sup>b,c</sup> Valor medio $\pm$ D.S.	% del control	Peso de hígado (g/100g peso corporal) Valor medio $\pm$ D.S.	% del control
Control	175 $\pm$ 50	100	2,74 $\pm$ 0,07	100
$\text{CCl}_4$	140.000 $\pm$ 35.000	80.000	3,98 $\pm$ 0,17	145
Cisteína	150 $\pm$ 25	86	2,91 $\pm$ 0,10	106
Cisteína + $\text{CCl}_4$	18.000 $\pm$ 31.000	10.285	3,93 $\pm$ 0,28	160

<sup>a</sup> Ratas macho ayunadas durante 12-14 hr fueron inyectadas intraperitonealmente con una solución de  $\text{CCl}_4$  al 20% (v/v) en aceite de oliva en una dosis de 5 ml de solución/kg. Los controles recibieron aceite de oliva en cantidades equivalentes. La cisteína se administró por vía oral disuelta en agua destilada (380 mg/ml) en una dosis de 1,9 g/kg 1 hora después del  $\text{CCl}_4$ . Los controles recibieron agua destilada. Se utilizaron 5 ratas por grupo; los animales se sacrificaron 24 hr después de la administración del  $\text{CCl}_4$ .

Continuación leyenda de la Tabla 22.

- <sup>b</sup> La determinación de la ICDh plasmática se realizó como se describe en la Parte Experimental; la actividad está dada en unidades; una unidad es la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de NADPH por ml de plasma por hora a 25°C.
- <sup>c</sup> El valor de p para el efecto global de la cisteína sobre el aumento de la ICDh plasmática producida por el CCl<sub>4</sub> y obtenida por análisis de variancia bimodal fue  $p < 0,001$  y para el aumento de peso de hígado  $p > 0,1$ .

Dado que el tratamiento preventivo con cisteína mostró ser exitoso, también se intentó verificar su posible eficacia cuando se administra terapéuticamente (o sea después del  $\text{CCl}_4$ ), administrando la cisteína 1 hora después del  $\text{CCl}_4$  y analizando el hígado 24 horas después. El tratamiento terapéutico con cisteína produjo también una notable disminución en la elevación de los niveles de ICDh plasmática inducida por el  $\text{CCl}_4$  en 24 horas, pero no produjo variaciones en el aumento de peso de hígado producido por éste último.

El tratamiento terapéutico también protegió notablemente contra la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  (Fig. 24); la zona necrótica abarca solamente una pequeña porción de la región centrolobulillar, alrededor de la cual se encuentran células con degeneración vacuolar de grado variable. El tratamiento terapéutico también produjo una protección parcial contra la infiltración grasa producida por el  $\text{CCl}_4$  (Fig. 25).



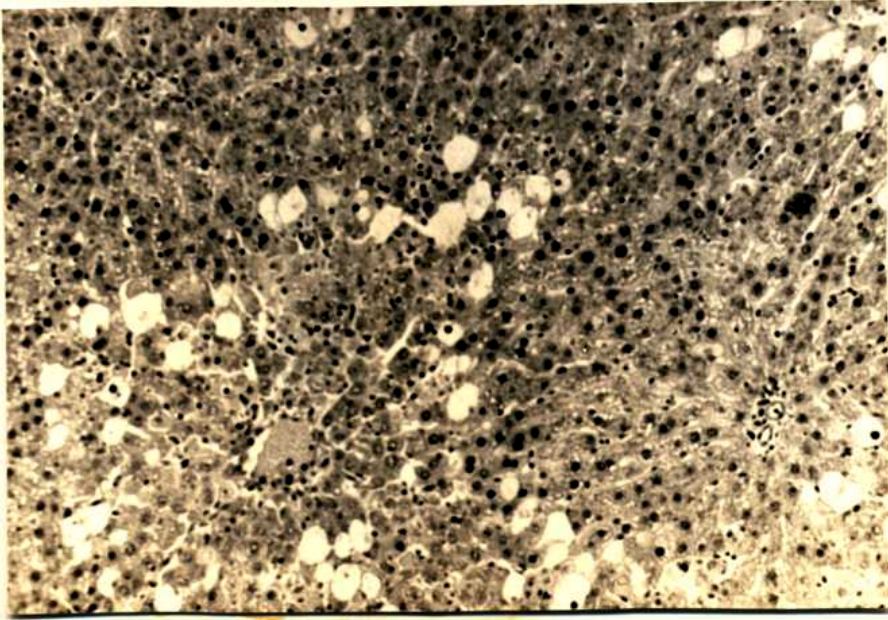


Fig. 24 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas y tratada terapéuticamente con cisteína (1,9gr/kg) 1 hora después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . La zona necrótica se circunscribe a la región centrolobulillar, rodeada por células con degeneración vacuolar. Hematoxilina-eosina. x 120.

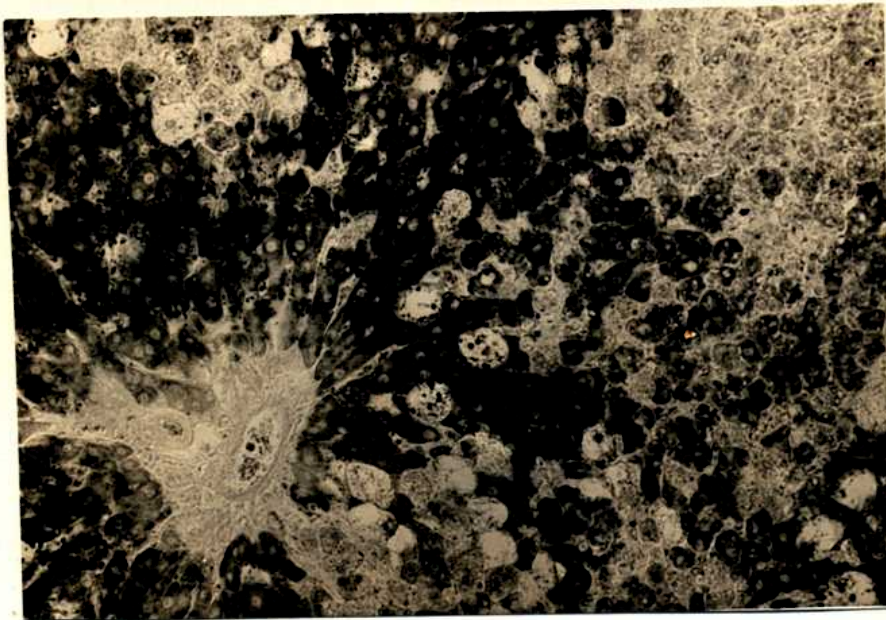


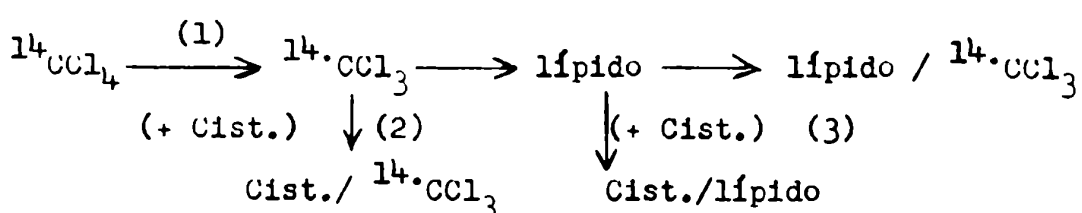
Fig. 25 - Hígado proveniente de rata ayunada durante 12-14 horas, intoxicada con  $\text{CCl}_4$  20% (5ml de solución/kg) durante 24 horas y tratada terapéuticamente con cisteína (1,9gr/kg) 1 hora después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . Se observa disminución parcial de la infiltración grasa producida por  $\text{CCl}_4$ . Sudán Negro B. x190.

### DISCUSION

De acuerdo con la similitud postulada entre el mecanismo de necrosis hepática producida por el  $\text{CCl}_4$  y el mecanismo de daño por radiaciones (8), la cistamina, un antídoto muy conocido contra el daño por radiaciones, también previno la necrosis inducida por  $\text{CCl}_4$ . La cistamina se administró en forma oral debido a su efecto prolongado como antídoto por esta vía (48), dado que el  $\text{CCl}_4$ , en contraste con los tratamientos usuales con radiaciones, actúa sobre el cuerpo durante un período de varias horas. La cistamina no alteró la absorción del  $\text{CCl}_4$ , dado que las concentraciones de éste fueron similares en los hígados de ratas tratadas y no tratadas con cistamina; estos resultados demuestran que el efecto protector de la cistamina no se debe a una mera demora de la absorción del  $\text{CCl}_4$ , sino que ejerce sus efectos a nivel molecular.

Una vez demostrado que existe un efecto protector real de la cistamina, dado que éste se verifica aún cuando los niveles de  $\text{CCl}_4$  en hígado no se alteran, tratamos de establecer cómo lo hacía. Para ello analizamos cómo afecta la cistamina a cada uno de los eventos que van desde el proceso inicial de activación del  $\text{CCl}_4$  a  $^*\text{CCl}_3$  hasta el de la necrosis resultante. En lo que hace a su acción sobre el proceso de activación a  $^*\text{CCl}_3$ , pudimos comprobar que la cistamina es capaz de reducir la intensidad de la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  de  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales, lo cual sugiere que es capaz de inhibirlo.

Para analizar cómo la cistamina reduce la magnitud de la unión irreversible a componentes celulares, consideramos al menos tres posibilidades: 1) que la cistamina inhiba el paso de activación del  $\text{CCl}_4$  a  $^*\text{CCl}_3$ ; 2) que la cistamina actúe como un agente atrapador de radicales libres y capture los  $^*\text{CCl}_3$ , previniendo la adición del  $^*\text{CCl}_3$  a los lípidos microsomales no saturados; 3) que la cistamina interaccione con el lípido marcado o con su estructura soporte, la membrana del retículo endoplásmico, de manera tal que proteja al lípido no saturado contra la adición de  $^*\text{CCl}_3$ . Estas posibilidades están ilustradas en el siguiente esquema:



Para poder discriminar cuál de éstas posibilidades está actuando, es útil analizar los experimentos sobre la unión irreversible a dos dosis diferentes de  ${}^{14}\text{CCl}_4$ , la standard y otra 3,6 veces mayor que la standard. En este rango de dosis existe proporcionalidad entre dosis empleada, concentración de  ${}^{14}\text{CCl}_4$  hepática y producción de  $\cdot\text{CCl}_3$  (69). Este experimento mostró que la cistamina retiene su capacidad preventiva a pesar de que se producen casi 4 veces más  $\cdot\text{CCl}_3$ . Si actuara la posibilidad número 2, se debería esperar que una cantidad constante de cistamina fuese menos eficiente en atrapar 4 veces más radicales libres y esto no sucede.

Una pérdida similar de efectividad debería esperarse si la cistamina protegiera al lípido no saturado contra los radicales libres (posibilidad número 3), dado que en el experimento con 3,6 veces la dosis standard, la misma protección debería enfrentarse con casi 4 veces más  $\cdot\text{CCl}_3$  que en el experimento con la dosis standard. Sin embargo, tampoco esto sucede. Después de excluir las posibilidades 2 y 3, solamente queda por analizar las probabilidades de la posibilidad número 1, esto es, que la cistamina inhiba el paso de activación por el cual el  $\text{CCl}_4$  da  $\cdot\text{CCl}_3$ . Si éste fuera el caso, la inhibición debería ser no competitiva, dado que un comportamiento competitivo no explicaría cómo es que casi 4 veces más sustrato no disminuye el porcentaje de inhibición por cistamina para dar menor porcentaje de prevención de la unión irreversible que con la dosis standard. Esta falta de competencia entre el  $\text{CCl}_4$  y la cistamina en interactuar con la enzima que activa el  $\text{CCl}_4$  es particularmente factible si se consideran dos hechos: uno es que la cadena microsomal transportadora de electrones estaría involucrada en la activación (7,8), y la otra es que se encontró que la cistamina se une a un componente de la cadena transportadora de electrones en un sitio distinto al del  $\text{CCl}_4$ . En efecto, la cistamina y la cisteamina, que es su metabolito, dan cambios espectrales tipo II, que están relacionados con la unión a

la porción Fe/hemo de la molécula de P-450, en tanto que el  $\text{CCl}_4$  da cambios espectrales tipo I, lo cual implica interacción con la parte apo-proteica del P-450 (34). Más aún, la saturación del P-450 con cistamina no previene la unión espectral de pequeñas cantidades de  $\text{CCl}_4$ .

Por lo tanto, el análisis de las tres posibilidades antes mencionadas permitirían postular que la cistamina podría reducir la cantidad de la unión irreversible, presumiblemente por una inhibición del paso de activación del  $\text{CCl}_4$  a  $\cdot\text{CCl}_3$ .

Una consecuencia interesante de ésta hipótesis sería la siguiente: si la administración de cistamina inhibe el paso de activación del  $\text{CCl}_4$  y si la cadena microsomal transportadora de electrones está involucrada en la activación del  $\text{CCl}_4$  (7,8), el conocimiento acerca de cómo la cistamina y la cisteamina (que es un metabolito de la cistamina) afectan dicha cadena transportadora de electrones, podría dar una idea acerca de cómo se activa el  $\text{CCl}_4$ . Por ello haremos un análisis de dicha interacción. En la administración de cistamina a las ratas no se encontró disminución en la actividad de la P-450 reductasa, pero ésto es probablemente debido a la naturaleza reversible de la interacción y a la considerable dilución que se produce durante el procesamiento de los hígados para obtener suspensiones microsomales. La aparente disminución en la actividad de la P-450 reductasa observada a las 6 y 24 horas son atribuibles a la disminución en las cantidades de sustrato endógeno P-450, dado que el cociente P-450 reductasa/ P-450 no era significativamente diferente en ratas controles y en tratadas con cistamina. Los hallazgos de que ambos, cistamina y cisteamina deceleran la reducción del P-450 por la P-450 reductasa a muy bajas concentraciones, y que la administración de cistamina a las ratas disminuye la unión irreversible de los  $\cdot\text{CCl}_3$  a los lípidos microsomales (que es una expresión del paso de activación) (45), y el hecho de que éste proceso reductivo aparenta ser el paso determinante en la hidroxilación (70), sugeriría que la activación por el  $\text{CCl}_4$  a radicales libres ocurriría durante la reducción del complejo  $\text{CCl}_4/\text{P-450}$ , mediada por la P-450 reductasa o durante la interacción del  $\text{CCl}_4$  con el P-450 reactivado.



También determinamos si algunas de las alteraciones moleculares producidas por el  $\text{CCl}_4$  podrían ser prevenidas por la administración previa de cistamina. Sobre la base de estudios in vitro se había postulado que dos alteraciones importantes que ocurren durante la intoxicación por  $\text{CCl}_4$ , la disminución del P-450 y la G6P-asa, eran causadas por un proceso de peroxidación de lípidos que acompaña a la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  (8,71). Nuestros estudios con cistamina proveen evidencia para apoyar la hipótesis de que los  $\cdot\text{CCl}_3$  serían los agentes dañinos y no la peroxidación de lípidos. En efecto, encontramos que la cistamina previene parcialmente la destrucción de la G6P-asa causada por el  $\text{CCl}_4$  y que ésta prevención guarda correlación con la unión irreversible encontrada después de la administración de cistamina y no con los cambios de peroxidación de lípidos, a pesar de que a tiempos mayores de 3 horas, la cistamina también reduce en pequeña proporción la intensidad de la peroxidación de lípidos inducida por el  $\text{CCl}_4$ . Los experimentos que muestran que la cistamina (pero no la cisteamina) inhibe a la G6P-asa in vitro irreversiblemente y no competitivamente, no apoyan la posibilidad de que la cistamina prevenga la destrucción de la G6P-asa producida por los  $\cdot\text{CCl}_3$  mediante un bloqueo temporal y reversible del sitio activo de la G6P-asa y da mayor apoyo a la posibilidad de que la cistamina proteja la enzima inhibiendo el paso de activación del  $\text{CCl}_4$ , con la consecuente disminución en la producción de  $\cdot\text{CCl}_3$ .

En lo que respecta a los efectos de la cistamina sobre el sistema enzimático que metaboliza tóxicos y fármacos y su posible acción preventiva contra el daño que sobre el mismo tiene el  $\text{CCl}_4$ , diremos que pudimos establecer que la cistamina interfiere con el metabolismo de fármacos tal como lo evidencia el efecto prolongador que ella tiene sobre el tiempo de sueño inducido por pentobarbital. Ese efecto se debería en parte a que como pudimos demostrar, la cistamina se combina reversiblemente con el P-450 impidiendo así que lo haga con el pentobarbital pero fundamentalmente por el hecho de que es capaz de inhibir a la P-450 reductasa, enzima ésta que es limitante en el proceso de metabolismo de los

barbituratos. A pesar de que no se encontró protección contra la destrucción de la EM-asa por el  $\text{CCl}_4$  con cistamina 3 horas después de dado el tóxico, se hallaron en cambio grados de protección significativos a períodos mayores de intoxicación. También se encontró protección cuando la cistamina se administró 3 horas antes que el  $\text{CCl}_4$  y los animales se sacrificaron después de un período de intoxicación de 3 horas. El efecto preventivo de la cistamina resulta más evidente cuando en lugar de medir la actividad global de la EM-asa, se estudia el efecto del  $\text{CCl}_4$  sobre el P-450, que es un componente de la cadena transportadora de electrones involucrado en la actividad de la EM-asa y es destruido por el  $\text{CCl}_4$  (33). En este caso, se encuentra prevención ya a las 3 horas después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . La falta de correlación entre grado de prevención medido como actividad de la EM-asa y los medidos como P-450 pueden deberse probablemente al hecho de que el contenido de P-450 no es el paso limitante en la hidroxilación de la etil-morfina, pero sí lo es la reducción del complejo etil-morfina/P-450 por la P-450 reductasa (70). Otra conclusión importante de éste experimento en el cual se encontró un efecto protector de la cistamina sobre el daño que el  $\text{CCl}_4$  hace al P-450, es que éste debe estar mediado por los  $\cdot\text{CCl}_3$  y no por el proceso de peroxidación de lípidos, puesto que el efecto protector de la cistamina se observó a tiempos en los cuales ésta inhibe la transformación a  $\cdot\text{CCl}_3$  y no la peroxidación.

Las hipótesis acerca de cómo se origina la necrosis que produce el  $\text{CCl}_4$  han estado dominadas en el curso de los últimos años por la idea de que el proceso de peroxidación de lípidos de los componentes membranosos y el daño que los mismos son capaces de hacer eran los responsables de las alteraciones que terminan en necrosis (8,72). No obstante varios autores sembraron dudas acerca de que su importancia sea tan grande como se pensaba (73, 74, 75, 76, 77). La dificultad en discriminar cuál es la importancia relativa de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y de peroxidación en los daños que llevan a la necrosis reside fundamentalmente en el hecho de que ambos fenómenos ocurren simultáneamente y que siendo los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  los que desatan la peroxidación, parece difícil modificar uno de esos

parámetros sin cambiar al otro también. Una nueva perspectiva dentro de éste panorama la abren los experimentos con cistamina, puesto que éste compuesto es capaz de modificar la intensidad de la formación de radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y en cambio altera mucho menos a la peroxidación. Dado que la inhibición de la activación del  $\text{CCl}_4$  a radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  por la cistamina es no competitiva, los datos obtenidos con la dosis traser de  $^{14}\text{CCl}_4$  son igualmente válidos para dosis tóxicas y por lo tanto el hecho de que la cistamina disminuya en un 40% la activación a radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  sin disminuir la peroxidación a las 3 horas significa que sólo una pequeña parte de los  $\cdot\text{CCl}_3$  son necesarios para desatar la peroxidación. A tiempos más largos que 3 horas la cistamina disminuye en parte también la peroxidación pero su efecto es pequeño comparado con el que ejerce sobre la activación a radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y por lo tanto la acción notablemente protectora que la cistamina tiene sobre la necrosis parecería más vinculada a su capacidad de disminuir la cantidad de radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  que a la peroxidación, de allí que se piense que la importancia de los  $\cdot\text{CCl}_3$  es mayor. La protección ejercida por la cistamina contra la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  parece por lo tanto estar más relacionada con la disminución de la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales que con los cambios en la peroxidación de lípidos, sugiriendo que el efecto de los radicales libres iniciales  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  sería más importante que la peroxidación de lípidos en el desarrollo de la necrosis. Es interesante hacer notar que la capacidad protectora de la cistamina no aparenta poder atribuirse a otros efectos que se sabe influyen en el grado de necrosis que es capaz de producir el  $\text{CCl}_4$  tales como el descenso de la temperatura corporal, la estabilización de mitocondrias o lisosomas, etc. (7). En efecto, se sabe que la disminución de la temperatura sólo conduce a una demora en el desarrollo de la necrosis, pero que ella fatalmente se observa a las 48 o a las 72 horas. En el caso de la cistamina, la protección se observa tanto a las 48 como a las 72 horas y por lo tanto puede descartarse un efecto de éste tipo.

Tampoco puede invocarse un efecto estabilizante sobre mitocondrias puesto que la cistamina por sí misma también produce hincha-

zón mitocondrial como el  $\text{CCl}_4$  (48) y tampoco porque estabilice lisosomas, puesto que aquí se encontró que no sólo no los estabiliza sino que aún los labiliza a la acción del  $\text{CCl}_4$ . Tampoco puede pensarse que dificulte el acceso del  $\text{CCl}_4$  al hígado puesto que los niveles del mismo son iguales en animales controles que en los tratados con cistamina.

Por lo tanto, a la luz de todos los elementos de juicio analizados, la acción protectora de la cistamina parece deberse fundamentalmente a que disminuye considerablemente la activación del  $\text{CCl}_4$  a radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y el hecho de que así lo sea, sugiere que la unión irreversible del radical  $\cdot\text{CCl}_3$  a componentes lipídicos u otros puede ser tanto o más importante con respecto a la necrosis que la peroxidación de lípidos.

En lo que respecta a la posibilidad de que la cisteína compartida con la cistamina sus propiedades de inhibir el proceso de activación del  $\text{CCl}_4$  con la ventaja de ser no tóxico, podemos decir lo siguiente: los resultados obtenidos indican que la cisteína no comparte con la cistamina su capacidad de disminuir la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales. A pesar de éstos resultados, la administración previa de cisteína redujo efectivamente la magnitud de la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a las proteínas microsomales solamente 6 horas después del tratamiento. Dado que resultados previos mostraron que la mayor parte del  $^{14}\text{CCl}_4$  unido a las proteínas microsomales proviene de una interacción entre éstas proteínas con los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  derivados de un único paso de activación, en tanto que el resto está causado por una interacción de naturaleza no específica (69), los estudios presentes aparentarían ser contradictorios. Sin embargo, esto no es necesariamente así, dado que la protección parcial por cisteína de la unión de  $^{14}\text{CCl}_4$  a proteínas microsomales puede ser fácilmente concebida como el resultado de un bloqueo temporal de un sitio determinado de la proteína, con el resultado de una protección parcial de éste sitio contra la acción destructora del  $\cdot\text{CCl}_3$  (por ejemplo, el sitio en cuestión podría ser un grupo SH que forma un disulfuro mixto con la cisteína y que luego se transforma nuevamente a la forma SH). Alternativamente, la reducción en la extensión de la unión irreversible



del  $^{14}\text{CCl}_4$  a las proteínas causada por la administración previa de cisteína, podría estar limitada a una unión de naturaleza no específica. Además de la falta de efecto de la cisteína sobre el paso de activación del  $\text{CCl}_4$ , éste compuesto no modifica el proceso de peroxidación de lípidos producido por el  $\text{CCl}_4$  ni la extensión de la destrucción del citocromo P-450.

Un hallazgo interesante es que la cisteína previno parcialmente la disminución de la actividad de la G6P-asa producida por el  $\text{CCl}_4$ , a pesar de que no inhibió el paso de activación del  $\text{CCl}_4$ . Este hallazgo fue sorprendente, dado que resultados anteriores habían demostrado que la prevención de la actividad de la G6P-asa por algunos compuestos, como por ejemplo la cistamina, estaba acompañada por una marcada inhibición del paso de activación del  $\text{CCl}_4$ , y que además otras líneas de evidencia sugerían que la G6P-asa es destruida por los radicales libres  $^{\bullet}\text{CCl}_3$  y  $^{\bullet}\text{Cl}$  producidos durante la activación del  $\text{CCl}_4$ . Esta observación aparentemente contradictoria podría ser explicada si se supusiera que la cisteína bloquea reversiblemente un sitio determinado en la porción proteica de la molécula de G6P-asa relacionada de alguna manera con su actividad enzimática en forma similar a lo postulado anteriormente para la prevención de la unión irreversible del  $^{14}\text{CCl}_4$  a las proteínas microsomales. En relación a ésta posibilidad, es interesante destacar que la cisteína mostró por sí misma un efecto transitorio sobre la actividad de la G6P-asa, observable a las 3 horas pero no a las 6 horas.

A pesar de la falta de eficacia de la cisteína para bloquear tanto el proceso de activación del  $\text{CCl}_4$  a  $^{\bullet}\text{CCl}_3$  como la peroxidación de lípidos y de haber sido postuladas éstas alteraciones moleculares como iniciadoras del proceso que conduce a la necrosis (7, 8), este compuesto probó ser la sustancia más efectiva de todas las estudiadas hasta el presente para prevenir la necrosis. Más aún, ésta fue efectiva aún cuando se la administró terapéuticamente, es decir, después del  $\text{CCl}_4$ .

Es importante hacer notar que el efecto antinecrótico del pretratamiento con cisteína sobre la necrosis observada 24 horas después de la administración de  $\text{CCl}_4$  no puede deberse a una mera demora en el desarrollo de la misma, como se sabe que ocurre en el caso

de la protección producida por disminución de la temperatura corporal (78,79), dado que también se observaron efectos protectores similares de la cisteína contra la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  a las 48 y 72 horas después de la administración de  $\text{CCl}_4$ . Más aún, el efecto protector de la cisteína no puede atribuirse a una disminución en las cantidades de  $\text{CCl}_4$  que llegan al hígado, dado que las concentraciones de  $\text{CCl}_4$  en este órgano a diferentes tiempos después de su administración no fueron significativamente modificadas por el tratamiento previo con cisteína.

Slater (7) había señalado previamente que hay muchas maneras de prevenir la necrosis inducida por  $\text{CCl}_4$ . De acuerdo con lo que indican éstos experimentos, la cisteína previene el desarrollo del proceso necrótico no por interferencia con los pasos iniciales tales como el de activación del  $\text{CCl}_4$  ó como el de peroxidación de lípidos, sino en un paso subsiguiente, cuya naturaleza es aún desconocida. Este mecanismo propuesto explicaría por qué la cisteína administrada después del  $\text{CCl}_4$  es aún efectiva, a pesar de que ya ha ocurrido gran parte de la activación a  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  y la peroxidación de lípidos.

Los experimentos aquí presentados no permiten definir cuál es el evento químico preciso que es prevenido por la cisteína, cuya importancia es tan grande para el desarrollo de la necrosis, aunque existe también la posibilidad de que la prevención por cisteína de la unión irreversible del  $\text{CCl}_4$  a alguna proteína celular cumpla algún rol en la protección contra la necrosis.

A pesar de esta falla en el conocimiento del mecanismo del efecto protector de la cisteína, su uso en el tratamiento de la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  es muy prometedor, debido a su aparente eficacia y poca toxicidad y además porque su efectividad podría estar aumentada por su combinación con otros antidotos de acción más específica, por ejemplo aquéllos que actúan sobre la activación del  $\text{CCl}_4$  o la peroxidación de lípidos.

RESUMEN

- 1) La cistamina, un conocido antídoto contra radiaciones, protegió a las ratas contra las lesiones hepáticas producidas por el  $\text{CCl}_4$ ; en efecto, disminuyó la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a lípidos microsomales, previno parcialmente la destrucción del citocromo P-450 producida por el  $\text{CCl}_4$  y la disminución de las actividades de la etil morfina demetilasa y la glucosa 6-fosfatasa de microsomas de hígado que este tóxico ocasiona. La cistamina no previno la peroxidación de lípidos inducida por el  $\text{CCl}_4$  a las 3 horas, pero ejerció su efecto protector desde las 6 horas en adelante. También atenuó el aumento de peso de hígado, la intensidad del hígado graso y disminuyó significativamente la necrosis hepática producida por el  $\text{CCl}_4$ .
- 2) La cistamina prolonga el tiempo de sueño producido por pentobarbital, lo cual indica que afecta a las enzimas que metabolizan sustancias extrañas al organismo. La cistamina y la cisteamina interaccionan con componentes de dicho sistema enzimático tal como el citocromo P-450 dando cambios espectrales tipo II y su acción es no competitiva con la del  $\text{CCl}_4$ . La cistamina altera significativamente el contenido de citocromo P-450 del hígado de ratas después de las 6 horas de su inyección y afecta la actividad de la citocromo P-450 reductasa a las 6 horas de administrado.
- 3) De acuerdo con los resultados obtenidos utilizando a la cistamina como herramienta de trabajo, y teniendo en cuenta trabajos previos de otros autores y de nuestro laboratorio, la secuencia de hechos que ocurren durante la intoxicación por  $\text{CCl}_4$  y que finalmente llevan a la necrosis hepática serían:
  - a) El  $\text{CCl}_4$  llega al hígado y allí se combina con el citocromo P-450 oxidado presente en el retículo endoplásmico para dar un complejo  $\text{CCl}_4/\text{P-450 (ox)}$ ; este complejo luego sería reducido por el NADPH en una reacción catalizada por la citocromo P-450 reductasa; en el curso de este proceso de reducción se formarían los radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$ . Alternativamente, es factible ima

- ginar que los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  se forman por la reacción del  $\text{CCl}_4$  con el citocromo P-450 previamente reducido por acción del NADPH en presencia de la citocromo P-450 reductasa.
- b) Estos radicales libres  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  reaccionan con dobles ligaduras de lípidos, con cisteína y metionina de proteína y presumiblemente con otros componentes celulares no establecidos.
  - c) Una pequeña parte de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  actúa sobre los lípidos no saturados transformándolos en radicales libres e iniciando un proceso de peroxidación de lípidos.
  - d) La unión de los radicales  $\cdot\text{CCl}_3$  y  $\cdot\text{Cl}$  con los componentes lipídicos, proteicos u otros no identificados del retículo endoplásmico destruye la actividad de la glucosa 6-fosfatasa y la del citocromo P-450 por un lado, en tanto que la fijación de  $\cdot\text{CCl}_3$  a lípidos y proteínas de las membranas de los componentes ultraestructurales podría alterar la polaridad de sus componentes lipídicos. Un efecto del mismo tipo que este último pero de menor intensidad, podría ser ocasionado por la peroxidación de lípidos. La Fig. 26 ilustra la secuencia en que se desarrollan los eventos que conducen a la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  en hígado.
- 4) Dado que la cistamina no fue efectiva en prevenir los daños hepáticos producidos por el  $\text{CCl}_4$  cuando se la administró en forma terapéutica, se estudiaron los efectos de la cisteína sobre dicha intoxicación. Pudo determinarse que ésta no disminuye la unión irreversible del  $^{14}\text{C}$  del  $^{14}\text{CCl}_4$  a los lípidos microsomales pero sí a las proteínas microsomales, no modifica el proceso de peroxidación de lípidos producido por el  $\text{CCl}_4$  ni la extensión de la destrucción del citocromo P-450. La cisteína previno parcialmente la disminución de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa producida por el  $\text{CCl}_4$ , probablemente debido a una acción directa sobre la molécula de la enzima.
- A pesar de la falta de eficacia de la cisteína para bloquear tanto el proceso de activación del  $\text{CCl}_4$  como la peroxidación de lípidos, protegió contra la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  en hígado.

MECANISMO DE LA NECROSIS POR CCl<sub>4</sub>  
 (como se postula actualmente)

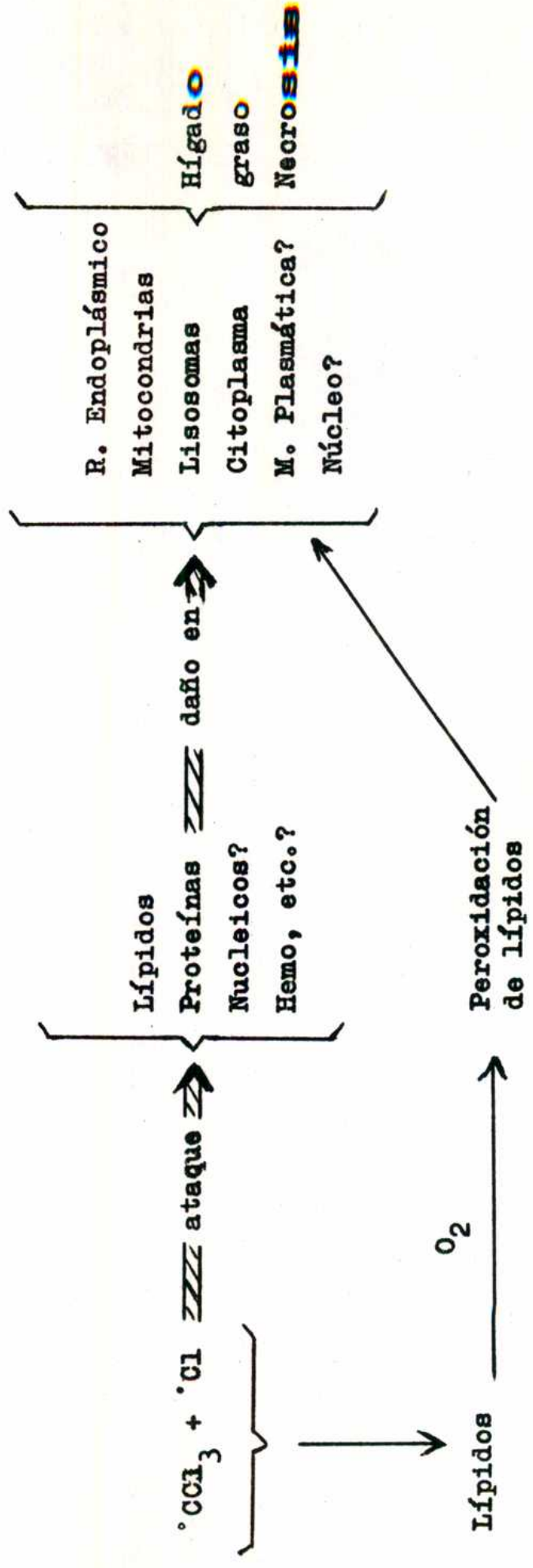
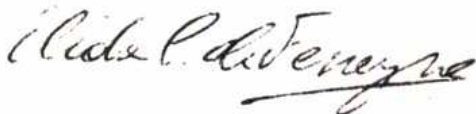


Fig. 26

do y el hígado graso lo cual indicaría que la cisteína previene el desarrollo del proceso necrótico no por interferencia con los pasos iniciales del mismo tales como el de activación del  $\text{CCl}_4$ , o el de peroxidación de lípidos, sino en un paso subsiguiente, cuya naturaleza es aún desconocida. No obstante, la cisteína fue efectiva en proteger contra la necrosis producida por el  $\text{CCl}_4$  cuando se la administró terapéuticamente.



Lic. Elida Virginia Cignoli  
de Ferreyra



Dr. José Alberto Castro

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Von Oettingen, W., The Halogenated Hydrocarbons of Industrial and Toxicological Importance, Elsevier, Amsterdam (1964).
- 2.- Dawkins, M., J. Path. Bact. 85, 189 (1963).
- 3.- Slater, T.F., Biochem. Pharmacol. 14, 178 (1965).
- 4.- Lester, D. y Greemberg, L., Arch. Industrial Hyg. 2, 335 (1950)
- 5.- Brauer, R., The Biliar System. 101 NATO Symposium. New Castle (1963).
- 6.- Mc Lean. A., Mac Lean y Judah, J., Intern. Rev. Exptl. Path. 4, 127 (1965).
- 7.- Slater, T.F., Nature 209, 36 (1966).
- 8.- Recknagel, R., Pharmacol. 19, 145 (1967).
- 9.- Smuckler, E., Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells, Universitetsforlaget, Oslo (1968).
- 10.- Gillette, J.R., Progress in Drug Research 6, 11 (1963).
- 11.- Jondorf, W., Maikel, R y Brodie, B., Biochem. Pharmacol. 1, 352 (1958).
- 12.- Brodie, B., Gillette, J.R. y La Du, B., Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958).
- 13.- Mc Collister, D., Beamer, W. y Atchinson, G., J. Pharmacol. Exptl. Ther. 102, 112 (1951).
- 14.- Paul, B. y Rubinstein, D., J. Pharmacol. Exptl. Ther. 141, 141 (1963).
- 15.- Butler, T., J. Pharmacol. Exptl. Ther. 134, 311 (1961).
- 16.- Comporti, M., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 41, 222 (1965).
- 17.- Comporti, M., Rita, G y Della Corte., Bol. Soc. Ital. Biol. Sper. 41, 678 (1965).
- 18.- Comporti, M., Saccoci, C. y Dianzani, M., Enzymology 29, 185 (1965).
- 19.- Dianzani, M., Baccino, F. y Comporti, M., Lab. Invest. 15, 149 (1966).
- 20.- Recknagel, R. y Ghoshal, A., Lab. Invest. 15, 132 (1966).
- 21.- Recknagel, R. y Ghoshal, A., Nature 210, 1162 (1966).
- 22.- Recknagel, R. y Ghoshal, A., Exptl. Molec. Pathol. 5, 108 (1966).

- 23.- Gallager, C., *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40, 241 (1962).
- 24.- Hofften, P., Hunter, F., Gebicki, J. y Weinstein, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 276 (1962).
- 25.- Desai, I. y Tappel, A., *Lipid Res.* 4, 204 (1963).
- 26.- Hochstein, P. y Ernster, L., *Cellular Injury. Ciba Simposio*, J. y A. Churchill. Londres (1964).
- 27.- Recknagel, R. y Ghoshal, A., *Lab. Invest.* 15, 132 (1966).
- 28.- Wittingk, L., *Fed. Proc.* 24, 912 (1965).
- 29.- Judah, J. D., *British Med. Bull.* 25, 19 (1969).
- 30.- Thiers, R., Reynolds, E. y Vallee, R., *J. Biol. Chem.* 235, 2130 (1960).
- 31.- Alpers, D. e Isselbacher, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 132, 33 (1967).
- 32.- Sato, R., Omura, T. y Nishibayashi, H., *Oxydases and Related Redox Systems* (King, T., Mason, H. y Morrison, ed.) p.861. J. Wiley, N. Y. (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., Narashimulu, D., Cooper, Y. y Rosenthal, O., *Molec. Pharmacol.* 2, 187 (1966).
- 36.- Mc Lean, A., *Biochem. Pharmacol.* 16, 2030 (1967).
- 37.- Castro, J.A., Sasame, H. y Gillette, J. R., *Pharmacologist* 9, 203 (1967).
- 38.- Castro, J. A., Sasame, H., Sussman, H. y Gillette, J. R., *Life Sci.* 2, 129 (1968).
- 39.- Smuckler, E., Arrhenius, H. y Hultin, T., *Biochem. J.* 103, 55 (1967).
- 40.- Sasame, H., Castro, J. A. y Gillette, J. R., *Biochem. Pharmacol.* 17, 1759 (1968).
- 41.- Reynolds, E., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 155, 117 (1967).
- 42.- Reynolds, E. y Yee, A., *Lab. Invest.* 16, 591 (1967).



- 43.- Cignoli, E. V. y Castro, J. A., Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 625 (1971).
- 44.- Cignoli, E. V. y Castro, J. A., Exp. Mol. Pathol. 14, 43 (1971).
- 45.- Gordis, E., J. Clin. Invest. 48, 203 (1969).
- 46.- Villarruel, M. C. y Castro, J. A., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 105 (1975).
- 47.- Keller, F., Snyder, A., Petracek, F. y Sancier, K., Biochem. Pharmacol. 20, 2507 (1971).
- 48.- Bacq, Z., Chemical Protection against Ionizing Radiation, p. 75-139. Thomas Springfield, Illinois (1965).
- 49.- Ormerod, M. G. y Alexander, D., Radiation Research, 18, 495 (1963).
- 50.- Foye, W. O., J. Pharmaceut. Science. 58, 283 (1969).
- 51.- Patt, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. y Smith, D. E., Science, 110, 213 (1949).
- 52.- Castro, J. A. y Gillette, J. R., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 426 (1967).
- 53.- Appelmans, F., Wattiaux, R. y De Duve, C., Biochem. J. 59, 438 (1955).
- 54.- Linhardt, K. y Walter, K., Methods in Enzymatic Analysis (Ed. H. U. Bergmeyer) p. 783. Academic Press, New York (1963).
- 55.- Kalnitsky, G., Hummel, J. P. y Dierks, C., J. Biol. Chem. 234, 1572 (1959).
- 56.- Harper, A., Methods of Enzymatic Analysis (Ed. H. U. Bergmeyer) p. 788. Academic Press, New York (1963).
- 57.- Gigon, P., Gram, T. y Gillette, J. R., Mol. Pharmacol., 5, 109 (1969)
- 58.- Lineweaver, H. y Burk, D. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
- 59.- Sterkel, R. L. Spencer, J.A. Wolfson, S.K. y Williams-Ashman, H. H., J. Lab. Clin. Med. 52, 176 (1958)
- 60.- Recknagel, R. y Litteria, M., Ann, J. Pathol. 36, 521 (1960).
- 61.- Klaassen, C. y Plaa, G., Biochem. Pharmacol. 18, 2019 (1969).
- 62.- Baccino, F., Rita, G. y Dianzani, M., Enzimologia 29, 169 (1965).

- 63.- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. J., Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 64.- Layne, E., en Methods in Enzymology (Ed. S Colowick y N. Kaplan) Vol. 3, p. 448. Academic Press, New York (1957).
- 65.- Bancroft, H. Introducción a la Bioestadística, p. 205. Eudeba, Buenos Aires. (1960).
- 66.- Brownlee, K. A. Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering, P. 378. Wiley, New York (1960).
- 67.- Rümke, C. L. y De Jonge, H. Evaluation of Drug Activities Vol. 1, Pharmacometrics. (Ed. D. Laurence y A. L. Bacharach). p. 80 Academic Press, Londres (1964).
- 68.- Lewis, A. Bioestadística. p. 77. Reinhold, New York (1966).
- 69.- Castro J. A. y Díaz Gómez, M. I., Toxicol. Applied Pharmacol. 23, 541 (1972).
- 70.- Holtzman, J., Gram, T., Gigon, P. y Gillette, J. R., Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 27, 838 (1968).
- 71.- Ghoshal, A. K. y Recknagel, R. O., Life Sci. 4, 2195 (1965).
- 72.- Dianzani, M. Il Fegato, 16, 1 (1970).
- 73.- Scheig, R. y Klatskin, G., Life Sci. 8, 855 (1969).
- 74.- Saslaw, L., Corwin, L. y Waravdckor., Arch. Biochem. Biophys. 114, 61 (1965).
- 75.- Green, J., Bunyan, Cawthorne, N. y Diplock, A., Brit. J. Nutr. 23, 297 (1969).
- 76.- Bunyan, J., Cawthorne, A. Diplock, A. y Green, J., Brit. J. Nutr. 23, 309 (1969).
- 77.- Keller, F., Snyder, A., Petracok, F. y Sancier, K., Biochem. Pharmacol. 20, 2507 (1971).
- 78.- Rice, A. J. y Plaa, G. L., Toxicol. Appl. Pharmacol. 12, 194 (1968).
- 79.- Rice, A. J. y Plaa, G. L., Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 151 (1969).