

Tesis de Posgrado

Estudios sobre el mecanismo de daño celular hepático producido por el tetracloruro de carbono

Bernacchi, Adriana Silvina

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bernacchi, Adriana Silvina. (1982). Estudios sobre el mecanismo de daño celular hepático producido por el tetracloruro de carbono. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1748_Bernacchi.pdf

Cita tipo Chicago:

Bernacchi, Adriana Silvina. "Estudios sobre el mecanismo de daño celular hepático producido por el tetracloruro de carbono". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1748_Bernacchi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE DAÑO CELULAR
HEPÁTICO PRODUCIDO POR EL TETRACLORURO DE
CARBONO

ADRIANA SILVINA BERNACCHI

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 1982 -

A MIS PADRES

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE AL DOCTOR JOSE
ALBERTO CASTRO, DIRECTOR DE ESTA TESIS, SUS
ENSEÑANZAS, SU ATENCION Y TODO EL ENTUSIASMO
QUE ME BRINDO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE
TRABAJO.

AL DOCTOR JULIO MARCOS AZCURRA, CONSEJERO DE ESTUDIOS, LE AGRADEZCO EL HABERME ORIENTADO EN LA ELECCION DE LAS MATERIAS Y APOYADO CON SU ENTUSIASMO EN LA REALIZACION DEL TRABAJO. AGRADEZCO TAMBIEN A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES TOXICOLÓGICAS, LA CONSTANTE COLABORACION Y APOYO EN EL DESARROLLO DE LAS TAREAS DIARIAS.

I N D I C E

INTRODUCCION	pág. 1
PARTE EXPERIMENTAL	pág. 40
RESULTADOS	pág. 56
DISCUSION	pág.113
BIBLIOGRAFIA	pág.124

I N T R O D U C C I O N

En la industria, la agricultura, el control de las enfermedades y en el hogar el hombre utiliza un gran número de sustancias químicas. Vivimos rodeados por cantidades crecientes / de productos químicos (aditivos de alimentos, pesticidas, fertilizantes, cosméticos, drogas terapéuticas, etc.) muchos de los cuales son peligrosos para la salud humana y el ambiente, aún / en pequeñas cantidades.

Se han identificado alrededor de cuatro millones de sustancias químicas y muchos cientos de nuevos productos químicos se descubren cada año. Si bien algunas de estas sustancias son curiosidades de laboratorio, otras muchas (más de 60.000) son de uso comercial y varios miles se introducen anualmente con éste fin.

No existe ninguna duda que muchos productos químicos han sido benéficos para el hombre y su ambiente, otros, sin embargo, han causado efectos dañinos inesperados.

Algunas sustancias químicas entran en el ambiente y llegan al hombre a través de caminos complejos e interrelacionados. Los fertilizantes, pesticidas y herbicidas entran en el ambiente como resultado de una aplicación directa, otras sustancias lo / hacen por procesos de combustión (hidrocarburos policíclicos, / etc.), y un tercer grupo aparece como resultado de la manufactura, transporte y consumo de todos los productos de la sociedad moderna.

Luego que la sustancia química ha entrado en el ambiente, puede ser diluída o concentrada por fuerzas físicas, puede también sufrir cambios químicos, incluyendo la combinación con otras sustancias que pueden modificar su peligrosidad.

Puede incorporarse a los organismos vivos, en donde se // puede transformar, acumular y/o eliminar.

El resultado de las interacciones entre los organismos vivos y las sustancias químicas es imprevisible; pero esas interacciones pueden originar compuestos que resultan más peligro- / sos que los contaminantes iniciales.

Podemos definir a un tóxico como un agente capaz de produ- / cir una respuesta nociva en un sistema biológico o capaz de des- / truir la vida o dañar seriamente una función, bajo ciertas con- / diciones y circunstancias. (1)

Una de las maneras de desentrañar los mecanismos fisioló- / gicos y bioquímicos involucrados en la reacción de células vi- / vas con respecto a un agente químico tóxico, es la de estudiar las reacciones de esas células ante un tóxico de estructura mo- / lecular simple, evitando así agregar complejidades inherentes / al compuesto.

En los últimos cincuenta años muchos investigadores han / estado interesados en revelar los mecanismos involucrados en el daño biológico causado por el tetracloruro de carbono. Por / ese motivo, los datos informativos acumulados con respecto a este tóxico son mayores que para cualquier otro agente químico.

El interés mayor en las primeras épocas se centralizó en

la acumulación grasa (hígado graso) asociada con la exposición al tetracloruro de carbono. Consecuentemente, los esfuerzos mayores en la investigación fueron orientados al metabolismo graso y a las enzimas involucradas en ese proceso. Más adelante, el interés por determinar el mecanismo de acción de la droga // creció paralelamente con el desarrollo de las habilidades bioquímicas para desentrañar las distintas funciones de las organelas celulares.

Si bien, la importancia que se le ha dado a la investigación de los mecanismos de intoxicación por el tetracloruro de / carbono podría creerse desmesurada, es importante reconocer que un tóxico puede transformarse en un instrumento útil para el análisis de la estructura viviente.

Esta es la causa por la cual se ha realizado una extensa investigación en patología experimental con respecto al tetracloruro de carbono.

Este compuesto químico representa así una notable ventaja al poder revelar reacciones de sustratos celulares complicadas y sutiles que de otra manera quedarían oscurecidas ante // las respuestas a múltiples metabolitos de una sustancia tóxica más compleja.

Por ello se considera que el efecto del tetracloruro de carbono sobre el hígado constituye lo que se denomina un sistema modelo para el entendimiento de las alteraciones que un agente tóxico pueda causar en el hígado y que llevan a la muerte celular, convirtiéndose el tetracloruro de carbono en una sustan-

cia de referencia cuando se comparan sus efectos con aquellos obtenidos con otros agentes tóxicos.

Una vez conocidos los pasos que llevan a la muerte celular es posible con la utilización de distintos compuestos con propiedades y características diferentes interferir con dicha secuencia; desarrollando así antídotos y tratamientos contra la acción del tóxico inhibiendo parcial o totalmente el desarrollo de la necrosis o revirtiendo el proceso.

HIGADO : Consideraciones morfológicas y funcionales.

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo; ubicado en la cavidad abdominal, de color pardo rojizo, está rodeado por una cápsula de tejido conectivo (cápsula de Glisson); constituido por un cierto número de lóbulos de tamaño desigual.

Embriológicamente el hígado deriva del tracto intestinal y, mantiene su conexión con el sistema gastrointestinal a través del conducto biliar en el adulto.

El producto exócrino más importante del hígado es la bilis, que es descargada en el duodeno. La bilis es necesaria para la emulsión de grasas en el momento de su absorción a través del epitelio intestinal.

El hígado posee la capacidad de servir como reservorio de sangre, ya que presenta una rica red de capilares sanguíneos sinusoidales. Estos sinusoides reciben la sangre de la vena porta, que también lleva la sangre al intestino, estómago, bazo y páncreas. La sangre arterial es descargada también a los sinusoi-

des por medio de arterias hepáticas, que derivan de la aorta. / Los sinusoides son drenados por venas hepáticas que se vacían / en la vena cava inferior.

Desde el punto de vista vascular el hígado está interpuesto en el recorrido venoso entre el tracto gastrointestinal y la vena cava inferior. Este hecho es ventajoso para el órgano en relación con las funciones que realiza.

El hígado acumula grasas e hidratos de carbono, manteniendo el nivel de azúcar en sangre mediante el metabolismo de los carbohidratos. Es capaz de sintetizar grasas, varias clases de proteínas y urea, activar muchos agentes químicos, actuar como detoxificante de sustancias extrañas al organismo, etc. (2)

MICROANATOMIA

La forma clásica de presentar las relaciones entre la célula hepática, su vascularización y el sistema biliar ha sido / la configuración del lobulillo hexagonal con un diámetro del 1 ó 2 mm y un número de alrededor de un millón en el hígado humano.

Rappaport y colaboradores (3) señalaron que ese concepto había sido introducido por Kiernan en el año 1833.

El lobulillo hepático se presenta en libros de texto como una unidad anatómica del hígado; constituido por células de forma poliédrica (hepatocitos) que se encuentran unidas formando / láminas celulares convergentes hacia la vena hepática terminal (vena central) ubicada en el centro del lobulillo.

El espacio presente entre las láminas convergentes está ocupado por los sinusoides, quedando en cada ángulo del lobulillo hexagonal el espacio portal, conteniendo la ramificación de la vena porta, una arteriola hepática, un conducto biliar, vasos linfáticos y nervios rodeados de tejido conectivo; siendo los primeros tres constituyentes lo que se conoce con el nombre de triada portal. (Fig. 1)

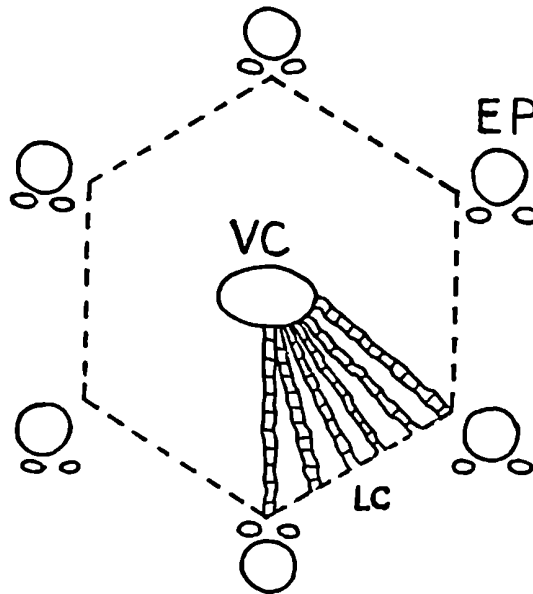


Fig.1: Esquema del lobulillo hexagonal.

EP: espacio portal
 VC: vena central (vena hepática terminal).
 LC: Láminas celulares.

Los canalículos biliares o capilares biliares, son canales submicroscópicos que se encuentran entre dos hepatocitos adyacentes. Representan un sistema de túbulos intercelulares, hacen

cia donde la bilis es secretada. En la periferia del lobulillo el canalículo biliar se vacía en los conductos biliares interlobulillares, que acompañan a los vasos sanguíneos del área portal y dejan el hígado como conductos biliares hepáticos (derecho e izquierdo).

La microanatomía descrita es nítida en secciones histológicas del cerdo; pero no es apreciada tan claramente en el caso de otros animales como por ejemplo en la rata.

Si bien la arquitectura geométrica es generalmente aceptada, no es compartida por todos los investigadores sobre la base de las diferencias estructurales manifestadas en las diferentes especies, las investigaciones histopatológicas y los análisis funcionales realizados.

En el año 1888 Sabourin (4) cuestionó la postura de Kiernan, enfatizó la función exócrina del hígado, y describió una unidad hepática secretoria que representa la cantidad de parénquima hepático que es drenado por el conducto biliar en una triada portal.

Años más tarde Mall (1906) (5) describió la unidad portal y su punto de vista fue adoptado por Any (1932) (sin separarse del concepto microanatómico de Kiernan) y Opie (1944) (6).

En 1949, Hans Elias (7), definió al hígado como una masa continua de células parenquimáticas atravesada por vasos por donde la sangre pasa del intestino al corazón.

El parénquima se distribuye entre estos vasos formando un sistema de paredes. Estas paredes son de una célula de espesor

en mamíferos y pájaros y predominantemente de dos en vertebrados inferiores. (8,9,10)

Los espacios entre las paredes parenquimáticas (platos o láminas hepáticas) se conocen como lagunas hepáticas. A través de las perforaciones de las láminas hepáticas, las lagunas son continuas, formando un laberinto hepático que ocupa, sin interrupción todo el órgano.

Se puede decir que el hígado entero es una lámina de hepatocitos, intensamente ramificada y frecuentemente recurrente; con una red tridimensional de sinusoides, suspendida en el laberinto.

Si bien el lobulillo hepático es observable histológicamente en el cerdo y no en el hígado del hombre; Elias describió que bajo condiciones normales de presión sanguínea se podía notar un ordenamiento radial de sinusoides y de láminas hepáticas alrededor de venas hepáticas, llamándolas venas centrales.

El territorio débilmente definido alrededor de la vena central constituye (por homología con el conocido para el cerdo) el lobulillo hepático.

La inyección de mezclas de gelatinas coloreadas por la vena porta o la arteria hepática ha mostrado que los vasos aferentes terminales suplen de sangre a algunos sectores de lobulillos hepáticos adyacentes. Estos sectores están situados alrededor de ramas portales terminales y extendidos desde la vena central de un hexágono a la vena central de otro hexágono.

Esto llevó al investigador Rappaport y sus colaboradores

(3) a definir la masa parenquimática en términos de unidades // funcionales llamadas acinos hepáticos. El acino hepático está constituido por una masa parenquimática pequeña, irregular en / forma y tamaño, ubicada alrededor de un eje consistente en: vena porta terminal, arteriola hepática, conducto biliar, vasos linfáticos y nervios. Este acino se encuentra entre dos o más venas hepáticas terminales (venas centrales) con las que sus ejes vascular y biliar interdigitan. Ocupa partes adyacentes de dos campos hexagonales vecinos. Las células hepáticas del acino están en contacto celular y sinusoidal con células de acinos adyacentes; a pesar de ello, son suplidas preferentemente por / los vasos que le corresponden.

Dentro del acino se han descrito tres zonas circulatorias // diferenciadas que se establecen de acuerdo a la distancia a la rama vascular terminal. (11;12)

Rappaport ha hecho una revisión del conocimiento de las actividades metabólicas diferenciales y lo ha relacionado con / su concepto sobre la circulación en el acino hepático. (13)

Concluyendo que la actividad de las enzimas respiratorias es particularmente alta en la zona cercana a los vasos aferentes (zona 1); mientras la zona 3 es particularmente rica en enzimas del retículo endoplásmico (zona cercana a la vena central).

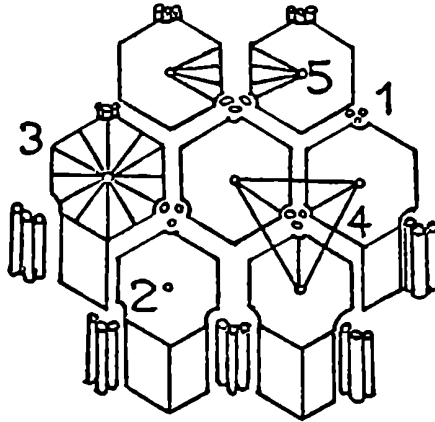


Fig. 2: Diagrama de una sección transversal de lobulillos hepáticos(14)

- 1- área portal.
- 2- vena central.
- 3- lobulillo hepático hexagonal clásico (las líneas representan las láminas / de células hepáticas y // los sinusoides).
- 4- lobulillo portal triangular.
- 5- acino hepático con forma de diamante.

Cualquiera de los conceptos señalados ofrece una forma diferente de entender la estructura y función del parénquima hepático. Ninguno es excluyente ni conflictivo y todos son útiles para el entendimiento de la arquitectura del hígado y su multitud de funciones. Fig. 2

El concepto de heterogeneidad enzimática en distintas cé-

lulas y en distintas zonas, si bien está en las primeras etapas de estudio, permitirá la racionalización de distintos mecanismos de acción en el desarrollo de lesiones hepáticas asociadas con agentes hepatotóxicos.

Siendo el lobulillo hepático la estructura geométrica unitaria más ampliamente aceptada y utilizada en las descripciones de tipo morfológico que se refieren al daño producido en el hígado por sustancias tóxicas, lo utilizaremos para explicar el / daño provocado por el tetracloruro de carbono.

VASOS SANGUINEOS Y LINFATICOS

Los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen del parénquima hepático junto con las fibras nerviosas y los conductos biliares en el espacio portal. La circulación sanguínea hepática baña las células hepáticas al pasar por los sinusoides, que forman una extensa red microvascular alrededor y a través / del parénquima hepático. La circulación va de la periferia del lobulillo hepático a la vena central.

Hay esencialmente tres sistemas de vasos en el hígado: 1-vena portal, 2-arteria hepática y 3-vena hepática. Del total / de sangre, las tres cuartas partes son provistas por la vena // porta y el resto por la arteria hepática.

Los sinusoides hepáticos (9-12 μ) están revestidos por // una única capa de células (capa extremadamente delgada). Las / células que la componen son de dos tipos : células endoteliales y células de Kupffer. (15)

Ambos tipos de células tienen una alta capacidad de fagocitosis. Por el hecho de poseer esta capacidad y por el alto / número de células de este tipo que hay en el hígado, representan la mayor parte del llamado sistema retículo endotelial.

CELULA HEPATICA (Fig. 3).

La célula hepática (14-16-17) es relativamente grande, de 15 a 20 μ de diámetro, de forma poliédrica irregular, con citoplasma rico en inclusiones y variable en su aspecto según el estado funcional. Dos de sus lados lindan con los sinusoides hepáticos y los otros con otras células hepáticas vecinas, formando entre ellas el canalículo biliar. En aquellos animales en / donde las paredes son de más de una célula de espesor, los canalículos biliares toman origen en el centro de cada dos trabéculas celulares contiguas. (8-9-10)

En la mayoría de los animales los hepatocitos están limitados por una única membrana, pero en otros es doble por ejemplo en hamsters.

En los bordes celulares que lindan con el espacio de Disse y en los canalículos biliares la membrana plasmática se / proyecta formando microvellosidades cortas. El espacio de Disse es un delgado espacio perisinusoidal que contiene manojos de fibras reticulares, y ocasionalmente células conocidas como lipocitos.

En los bordes celulares que lindan con el espacio de Disse son fácilmente observables invaginaciones (depressiones de

0.1 μ de ancho rodeadas de material más denso) micropinocíticas y vesículas redondeadas; ambas diferenciaciones sirven al proceso de toma y descarga de sustancias de alto peso molecular.

Cercana al canalículo biliar se observa la presencia del complejo de unión que mantiene a las células que lo forman en íntimo contacto, también se ha descrito la presencia de desmosomas.

El núcleo es grande, con forma esférica y localizado centralmente. Está limitado por una envoltura bien definida que / consiste en dos membranas separadas entre 40 y 50 μ de ancho. Esta doble membrana presenta un número variable de poros, que / permiten la comunicación entre el nucleoplasma y el citoplasma.

La cromatina en el núcleo interfásico se dispone: alrededor del nucleolo, dispersa en islotes en el núcleo y en asociación con la membrana nuclear formando la heterocromatina y las zonas menos densas corresponden a la eucromatina.

El nucleolo es fácilmente distinguible.

La apariencia granular del citoplasma mayormente se debe a un gran número de mitocondrias, relativamente pequeñas, redondeadas y elongadas.

Presentan una matriz electrónicamente densa, con crestas tubulares y algunos gránulos densos.

Los lisosomas están concentrados en el citoplasma alrededor del canalículo biliar. Son extremadamente pleomorfos y están de alguna forma relacionados con las funciones digestivas de la célula hepática, en el proceso de formación de bilis, etc.

Los peroxisomas o microcuerpos son comunes, presentan un nucleído nítido formado por microtúbulos y láminas. Se considera que estas organelas participan en el metabolismo de purinas, ruptura de colesterol y gluconeogénesis.

Las células hepáticas están provistas de una buena cantidad de retículo endoplásmico que consiste en membranas lipoproteicas organizadas en vesículas, túbulos y cisternas achatadas y apiladas extendiéndose como un sistema tridimensional a toda la célula. Las membranas tienen 50-70 Å de ancho y en algunas áreas tienen partículas de ribonucleoproteínas en su superficie. Estas partículas o gránulos son los ribosomas (involucrados en la síntesis proteica) y su presencia determina la identificación como retículo endoplásmico rugoso. También hay ribosomas libres que se presentan como monoribosomas o como polisomas.

El retículo endoplásmico liso consiste en una red de túbulos y vesículas de forma irregular y se encuentra preferentemente en la zona periférica de la célula, o en relación al área de glucógeno. Se lo considera involucrado en la formación de glucógeno, en la síntesis de colesterol y en los procesos enzimáticos que metabolizan sustancias extrañas al organismo.

El aparato de Golgi consiste en una serie de sacos voluminosos y curvos con los extremos dilatados; generalmente conteniendo gránulos pequeños amorfos.

Un número variable de vacuolas y vesículas de distintos / tamaños están asociadas con los sacos del Golgi.

La ubicación del aparato es cercana al canalículo biliar

pero, ocasionalmente puede observarse en otra posición en la célula. Su función es acumular y concentrar productos ricos en / proteínas que llegan del retículo endoplásmico y empaquetarlos como productos de secreción.

Partículas de glucógeno están generalmente asociadas con el espacio intertubular del retículo endoplásmico liso. El glucogeno puede presentarse como partículas aisladas (partículas β) o como grupos o rosetas (clusters) conocidas como partículas α (900 Å de diámetro).

Las gotas de grasa (alrededor de 1μ de diámetro) están / presentes en número variable en condiciones normales. Se forman por esterificación de los ácidos grasos libres y sirven como reserva de lípidos neutros .

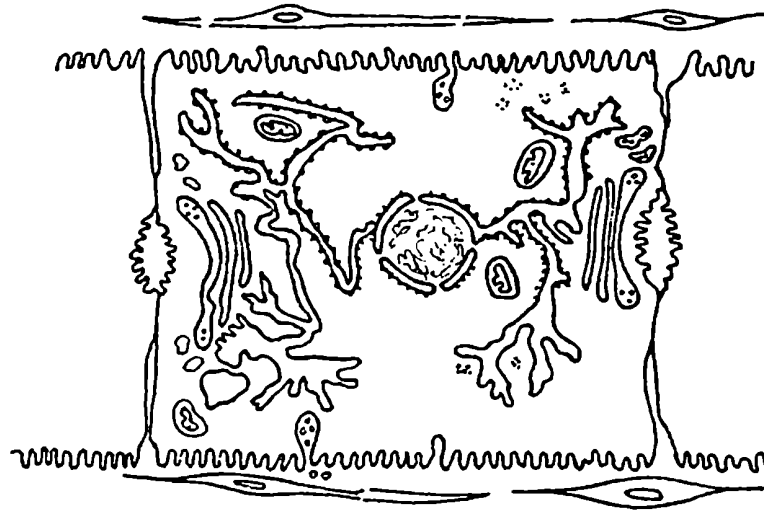


Fig.3: Representación diagramática de un hepatocito. (18)

METABOLISMO DE TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄)

El haberse encontrado que existe un proceso de activación del tóxico CCl₄ imprescindible para que ejerza sus efectos dañinos sobre el hígado, constituye uno de los conocimientos actuales más importantes en patología hepática experimental.

Varias fueron las causas que llevaron a los investigadores a creer en la existencia de un proceso de activación, algunas de las cuales se detallan a continuación:

Durante el proceso de intoxicación con CCl₄ se daña fundamentalmente el hígado. En otros órganos, como por ejemplo médula ósea, cerebro, tejido adiposo, donde las concentraciones del tóxico son mucho mayores, no hay evidencia de su acción. Es decir que hay una acción tóxica selectiva del CCl₄ que es independiente de su concentración, y puede estar relacionada con la // transformación que dicho compuesto sufre en el hígado.

Se ha establecido que el CCl₄ se metaboliza en el hígado dando cloroformo y dióxido de carbono (19-20-21) por acción del sistema enzimático presente en el retículo endoplásmico. (22-23)

El CCl₄ no causa efectos sobre el hígado de ratas recién nacidas (menores de 6 días), y animales de otras especies (24), a pesar que la concentración de la hepatotoxina en el hígado es muy similar a aquella que resulta dañina en el hígado de rata adulta.

Si el daño se debiera a una acción directa del CCl₄ sobre el órgano (por ejemplo una acción tipo solvente sobre los componentes lipídicos celulares) no podríamos explicar porqué

se daña el hígado de rata adulta y no ocurre lo mismo en los animales recién nacidos. Se conocen ciertos compuestos como el dicloroetileno ($\text{CH}_2 \text{Cl}_2$) que tienen propiedades como solventes lipídicos, pero que no producen necrosis hepática (24-25-26-//27); creyéndose entonces que el daño provocado por el CCl_4 no se debe a una acción directa del tóxico sobre el hígado.

Todo lo descrito sugiere que el hígado de rata recién nacida carece de alguna propiedad importante para la toxicidad de CCl_4 y confirma que la presencia del tóxico no es suficiente para causar necrosis en el parénquima hepático.

Es posible que por falta de alguna enzima actuante no se forme el metabolito reactivo responsable del daño en las células hepáticas. Esto es factible dado que durante los primeros días de vida hay muchas enzimas que faltan o que están presentes en una pequeña proporción.

Si ésta fuese la razón, podríamos observar la aparición de los efectos necrogénicos causados por el CCl_4 en relación con el aumento en la capacidad enzimática responsable de su activación.

La localización del daño causado por el CCl_4 es centrolobulillar, a pesar que las concentraciones del tóxico son mayores en la zona portal. En un primer momento se trató de explicar esa distribución del daño en el lobulillo hepático considerando que la anoxia producida por isquemia causa la necrosis.//
(28)

Pero, cuando se midió directamente el flujo sanguíneo he-

pático durante las primeras horas de intoxicación no se detectaron cambios significativos.

Esta hipótesis podría ser de importancia en etapas posteriores pero el daño temprano resultante de la intoxicación con CCl_4 precede a los cambios vasculares y es independiente de ellos. Es importante hacer notar que la localización centrolobulillar de la necrosis se obtiene en hígados perfundidos independientemente de que el flujo de perfusión se haga con entrada portal o central.

Brauer (29) mostró que la reversión en la dirección del flujo sanguíneo a través de un hígado aislado de rata (es decir la circulación tomó como sitio aferente la vena central y como eferente la vena portal) no afectó la localización de la necrosis.

Los investigadores Rogué y Fedorko (30) demostraron mediante técnicas de autoradiografía que existe una acumulación preferencial del tetracloruro de carbono unido irreversiblemente en la zona central del lobulillo hepático, si existiera una distribución preferencial en la zona central del lobulillo de enzimas responsables del proceso de activación del tóxico, los efectos en lo que se refiere a daño celular se verían sinergizados. Se conoce muy bien que hay heterogeneidad lobulillar en la actividad enzimática. Por ejemplo, se sabe que las reacciones ligadas a flavinas se encuentran concentradas en la región central del lobulillo hepático.

Las alteraciones más tempranas bioquímicas y ultraestruc-

turales no se puedan explicar por una acción solvente sobre las organelas celulares, ya que ellas ocurren en el retículo endoplásmico y no en otras organelas como mitocondrias o lisosomas a las que el tetracloruro de carbono llega. (28-31-32-33)

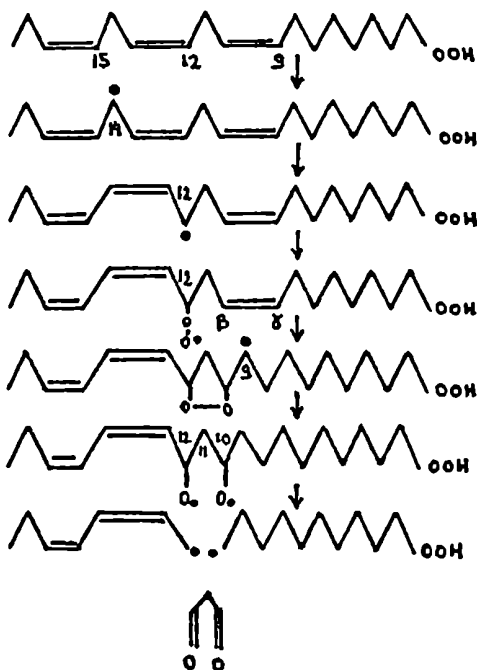
Si la activación del tetracloruro de carbono fuese condición necesaria para la producción de daño, parecería lógico pensar que el proceso ocurriese principalmente en el retículo endoplásmico, ya que los sistemas enzimáticos presentes en las membranas podrían dar cuenta de la producción de radicales libres a partir del tóxico, dando una cadena de reacciones no controlada y potencialmente dañina.

Los estudios realizados por Recknagel y colaboradores (34-35-36) determinaron que el tetracloruro de carbono "in vitro" aumentaba la peroxidación de lípidos en homogenatos de hígado. Este fenómeno requiere que el CCl_4 sufra un proceso de activación por radicales libres.

PEROXIDACION DE LIPIDOS

Según la hipótesis establecida de la peroxidación de lípidos; el tetracloruro de carbono se activaría a radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ y $\cdot\text{Cl}$ mediante la acción de enzimas del retículo endoplásmico. Estos radicales (altamente reactivos) activarían a ácidos / poli-no saturados como linolénico, linoleico y araquidónico, desatando el proceso de peroxidación.

Esquema de la secuencia peroxidativa de un ácido graso poli-no saturado con producción de malondialdehído ejemplificada con ácido linolénico. Fig. 4



El efecto deletéreo era atribuido a diferentes productos que se forman en el proceso: hidroperóxidos, peróxidos, radicales libres, malondialdehído y otros aldehídos, hidroxialquenos. Este proceso causaría alteraciones bioquímicas como la inactivación de enzimas (ej. glucosa 6 fosfatasa), daños en las propiedades de las membranas celulares (retículo endoplásmico, mitocondrias, etc.) cambiando su polaridad (37) e interrumpiendo su continuidad.

Se afectaría la permeabilidad iónica, que causaría la acumulación de Ca^{++} en las mitocondrias, causando tumefacción, pér

dida de la capacidad oxidativa en el ciclo de Krebs y desacople de la fosforilación oxidativa, disminuyendo el contenido de ATP. (38)

La falla energética surgida de la no funcionalidad mitocondrial podría ser la causa fundamental de la necrosis hepática (39), así como la liberación de enzimas lisosomales (40) que podrían intervenir sinergizando los efectos dañinos.

El saber que el proceso de peroxidación de lípidos es poco activo en el hígado de ratas recién nacidas (24); hallar que varios inhibidores de reacciones por radicales libres también / reducen las manifestaciones tóxicas después de la administra- / ción del tetracloruro de carbono (ej.: vitamina E, la difenil / p-fenilene diamina, el SKF 525 A); encontrar que el contenido / de ácido araquidónico está disminuído durante el proceso de in- / toxicación (34) y que los lípidos microsomales mostraran en el espectro ultravioleta una banda de absorción a 233 nm , típica de los procesos de peroxidación, llevaron a Recknagel (32) a // postular que la peroxidación de lípidos era responsable de la necrosis hepática producida por el tetracloruro de carbono. // Desde entonces se tomó al proceso de peroxidación como causa de los daños hepáticos que desencadenan la muerte celular.

UNION IRREVERSIBLE DE LOS METABOLITOS REACTIVOS. SU IMPORTANCIA

Está bien documentado que la toxicidad del tetracloruro / de carbono está relacionada a su metabolismo (29-33). El tetra- / cloruro de carbono como ya dijimos se metaboliza primero a clo-

roformo que luego es transformado en dióxido de carbono. Para explicar la formación de cloroformo a partir del tetracloruro / de carbono, Butler propuso en 1961 (19) que los radicales li- / bres $\cdot\text{CCl}_3$ y $\cdot\text{Cl}$ formados por fusión homolítica de la unión del / carbón halogenado eran los intermediarios en la reacción y pos- / tuló que eran los responsables de la acción tóxica de la hepato / toxina.

El peso de los argumentos planteados por los seguidores / del proceso de peroxidación de lípidos ha disminuído por los ha / llazgos hechos en varios laboratorios en particular por el nues / tro. En efecto, se ha demostrado que los antioxidantes dados / en una dosis que previene la necrosis y/o el hígado graso, no / previenen las alteraciones bioquímicas producidas por el tetra- / cloruro de carbono atribuídas también a la peroxidación de lípi / dos (41-42). Se encontró también que algunos inhibían el meta- / bolismo de drogas (42) y otros inhibían la activación del tetra / cloruro de carbono a $\cdot\text{CCl}_3$ (43). También hemos encontrado eviden- / cias que en muchas condiciones experimentales hay una mejor co- / rrelación entre el daño inducido por el tetracloruro de carbono / (por ejemplo destrucción de P-450, pérdida de la actividad de / la glucosa 6 P-asa, ruptura de polisomas y necrosis) con la u- / nió n covalente de los radicales libres a constituyentes celula- / res que con el proceso de peroxidación de lípidos (44-45-46-47- / 48-49).

Uno de los trabajos que más cuestiona el rol del proceso / peroxidativo es que la cepa de ratones A/J, que es mucho más //

susceptible al daño producido por tetracloruro de carbono, tiene mayor grado de unión covalente de los radicales libres a los constituyentes celulares en ausencia total de peroxidación de lípidos inducida por el tetracloruro de carbono "in vivo" durante 24 horas después de la intoxicación (47-50-51-52). La peroxidación de lípidos "in vivo" se midió por el procedimiento UV (47-52) y por cambios en el contenido de ácido araquidónico en fosfolípidos microsomales (50-51).

Existe la confirmación para estos resultados y la extensión a otras cepas de ratones. (53)

Asimismo hemos encontrado en el laboratorio la destrucción de P-450 de testículos de ratas intoxicadas por tetracloruro de carbono en ausencia de peroxidación de lípidos y en presencia de unión irreversible a lípidos microsomales de testículos. (54)

También hemos hallado interacción de los radicales $\cdot\text{CCl}_3$ con los constituyentes tales como DNA y fracciones de proteínas nucleares en ratón (55), a proteínas y lípidos del retículo endoplásmico liso y rugoso (56), fosfolípidos de las membranas de retículo y núcleo. (55-56)

En una reciente recopilación hecha por especialistas en el campo toxicológico se admite que el rol de la peroxidación de lípidos "in vivo" no está claramente establecida. (57)

Cada día se incrementa la idea que los radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ ejercen efecto directo uniéndose irreversiblemente a los componentes celulares, de manera de poder explicar suficiente-

mente la muerte de las células hepáticas. (44-56)

El punto más importante de divergencia en la hipótesis sobre el mecanismo de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono parece residir en el distinto peso que cada grupo de investigación dá ya sea al ataque directo de los radicales libres, / causando su efecto dañino al interaccionar con componentes celulares o al proceso de peroxidación de lípidos no saturados de / las membranas de las organelas celulares (retículo endoplásmico, mitocondrias, lisosomas) (30-47-58-59-60-61-62-63-64-65-66-67)

La controversia entre los roles de ambos procesos ha causado mucho interés en los últimos años; tratándose cada vez / con más empeño de saber cuál de los procesos es el que es responsable del daño celular induciendo alteraciones ultraestructurales y bioquímicas tempranas, y necrosis.

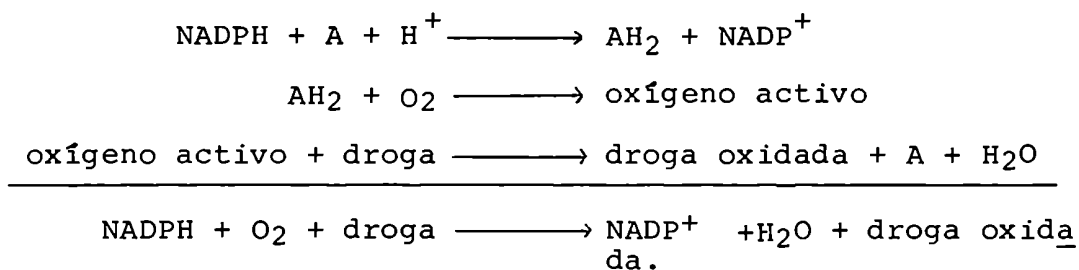
Mientras algunos investigadores piensan que el proceso de peroxidación de lípidos no existe (61-68), otros creen que tiene menos importancia. (45-56-59-69-70)

Frente a la propuesta hecha por Butler sobre la activación del tóxico a radicales libres CCl_3 y la acción hepatotóxica de los mismos; dos problemas se suscitaron, primero: establecer la naturaleza enzimática del proceso que involucra la activación, y segundo: encontrar evidencia de la formación de los / radicales libres.

SISTEMA ENZIMATICO INVOLUCRADO EN EL METABOLISMO DEL TETRACLORURO DE CARBONO.

Durante los últimos quince años, los sistemas enzimáticos localizados en el retículo endoplásmico celular han sido objeto de numerosos y profundos estudios. Este interés está muy justificado, ya que se ha demostrado que una amplia variedad de compuestos exógenos son metabolizados en el retículo endoplásmico. La versatilidad de este sistema enzimático es virtualmente única en bioquímica porque cataliza una amplia variedad de reacciones diversas, como la oxidación de hidrocarburos saturados y aromáticos, la dealquilación de aminas secundarias y terciarias, la ruptura oxidativa de éteres, la epoxidación de hidrocarburos aromáticos halogenados y alquenos, la conversión de fosforotionatos a derivados fosfatos, la sulfooxidación de tioéteres.

Este sistema microsomal se considera como una función oxidasa mixta, mecanismo por el que un componente del retículo endoplásmico es reducido por el NADPH; y reacciona con el oxígeno molecular para formar un intermediario: oxígeno activo. Este / oxígeno activo se transfiere a la droga. (71)



El componente reducido es una hemoproteína, llamada citocromo P-450 (72) ya que en su forma reducida dá un pico de absorción a 450 nm en presencia de monóxido de carbono.

Pero ¿cuál es la enzima que media la reducción del citocromo P-450?. Existen evidencias que se trata de la NADPH;citocromo c reductasa, ya que el citocromo c inhibe algunas reacciones (73) y un anticuerpo de la NADPH citocromo c reductasa bloquea la hidroxilación de la anilina.

Resumiendo, las enzimas involucradas en la reacción son: NADPH citocromo c reductasa, una flavoenzima involucrada en la oxidación del NADPH, el citocromo P-450, cuya función es la reducción del citocromo P-450 oxidado (74) (fig.5). Se ha encontrado en el retículo endoplásmico de células de glándula adrenal y en mitocondrias una proteína que actúa como transportadora entre la flavoenzima y el citocromo P-450.

A causa de que en su forma reducida el complejo P-450-sustrato se combina con el monóxido de carbono; atmósferas que // contienen monóxido de carbono inhiben las reacciones catalizadas por este sistema.

El encontrar que varios sustratos e inhibidores se combinan con la forma oxidada del P-450 y causan un cambio en su espectro de absorción característico, sirvió para clarificar el / mecanismo de este sistema oxidativo.

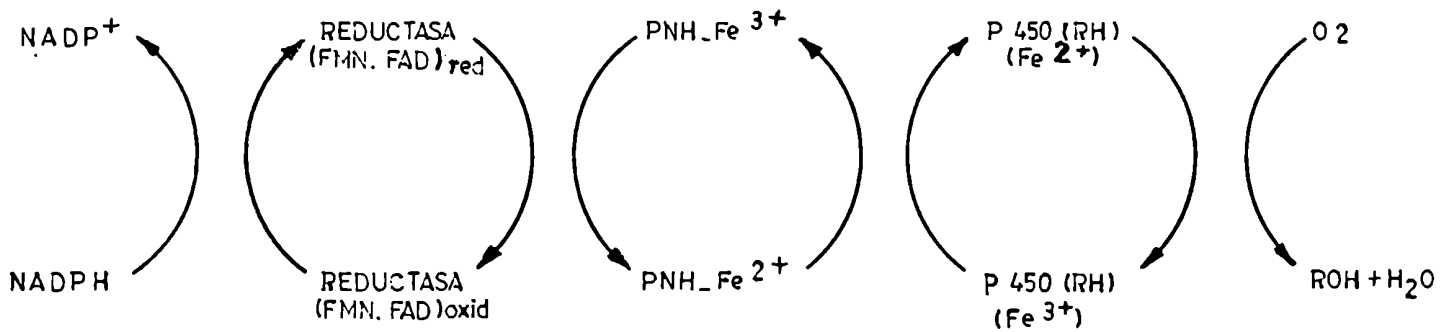


Fig.5: Sistema enzimático microsomal que cataliza el metabolismo de drogas.

PNH: Proteína no hemática (presente solamente en suprarrenales).
RH: sustrato.

En general se observan dos tipos de cambios espectrales:

1.- Cambios de Tipo I, con aumento de absorbancia a 385-390 nm y un decrecimiento a 418-427 nm.

Este tipo de cambio espectral lo producen sustancias como / el hexobarbital, la aminopirina y la etilmorfina.

2.- Cambios de Tipo II, con un incremento de absorbancia a 425-435 nm y un decrecimiento a 390-395 nm.

Este tipo de cambio espectral es producido por sustancias /

tales como la nicotinamida, la anilina.

Los espectros de Tipo I y II son aproximadamente imágenes / especulares uno del otro. (fig.6)

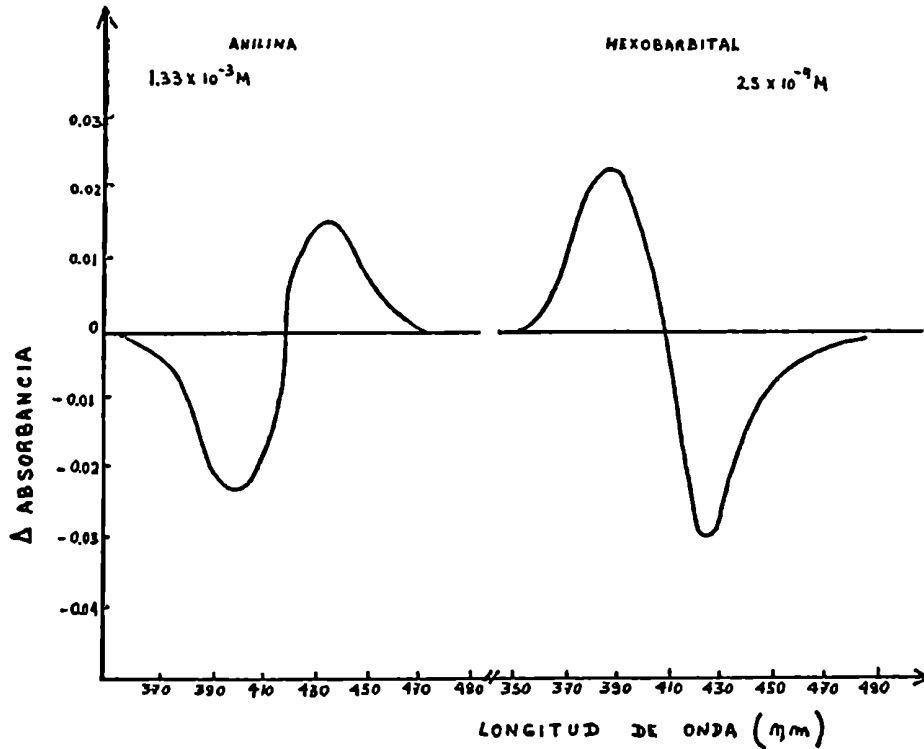


Fig.6: Cambios espectrales producidos por interacción de / compuestos con el P-450 de suspensiones microsomales. (Tipo I: hexobarbital ; Tipo II: anilina).

En general las drogas son conocidas como drogas Tipo I o II de acuerdo a que el cambio espectral que producen sea de Tipo I o II, respectivamente.

Las evidencias que estos cambios espectrales eran producidos por interacción con el citocromo P-450 fueron obtenidas por

Imai, Sato en el año 1967 (75) quienes comprobaron: a) la magnitud del cambio espectral es proporcional al contenido del /// P-450 en diferentes preparaciones de microsomas, b) el isocianuro de etilo se combina con los microsomas aerobios (espectro máximo a 434 nm) y la anilina (compuesto Tipo II) interfiere con esa unión en forma competitiva.

Otros investigadores encontraron que el citocromo parcialmente purificado se combina con compuestos Tipo I y II dando // los espectros característicos. (76)

También es importante notar que existe una aparente relación entre la cinética del metabolismo de drogas y la cinética de interacción de las mismas con el citocromo P-450.

Es muy probable que la velocidad de oxidación de una droga por el sistema enzimático del retículo endoplásmico pueda // ser alterada si se afecta cualquiera de los componentes del sistema, incluyendo el contenido de P-450, la capacidad del sustrato para combinarse con el P-450, la cantidad de NADPH citocromo c reductasa, la relación entre NADPH citocromo c reductasa y /// P-450 y la afinidad del sustrato por el complejo "oxígeno activo P-450".

El metabolismo biológico de una droga depende de una multitud de factores incluyendo aquellos que determinan su volumen de distribución, su excreción en aire, bilis y orina, su metabolismo enzimático. (77)

Las actividades de las enzimas del retículo endoplásmico pueden ser modificadas por factores genéticos (78-79), fisioló-

gicos (80-81) y factores externos como la exposición a contaminantes ambientales y administración de drogas. (77)

También varía ampliamente entre distintas especies animales, cepas, sexos. (82-83)

La mayoría de los investigadores estuvieron de acuerdo en que el sistema enzimático de función mixta del retículo endoplásmico del hígado de rata fuera el sitio en donde ocurre el proceso de activación a radicales libres, mayormente porque el retículo endoplásmico de los hepatocitos es el sitio de daño más temprano de la intoxicación causada por el tetracloruro de carbono (31) y el sistema enzimático está localizado en el retículo endoplásmico. (30-31-58)

Más evidencias apoyan esta posibilidad ya que Recknagel, R. y Glende, E. (58); Mc Lean, A. (84) y Castro, J. y colaboradores (85), reportaron que el tetracloruro de carbono interacciona con el citocromo P-450 para dar un cambio espectral de Tipo I.

Contribuciones hechas por distintos investigadores dieron más apoyo a la hipótesis, identificando al citocromo P-450 como participante en el proceso de activación del tetracloruro de carbono para dar metabolitos intermediarios.

En nuestro laboratorio se ha encontrado más evidencia apoyando la ocurrencia del proceso de activación al encontrar que el tetracloruro de carbono interacciona con el P-450 reducido o cuando el complejo CCl_4 - P-450 se reduce por el NADPH en presencia de la P-450 reductasa (60-86-87-88-89-90-91)

En relación a la formación de radicales libres, toda la evidencia existente es de naturaleza indirecta.

Estudios de Fowler (92) evidenciaron que el tetracloruro de carbono se metaboliza en el conejo dando metabolitos clorados, cloroformo, hexacloroetano, postulando que éste último se forma por la dimerización de radicales libres triclorometilos.

Ya que los radicales triclorometilos son extremadamente / reactivos (no detectables por resonancia paramagnética), era lógico suponer que estuvieran involucrados fácilmente en reacciones químicas.

Un intento para evidenciar la formación de los radicales libres fue introducido por Gordis (93) quien concluye que la unión irreversible del tetracloruro de carbono a lípidos parece responder a una reacción que involucra radicales libres triclorometilos. Luego estos estudios fueron profundizados por Villarruel y Castro (94) demostrando que los ácidos linolénico y araquidónico de fosfolípidos de retículo endoplásmico eran blanco de la acción de los radicales libres triclorometilo. También / se mostró que esa interacción no ocurre si existen inhibidores del paso de activación. (95)

Reynolds (1967) (96) y Reynolds Yee (97) postularon que la marca de los constituyentes citoplasmáticos con ^{14}C y ^{36}Cl del $^{14}\text{C}^{36}\text{Cl}_4$ apoya la hipótesis que el tetracloruro de carbono es tóxico para las células hepáticas en virtud a un ataque químico de sus productos de ruptura sobre los componentes (lípidos y proteínas) del retículo endoplásmico. La marca se incorpora

preferentemente en los lípidos. (93-96-97)

Una medida indirecta pero sugestiva que la hepatotoxicidad depende de la ruptura de la molécula lo dá el estudio toxicológico comparativo de CHCl_3 , CCl_4 , CBrCl_3 , CFCl_3 que se correlaciona con la energía de disociación de estos haloalcanos. (98-99)

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos derivados de fosfatidil colina del retículo endoplásmico del hígado de animales tratados con tetracloruro de carbono revela // una composición muy similar a aquella observada durante el análisis de los productos de reacción aparecidos por el agregado / de radicales libres a fosfatidil colina del retículo endoplásmico, radicales formados "in vitro" a partir de tetracloruro de / carbono y peróxido de benzoílo. (100). El radical libre triclorometilo es el responsable de esta reacción química "in vitro"; refuerza la idea de la formación de los radicales libres "in vivo".

También se ha demostrado que los radicales triclorometilos producidos "in vitro" a partir de tetracloruro de carbono catalizado químicamente por peróxido de benzoílo son capaces de interactuar con ésteres de aminoácidos. Esta interacción es // más intensa con cistina, tirosina y triptofano. (101)

Todos los resultados indican claramente la existencia de un proceso de activación del tetracloruro de carbono, que ocurre en el retículo endoplásmico celular por acción del sistema enzimático de función mixta, dando como productos de reacción /

radicales libres altamente reactivos, que interaccionan con los distintos componentes de la célula, poniéndose de manifiesto de esa manera su existencia.

OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS

El mayor problema en el campo de la hepatotoxicidad provocada por el tetracloruro de carbono y uno de los más importantes con respecto al daño celular provocado por sustancias químicas en general (hidrazinas, tetracloroetano, etc.) es el desconocer cuál es el proceso que desencadena el daño irreversible, si la peroxidación de lípidos o la unión covalente a componentes celulares.

El objetivo general de este trabajo es aumentar el conocimiento que permita resolver la controversia sobre la importancia relativa de la unión covalente de los metabolitos reactivos y la peroxidación de lípidos en el daño inducido por el CCl_4 en el hígado.

Con este fin el plan de trabajo consta de 2 estudios diferentes: A y B.

Plan "A":

Se estudiarán los efectos provocados por el CCl_4 sobre // los animales tratados previamente con pirazol y con 3 amino 1-2-4 triazol. (AT)

El 3 amino 1-2-4 triazol es un inhibidor de la síntesis / de hemo y de la inducción del P-450 (122-123-124-125), afecta / el grado de activación del CCl_4 y la peroxidación de lípidos.
(88)

El pirazol es una sustancia capaz de dar un cambio espectral tipo II y de desacelerar la reducción del P-450 (121), de

tal manera que afecta el grado de unión covalente de los metabolitos reactivos del CCl_4 a componentes celulares. (69)

Se correlacionará la presencia o no de daño a nivel bio-/químico y ultraestructural a las 3 y 6 horas después de la intoxicación con el CCl_4 en animales previamente tratados con pirazol o 3 amino 1-2-4 triazol, con la unión covalente y la peroxidación de lípidos, en hígado de ratas.

Plan "B":

Se conoce muy bien que la estructura y el nivel de ciertas funciones del retículo endoplásmico varían entre las distintas especies animales.

La mayoría de los investigadores utilizan cepas de roedores o cultivo de células, pero recientemente ha aumentado el manejo de animales de otras especies en aquellas experiencias en donde se miden cambios en las funciones hepáticas.

Es por ello que podemos aprovechar las diferencias entre las especies en lo que se refiere a su capacidad metabólica para poder desentrañar los procesos que mejor se correlacionen // con la muerte celular provocada por el CCl_4 .

Con este fin se comparan las capacidades metabólicas, las actividades enzimáticas y las alteraciones histológicas y ultraestructurales entre rata y gallina. La elección de la gallina se basa en el estudio realizado anteriormente por Slater (31)// y en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio // (126) donde se demostró que el sistema peroxidativo en los mi-

crosmas hepáticos de gallina es bajo.

PLAN DETALLADO DE TRABAJO "A"

Se tratará de ver los cambios espectrales resultantes de la interacción del AT y CCl_4 con el P-450 de las suspensiones microsomales.

Se estudiarán los efectos del AT sobre la actividad de la enzima citocromo P-450 reductasa.

Se determinará si el AT modifica el proceso de peroxidación de lípidos inducido por el CCl_4 a 3 y 6 horas de su administración.

Se verá si el AT es capaz de modificar la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos a 3 y 6 horas después de la administración del tóxico.

Se determinará si el pretratamiento con AT es capaz de modificar la actividad de la enzima ICDh plasmática en los animales tratados con CCl_4 (24 horas).

Se estudiarán los efectos a nivel ultraestructural de los distintos tratamientos (CCl_4 , AT, AT más CCl_4) y se determinará si el AT es capaz de prevenir los daños tempranos causados por el tóxico.

Se determinará si el AT es capaz de prevenir los efectos tardíos del CCl_4 (necrosis, infiltración grasa).

Se analizará si el pirazol afecta a las enzimas que metabolizan sustancias extrañas al organismo, midiendo el tiempo de sueño producido por el pentobarbital. Se analizará también si interacciona con los componentes enzimáticos de dicho sistema, /

así como también si afecta la actividad de ciertas enzimas como la citocromo P-450 reductasa.

Se determinarán los cambios espectrales resultantes de la interacción del pirazol, CCl_4 y pentobarbital sobre las suspensiones microsomales.

Se estudiará por medio de distintas técnicas si el pirazol es capaz de modificar el proceso de peroxidación de lípidos que produce el CCl_4 .

Se determinará si el pirazol puede modificar la unión covalente del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos a 3 y 6 horas después de la administración del tóxico.

Se estudiará si el pirazol modifica o no el contenido de glutatión en el hígado.

Se tratará de ver si el pirazol previene los daños tempranos ultraestructurales provocados por el CCl_4 , y también si produce efectos propios sobre la célula hepática.

Se tratará de ver si el pirazol previene los daños tardíos causados por CCl_4 (necrosis, hígado graso).

PLAN DETALLADO DE TRABAJO "B"

Se analizará si el CCl_4 a distintos tiempos de su administración es capaz de modificar el contenido del citocromo P-450 en hígado de gallina y se comparará con los valores obtenidos / en hígado de rata.

Se verá si el tratamiento con CCl_4 a distintos tiempos mo

difica la actividad enzimática de la glucosa 6 P-asa y de la // aminopirina N-demetilasa.

Se analizará el efecto del CCl_4 sobre la peroxidación de lípidos en hígado de gallina. Se comparará con los valores obtenidos a distintos tiempos de intoxicación.

Se medirá la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos de rata y gallina, a distintos // tiempos de su administración, se compararán los resultados obtenidos en las dos especies.

Se intentará medir y comparar el efecto del CCl_4 24 horas después de su administración sobre la actividad de la enzima // ICDh plasmática, en rata y gallina.

Se determinará si existen efectos causados por la intoxicación de CCl_4 sobre el hígado de gallina, a nivel histológico y ultraestructural; se los comparará con los estudios sobre hígado de rata.

PARTE EXPERIMENTAL

COMPUESTOS UTILIZADOS:

El tetracloruro de carbono radiactivo ($^{14}\text{CCl}_4$ actividad / específica 27,5 mCi/mM) fue adquirido en New England Nuclear.

El pirazol fue adquirido en T. Schuchardt, Germany.

El 3Amino- 1,2,4 triazol (AT) fue comprado en Aldrich /// Chemical Company.

La hematoxilina y la eosina amarillenta adquiridas en /// George T. Gurr Lda.

Dibutil ftalato; Epón 812; Anhidrido succínico del ácido dodecenil sulfónico (DDSA); Araldita 6005; Tetróxido de osmio; Solución al 50% de glutaraldehído fueron adquiridos en Electron Microscopy Sciences, y el DPM-30, fue adquirido en Polysciences Inc.

Citrato de plomo adquirido en Ernest Fullan y el Acetato de uranilo en Merck.

Todos los demás compuestos empleados fueron de grado-reactivo.

ANIMALES Y SU TRATAMIENTO

En los experimentos se utilizaron ratas albinas macho cepa Sprague-Dawley (220-270g) y gallinas de 1,5 - 1,6 kg. Leghorn.

El alimento se les retiró 12-14 horas (ratas) y 24 hs. (gallinas) antes de la administración del CCl_4 y el agua fue dada a voluntad.

El pirazol en ratas se administró intraperitonealmente en solución con ClNa 0,9% (150mg/kg) 30 minutos antes de la administración del CCl_4 ; o del aceite de oliva en el caso de los animales tratados sólo con pirazol.

El $^{14}\text{CCl}_4$ con actividad específica 27,5 mCi/m mol se disolvió en aceite de oliva para dar una solución de 23 n mol/ml ($1,4 \times 10^6$ dpm/ml de solución) y fue dado ip con una dosis de / 5 ml. de solución por kg. de peso. Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución fisiológica o aceite de oliva, administrado intraperitonealmente.

El tiempo de sueño producido por el pentobarbital en animales previamente tratados con pirazol fue determinado inyectando intraperitonealmente pentobarbital sódico 40 mg/kg en solución fisiológica.

En el segundo grupo de experiencias las ratas fueron ayunadas 24 horas antes de la administración de la primera dosis / de la solución acuosa de AT (3g/kg) dada por vía oral. Una segunda dosis fué dada 24 horas después de la primera y antes del tetracloruro de carbono.

El CCl_4 fue dado intraperitonealmente 1 ml./kg., en solución al 20% (v/v) con aceite de oliva, en gallina y rata. Los controles recibieron cantidades iguales de aceite de oliva.

Todas las administraciones se hicieron a las 8 horas.

Cuando se tomaron muestras de sangre, los animales se mantuvieron bajo anestesia superficial con éter, y la sangre se colectó de la vena cava inferior en una jeringa heparinizada.

Este procedimiento se utilizó con rata mientras la obtención de sangre en gallina se realizó decapitando al animal y recogiendo la sangre en un tubo de ensayo con heparina, haciendo uso de / un embudo.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos de / la administración de las drogas. Se les extrajo el hígado con rapidez, el cual fue pesado y procesado.

Las muestras de hígado para los estudios de microscopía e lectrónica fueron obtenidos después de la perfusión del hígado vía vena porta de ratas anestesiadas con éter de acuerdo al proceso descrito por Sjöstrand (102). En la gallina se procede a fijar el hígado sin realizar la perfusión.

PROCESAMIENTO DE ORGANOS

Todas las manipulaciones del hígado y las operaciones siguientes se llevaron a cabo a 0-4°C.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Se utilizaron animales tratados con los compuestos que se detallan en Animales y su tratamiento (en todos los casos se utilizaron 5 animales 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 horas; se recortaron y se sometieron a

un proceso de deshidratación utilizando alcoholes de gradación creciente 75%, 96% y 100%; efectuando tres lavados de 30 minutos con cada uno de ellos. Se los sometió luego a 3 lavados de 30 minutos cada uno de ellos con benceno como líquido intermedio, para luego embeberlos en parafina fundida a 60°C durante 24 horas y por último se incluyeron en parafina.

Se obtuvieron cortes de 20-30 micrones utilizando un microtomo para cortes en parafina Reichert que fueron luego coloreados con hematoxilina - eosina de Mayer. (103)

Los tiempos utilizados para la desparafinación, hidratación, coloración y posterior deshidratación fueron los siguientes:

xilol	20 minutos
alcohol 100.....	7 minutos
alcohol 96	7 minutos
agua corriente	10 minutos
hemalumbre de Mayer	10 minutos
agua corriente	20 minutos
eosina	5 minutos
alcohol 96	1 minuto
alcohol 100	1 minuto
xilol	30 segundos

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 los cortes por congelación utilizando un Microtomo

mo Criostato Internacional modelo CTI y fueron teñidos con Sudan Negro B.

La observación de los preparados histológicos se llevó a cabo con un Microscopio Carl-Zeiss, Fotomicroscopio II.

ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Se utilizaron animales tratados con los compuestos que se detallan en animales y su tratamiento (en todos los casos se utilizaron 5 animales por grupo).

I.- FIJACION

Se procede a la perfusión del hígado de rata con glutaraldehído al 0,5% en Buffer Milloning pH= 7,4, vía vena porta, en ratas anestesiadas con éter superficialmente según el procedimiento de Sjöstrand. (102)

En los casos de los hígados de gallina se fijan con glutaraldehído al 2% durante 1 hora y se continúa luego con el procedimiento descrito para la rata.

Se hace una fragmentación progresiva bajo glutaraldehído partiendo de trozos de 4 mm^3 , hasta llegar a un tamaño de alrededor de 1 mm^3 .

Luego se lava 2 veces, 15 minutos cada una con buffer /// Milloning y se procede luego a post fijar el tejido con tetróxido de osmio al 1% 3 horas en frío. Se lava con buffer Millo-// ning 2 veces, y se deja toda la noche en buffer.

II.- Luego se procede a la deshidratación, coloración en bloque de la siguiente manera:

2 cambios de alcohol 50 en frío	5 minutos c/u
1 cambio de alcohol 75 en frío	5 minutos c/u
1 cambio en acetato de uranilo al 2% en alcohol 96 a temperatura ambiente, en oscuridad	60 minutos
1 cambio de alcohol 96 en frío.....	5 minutos
3 cambios de alcohol absoluto en frío.....	15 minutos c/u
2 cambios de óxido de propileno en frío	15 minutos c/u
1 cambio de resina/óxido de propileno 50%	dejar evaporar, guardar en frío durante 12 horas.
1 cambio de resina pura a temperatura ambiente	45 minutos

III.- INCLUSION

Se colocan los trozos de tejidos en cápsulas Beem (previamente secadas en estufa 30 minutos a 60° C)..... 24 horas en estufa a 80° C.

Mezcla de la inclusión utilizada (104):

Resina epoxy

Epón 812 25 ml

Araldita 6005 15 ml

Endurecedor ácido

DDSA 55 ml

Plastificador

Dibutil ftalato 4 ml

Acelerador

DMP-30 3 ml

Los tacos de inclusión después de haber transcurrido por lo menos 24 horas de la polimerización; son desprovistos de la cápsula Beem y luego tallados bajo la lupa del ultramicrotomo utilizando una hoja de afeitar; formando una pequeña pirámide // truncada que contenga solamente el tejido.

Cortes gruesos de alrededor de 1 μ de espesor son cortados con un ultramicrotomo LKB I; se montan en un portaobjetos / sobre una gota de agua, y luego se realiza la adhesión de los cortes por medio de calentamiento sobre una platina. Se tiñen con azul de toluidina alcalino y se observan con el microscopio óptico.

Esta observación permite seleccionar la zona de estudio / centrolobulillar hepática y también, controlar la calidad de la fijación del tejido de manera aproximada.

Una vez seleccionada la zona se procede a tallar finamente el taco en forma definitiva, dejando en él, sólo la zona que se desea estudiar.

La obtención de cortes ultrafinos de alrededor de 600 Å / de espesor (color de interferencia gris) se obtienen con el ultramicrotomo LKB I. Las cuchillas de cristal utilizadas son ob-

tenidas a partir de las barras LKB mediante la Máquina de hacer cuchillas de la misma marca; con un ángulo de 45°.

Los cortes delgados se montan sobre grillas de cobre de / malla 300 de Ernest Fullan. Se tiñen con acetato de uranilo // (105), durante 18 minutos por flotación, a 40°C. Luego las grillas se lavan sumergiéndolas muchas veces en agua destilada. Se secan y se sumergen en citrato de plomo (106) durante 5 minututos, a temperatura ambiente. Se lavan en 4 cambios de agua destilada y se secan.

Los preparados son observados en un microscopio electrónico Phillips EM 300, y las microfotografías son sacadas con la / cámara de 35 mm.

SEPARACION DE MICROSOMAS

La aislación de los microsomas para la determinación de / la peroxidación de lípidos y unión irreversible de $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos fue realizada por el siguiente procedimiento (107): 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 Teflón-vidrio Potter-Elvehjem. El homogenato se centrifugó a 9000x g durante 20 minutos. La / fracción sobrenadante fue luego centrifugada 1 hora a 105000x g en una ultracentrífuga preparativa Spinco Modelo L. El pellet microsomal se suspendió en dos ml de la misma solución de sacarosa EDTA usada para la homogeneización. En esta suspensión se / determinaron la peroxidación de lípidos y la unión irreversible

del $^{14}\text{CCl}_4$ según se describe luego.

La fracción microsomal para la determinación del contenido de P-450 (P-450), de la actividad del citocromo P-450 reductasa (P-450 reductasa), de los cambios espectrales producidos por interacción de compuestos con el P-450 de suspensiones microsomales (cambios espectrales), fue separada por la misma técnica ya descripta salvo que el hígado se homogeneizó con un volumen igual a 4 veces su peso de una solución de Cl K 1,15%. El homogenato se centrifugó a 9000xg durante 20 minutos y la fracción sobrenadante a 105000xg durante 1 hora. Los microsomas así separados se resuspendieron en 13 ml de solución de ClK 1,15% -// Tris Cl H 0,02M (pH 7,4). En esta suspensión se determinaron / P-450, P-450 reductasa, cambios espectrales, como se describe / luego.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS Y ENSAYOS

Isocítrico deshidrogenasa (ICDh): Su actividad en plasma fue medida según la técnica de Sterkel y colaboradores (108). La actividad está expresada en unidades; cada una representa la cantidad de enzima que produce 1 milimicromol de NADPH por ml por hora a 25°C.

Glutati6n: Su concentraci6n en hígado fue medida según la técnica descripta por G. Ellman (109). Los valores se expresan en / μg de glutati6n por gramo de hígado.

Determinación de la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ 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 agregan 19 ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se agita y luego se centrifuga a 3000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo de centrifuga graduado y se lleva a un volumen de 20 ml con la solución de cloroformo-metanol (2:1). Se agregan 4 ml de agua destilada, se mezclan las dos fases por agitación y luego se centrifuga a 3000 xg durante 5 minutos. La fase superior acuosa fue aspirada y desechada; la fase clorofórmica inferior remanente fue lavada dos 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 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 CCl_4 no marcado para favorecer la eliminación del $^{14}\text{CCl}_4$ remanente no irreversiblemente unido a los lípidos, la muestra fue secada nuevamente

a 40°C y pesada. Luego el residuo se disolvió en 10 ml de una solución al 0,5% de 2,5 difeniloxazol (PPO) en tolueno y se midió 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, y se les descontó el valor del blanco (solución de PPO sólo). Los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto (dpm) por miligramo de lípidos microsomales.

Determinación del 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 (110), 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 nm antes y después de la adición del reductor (ditionito de sodio). El resultado se expresó en milimicromoles de P-450 por miligramo de proteína.

Determinación del 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 (111). Se utilizó una anaeróbica Aminco (A 1-65085) para trabajar en atmósfera de O₂. La suspensión de microsomas hepáticos se obtuvo como se detalla en Procesamiento de los órganos. Tres ~~Al~~ de esa

suspensión microsomal saturada con OC 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_2Mg 1 M; 124 mg de isocitrato de sodio; 20 mg de NADP 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 nanómetros y se expresó nanómole~~s~~ de P-450 reducido a 25°C por mg por minuto.

Determinación de los cambios espectrales producidos por interacción del CCl_4 , pirazol, AT con el P-450 de microsomas de hígado:

Fueron determinados según el método descrito por / / / / Schenkman y colaboradores (110). Los microsomas hepáticos obtenidos según lo descrito en la parte experimental se suspendieron en buffer Tris 0,025M / ClH / ClK 0,15 M (pH= 7,5) se agregaron a ambas cubetas del espectrofotómetro Aminco Chance y se registró la línea de base.

La línea de base se restó del cambio en absorbancia producido por la adición de pirazol, AT o CCl_4 a una de las cubetas.

Determinación de las concentraciones de CCl_4 en hígado:

Para medir las concentraciones de CCl_4 en hígado, se utilizaron animales tratados con CCl_4 como se detalla en Animales y su tratamiento; las determinaciones fueron realizadas de acuerdo con el procedimiento descrito por Recknagel y Litteria (112) que consiste esencialmente en: 3 g de hígado fueron homo-

geneizados en 15 ml de agua destilada a 0-2°C con un homogenizador de Teflon-vidrio Potter Elvehjen. Se utilizó una celda / de microdifusión de 12 cm de diámetro externo y 2 cm de diámetro interno; en el compartimiento central se colocó 1 ml de tolueno y en el exterior 5 ml de homogenato de hígado y se dejó / difundir durante 24 horas a temperatura ambiente. El CCl_4 recogido en el tolueno del compartimiento central de la celda de microdifusión se determinó por calentamiento con piridina en medio alcalino y lectura a 530 nanómetros con un espectrofotómetro Gilford 240. Los resultados se expresan en microgramos de CCl_4 por g de hígado.

Determinación del contenido del $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado:

Para medir el contenido de $^{14}\text{CCl}_4$ 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 (112) sólo / hasta la etapa de microdifusión; luego el $^{14}\text{CCl}_4$ recogido en el tolueno del compartimiento central de la celda de microdifusión fue transferido a un frasco de centelleo conteniendo 10 ml de / una solución al 0,5% de PPO en tolueno y medida su 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 sólo (solución PPO sólo). Los resultados se expresaron en desintegraciones por minu

to (dpm) por gramo de hígado.

Determinación de proteínas.

Las concentraciones proteicas en las distintas fracciones subcelulares fueron estimadas por el método descrito por Lowry y col. (113) o por el método del Biuret (114).

Peroxidación de lípidos.

La estimación cuantitativa de la peroxidación de lípidos fue efectuada 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 (115). 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 m μ x 1000 para una solución que contiene 1 mg de lípidos microsomales por gramo de hígado.

Estimación del proceso peroxidativo efectuado por el método basado en la disminución del contenido del ácido araquidónico de los fosfolípidos microsomales en hígado de animales intoxicados con CCl₄ según se detalla en Animales y su tratamiento.

Una vez aisladas las fracciones microsomales y extraídos los lípidos según técnica de Klaassen y Plaa (115) se emplea pa

ra separar los mismos la cromatografía en capa delgada.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los fosfolípidos se obtienen por transesterificación utilizando dimetoxi-/propano/ H_2SO_4 /metanol, según el método descrito por Lipsky y Landowne (116).

Luego de extraen con éter de petróleo (30-60°) y las muestras se analizan por cromatografía gaseosa en un Cromatógrafo / Packard Modelo 824, con las siguientes condiciones: columna de vidrio de 700 mm x 2 mm DI, rellenas con 3% SE 30 sobre / / // Chromosorb W 30/60° temperatura de columna 200°C.

Los resultados se expresan como composición porcentual de ácidos grasos totales (C16:0 palmítico, C18:0 esteárico, C18:1 oleico, C18:2 linoleico, C20:4 araquidónico).

Peroxidación de lípidos medida en la fracción microsomal "in vitro".

La fracción microsomal se incuba aeróbicamente en una solución de ClNa 0,155 M, pH 6,5 con una concentración de 25 mg Eq microsomas por ml (1,33 mg/ml de proteínas microsomales), por 60 minutos a 38°C; con el agregado de 0,2 mM de NADPH y 6 ml de CCl_4 .

El grado de la peroxidación de lípidos se determina midiendo la concentración de malondialdehído en alícuotas de la incubación, con ácido tiobarbitúrico previa desproteínización / con ácido tricloroacético con concentración final de 5%; según la técnica descrita por Glende y Recknagel (117).

La producción de malondialdehído se expresa como Δ absorbancia x 1000 a 535 nm.

Análisis estadístico.

La significación de la diferencia entre dos valores promedio se determinó por el Test de T (118); 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 (119). En los casos en que el cociente F entre dos variancias indicó que las variancias eran significativamente diferentes, la significación entre dos valores medios se estableció mediante el Test de U de Mann-Whitney según el método descrito por Rumke y DE Jonge (120).

RESULTADOS QUE CORRESPONDEN AL PLAN DE TRABAJO "A"Cambios espectrales resultantes de la interacción del AT o CCl₄ con P-450 de las suspensiones microsomales:

AT (4 mM a 23 mM) es capaz de dar un cambio espectral tipo II al interaccionar con las suspensiones microsomales hepáticas; mientras el CCl₄ (3,4 mM a 17 mM) da un cambio espectral / de tipo I.

AT se une a un sitio distinto que el CCl₄ ya que cantidades saturantes (23 mM) no logran prevenir la unión de pequeñas cantidades de CCl₄ (3,4 mM a 17 mM).

Efecto del AT sobre la actividad de la P-450 reductasa (Tabla 1)

El AT (30 mM - 400 mM) es capaz de desacelerar la reducción del P-450 por el NADPH entre 36 y 81% respectivamente.

TABLA 1

Efecto del AT sobre la actividad de la P-450 reductasa.

TRATAMIENTO ^a	P-450 Reductasa ^b (n mol/min/mg prot) VALOR MEDIO ± DS	% INHIBICION
Control	0.79 ± 0.03	--
AT (30 mM)	0.50 ± 0.04 ^c	36
AT (400 mM)	0.15 ± 0.02 ^c	81

a.- Ratas macho ayunadas 12-14 horas. El AT fue dado oralmente. Se utilizaron tres animales por grupo.

b.- La actividad de la P-450 reductasa está expresada en n mol de / P-450 reducido a 25°C por minuto por mg de proteína.

c.- $P < 0.05$, test de T.

Efecto del AT sobre la peroxidación de lípidos microsomales //
"in vivo" producido por el CCl₄ a distintos tiempos de su admi-
nistración. (Tabla 2)

El AT fue capaz de disminuir levemente la intensidad del proceso de peroxidación de lípidos inducido por el CCl₄ a las / 3 horas y no a las 6 horas, (medida por la técnica de dienos // conjugados).

Tabla 2

Efecto del AT sobre la peroxidación de lípidos microsoma-
 les "in vivo" producida por el CCl₄ a distintos tiempos de su /
 administración.

TRATAMIENTO ^a	Peroxidación de lípidos "in vivo" ^{bc} (\bar{x} + DS)	
	3 horas	6 horas
Control	166 ± 9	196 ± 18
CCl ₄	328 ± 40	314 ± 30
AT	196 ± 16	184 ± 33
AT + CCl ₄	280 ± 41	281 ± 30

- a- Ratas macho ayunadas durante 24 horas antes de la administración de AT // (3 g/kg,po). El CCl₄ fue dado ip en una dosis de 1 ml por kg como solu-// ción en aceite de oliva al 20% (v/v), 24 horas después que el AT. Una se-// gunda dosis de AT fue dado con el CCl₄. Los controles recibieron la canti-// dad equivalente de solución salina y aceite de oliva.
 Los animales fueron sacrificados 3 ó 6 horas después de la administración del CCl₄. Se utilizaron 5 animales por grupo.
- b- El valor de peroxidación de lípidos esta expresado como Δ de absorbancia a 243 nanómetros x 1000 para una solución que tiene 1 mg de lípidos mi-// crosomales por ml.
- c- El valor de p para el efecto total del AT sobre el proceso de peroxida-// ción de lípidos inducido por el CCl₄ obtenido por análisis de variancia / bimodal fue $p < 0,05$ para 3 horas y $p > 0,1$ para 6 horas.

Unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos 3 o 6 horas después de la administración a ratas pretratadas con AT y la concentración del $^{14}\text{CCl}_4$ en hígado. (Tabla 3)

La administración previa de AT disminuye significativamente la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a los lípidos microsomales 3 y 6 horas después de la administración del $^{14}\text{CCl}_4$.

Tabla 3

Unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales 3 y 6 horas después de la administración a ratas pretratadas con AT y la concentración del $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado.

Tabla 3

TRATAMIENTO	UNION IRREVERSIBLE DEL ^{14}C (dpm/mg de lip)			$^{14}\text{CCl}_4$ LIBRE EN HIGADO (dpm/g)				R	
	VALOR MEDIO \pm DS			VALOR MEDIO \pm DS				3 Hs.	6 Hs.
	3 HORAS	% CONTROL	6 HORAS	3 HORAS	% CONTROL	6 HORAS	% CONTROL	3 Hs.	6 Hs.
$^{14}\text{CCl}_4$	72,2 \pm 14,9	100	114,2 \pm 12,0	303 \pm 61	100	38 \pm 5	100	3,64	45,90
AT + $^{14}\text{CCl}_4$	52,1 \pm 7,9 ^d	72	66,1 \pm 16,1 ^e	713 \pm 215	57	67 \pm 4	23 5	1,11	15,05

- Ratas macho ayunadas durante 24 horas antes de la administración de AT (3g/kg;po). $^{14}\text{CCl}_4$ en solución con aceite de oliva (1,4 x 106 dpm/ml) fue administrado ip con una dosis de 5 ml/kg, 24 horas después que el AT. Una segunda dosis de AT fue dado junto con el $^{14}\text{CCl}_4$. Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución salina.

b - La unión irreversible del control respectivo se tomó como 100%.

c - R es la relación entre los valores de unión irreversible y la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ respectiva.

d - $p < 0,01$ (Test de T).

e - $p < 0,001$ (Test de T).

Valores de la isocíttrico deshidrogenasa plasmática (ICDh) 24 horas después de la administración del CCl₄, efecto del pretratamiento con AT. (Tabla 4)

El AT fue efectivo en prevenir la necrosis hepática causada por la administración ip del CCl₄.

Este efecto se ve claramente en la Tabla en donde se observan los valores de ICDh plasmática; ya que la actividad de dicha enzima está aumentada significativamente como resultado de la intoxicación con CCl₄; evidenciando el daño provocado por el tóxico; mientras que el pretratamiento con AT disminuye su actividad evidenciando así efecto preventivo en un 90%.

Tabla 4

Efecto del CCl₄ 24 horas después de su administración sobre los valores de ICDh plasmática en ratas previamente tratadas con AT.

a TRATAMIENTO	ACTIVIDAD de ICDh (unidades / ml) VALOR MEDIO ± DS
Control	580 ± 310
CCl ₄	84900 ± 17100
AT	960 ± 780
AT + CCl ₄	9400 ± 4600

a- Ratas macho ayunadas 24 horas antes de la administración de / AT (3g/kg;po). El CCl₄ fue dado ip como solución en aceite / de oliva al 20% (v/v) en una dosis de 1 ml/kg, 24 horas des- / pues que el AT. Una segunda dosis de AT fue dado con el CCl₄.

Los controles recibieron la cantidad equivalente de solución salina y aceite de oliva. Los animales fueron sacrificados / 24 horas después de la administración de CCl_4 . Se utilizaron 5 animales por grupo.

- b- 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 nmol de NADPH por ml de plasma por hora a 25°C . El valor p para el análisis del efecto completo del pretratamiento con AT fue obtenido por el análisis bimodal de variancia; y fue, $p < 0,001$ para la actividad de ICDh.

Efecto de la administración previa del pirazol sobre el tiempo / de sueño provocado por el pentobarbital. (Tabla 5)

La administración de pirazol 3 o 6 horas antes que el pentobarbital prolongan el tiempo de sueño producido por el pentobarbital de manera significativa.

Tabla 5

Tiempo de sueño del pentobarbital en ratas pretratadas con pirazol.

Tiempo del tratamiento de pirazol. (horas)	Tiempo de sueño del pentobarbital. (minutos)		b % del control
	VALOR MEDIO \pm DS		
	Control	Pirazol	
3	125 \pm 29	223 \pm 37	178
6	91 \pm 17	196 \pm 41	215

- a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas fueron inyectadas ip con pirazol con una dosis de 150 mg/kg. Los controles recibieron / solución de ClNa al 0,9%.
A las 3 o 6 horas de la administración del pirazol o del ClNa

0,9%. Los animales recibieron pentobarbital sódico ip con una dosis de 40 mg/kg.

Se utilizaron 8 animales por grupo.

b- El tiempo de sueño del control respectivo se consideró el /// 100%.

c- $p < 0,001$, test de T.

Efecto del pirazol sobre la P-450 reductasa (Tabla 6)

Pirazol 1 mM es capaz de desacelerar la reducción del P-450 por NADPH en un 36,2%.

Aumentando la concentración del pirazol a 6 mM no lleva a una inhibición mayor.

Tabla 6

Efecto del pirazol sobre la P-450 reductasa.

TRATAMIENTO ^a	P-450 reductasa (n mol/min/mg prot) VALOR MEDIO + DS ^b	% INHIBICION
Control	0.80 ± 0.03	
Pirazol (1 mM)	0.51 ± 0.03 ^c	36,2
Pirazol (6 mM)	0.50 ± 0.04 ^c	36,2

a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas. El pirazol fue dado ip en / solución salina. Los controles recibieron cantidad equivalente de solución fisiológica.
Se utilizaron 3 animales por grupo.

b- La actividad de la P-450 reductasa está expresada en n mol de P-450 reducido a 25°C por minuto por mg de proteína.

c- $p < 0.05$, test de T.

Cambios espectrales resultantes de la interacción del pirazol, / CCl₄ y pentobarbital sobre las suspensiones microsomales.

Pirazol (0,1 mM) es capaz de dar un cambio espectral tipo II (con un valle a 395 nm y un pico a 430 nm) al interaccionar / con las suspensiones microsomales.

CCl₄ y pentobarbital (5 mM y 0,05 mM respectivamente), en contraste, causan cambios espectrales tipo I (teniendo un pico / alrededor de 385 nm y un valle alrededor de 420 nm).

Concentraciones saturantes de pirazol (por ejemplo de 0,8 mM) interaccionan con los microsomas y son capaces de bloquear / la producción del cambio espectral causado por CCl₄ 10 mM o por pentobarbital al 0,05 mM.

Efecto del pirazol sobre la peroxidación de lípidos microsomales 'in vivo' producida por el CCl₄ a distintos tiempos de su administración. (Tabla 7)

El pirazol no fue capaz de modificar la intensidad de la / peroxidación de lípidos inducida por el CCl₄, medida por la técnica de dienos conjugados a distintos tiempos de intoxicación // (30 minutos, 3 y 6 horas).

Tabla 7

El efecto del pirazol sobre la peroxidación de lípidos microsomales "in vivo" producida por el CCl_4 a distintos tiempos / de su administración.

Tratamiento ^a	Peroxidación de lípidos "in vivo" ^{cb} (Valor Medio \pm DS)		
	30 min.	3 horas	6 horas
Control	195 \pm 18	191 \pm 13	114 \pm 8
CCl_4	307 \pm 18	278 \pm 25	199 \pm 19
Pirazol	156 \pm 17	199 \pm 6	126 \pm 9
Pirazol + CCl_4	260 \pm 20	267 \pm 17	189 \pm 3

a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas fueron inyectadas con pirazol ip con una dosis de 150 mg/kg, media hora antes de la administración del CCl_4 , dado ip en una dosis de 1 ml/kg como solución en a-/ceite de oliva al 20% (v/v). Los controles recibieron solución / de Cl Na al 0,9% o aceite de oliva según corresponda. Los animales fueron sacrificados 30 minutos, 3 y 6 horas después de la administración del CCl_4 . Se utilizaron 5 animales por grupo.

b- El valor de peroxidación de lípidos está expresado como Δ de absorbancia a 243 nm x 1000 para una solución que tiene 1 mg de lípidos microsomales por ml.

c- El valor de p para el efecto total de pirazol sobre el proceso de peroxidación de lípidos inducido por el CCl_4 obtenido por análisis de variancia bimodal fue $p > 0,1$ para todas las veces testeadas.

Acción del pirazol "in vitro" sobre el efecto prooxidante del // CCl_4 dependiente del NADPH sobre los lípidos microsomales hepáticos. (Tabla 8)

El pirazol con una concentración de 1 mM no fue capaz de alterar significativamente el efecto prooxidante del CCl_4 depen-

diente del NADPH sobre los lípidos microsomales ($p < 0,05$).

Esto está en contraste con el comportamiento de una sustancia antioxidante típica como el dietilditiocarbamato (DDTC) que, en una concentración de 1 mM inhibe hasta el 13% el efecto prooxidante del CCl_4 ($p < 0,001$).

Tabla 8

Acción del pirazol "in vitro" sobre el efecto prooxidante del CCl_4 dependiente del NADPH sobre los lípidos microsomales // hepáticos.

Condiciones experimentales . ^a	Producción de malondialdehído ($\bar{x} \pm \text{DS}$)	Peroxidación de lípidos dependiente de NADPH // promovida por el CCl_4 .
Control	654 \pm 11	100
Pirazol 1 mM	665 \pm 9 ^c	102
DDTC 1 mM	88 \pm 52 ^d	13

a- La incubación se llevó a cabo aeróbicamente a 38°C por 60 minutos en 0,155 M Cl Na, pH 6,5 conteniendo 25 mg Eq microsomas (1,33 mg/ml de proteínas microsomales) en un volumen final de 6 ml; se usan 0,2 mM NADPH y 6 μl de CCl_4 se agregan. DDTC: dietilditiocarbamato, sal de / sodio.

b- La producción de malondialdehído se expresa como Δ de absorbancia \times 1000 a 535 nm en alícuotas de 2 ml de incubación con ácido tiobarbitúrico como se describe en Determinaciones enzimáticas y ensayos. // Los resultados son la media de tres determinaciones.

c- $p > 0,05$ Test de T.

d- $p < 0,001$ Test de T.

Efecto del pirazol sobre la composición de los ácidos grasos de fosfolípidos microsomales de ratas tratadas con CCl_4 . (Tabla 9)

La administración del CCl_4 a las ratas causa una disminución en el contenido del ácido araquidónico de los fosfolípidos microsomales después de 6 o 24 horas de intoxicación.

El pirazol causa asimismo en el contenido del ácido araquidónico de fosfolípidos microsomales una pronunciada disminución dado sólo o con CCl_4 . Este comportamiento se observa en animales sacrificados a 6 o 24 horas después de la administración de CCl_4 .

Tabla 9

Efecto del pirazol sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos microsomales de ratas tratadas con CCl_4 .

TIEMPO	TRATAMIENTO ^a	COMPOSICION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS VALOR MEDIO \pm DS				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:4 ^b
6 hs	Control	26,9 \pm 0,8	28,1 \pm 2,1	6,2 \pm 1,4	8,3 \pm 1,4	30,4 \pm 2,3
	CCl_4	28,9 \pm 1,5	28,1 \pm 0,8	7,9 \pm 0,4	7,1 \pm 1,2	27,3 \pm 1,6
	Pirazol	31,5 \pm 2,6	30,2 \pm 3,1	7,2 \pm 0,6	8,2 \pm 1,4	22,9 \pm 3,8
	Pirazol + CCl_4	32,5 \pm 2,9	29,1 \pm 1,6	8,9 \pm 0,5	0,5 \pm 1,1	19,9 \pm 2,3
24 hs	Control	31,2 \pm 2,0	35,8 \pm 2,1	5,3 \pm 0,5	10,5 \pm 0,4	17,1 \pm 3,1
	CCl_4	33,3 \pm 1,8	32,8 \pm 2,6	10,6 \pm 2,3	11,4 \pm 1,5	8,8 \pm 2,3
	Pirazol	44,9 \pm 2,6	41,0 \pm 1,8	7,8 \pm 1,1	4,1 \pm 0,4	2,3 \pm 0,9
	Pirazol + CCl_4	42,1 \pm 2,0	34,7 \pm 1,6	10,7 \pm 0,5	6,6 \pm 1,4	3,5 \pm 1,7

a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas fueron inyectadas con pirazol ip con una dosis de 150 mg/kg, media hora antes del CCl_4 . El CCl_4 fue dado ip con // una dosis de 1 ml por kg como solución en aceite de oliva al 20% (v/v). Los controles recibieron la cantidad equivalente de aceite de oliva o solución de Cl Na al 0,9%. Los animales fueron sacrificados a 6 ó 24 horas después de la administración de CCl_4 .

b- El valor de p para el efecto total de pirazol sobre el contenido del ácido araquidónico de los fosfolípidos microsomaes es $P < 0,001$ después de 6 ó 24 horas de intoxicación con CCl_4 .

Unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomaes hepáticos 3 ó 6 horas después de la administración a ratas pretratadas con pirazol y la concentración del $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado.

(Tabla 10)

La administración de pirazol disminuye significativamente la unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a los lípidos microsomaes 3 y 6 horas después de la administración del $^{14}\text{CCl}_4$. Esta / disminución se observó a pesar del hecho que la administración / previa del pirazol aumenta los niveles del $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado a las 3 horas.

Tabla 10

Unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomaes 3 y 6 horas después de la administración a ratas pretratadas con pirazol y la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado.

Tabla 10

TRATAMIENTO	UNION IRREVERSIBLE DEL ^{14}C (dpm/mg de lip) VALOR MEDIO \pm DS				$^{14}\text{CCl}_4$ LIBRE EN HIGADO (dpm/g) VALOR MEDIO \pm DS				R ^c	
	3 HORAS	% CONTROL	6 HORAS	% CONTROL	3 HORAS	% CONTROL	6 HORAS	% CONTROL	3 Hs.	6 Hs.
$^{14}\text{CCl}_4$	50 \pm 4,4	100	42,8 \pm 4,5	100	536 \pm 71	100	549 \pm 91	100	0,09	0,07
Pirazol + $^{14}\text{CCl}_4$	20,9 \pm 1,9 ^d	42	20,7 \pm 2,4 ^d	48	755 \pm 114 ^d	141	587 \pm 86 ^e	106	0,02	0,03

a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas. El pirazol fue dado ip en solución salina con una dosis de 150 mg/kg 30 minutos antes que el $^{14}\text{CCl}_4$.

El $^{14}\text{CCl}_4$ fue dado ip en solución con aceite de oliva (1,4 x 10⁶ dpm/ml) con una dosis de 5 ml de solución/kg.

Los animales fueron sacrificados 3 ó 6 horas después de la administración de $^{14}\text{CCl}_4$. Fueron utilizadas 10 ratas por grupo.

b- La unión irreversible del control respectivo se tomó el 100%.

c- R es el cociente entre los valores de unión irreversible y la concentración de $^{14}\text{CCl}_4$.

d- p < 0,001 Test de T.

e- p > 0,3 Test de T.

Las concentraciones del $^{14}\text{CCl}_4$ fueron estimadas colectando el $^{14}\text{CCl}_4$ de los homogenatos hepáticos en tolueno colocado en el compartimiento central de una celda de microdifusión, seguido // por conteo en el centellador, como se indica en Determinaciones enzimáticas y ensayos.

Efecto de la administración del pirazol sobre el contenido de glutatión en el hígado. (Tabla 11)

La administración del pirazol a ratas no cambia significativamente el contenido de glutatión en hígado a 3 ó 6 horas.

Tabla 11

Efecto del pirazol sobre el contenido hepático de glutatión, 1 ó 3 horas después de su administración.

TRATAMIENTO	Contenido de glutatión en hígado ($\mu\text{g/g}$ hígado)	
	VALOR MEDIO \pm DS	
	1 hora	3 horas
Control	1,54 \pm 0,29	1,68 \pm 0,13
Pirazol	1,67 \pm 0,13 ^b	1,62 \pm 0,11 ^b

a- Ratas macho ayunadas 12-14 horas fueron inyectadas con pirazol ip con una dosis de 150 mg/kg. Los controles recibieron solución del ClNa al 0,9%.

Los animales fueron sacrificados a 1 ó 3 horas después de la administración del pirazol. Se utilizaron seis animales por grupo.

b- $p > 0,1$ Test de T.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

La morfología hepática normal de rata ha sido descripta // previamente (fig. 7).

El CCl_4 24 horas después de su administración produce una intensa necrosis centrolobulillar (fig. 8), asociada con hemorragia y edema. En la zona que bordea el área necrótica, las / células se encuentran agrandadas, al igual que en la zona periportal. La arquitectura normal está alterada.

El tratamiento de los animales con AT causa un cierto grado de protección en los hígados de animales tratados con CCl_4 // (fig. 9). Existen áreas de necrosis centrolobulillar, focalizadas y pequeñas, rodeadas por células agrandadas. Areas con la / típica arquitectura hepática se observan en mucha mayor cantidad que las que pueden hallarse en los preparados de animales tratados sólo con CCl_4 .

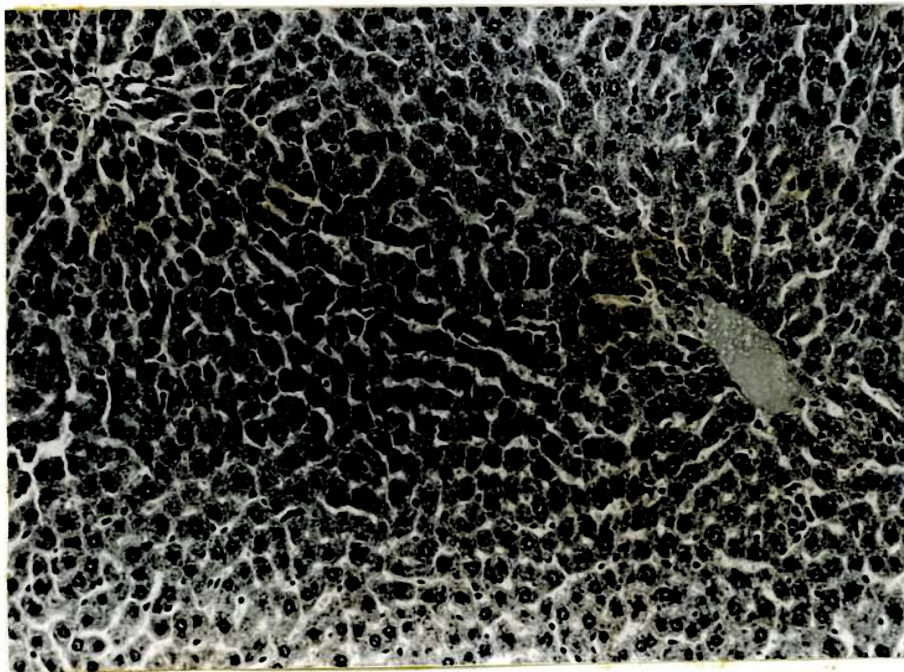
La administración de AT no modifica la arquitectura normal celular y no produce cambios histológicos visibles.

La administración de CCl_4 (24 horas) produce una intensa / infiltración grasa que se extiende desde la zona central a la periportal del lobulillo (fig. 10), que se evidencia nítidamente cuando se compara con el aspecto histológico de los animales // control (fig. 11).

El pretratamiento con AT decrece parcialmente la infiltración grasa provocada por la administración del CCl_4 . (fig. 12)

El tratamiento con AT no produjo ninguna modificación en / el contenido graso del hígado.

Figura nº 7



Hígado de rata. Se observa la morfología hepática característica. Hematoxilina > eosina. Magnificación 160 X.

Figura n° 8

Hígado de rata 24 horas después del tratamiento con // CCl_4 .
Se aprecia una intensa necrosis centrolobulillar. Hema
toxilina - eosina. Magnificación 160 X.

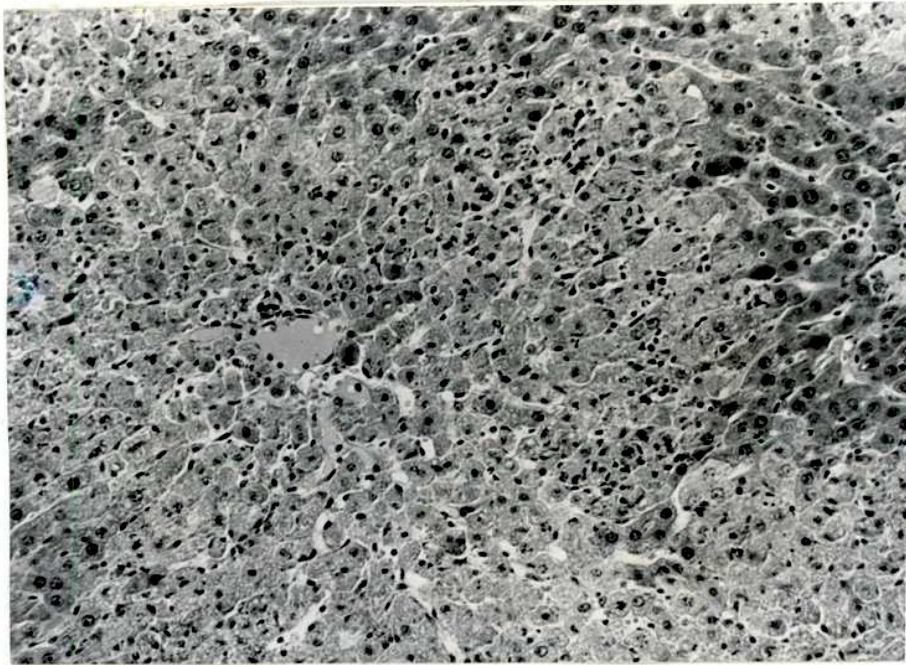
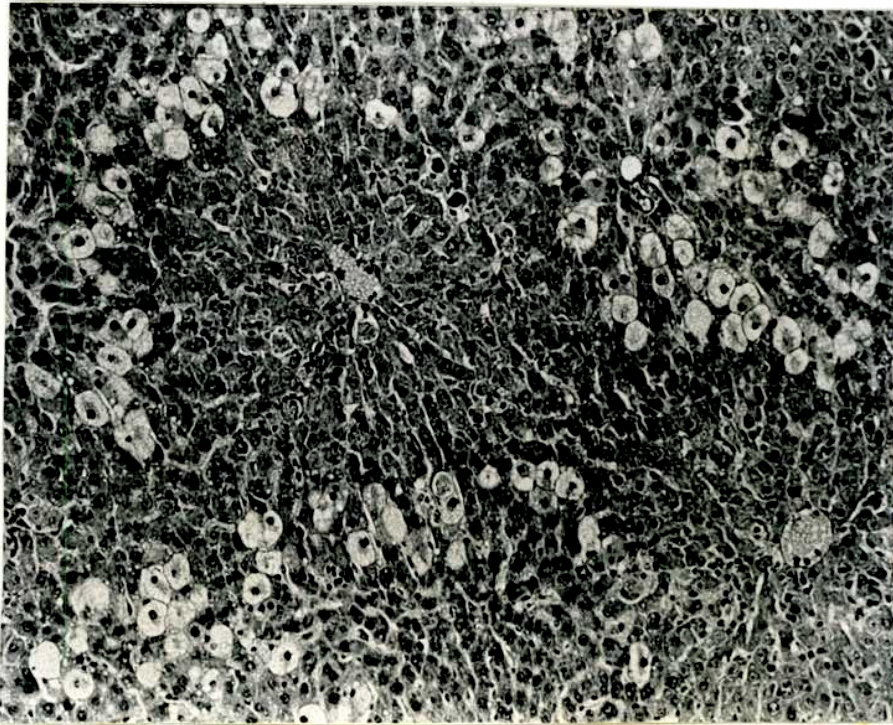


Figura n° 9



Hígado de rata, pretratada con AT, 24 horas después de la administración del CCl_4 . Se observan pequeñas áreas de necrosis centrolobulillar y algunas células con degeneración vacuolar hematoxilina - eosina. Magnificación 160 X.

Figura n° 10

Hígado de rata 24 horas después del tratamiento con // CCl_4 .

Se aprecia la infiltración grasa en las zonas central y periportal.

Sudán Negro B. Magnificación 160 X.

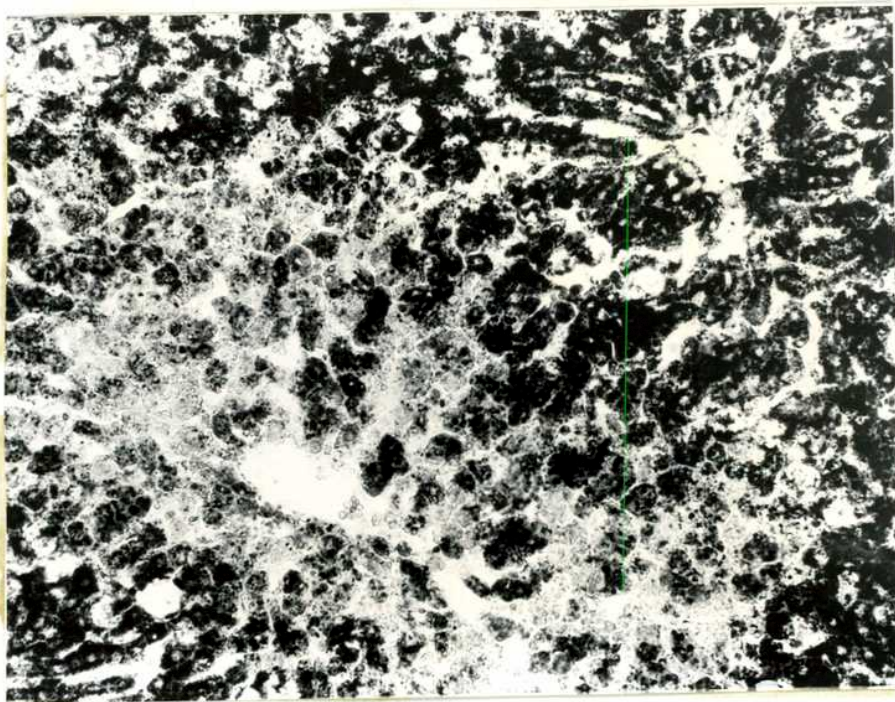
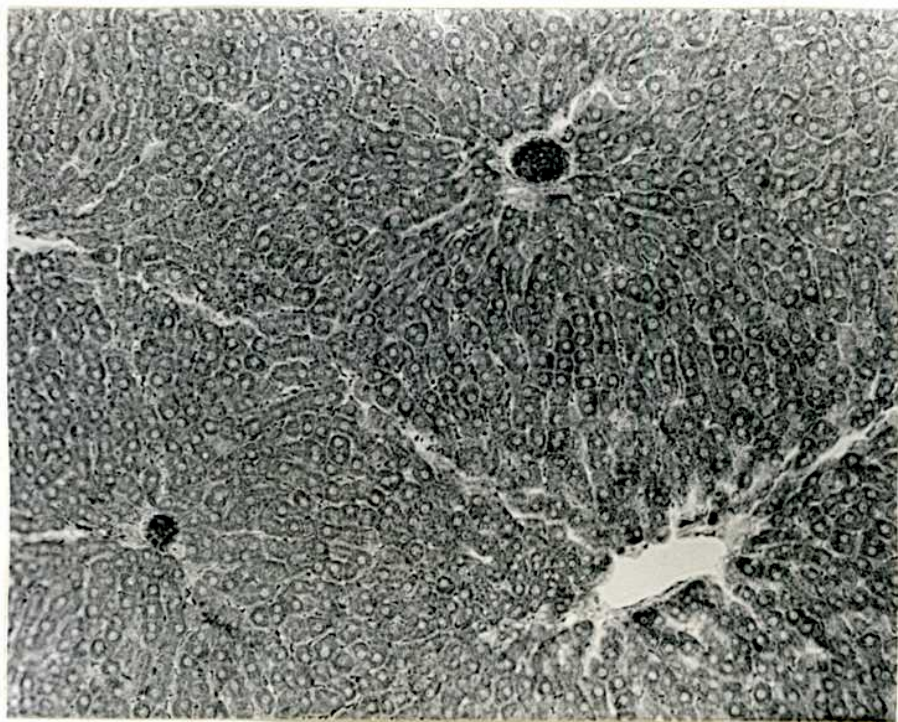


Figura n° 11



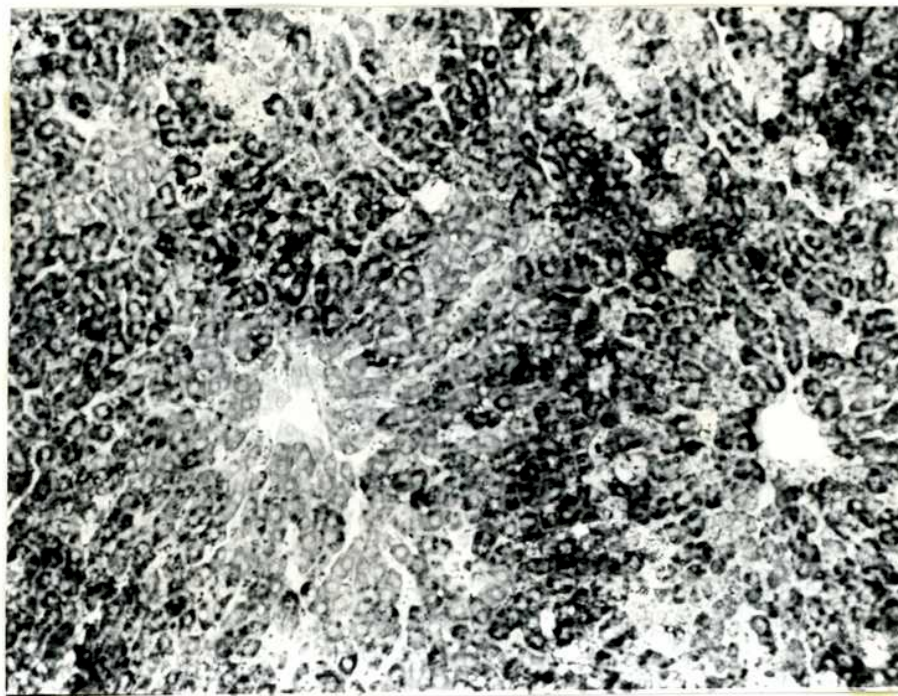
Hígado de rata.
Sudán Negro B. Magnificación 160 X.

Figura n° 12

Hígado de rata, pretratada con AT, 24 horas después de la administración del CCl_4 .

Es posible observar la disminución de la infiltración grasa, sobre todo en la zona periportal.

Sudán Negro B. Magnificación 160 X.



El pretratamiento con pirazol disminuye la extensión de la necrosis provocada por la administración de CCl_4 , disminuyendo / de manera considerable las áreas afectadas por el tóxico. La arquitectura del lobulillo hepático se recupera y sólo se observan zonas pequeñas de necrosis en las áreas que corresponden a las / venas centrales. (fig.13)

La administración del pirazol no afecta en absoluto la arquitectura y aspecto histológico del hígado, no encontrándose // ningún efecto al ser comparado con los controles.

El pretratamiento con pirazol modifica el efecto causado / por el CCl_4 sobre el contenido graso en el hígado, disminuyendo su efecto después de 24 horas de intoxicación. (fig.14)

El aspecto ultraestructural de las células de hígado en // los animales no intoxicados no difiere mayormente de descripciones previas. El núcleo esférico localizado centralmente presenta uno o más nucleolos fácilmente distinguibles. Cercano al núcleo se dispone una abundante cantidad de RER organizado consistiendo en cisternas apiladas, dispuestas de manera paralela. // Los ribosomas se encuentran en su mayor parte adheridos a las // membranas, algunos de los libres se disponen como polisomas o mo noribosomas.

En la zona periférica de la célula próximo a la zona ocupada por el canalículo biliar es fácil distinguir una buena proporción de SER. No es posible distinguir partículas de glucógeno y ésto se debe al ayuno al que se ven afectados los animales para

llevar a cabo las experiencias.

En esta zona se distingue la presencia del aparato de Golgi asociado con un número de vacuolas y vesículas de distintos tamaños.

El número grande de mitocondrias es lo que le confiere al citoplasma su apariencia granular. En la zona próxima al canalículo biliar es posible distinguir la presencia de un número pequeño de lisosomas, pleomorfos.

Los peroxisomas son escasos, al igual que el número de gotas de grasa que se presentan en el citoplasma. (fig.15)

La ultraestructura de los hepatocitos centrolobulillares 3 horas después de la administración del CCl_4 presenta algunas alteraciones (fig. 16). La más notoria es una suave dilatación y vesiculización del RE, perdiendo el RER su ordenamiento característico. Estos cambios observados son coincidentes con el despegue de los ribosomas de las membranas, no siendo posible ver polisomas en el citoplasma pero sí partículas ribosomales dispersas.

En muchas de las células es posible observar la dilatación de los extremos de las cisternas del complejo de Golgi, así como un número variable de cuerpos ovales y redondeados de distintos tamaños, rodeados por una única membrana (no encontrándose en las células de los controles). Al igual que las membranas del RE, las cubiertas que conforman la envoltura nuclear sufren una suave dilatación. Las mitocondrias y los peroxisomas presentan un aspecto normal. El número de gotas de grasa se ve aumentado

y es posible observar en forma ocasional la presencia de figuras de mielina.

Seis horas después de la administración del CCl_4 las alteraciones en el hepatocito son mucho más intensas (fig. 17). Las alteraciones en los núcleos no son infrecuentes, involucrando // tanto las membranas de la envoltura, como los poros y el contenido nuclear. Muchos núcleos muestran la condensación del mate-// rial cromatínico con marginación nuclear y nucleolar.

El citoplasma de las células hepáticas está ocupado con un gran número de vesículas abultadas, rodeadas por una única membrana que parecen comprimir una pequeña zona de material cito-// plasmático en donde se encuentran las mitocondrias y peroxisomas. La mayor parte de estas vesículas presentan un lumen claro, pero también es posible observar sustancias densas o filamentosas dentro de ellas.

El despeque de los ribosomas de las membranas del retículo es mucho más intenso, siendo muy difícil encontrar áreas con los ribosomas unidos a las membranas, masas de pequeños túbulos y vesículas no muy nítidamente definidos se ven como integrantes del SER.

Las figuras de mielina se observan tanto en el citoplasma como en las zonas próximas a las microvellosidades y en el lumen de los sinusoides (fig.18 A,B) Con este tratamiento la dilatación de las membranas que conforman el complejo de Golgi es mucho más notable, observándose en muchas células grupos de vesículas re-// dondeadas cercanas al canalículo biliar (fig. 18C). En este mis-

mo lugar es posible observar un número elevado de vacuolas autofágicas. Ocasionalmente es posible ver la ruptura de las membranas celulares de forma tal que las organelas se vuelcan en el espacio de Disse.

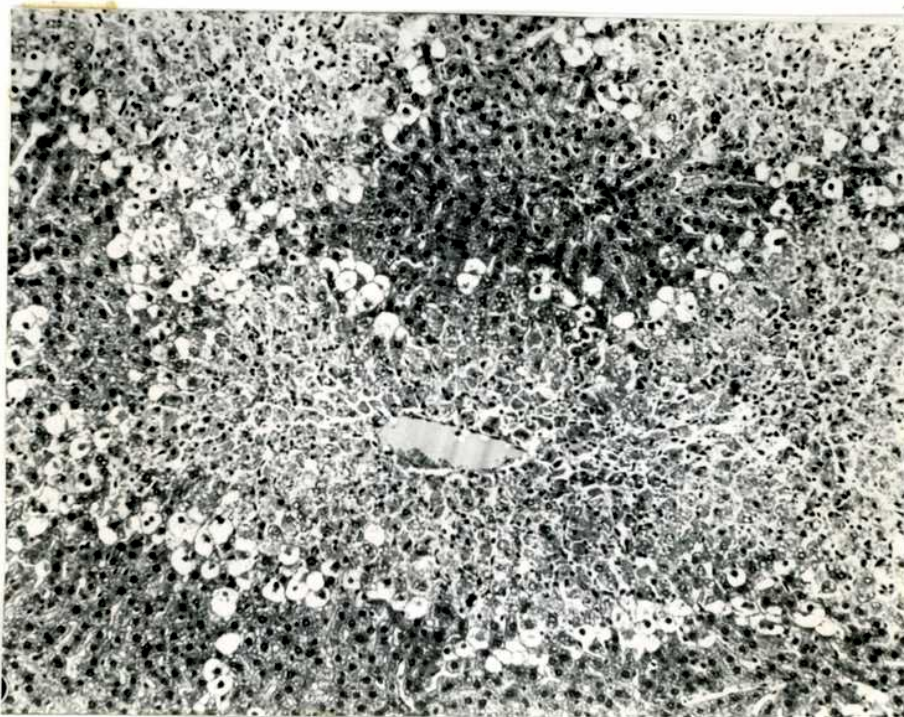
El efecto del pirazol 3 horas después de su administración no es intenso. Se observa un leve despeque de ribosomas del RER.

A las 6 horas de su administración el pirazol causa una leve dilatación de las membranas del RER, pero manteniendo su organización en líneas paralelas. Se aprecia una leve disminución / en el número de ribosomas adheridos a las membranas del RER. /// (fig. 19). En forma ocasional se observan extensas áreas de SER como consecuencia del tratamiento con pirazol.

El pretratamiento con pirazol en aquellos animales intoxicados 3 horas con CCl_4 preserva la integridad de las estructuras subcelulares. Observándose que el RER consiste en cisternas ordenadas, en dónde los ribosomas tapizan las membranas casi totalmente (es importante recordar el efecto propio del pirazol sobre el RER y el despeque de ribosomas). Los ribosomas libres se ven en el citoplasma como polisomas en su mayor parte, (fig. 20)

El pretratamiento con pirazol en animales intoxicados 6 // horas con CCl_4 disminuye el grado de dilatación de las vesículas citoplasmáticas (fig. 21). No tiene efecto sobre la vesiculización de las cisternas que conforman el aparato de Golgi. Tampoco se previenen los efectos sobre los núcleos de los hepatocitos. El pretratamiento elimina la formación de figuras de mielina.

Figura n° 13



Hígado de rata, pretratada con pirazol, 24 horas des-/
pués de la administración del CCl_4 .

Se pueden observar áreas pequeñas con necrosis centro-
lobulillar. Se aprecian células con degeneración vacuo-
lar.

Hematoxilina - eosina. Magnificación 160 X.

Figura n° 14

Hígado de rata, pretratada con pirazol, 24 horas después de la administración del CCl_4 .

Se observa la disminución de la infiltración grasa que provoca el CCl_4 .

Sudán Negro B. Magnificación 160 X.

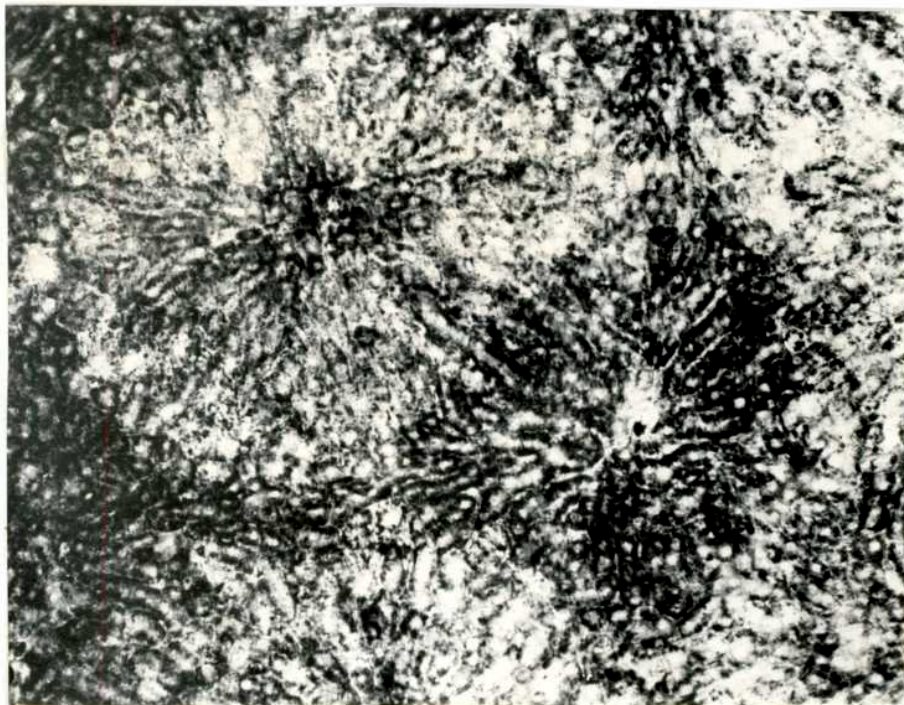


Figura n° 15



Hepatocito centrolobulillar de rata.
Se observa: parte del núcleo, mitocondrias, RER organi-
zado con los ribosomas unidos a sus membranas. Magnifi-
cación 27000 X.

Figura n° 16

Hepatocito centrolobulillar de rata tratada con CCl_4 a tres horas de su administración.

El RE se encuentra algo dilatado y desorganizado. Los ribosomas en su mayoría se encuentran despegados de // las membranas del RER.

Se puede observar la presencia de gotas de grasa. La apariencia de las mitocondrias es normal. Magnificación 27000 X.

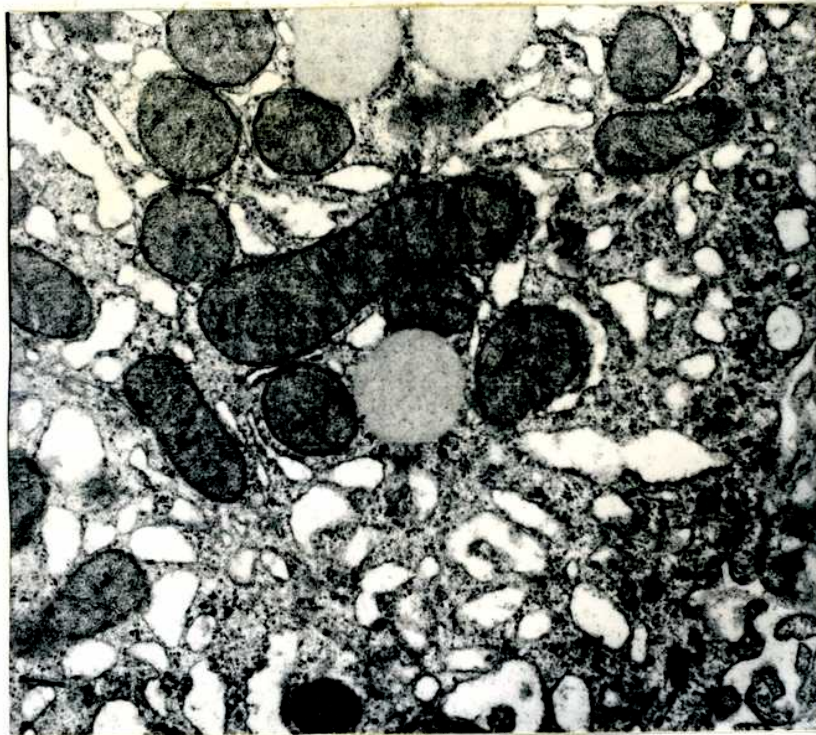
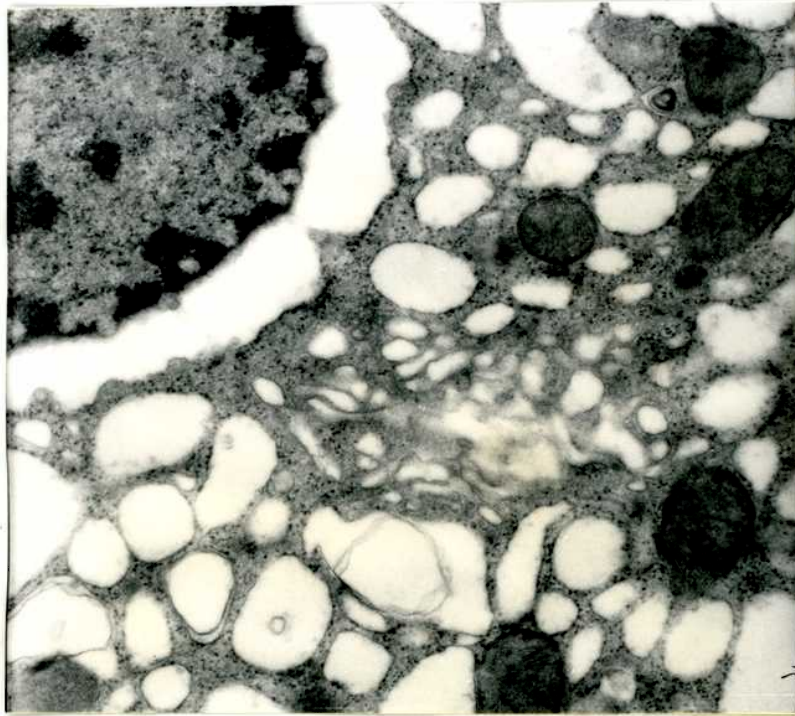


Figura n° 17



Hepatocito centrolobulillar de rata tratada con CCl_4 a seis horas de su administración.

La envoltura nuclear está dilatada, el material cromatínico se presenta condensado.

El citoplasma se encuentra ocupado por gran número de vacuolas. Las mitocondrias tienen apariencia normal.

Magnificación 27000 X.

Figura n° 18

Detalle de las alteraciones provocadas por el CCl_4 sobre los hepatocitos centrolobulillares de rata, seis / horas después de su administración.

- a- Zona correspondiente al SER. Puede apreciarse la // presencia de una figura de mielina. Magnificación / 30000 X.
- b- Figura de mielina en el citoplasma celular. Magnifi
cación 27000 X.
- c- Complejo de Golgi dilatado. Magnificación 27000 X.

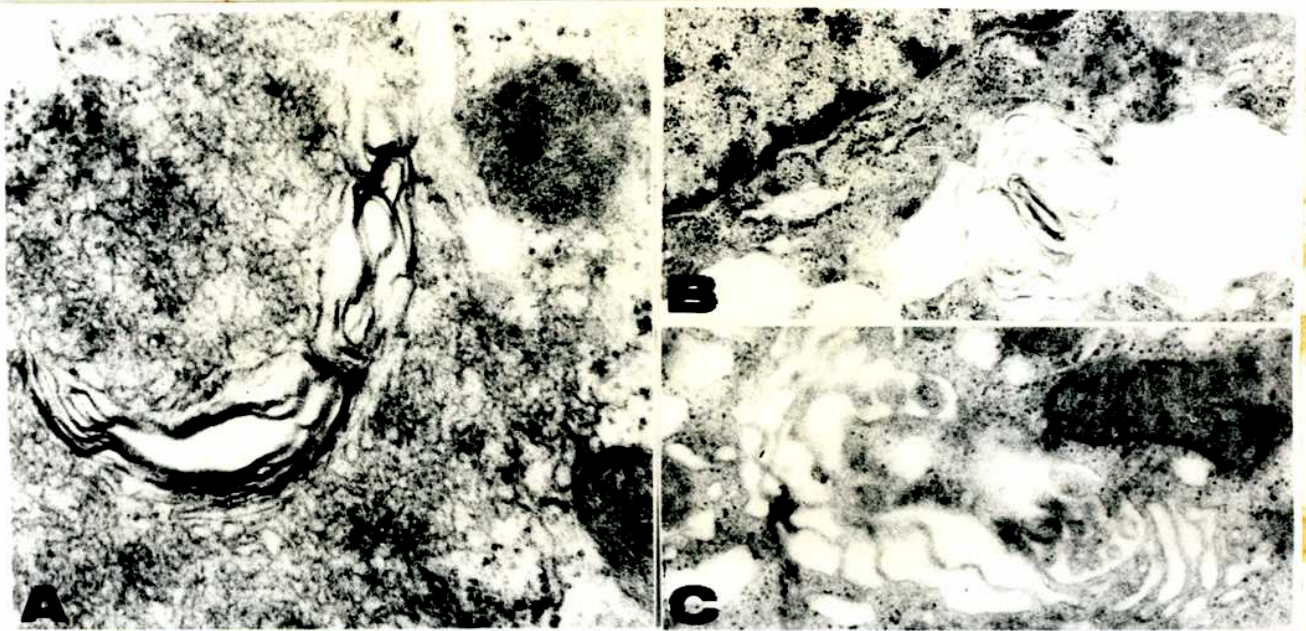
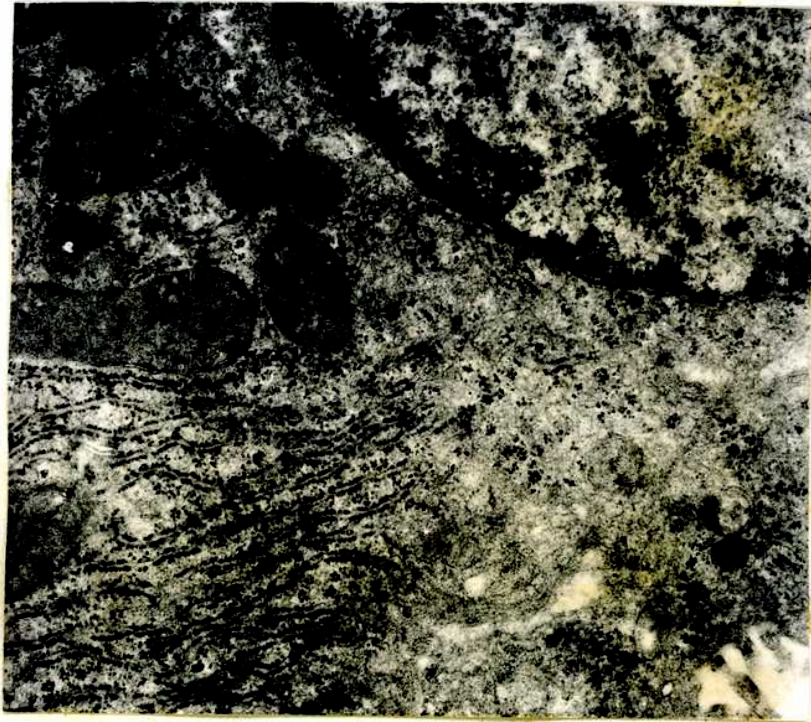


Figura n° 19



Hepatocito centrolobulillar de rata tratada con pira-/
zol, seis horas después de su administración, se observa
parte del núcleo con su envoltura y contenido intactos.
Las membranas del RER no se encuentran tapizadas total
mente por los ribosomas.
Las mitocondrias presentan su aspecto normal. Magnifi-
cación 27000 X.

Figura n° 20

Hepatocito centrolobulillar de rata, pretratada con pirazol, tres horas después de la administración de CCl_4 . Las mitocondrias presentan aspecto normal. El RER ubicado próximo a ellas está algo dilatado, notándose la presencia de ribosomas en sus membranas. Magnificación 27000 X.

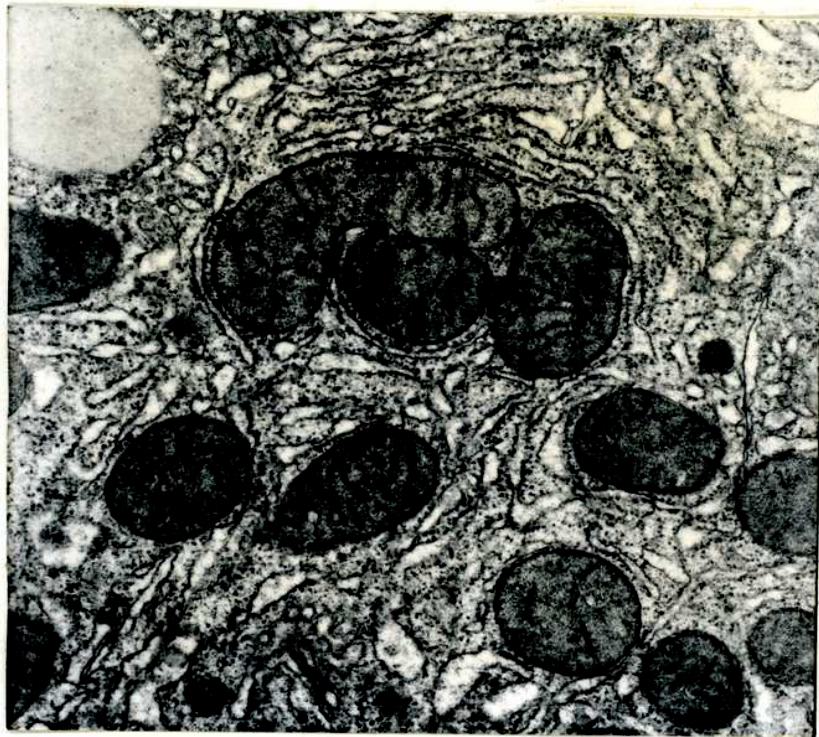
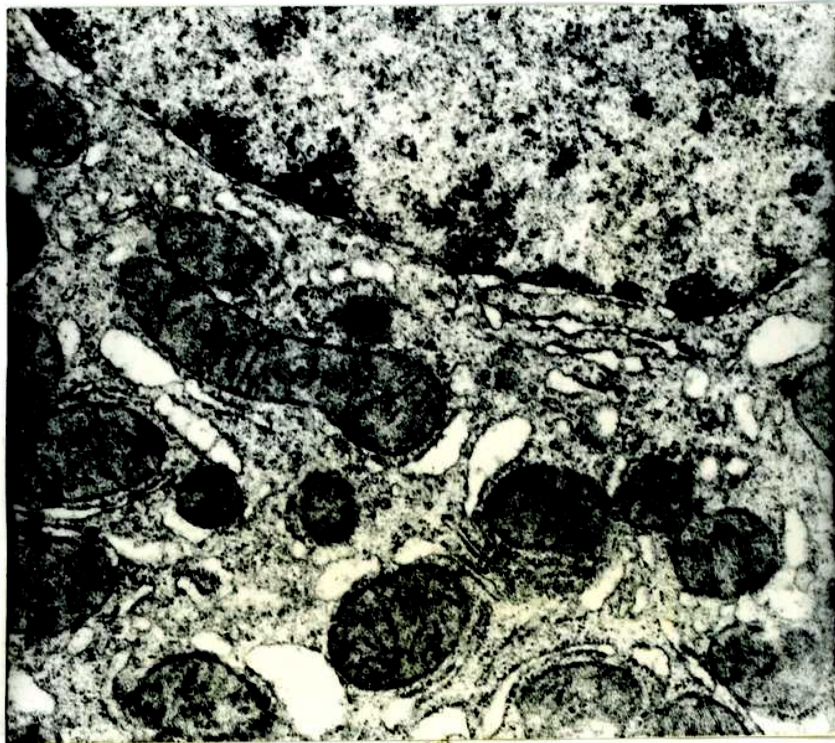


Figura n° 21



Hepatocito centrolobulillar de rata, pretratada con pi
razol, seis horas después de la administración del CCl_4 .
La envoltura nuclear y el RER se encuentran dilatados.
Las mitocondrias tienen aspecto normal. Magnificación
27000 X.

La administración de AT a 3 y a 6 horas causa diferentes / alteraciones en la ultraestructura celular. (fig. 22). Una de / las más características es la microvesiculización de la estructura del RER. Su estructura típica con membranas dispuestas en forma paralela, con abundante cantidad de ribosomas unidos a e-llos, aparece por acción del AT constituida por vesículas pequeñas y redondeadas, sin ribosomas adosados a su superficie. También se observan áreas extensas de SER. El tratamiento con AT causa efectos sobre la estructura mitocondrial, algunas son a-largadas, con estrangulación en su parte media, otras, muestran dilatación del espacio comprendido entre la membrana externa e interna, otras presentan crestas vesiculadas, mientras algunas de ellas están rotas. Los peroxisomas aumentan en número con / respecto a los controles, presentando una matriz menos densa y un nucleído mucho más prominente y nítido. (fig.23)

Los efectos de AT y de CCl_4 (3 horas de intoxicación) disminuyen en aquellos animales tratados con ambos compuestos /// (fig.24). Esto es muy evidente sobre la estructura del RER, ya que se presenta con sus membranas dispuestas ordenadamente y // con algunos ribosomas unidos a ellas. Muy pocas células presentan el aspecto característico de la intoxicación con CCl_4 , mientras ninguna de ellas muestran el aspecto descrito para los hígados de animales tratados con AT.

Se observan extensas áreas de SER pero sólo ocasionalmente se ven mitocondrias dañadas o rotas; las alteraciones en el complejo de Golgi son menos intensas. La variación en el número y

en el aspecto de los peroxisomas se mantiene, mientras que el número de gotas de grasa y de figuras de mielina es menor que en los hígados de animales tratados con CCl_4 .

En aquellos animales tratados con AT y con CCl_4 (6 horas) hay una cierta disminución de las alteraciones provocadas por el CCl_4 sobre el RER, pero en ningún caso llega a ser tan completa como la obtenida a 3 horas. (fig. 25)

El número de gotas de grasa y figuras de mielina también se ve disminuído con respecto a los animales intoxicados con el tóxico.

Figura n° 22

Hepatocito centrolobulillar de rata tratada con AT /// seis horas después de su administración. El núcleo está intacto. En el citoplasma se observa la microvesiculización del RER, así como el despegue de los ribosomas de sus membranas. Puede notarse la dilatación del espacio comprendido en las crestas mitocondriales. Magnificación 27000 X.

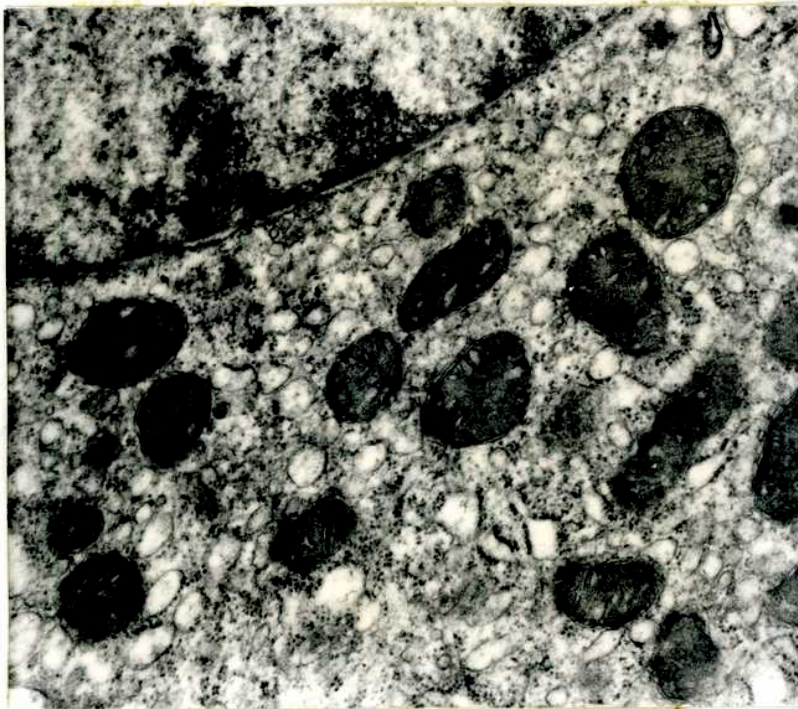
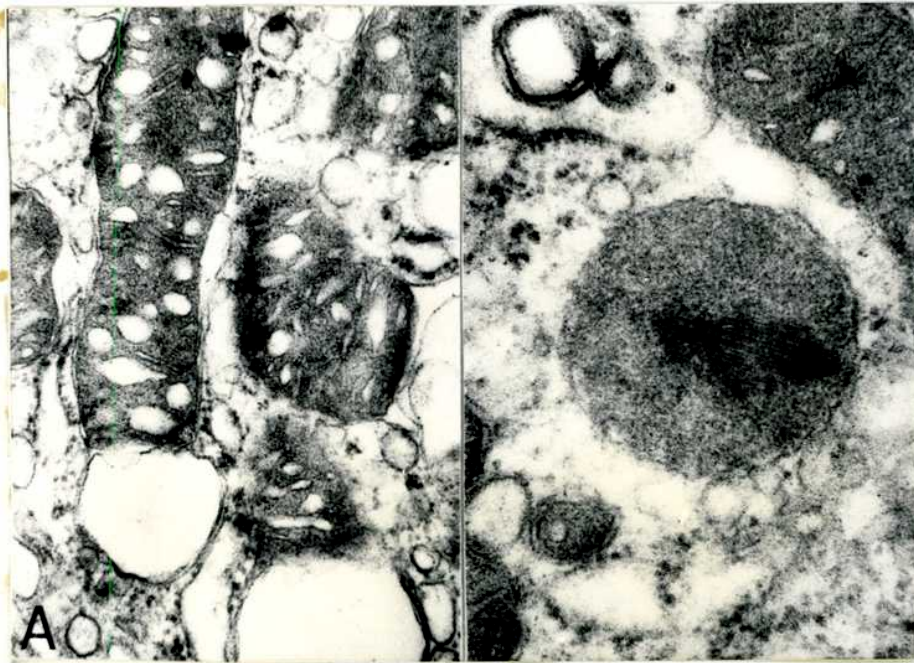


Figura n° 23



Detalle de las alteraciones causadas por el AT sobre /
los hepatocitos centrolobulillares de rata, seis horas
después de su administración.

- a- Mitocondrias con crestas extremadamente dilatadas.
Magnificación 48000 X.
- b- Peroxisoma con matriz densa y nucleído muy definido
y prominente. Magnificación 48000 X.

Figura n° 24

Hepatocito centrolobulillar de rata, pretratada con AT, tres horas después de la administración del CCl_4 . El núcleo está intacto. El RER, ordenado y con sus membranas tapizadas con ribosomas. Es posible observar la presencia de polisomas. Las mitocondrias presentan las crestas dilatadas. Magnificación 27000 X.

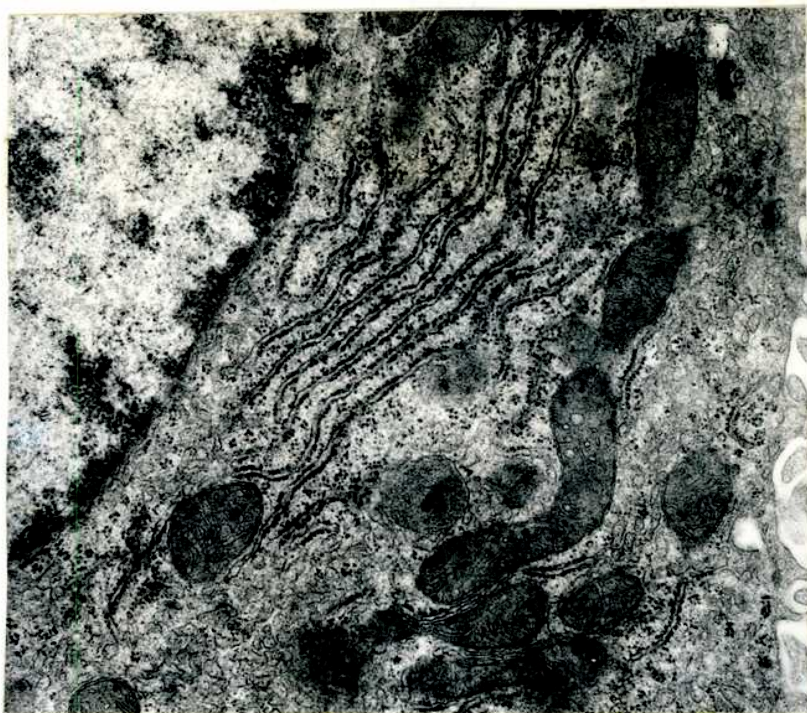
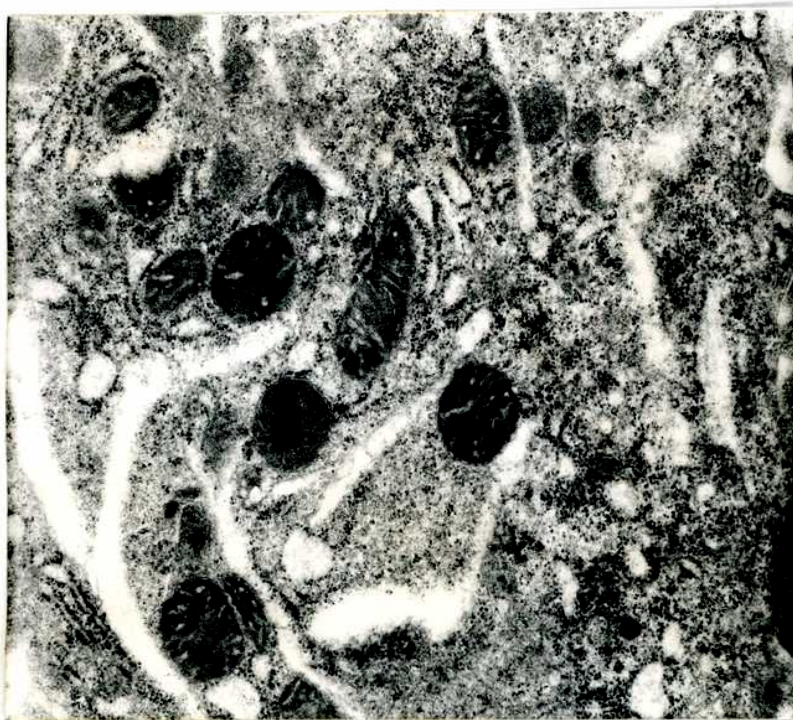


Figura n° 25



Hepatocito centrolobulillar de rata, pretratada con AT, seis horas después de la administración del CCl_4 . El RER se encuentra marcadamente dilatado, con pocos / ribosomas adheridos a sus membranas, la mayoría de e- / llos están libres en el citoplasma. Magnificación /// 27000 X.

RESULTADOS QUE CORRESPONDEN AL PLAN DE TRABAJO "B"

Efecto del CCl₄ sobre el contenido del Citocromo P-450 (P-450) en gallina. (Tabla 12)

El contenido del Citocromo P-450 se ve disminuído significativamente a 1,3 y 6 horas de la administración del CCl₄, a 24 horas el contenido es igual al observado para los animales controles , lo que indica una clara capacidad de reparación del daño provocado por el tóxico.

Tabla 12

Efecto del CCl₄ sobre el contenido del P-450 en hígado de gallina.

TRATAMIENTO ^a	CONTENIDO DE P-450 ^b (n mol/mg prot) VALOR MEDIO ± DS			
	1 h	3 hs	6 hs	24 hs
Control	0.15 ± 0.06	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02
CCl ₄	0.06 ± 0.01 ^c	0.09 ± 0.04 ^d	0.04 ± 0.02 ^e	0.16 ± 0.04 ^f

a- CCl₄ fue dado intraperitonealmente en una dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v) en aceite de oliva. Los controles recibieron la cantidad equivalente de aceite de oliva.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos después de la administración del tóxico. Se utilizaron seis animales por grupo, ayunados / 24 horas antes a la administración del tóxico.

b- El contenido del citocromo P-450 se expresa como n mol/mg de proteína microsomal.

c- $p < 0.05$, Test de T.

d- $p < 0.01$, Test de T.

e- $p < 0.001$, Test de T.

f- $p > 0.01$, Test de T.

Efecto del CCl₄ a distintos tiempos de su administración sobre la actividad de la enzima Glucosa 6 Fosfatasa (G6P-asa) en gallina. (Tabla 13)

La actividad de la enzima glucosa 6 fosfatasa se vé disminuída por acción del tóxico ya sea a 1;3;6 y 24 horas después de la administración de la droga.

Tabla 13

Efecto del CCl₄ sobre la actividad de la GGP-asa.

a TRATAMIENTO	b ACTIVIDAD DE LA G6P-asa VALOR MEDIO ± DS			
	1 h	3 hs	6 hs	24 hs
Control	30,88 ± 3,59	28,43 ± 3,27	38,58 ± 4,31	42,05 ± 3,75
CCl ₄	25,73 ± 3,39 ^c	24,04 ± 2,73 ^c	29,45 ± 2,02 ^d	34,28 ± 1,22 ^d

a- CCl₄ fue dado intraperitonealmente dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v) en aceite de oliva. Los controles recibieron la cantidad equivalente de aceite de oliva.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos después de la / administración del tóxico. Se utilizaron seis animales por grupo ayu nados 24 horas antes de la administración del tóxico.

b- Una unidad enzimática es la requerida para formar 1 mg de fósforo i-norgánico en 15 minutos a 37°C por mg de proteína microsomal.

c- $p < 0.05$ Test de T

d- $p < 0.01$ Test de T

Efecto del CCl_4 sobre la actividad de la Aminopirina N-demetilasa (AP-asa) de hígado de gallina. (Tabla 14)

A una, tres y seis horas de intoxicación con el CCl_4 se // puede observar una disminución en la actividad enzimática de la aminopirina N-demetilasa, mientras que a las 24 horas se observa un valor semejante al control, lo que indicaría la recuperación de la actividad.

Tabla 14

Efecto del CCl_4 sobre la actividad de la AP-asa.

TRATAMIENTO ^a	ACTIVIDAD DE LA AP-asa ^b			
	VALOR MEDIO \pm DS			
	1 h	3 hs	6 hs	24 hs
Control	29,42 \pm 3,44	42,38 \pm 5,46	37,48 \pm 2,80	28,7 \pm 5,73
CCl_4	13,38 \pm 5,02 ^c	25,44 \pm 5,38 ^c	21,62 \pm 4,47 ^c	24,64 \pm 7,53 ^d

a- CCl_4 fue dado intraperitonealmente en una dosis de 1 ml/kg como solución en aceite de oliva al 20% (v/v). Los controles recibieron la cantidad equivalente de aceite de oliva. Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos después de la intoxicación. Se utilizaron seis animales por grupo ayunados 24 horas antes de la administración del tóxico.

b- Una unidad enzimática es la requerida para formar 1 n mol de formaldehído en 30 minutos por mg de proteína microsomal a 37°C.

c- $p < 0.001$ Test de T.

d- $p > 0.1$ Test de T.

Efecto del CCl₄ sobre la peroxidación de lípidos microsomales "in vivo" a distintos tiempos de su administración en gallina. (Tabla 15)

Como puede evidenciarse en la Tabla 15, no hay una estimulación significativa de la peroxidación de lípidos a causa de la administración de CCl₄, a distintos tiempos de intoxicación (15', 1,3,6 y 24 hs), revelable por la técnica de absorción ultravioleta de dienos conjugados.

Asimismo no es posible notar una disminución significativa en el contenido del ácido araquidónico de microsomas hepáticos / de gallinas (Tabla 16), sustrato favorito de la peroxidación de lípidos, hecho que se observa en rata, intoxicadas con CCl₄ en / donde la peroxidación de lípidos tiene lugar. Esto sugiere que no ocurre el proceso peroxidativo en el hígado de gallinas tratadas con CCl₄, a pesar que los niveles de CCl₄ que llegan al hígado de gallina son similares a aquellos observados para rata.

Tabla 15

Efecto del CCl₄ sobre la peroxidación de lípidos microsomales.

a TRATAMIENTO	PEROXIDACION DE LIPIDOS "in vivo" ^b (VALOR MEDIO ± DS)				
	15 min.	1 h.	3 hs.	6 hs.	24 hs.
Control	277 ± 179	240 ± 65	182 ± 29	282 ± 58	290 ± 48
CCl ₄	433 ± 137 ^c	254 ± 49 ^c	190 ± 10 ^c	345 ± 128 ^c	378 ± 95 ^c

- a- CCl_4 fue dado intraperitonealmente en una dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v) en aceite de oliva. Los controles recibieron la cantidad equivalente de aceite de oliva. Los animales fueron sacrificados 15 min.; 1, 3, 6 y 24 hs. después de la administración del tóxico. Se utilizaron 6 animales por grupo ayunados 24 horas antes de la administración del tóxico.
- b- El valor de la peroxidación está expresado como Δ de absorbancia a 243 nm x 1000 para una solución que tiene 1 mg de lípidos microsomales por ml.
- c- $p > 0,1$ Test de T.

Efecto del CCl_4 sobre la composición de los ácidos grasos de fosfolípidos microsomales de gallina a distintos tiempos de su administración. (Tabla 16)

Tanto a 6 como a 24 horas de intoxicación con CCl_4 no se encuentra una disminución significativa en el contenido del ácido araquidónico (C20:4) como puede verse en la Tabla.

Tabla 16

Efecto del CCl_4 sobre la composición porcentual de los ácidos grasos.

T I E M P O	TRATAMIENTO ^a	COMPOSICION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS				
		VALOR MEDIO \pm DS				
		C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 20:4
6 hs	Control	25,59 \pm 1,49	30,43 \pm 1,27	13,41 \pm 1,34	13,50 \pm 1,23	17,07 \pm 2,05
	CCl_4	29,63 \pm 2,72 ^b	25,49 \pm 1,66 ^b	19,55 \pm 2,51 ^b	11,54 \pm 1,76 ^c	13,79 \pm 2,52 ^c
24 hs	Control	29,49 \pm 2,72	28,04 \pm 1,88	13,04 \pm 0,88	11,21 \pm 0,91	18,22 \pm 2,06
	CCl_4	27,19 \pm 0,85 ^c	27,28 \pm 2,09 ^c	17,90 \pm 4,86 ^c	12,65 \pm 3,20 ^c	14,98 \pm 2,59 ^c

a- CCl_4 fue dado intraperitonealmente en una dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v) en aceite de oliva. Los animales fueron ayunados 24 horas antes de la administración del tóxico y matados a 6 y / 24 horas de intoxicación.

b- $p < 0.05$, Test de T.

c- $p > 0.005$, Test de T.

Concentración de CCl_4 en el hígado a distintos tiempos de su administración ip a gallinas. (Tabla 17)

Tabla 17

TIEMPO DE TRATAMIENTO ^a (hs)	CONCENTRACION CCl_4 EN HIGADO (mg/g de hígado) VALOR MEDIO \pm DS
1	536 \pm 85
3	473 \pm 399
6	278 \pm 166

a- CCl_4 fue dado intraperitonealmente en una dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v). Los animales / fueron sacrificados a distintos tiempos después de la administración de la droga. Se utilizaron seis animales por grupo.

Unión covalente del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales y concentración del $^{14}\text{CCl}_4$ libre en hígado en rata y gallina. (Tabla 18)

El cociente entre la unión irreversible del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsomales hepáticos y las concentraciones del $^{14}\text{CCl}_4$ en / hígado es una expresión de la capacidad activante de los microso

mas hepáticos. Es posible observar que la capacidad en la rata es aproximadamente el doble que en la gallina.

Tabla 18

Unión irreversible del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a lípidos microsoma-
les 3 hs. después de la administración y concentración del $^{14}\text{CCl}_4$ en el hígado.

ESPECIE ^a	UNION IRREVERSIBLE ^{14}C de $^{14}\text{CCl}_4$ (dpm/g lípidos) VALOR MEDIO \pm DS	CONCENTRACION DEL $^{14}\text{CCl}_4$ EN HIGADO (dpm/g híg.) (VALOR MEDIO \pm DS)	R ^b
RATA	46.200 \pm 7.400	460 \pm 114	100 \pm 18
GALLINA	34.000 \pm 900	649 \pm 217	55 \pm 14

a- Los animales fueron ayunados 12 - 14 horas (rata), 22-24 horas (gallinas) previos a la administración del $^{14}\text{CCl}_4$ en aceite de oliva / ($1,4 \times 10^6$ dpm/ml) con una dosis de 5 ml de solución/kg, y fueron sacrificados 3 horas después de la administración del tóxico. Se utilizaron 5 animales por grupo.

b- R es el cociente entre los valores de unión irreversible y las concentraciones de $^{14}\text{CCl}_4$ respectivas. Están expresadas como g hígado /g lípido \pm DS.

Efecto del CCl_4 24 horas después de su administración sobre la actividad de la enzima Isocítrica deshidrogenasa plasmática (ICDh) en rata y gallina; su correlación con el efecto histológico. (Tabla 19)

El valor de la actividad de la ICDh en hígado de rata au-/

menta significativamente a causa de la intoxicación con CCl_4 , // existiendo una correlación con el daño evidenciado histológicamente.

En el caso de la gallina no se observa ningún cambio en la actividad enzimática, ya que los valores de la actividad de la / ICDh no difieren de los obtenidos para los animales no tratados con el tóxico. De la misma manera se correlaciona con la ausencia de daño a nivel histológico.

Efecto del CCl_4 24 horas después de su administración sobre la actividad de la enzima Isocítrica deshidrogenasa plasmática / (ICDh) en rata y gallina.

Tabla 19

ESPECIES Y ^a TRATAMIENTO	ICDh ^b VALOR MEDIO \pm DS	Grado de daño ^c (necrosis) obser vada histológica mente.
RATA Control	160 \pm 80	--
CCl_4	108.000 \pm 16.800 ^d	++++
GALLINA Control	570 \pm 130	--
CCl_4	600 \pm 200 ^e	

a- Ratas macho Sprague Dawley (240-280g) y gallinas Leghorn (1,5-2kg) fueron ayunados 12-14 hs y 22-24 hs antes de la administración del CCl_4 ; CCl_4 fue dado ip en una dosis de 1 ml/kg como solución al 20% (v/v) en aceite de oliva. Los controles recibieron la cantidad equi valente de aceite de oliva. 5 animales por grupo se utilizaron.

- b- Una unidad de enzima es la requerida para formar 1 n mol NADPH/ml plasma/ hora a 25°C.
- c- += leve (20-30 % necrosis); ++= moderada (50% necrosis); marcada (75% necrosis); +++= muy intensa (90-100% necrosis).
- d- $p < 0,001$, Test de T.
- e- $p > 0,1$, Test de T.

ESTUDIOS HISTOLOGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN HIGADO DE GALLINA

La estructura histológica de un hígado de gallina no tratada ha sido descripta previamente. (fig. 26)

No es posible evidenciar alteraciones a nivel histológico en hígado de gallina intoxicada 24 horas con CCl_4 , tal como // queda demostrado en la fig. 27, donde es posible observar la arquitectura típica del lobulillo hepático, ordenado, con ausencia de necrosis en la zona centrolobulillar. No es posible observar a este nivel ningún daño provocado por el tóxico.

La ultraestructura del hígado a 3,6 y 24 horas después de la administración del tóxico, muestra algunas alteraciones cuando se lo compara con el hígado normal. (fig. 28)

El núcleo tiene apariencia normal, la membrana nuclear se encuentra dilatada.

Las mitocondrias presentan un aspecto normal, manteniendo su densidad, forma y tamaño característicos.

El RER ubicado en su mayor proporción en la zona próxima / a las mitocondrias está algo dilatado. Es posible observar el / despegue de ribosomas de sus membranas. También se evidencia la dilatación y suave vesiculización del RER cercano al núcleo, notándose asimismo el despegue de los ribosomas. (fig. 29)

En forma ocasional se observan mitocondrias hinchadas, manteniéndose en dichos casos la dilatación del RER y despegue de / los ribosomas. (fig. 30)

Figura n° 26

Hígado de gallina.
Se observa la morfología hepática característica.
Hematoxilina - eosina. Magnificación 160 X.

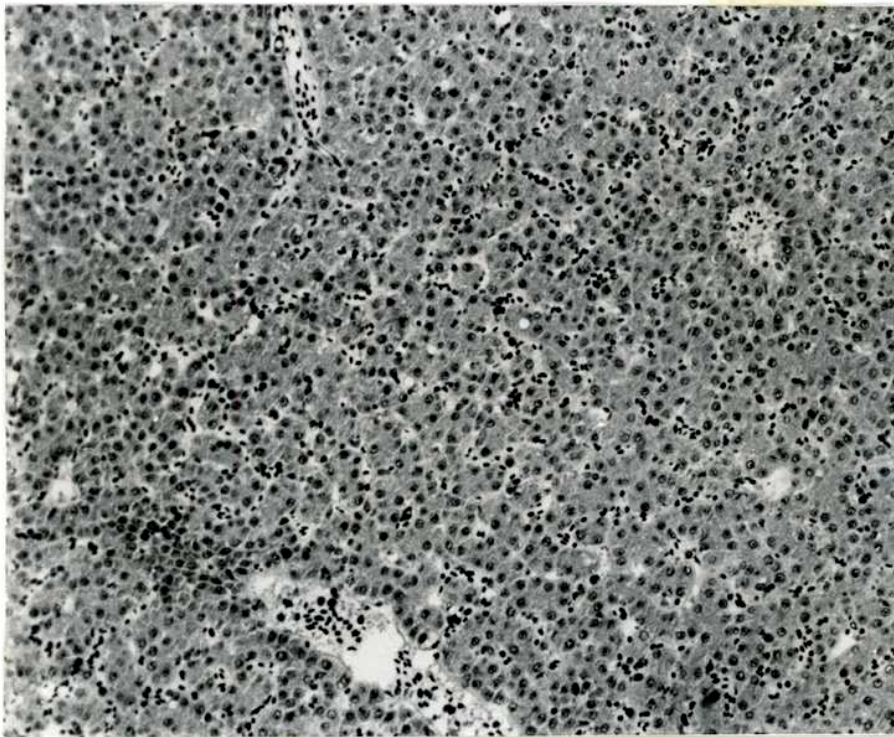
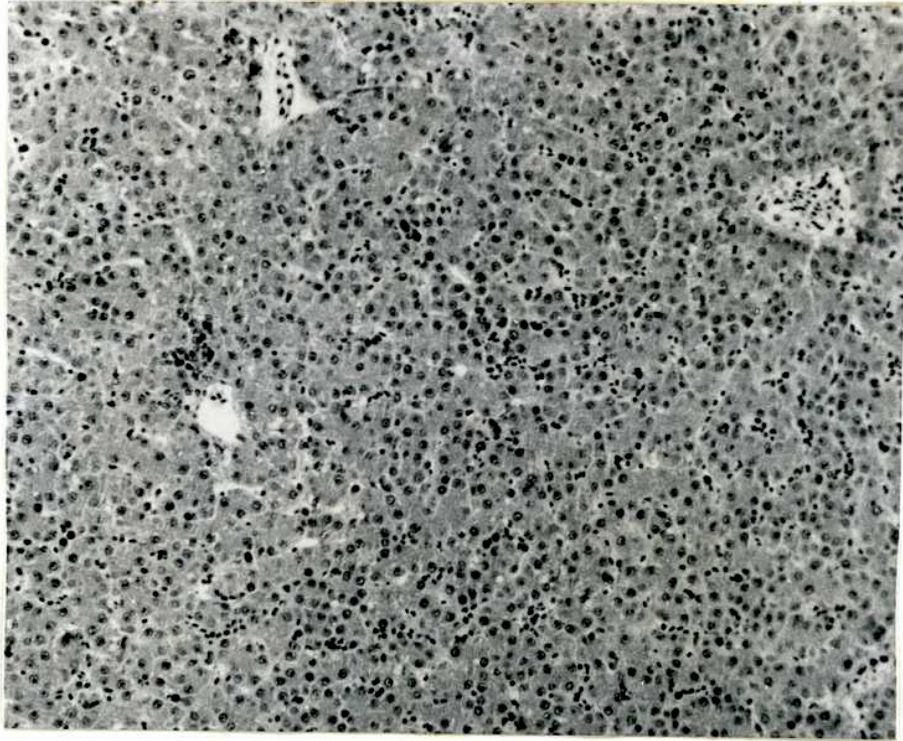


Figura n° 27



Hígado de gallina, 24 horas después de la administra-
ción del CCl_4 .
No es posible detectar ninguna alteración histológica.
Hematoxilina - eosina. Magnificación 160 X.

Figura n° 28

Hepatocitos centrolobulillares de gallina.
Se observan dos células adyacentes, con sus núcleos-
el RER es escaso y sus membranas no están totalmente
tapizadas por ribosomas. Las mitocondrias presentan
su aspecto característico. Magnificación 27,000 X.



Figura n° 29



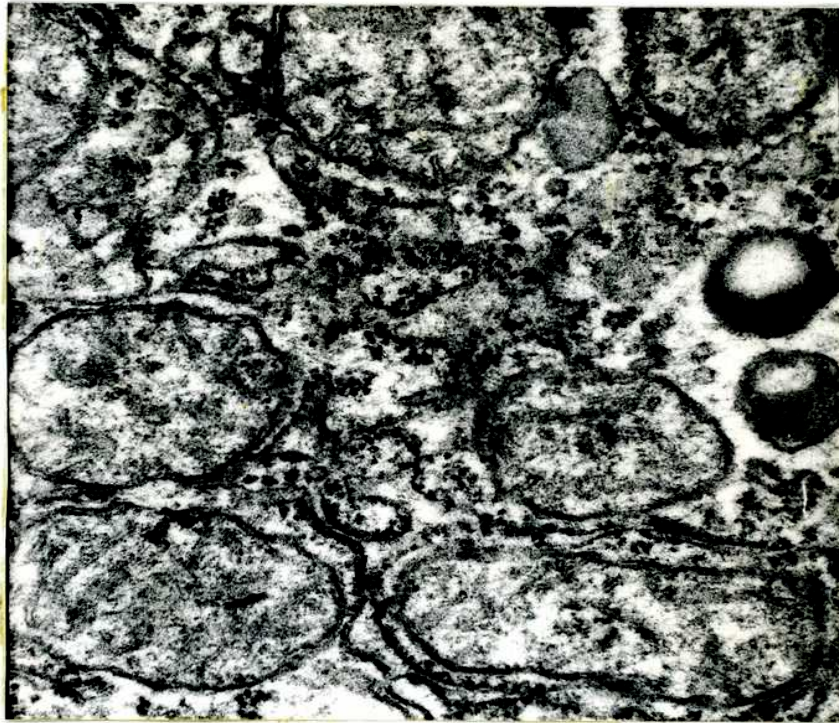
Hepatocito centrolobulillar de gallina, seis horas después de la administración de CCl_4 .
Se observa el núcleo con su aspecto normal. El RER está dilatado y los ribosomas unidos a sus membranas son escasos.
Las mitocondrias presentan aspecto normal. Magnifica-
ción 35000 X.

Figura n° 30

Detalle de las alteraciones causadas por el CCl_4 sobre los hepatocitos centrolobulillares de gallina, seis horas después de la administración del CCl_4 .

El RER se encuentra dilatado, los ribosomas en su ma- /
yor parte no están adheridos a sus membranas.

Las mitocondrias se encuentran hinchadas. Se observa /
la presencia de lisosomas. Magnificación 48000 X.



DISCUSION

Como ya hemos analizado detalladamente en la Introducción de este trabajo, el llegar a discernir cómo el CCl_4 inicia la // cadena de sucesos que terminan en la muerte de la célula hepática, es un problema central en toxicología y en patología celular.

Tradicionalmente, dos tipos de hipótesis fueron puestas en juego: una, postulaba que el efecto solvente del CCl_4 sobre las membranas celulares era suficiente para provocar los efectos observados. Otra, enunciaba que la célula participaba activamente en el proceso, transformando al CCl_4 en metabolitos reactivos, / los cuales al interaccionar con la célula causaban las alteraciones que llevarían a ésta a su fin. Las hipótesis acerca de cuáles podrían ser estas interacciones serán enunciadas pues fueron analizadas en la Introducción; ellas son: 1- unión covalente de metabolitos reactivos del CCl_4 a componentes celulares (lípidos, proteínas, nucleicos, hemo, etc.; tomaremos como ejemplo de ex- / presión de esa posibilidad global la unión de los metabolitos a lípidos). 2- El proceso de peroxidación de lípidos del retículo endoplásmico que los metabolitos reactivos del CCl_4 o sea los // $\cdot\text{CCl}_3$, son capaces de iniciar y que luego continuaría como reac- / ción en cadena.

¿ De qué manera pueden los estudios realizados contribuir a esclarecer estos interrogantes ?

Si bien existen en la actualidad una serie de experimentos claros que sugieren que el efecto solvente del CCl_4 no sería im-

portante en relación al daño causado (los cuales fueron analizados anteriormente); nuestros experimentos acerca de la prevención de efectos tempranos (daños ultraestructuralmente o bioquímicamente revelables) o tardíos (daños histológicamente evidenciables) del CCl_4 con AT excluyen rotundamente la participación del efecto solvente en el desarrollo del daño celular.

En estudios anteriores se determinó que el AT previene la necrosis inducida por el CCl_4 (88-127), la ruptura de polisomas (50), la destrucción del P-450 (49). Los efectos preventivos // del AT pueden deberse a una capacidad para disminuir la intensidad de unión covalente del ^{14}C del $^{14}\text{CCl}_4$ a componentes celulares o a disminuir la intensidad del proceso peroxidativo.

Se confirma que la unión covalente de los metabolitos a 3 y 6 horas de la administración del CCl_4 se ve disminuída notablemente (aproximadamente un 57%) por el tratamiento previo con AT.

Este efecto de disminuir la capacidad activante del sistema enzimático se debe a su acción inhibitoria sobre la reducción del P-450 por NADPH catalizada por la P-450 reductasa, más que sobre la inhibición de la síntesis de P-450 o de una competencia entre el CCl_4 y el AT por el citocromo P-450 (ya que cantidades saturantes de AT, droga tipo II, no logran prevenir la unión de pequeñas cantidades de CCl_4 al citocromo P-450). El AT previene / levemente el proceso peroxidativo medido a las 3 horas de intoxicación, pero no lo afecta a las 6 horas (medido "in vivo").

El AT previene la necrosis hepática producida por el CCl_4 a las 24 horas como lo demuestra la medida de la actividad de la

enzima ICDh y la observación histológica de los hígados de animales intoxicados. También previene la formación de hígado graso.

Cuando se observa a nivel ultraestructural el efecto del AT en prevenir el daño inducido por el CCl_4 se evidencia una disminución en la dilatación y desorganización del retículo endoplásmico rugoso, así como también disminución en el número de gotas de grasa y en la aparición de figuras de mielina, mientras otros efectos como el despegue de ribosomas, zonas extensas de retículo endoplásmico liso no son prevenidas por AT.

La protección es más evidente a las 3 que a las 6 horas de intoxicación.

Ahora bien, estos estudios con AT permiten sugerir que ya sea la unión covalente o la peroxidación de lípidos serían responsables de iniciar el daño pero no permiten discriminar cuál de ellos tiene mayor o única participación en el mismo.

Para poder discriminar la participación relativa de cada uno de estos procesos encaramos dos tipos de enfoques experimentales. En uno de ellos nos valimos de la propiedad evidenciada del pirazol para disminuir la intensidad de la unión covalente y de su incapacidad para modificar los procesos de peroxidación de lípidos.

El tratamiento con pirazol previene algunos de los efectos causados por el CCl_4 3 horas después de su administración, ya que preserva la organización del retículo endoplásmico rugoso en su aspecto característico, evita su dilatación y vesiculización,

mantiene las estructuras del complejo de Golgi y la membrana perinuclear intactas.

El pirazol causa el despegue de ribosomas del retículo endoplásmico y es por eso que resulta muy difícil reconocer si ejerce algún tipo de prevención sobre el despegue que causa la intoxicación con el CCl_4 . El efecto preventivo puede quedar oscurecido por su propia acción. Sin embargo, y de acuerdo a datos previamente reportados (50) el pirazol previene la ruptura de polisomas producida por la intoxicación con CCl_4 y, se observa en efecto que en los animales intoxicados con CCl_4 y pretratados // con pirazol, los ribosomas en el hepatocito se mantienen como polisomas y no como monómeros.

El efecto preventivo del pirazol a las 6 horas de intoxicación con CCl_4 aminora, no eliminando totalmente los efectos causados por el tóxico. Ahora bien ¿qué es lo que el pirazol modifica en la célula hepática para que se traduzca en una prevención del daño?.

Analizando los resultados de las distintas experiencias esta pregunta parece sencilla de responder.

La administración del pirazol previene considerablemente / la unión irreversible de los radicales libres (metabolitos del / CCl_4) a los componentes celulares, ya que disminuye el valor de unión en aproximadamente un 45% cuando se mide a 3 y 6 horas de intoxicación, pero se hace notar que el pirazol no disminuye la cantidad de CCl_4 que llega al hígado (no siendo ésta la causa de su efecto preventivo).

Algunos investigadores consideran que el contenido de ácido araquidónico en los fosfolípidos microsomales decrece en aquellos animales tratados con CCl_4 como consecuencia del proceso de peroxidación de lípidos (128-129-130). El pirazol no es capaz de prevenir esa disminución dando entonces la evidencia que no modifica el proceso peroxidativo. Es interesante hacer notar que el pirazol causa por sí mismo un pronunciado efecto disminuyendo el contenido de ácido araquidónico, en ausencia de daño celular.

Es conocido el hecho que el glutatión juega un importante papel en contra de los agentes tóxicos oxidantes (131), el comprobar que el pirazol no fue capaz de disminuir significativamente su contenido es importante ya que aumenta las evidencias en favor del daño por acción directa de los radicales libres.

Haciendo uso de distintas metodologías se verifica que el pirazol no modifica el proceso peroxidativo, aún a tiempos muy cortos (30 minutos) en donde el efecto del CCl_4 es alto.

¿Cómo actúa el pirazol?

El pirazol interacciona con el P-450 de los microsomas hepáticos dando un cambio espectral tipo II y es capaz de bloquear la unión del CCl_4 con dicho citocromo.

También es capaz de desacelerar la reducción del P-450 por el NADPH, en cantidades catalíticas de citocromo P-450 reductasa.

Ya que el CCl_4 necesita unirse al P-450 y que su reducción, dependiente del NADPH, mediada por la reductasa es necesaria para su activación a radicales libres, queda claro que el efecto /

del pirazol es disminuir la capacidad activante del sistema.

El sistema enzimático descrito para la activación del CCl_4 es el responsable del metabolismo del pentobarbital (droga tipo I) y por lo tanto controla el tiempo de sueño provocado por la droga. El saber que el tratamiento con pirazol dado 3 y 6 // horas antes que el pentobarbital prolonga el tiempo de sueño en forma significativa es importante ya que permite correlacionar / el mecanismo propuesto con los procesos que suceden "in vivo".

Es decir, que el efecto preventivo que ejerce el pirazol sobre el daño provocado por el CCl_4 se debe a una disminución en la capacidad activante del sistema enzimático y no a un efecto / sobre el proceso de peroxidación de lípidos con el que no interfiere.

Esta sugerencia queda aún más fuertemente reforzada por // nuestros experimentos acerca de daños tempranos y tardíos en el hígado de gallina provocados por el CCl_4 . En efecto, estudios / previos de Slater en 1965 (26) "in vitro" y preliminares en nuestro laboratorio (47) Diaz Gómez et al 1975 habían sugerido que / el CCl_4 no produce peroxidación de lípidos microsomales en hígado de gallina.

En este estudio detallado del proceso de peroxidación por técnicas de absorción en el ultravioleta a tiempos distintos (15 min.; 1, 3, 6 y 24 horas) y por medidas de contenido de ácido araquídico en lípidos microsomales se confirmó que el CCl_4 no estimula significativamente el proceso de peroxidación de lípidos en / hígado de gallina.

No obstante existe en la gallina una capacidad no despreciable para activar CCl_4 a sus metabolitos reactivos dando unión covalente. El valor es aproximadamente la mitad del que corresponde a la rata. Si la unión covalente es capaz de dar cuenta / de los efectos tempranos y aún tardíos del CCl_4 sobre la célula hepática debiera haber en el hígado de gallina algún tipo de alteración aunque por supuesto menos intensa que lo que ocurre en rata. Ello sucede así, por lo menos para el caso de los efectos tempranos (como son las alteraciones ultraestructurales y los daños bioquímicos sobre la AP-asa, el P-450 y la G6P-asa).

Es decir nuestros experimentos sobre el descenso de la actividad de la AP-asa, G6P-asa y el contenido del citocromo P-450 en hígado de gallina expuesta a CCl_4 sugieren que es la unión covalente y no la peroxidación de lípidos el proceso responsable / de estos efectos. Ello está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales los antioxidantes "in vivo" / no previenen los daños producidos por el CCl_4 en hígado de rata. (136) o en los cuales compuestos que modulan la intensidad de la unión covalente sin modificar la peroxidación de lípidos, disminuían la intensidad del daño causado por el CCl_4 (69-46) o que / causan necrosis en ausencia de peroxidación (48-132-133).

En lo que hace a efectos tardíos del CCl_4 , concretamente a la necrosis hepática el análisis es más complejo, ya que inter-/vienen más factores en su desarrollo y no solamente la peroxidación de lípidos o la unión covalente.

Uno de ellos es la distinta susceptibilidad intrínseca de

la célula hepática de cada especie a una misma intensidad de unión covalente o peroxidación.

Pero suponiéndole constante quedan aún otros factores. Uno muy importante radica en el hecho de que tanto estos estudios, / como otros anteriores de nuestro laboratorio sugieren la existencia de un umbral de intensidad de unión covalente por debajo del cual no hay muerte celular y la consiguiente necrosis. En efecto, tratamientos con pirazol, AT, cistamina (69-88-46) protegen casi completamente la necrosis hepática producida por el CCl_4 , en tanto que sólo disminuyen la unión irreversible a la mitad aproximadamente. Ello significa que el daño que produce ese valor / de unión covalente no es lo suficientemente alto como para perturbar la célula de manera tal que su vida no sea posible. Es / decir, no significa que no ocurra ningún daño o que el daño no / tenga alguna importancia o consecuencia, sino, simplemente, que no es suficiente para provocar la muerte celular.

En el caso concreto de la gallina, su capacidad es alrededor de la mitad de la de la rata y por ello no debe sorprender / que el proceso no llegue a necrosis. Prueba de que esta intensidad permite de algún modo la reparación del daño es que tanto la AP-asa como el P-450, que están considerablemente disminuídos a 6 horas de intoxicación, ya están recuperados a las 24 horas (los valores no difieren de los obtenidos para los controles). Esto no sucede en la rata (69). La actividad de la G6P-asa sin embargo no se recupera.

Ahora bien ¿Cómo produciría la unión covalente los efectos

tempranos?.

En el caso, por ejemplo de la dilatación del RER, ella podría deberse a que los $\cdot\text{CCl}_3$ reaccionan covalentemente con las / proteínas y fosfolípidos de las membranas, tal como se ha evidenciado en estudios previos de nuestro laboratorio (56). La reacción sobre proteínas parece involucrar fundamentalmente a los aminoácidos cistina, tirosina y triptofano (101) y la interacción con los fosfolípidos involucrando a los ácidos grasos, en particular araquidónico, linolénico (94-95). Estas alteraciones modificarían la permeabilidad de esas membranas permitiendo la entrada de agua al RER que conduce posteriormente a la dilatación. El pirazol y el AT al impedir estas reacciones con proteínas y / lípidos, por inhibir el proceso de formación de los radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$, impedirían la dilatación del RER.

Esta alteración de la membrana del RER podría también estar involucrada en el proceso de despegue de ribosomas del RER / causado por el CCl_4 . Para éste fenómeno podría también participar una alteración del ribosoma en sí mismo, ya que estudios previos de nuestro laboratorio (48) evidenciaron que los radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ interaccionan covalentemente sobre las proteínas, pero no sobre el RNA de los ribosomas.

Estos tipos de interacciones de sustancias químicas con // proteínas ribosomales se saben que están involucradas en procesos de despegue de ribosomas del RER y de ruptura de polisomas / como ocurre con el caso de la puromicina (134). El CCl_4 también produce ruptura de polisomas, y las observaciones realizadas por

microscopia electrónica en este trabajo, evidencian que el pirazol impide la ruptura de polisomas causada por el tóxico.

Su efecto sería por inhibir la formación CCl_3 .

La interacción de los CCl_3 (uniéndose covalentemente) con componentes del P-450 y la AP-asa puede perfectamente explicar / como ambos componentes son destruidos. Estudios recientes de // nuestro laboratorio evidencian que los CCl_3 pueden reaccionar // con el hemo y con la apoproteína del P-450 (135) ello podría perfectamente explicar que se destruyan. Esta hipótesis está de acuerdo con el hecho de que sustancias como el pirazol y la cistamina que disminuyen la intensidad de la formación de los CCl_3 // previenen la destrucción del P-450 por el CCl_4 .

En lo que hace a la destrucción de la actividad de la AP-asa la situación es más compleja por ser ella resultado de la acción concertada del P-450, citocromo c reductasa, fosfolípido // fosfatidil colina y NADPH. Los CCl_3 podrían afectar a la AP-asa por un lado por destruir al P-450. Pero además porque según ya previamente demostramos, los CCl_3 atacan covalentemente a la fosfatidil colina y la alteran (94).

En resúmen, estimamos que nuestros estudios sobre los efectos protectores del AT, pirazol y los daños que causan el CCl_4 / en el hígado de gallina, permiten sugerir que la interacción covalente de los metabolitos reactivos del CCl_4 producidos en el / retículo endoplásmico, con distintos componentes celulares tales como: proteínas, lípidos, hemo, ADN, etc., es capaz de explicar la mayor parte de los efectos dañinos del CCl_4 sobre la célula /

hepática. Si bien es mucho lo que aún falta saber para entender en detalle el total del proceso de muerte celular, el sólo haber comenzado a desentrañar parte del mismo, ya permite contar con / tratamientos antidotos como el pirazol, que impiden todos o casi todos los efectos dañinos del CCl_4 , sobre la célula hepática.

Adriana S. Buscchi

Juan Alberto Calvo

- BIBLIOGRAFIA -

- 1- CASARETT, L. y DOULL, J (1975). Ed. Macmillan Publishing Co, Inc. Nueva York.
- 2- TARVER, H. (1963). "The Liver" vol. I, Ed. Ch. Rouiller. Nueva York.
- 3- RAPPAPORT, A., BOROWY, Z. LOUGHEED, W. y LOTTO, W. (1954). Anat Rec 119, 11.
- 4- SABOURIN, C. (1988). "Recherches sur l'anatomie normale et pathologique de la glande biliare de l'home". Paris
- 5- MALL, F. (1906). Am. J. Anat. 5, 227.
- 6- OPIE, E. (1944). J. Exp. Med. 80, 231.
- 7- ELIAS, H. (1963). "The Liver". vol. I, Ed. Ch. Rouiller. Nueva York.
- 8- TRAUTMANN, A. y FIEBIGER, J. (1942). "Histología y Anatomía Microscópica Comparada de los Animales Domésticos".
- 9- SCHWARZE, E. (1970). Compendio de Anatomía Veterinaria. Anatomía de las Aves Domésticas. Tomo V.
- 10- NUSSHAG, W. (1977). "Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos".
- 11- RAPPAPORT, A. y HIRAKI, G. (1958). Acta Anat. 32, 126.
- 12- RAPPAPORT, A. (1973). Microvascular Res. 6, 212.
- 13- RAPPAPORT, A. (1969). "Diseases of the Liver. Anatomic Considerations". Ed. L. Schiff Lippincott, Philadelphia.
- 14- RHODIN, J. (1974). "Histology. A Text and Atlas" Nueva York. Oxford University Press.
- 15- WIDMAN, J., COTRAN y FAHIMI, H. (1971). J Cell Biol 52, 159.

- 16- ROULLIER, CH. y JEZEQUEL, A. (1963). "The Liver". Vol I. Ed Ch Roullier. Nueva York.
- 17- HAM, A. (1967). "Tratado de Histología". Ed. Interamericana. México.
- 18- NOVIKOFF, A. y HOLTZMAN, E. (1976). "Cells and Organelles". Ed. Holt, Rinehart y Winston. Nueva York.
- 19- BUTLER, T. (1961). J.Pharmacol. Exp.Ther. 134, 311.
- 20- PAUL, B. y RUBINSTEIN, D. (1963). J.Pharmacol.Exp.Ther. 141, /
141,
- 21- RUBINSTEIN, D. y KANICS, L. (1964). Can.J.Biochem.Physiol.42,
1577.
- 22- GILLETTE, J. (1966). Advan.Pharmacol. 4, 219.
- 23- SEAWRIGHT, A. y Mc LEAN, A. (1967). Biochem.J. 105, 1055.
- 24- DAWKINS, M. (1963). J.Path.Bact. 85, 189.
- 25- LESTER, D. y GREEMBERG, L. (1950). Arch.Industrial Hyg. 2, 235.
- 26- SLATER, T. (1965). Biochem.Pharmacol. 14, 178.
- 27- VON OETTINGEN, W. (1964). The Halogenated Hydrocarbons of //
Industrial and Toxicological Importance. Elsevier, Amsterdam.
- 28- Mc LEAN, A., Mc LEAN, E. y JUDAH, J. (1965). Inter.Rev.Exptl.
Path. 4, 125.
- 29- BRAUER, R. (1963). The Biliar System. 101 NATO Symposium. New
Castle.
- 30- ROGUE, A. y FEDORKO, M. (1961). J.Histochem 9, 613.
- 31- SLATER, T. (1966). Nature 209, 36.
- 32- RECKNAGEL, R. (1967). Pharmacol.Rev. 19, 145.
- 33- SMUCKLER, R. (1968). Structure and Function of the Endoplas-
mic Reticulum in Animal Cells. Universitetsforlaget, Oslo.

- 34- RECKNAGEL,R. y GHOSHAL,A. (1966). Lab.Invest. 15, 132.
- 35- RECKNAGEL,R. y GHOSHAL,A. (1966). Nature 210, 1162.
- 36- RECKNAGEL,R. y GHOSHAL,A. (1966). Exptl.Molec.Pathol. 5,108
- 37- WITTINGLE,L. (1965). Fed.Proc. 24, 912.
- 38- JUDAH,J. (1969). British Med.Bull. 25,19.
- 39- THIERS,R., REYNOLDS,E. y VALLEE,R. (1960)., J.Biol.Chem.235, 2130.
- 40- ALPERS,D. y ISSELBACHER,K. (1967). Biochem.Biophys. Acta // 137, 33.
- 41- COMPORTI,M., BENEDETTI,A. y CASINI,A. (1974). Biochem.Pharmacol. 23, 421.
- 42- GABRIELI,L., BURDINO,E., TORRIELLI,M. y UGAZIO,G. (1974). Pharmacol.Res.Comm. 6, 127.
- 43- FERREYRA,E. de, CASTRO,J., DIAZ GOMEZ, M.I., D ACOSTA,N.,// CASTRO,C. de y FENOS,O. de. (1975). Toxicol.Appl.Pharmacol. 21, 49.
- 44- CIGNOLI,E. y CASTRO,J. (1971). Exptl.Mol.Pathol. 14, 43.
- 45- CASTRO,J., CIGNOLI,E., CASTRO,C.de ,FENOS,O. de. (1972). // Biochem.Pharmacol. 21, 49.
- 46- CASTRO,J., FERREYRA,E., D´ACOSTA,N., DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO C.de. (1973). Toxicol.Appl.Pharmacol. 24, 1.
- 47- DIAZ GOMEZ,M., CASTRO,C.de, D´ACOSTA,N., FENOS,O. de, FERREYRA,E. de, y CASTRO,J. Toxicol.Appl.Pharmacol. 34, 102.
- 48- CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., CASTRO,C. de, FENOS,O.de, FERREYRA,E. de y D´ACOSTA,N. (1975) Res.Comm. Chem.Pathol.Pharmacol. 10, 93.
- 49- TORANZO,E., DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO,J. (1975). Biochem.////// Biophys Res Commun. 64, 823.

- 50- CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., (1976). Res.Commun.Chem.Pathol. Pharmacol. 13, 731.
- 51- VILLARRUEL,M., TORANZO,E. y CASTRO,J. (1976). Res.Commun. Chem.Pathol.Pharmacol. 14, 193.
- 52- TORANZO,E.de, DIAZ GOMEZ,M., y CASTRO,J. (1978). Res.Commun Chem.Pathol. Pharmacol. 19, 347.
- 53- HORNBROOK,K., POYER,J. y Mc CAY,P. (1976). The Pharmacologist 18, 246.
- 54- TORANZO,E.de, VILLARRUEL,M. y CASTRO,J. (1978). Toxicology 10, 39.
- 55- DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO,J. (1980). Toxicol.Appl.Pharmacol. 56, 199.
- 56- CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., FERREYRA,E.de, CASTRO,C.de, D´ACOTA,N. y FENOS,O de (1973). Biochem.Biophys.Res.Commun / 50, 337.
- 57- PLAA,G. y WITSCHI,H. (1976). Am.Rev.Pharmacol. 16, 125.
- 58- RECKNAGEL,R. y GLENDE,E. (1973). Crit.Rev.Toxicol. 2, 263.
- 59- CASTRO,J., FERREYRA,E.de, D´ACOSTA,N., DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO,C. de (1973). Toxicol.Appl.Pharmacol. 24, 1.
- 60- D´ ACOSTA,N., CASTRO,J., FERREYRA,E.de, DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO,C.de (1972). Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 4, 641.
- 61- CAWTHORNE,M., BUNYAN,J., SENNITT,M. y GREEN,J. (1970).Br.J. Nat. 24, 357.
- 62- KELLER,F., SNYDER,A., PETRACEK,F. y SANCIER,K. (1971). Biochem.Pharmacol. 20, 2507.
- 63- CHOPRA,P., ROY,S., RAMALENGASWAMI,V. y NAYAK,N. (1972).Lab. Inves. 26, 6.
- 64- NACHTOMI,E. y ALUMOT,E. (1972).Exp.Mol.Pathol. 16, 71.

- 65- CASTRO,J.y DIAZ GOMEZ,M. (1972).Toxicol.Appl.Pharmacol. 23, 541.
- 66- GILLETTE,J. (1973). Pharmacology and the future of man.Proc 5. Int.Cong.Pharmac. vol.2, 187-202, Kerger, Basel.
- 67- RECKNAGEL,R. (1973). Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity: / an example of lethal cleavage. Critical Rev. in Toxicology vol.2, 263-297. CRC Press.Ohio.USA.
- 68- GREEN,J. BUYAN,M., CAWTHORNE,M. y DIPLOCK. (1969). Br.J.// Nutr. 23, 297.
- 69- D' ACOSTA,N., CASTRO,J., FERREYRA,E. de, DIAZ GOMEZ,M. y CASTRO,C.de (1972). Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 4,641
- 70- NACHTOMI,E. y ALUMOT,E. (1972).Exptl.Mol.Pathol. 16, 71.
- 71- GILLETTE,J. (1963). Prog.Drug Res. 6, 11.
- 72- COOPER,D., LEVIN,S., NARASIMHULU,S., ROSENTHAL,O. y ESTA-// BROOK,R. (1965). Science 147, 400.
- 73- GILLETTE,J., BRODIE,B. y LA DU,B. (1958). J.Pharmacol.Exp. Therap. 119, 532.
- 74- MANNERING,G. (1971). "Fundamentals of Drug Metabolism and / Drug Disposition" (B.N. LA DU,H.G., MANDEL,E., LEONG WAY // EDS.). The William Wilkins, Co Baltimore.
- 75- IMAI,Y. y SATO,R. (1967). J.Biochem. 62, 239.
- 76- LU,A. y COON,M. (1968).J.Biol.Chem. 243, 1331.
- 77- GILLETTE,J. (1971). Annals of the New York Academy of Sciences. 179, 43.
- 78- MILLER,E., MILLER,J. y ENOMOTO,M. (1964). Cancer Res.24,2018
- 79- GRAM,T., ROGERS,L. y FOUTS,J. (1967).J.Pharmacol.Exp.Ther. 155, 493.

- 80- KATO,R. y GILLETTE,J. (1965). J.Pharmac.Exp.Therp.150, 279.
- 81- GIGON,P., GRAM,T. y GILLETTE,J. (1969). Molec.Pharmacol. 5, 109.
- 82- HUCKER,H. (1979). Annual Rev.of Pharmacology 10,
- 83- KOPPANYI,T. y AVERY,M. (1966). Clinical Pharmacology and // Therapeutics. 7, 250.
- 84- Mc LEAN,A. (1967). Biochem.Pharmacol. 16, 2030.
- 85- CASTRO,J., SASAME,H. y GILLETTE,J. (1967). The Pharmacol. 9, 203.
- 86- CASTRO,J. y DIAZ GOMEZ,M. (1972). Toxicol.Appl.Pharmacol. 23, 541.
- 87- CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., FERREYRA,E.de, CASTRO,C.de, D´A-COSTA,N., y FENOS,O.de (1972). Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 315.
- 88- D´ACOSTA,N.,CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., FERREYRA,E.de, CAS-TRO,C.de, y FENOS,O.de (1973).Res.Comm. Pathol.Pharmacol. 6, 175.
- 89- CASTRO,J., CASTRO,C.de, D´ACOSTA,N., DIAZ GOMEZ,M., y FE-RREYRA,E.de (1973). Biochem.Biophys.Res.Comm. 50, 273.
- 90- CASTRO,J., FERREYRA,E.de, CASTRO,C.de, DIAZ GOMEZ,M., D´A-COSTA,N. y FENOS,O.de (1973).Toxicol. Appl.Pharmacol. 24,1

- 91- DIAZ GOMEZ, M., CASTRO, J., FERREYRA, E. de, D'ACOSTA, N. y CASTRO C. de (1973). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 25, 534.
- 92- FOWLER, J. (1969). *Br. J. Pharmacol.* 37, 733.
- 93- GORDIS, E. (1969). *J. Clin. Invest.* 48, 203.
- 94- VILLARRUEL, M. y CASTRO, J. (1975). *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 10, 105.
- 95- VILLARRUEL, M. y CASTRO, J. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 108.
- 96- REYNOLDS, E. (1967). *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 155, 117.
- 97- REYNOLDS, E. y YEE, A. (1967). *Lab. Invest.* 16, 591.
- 98- SLATER, T. y SAWYER, (1971). *Biochem. J.* 123, 815.
- 99- KOCH, R., GLENDE, E. y RECKNAGEL, R. (1973). *Gastroenterology.* 65, 553.
- 100- VILLARRUEL, M., DIAZ GOMEZ, M., CASTRO, J. (1975). *Tox. Appl. Pharmacol.* 33, 106.
- 101- VILLARRUEL, M. y CASTRO, J. (1980). *Res. Commun. Chem. Pathol. // Pharmacol.* 28, 79.
- 102- SJOSTRAND, D.A. (1967). *Electron microscopy of cells and // tissues. Vol. I, pág. 172. Academic Press. New York.*
- 103- DI FIORI, M.F.H. (1974). *Diagnóstico Histológico. Tomo I, pág. 96. El Ateneo, Buenos Aires, séptima edición.*
- 104- GIVAN, K.F., TURNBULL, C. y JEZEQUEL, A.M. (1967). *Pepsin digestion of virus particles in canine hepatitis using Epon-embedded material. J. Histochem.* 15, 688-698.
- 105- WATSON, M.L. (1978). *Staining of tissue sections for elec-// trom microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475-485.

- 106- REYNOLDS,E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microcopy. J.Cell Biol. 17, 208.
- 107- CASTRO,J.A. y GILLETTE,J.R. (1967). Biochem.Biophys.Res. Commun. 28, 426.
- 108- STERKEL,R.L., SPENCER,J.A., WOLFSON,S.K. y WILLIAMS ASHMAN H.H. (1958) J.Lab.Clin.Med. 52, 176.
- 109- ELLMAN,G.L.(1959).Tissue sulfhydryl groups. Arch.Biochem / Biophys, 82, 70-77.
- 110- SCHENKMAN,J., REMMER,H. y ESTABROOK, R. (1967) Mol.Pharmacol. 3, 113.
- 111- GIGON,P., GRAM,T.y GILLETTE,J. (1969) Molec Pharmacol. 5, 109.
- 112- RECKNAGEL,R. y LITTERIA,M. (1960) Ann.J.Pathol. 36, 521.
- 113- LOWRY,O., ROSEBROUGH,N., FARR,A. y RANDALL,R. (1951) Biol. Chem. 193, 265.
- 114- LAYNE,E., (1957) Methods in enzimology (ed.S.Colowich y N. Kaplan) vol.3, pág. 448. Academic Press, New York.
- 115- KLAASSEN,C. y PLAA,G. (1969) Biochem.Pharmacol. 18, 2019.
- 116- LIPSKY,S. y LANDOWNE,R. (1963). "Methods in Enzimology // (Ed.S.Colowich y N.Kaplan) vol.VI, pág. 513.
- 117- GLENDE,E. y RECKNAGEL,R. (1969). Exp.Molec.Pathol. 11, 172.
- 118- BANCROFT,H. (1960). Introducci3n a la bioestadística, pág. 205. EUDEBA, Buenos Aires.
- 119- BROWNLEE,K.A. (1960). Statistical Theory and methodology in Science and Engineering, pág.378, Wiley, Nueva York.

- 120- RUMKE,C.L. y DE JONGE,H. (1964) Evaluation of drug activities. vol. 1. Pharmacometrics (Ed. D.Laurence y A.L. Bacharach). pág.80 Academic Press, Londres.
- 121- RUBIN,E., GANG,H. y LIEBER,C. (1971). Biochem.Biophys.Res. Commun. 42, 1.
- 122- BARON,J. y TEPHLY,T. (1969). Mol. Pharmacol. 5, 10.
- 123- BARON,J. y TEPHLY,T. (1969). Biochem.Biophys Res. Commun. 36, 526.
- 124- TEPHLY,T.,MANNERING,G. y PARKS,R. (1961). J.Pharmacol.Exp. Ther. 134, 77.
- 125- TEPHLY,T., HASEGAWA,E. y BARON,J. (1971). Metabolism.20,200.
- 126- DIAZ GOMEZ,M.I., CASTRO,C.R. de, D´ACOSTA,N., FENOS,O.M.de, FERREYRA,E.de y CASTRO,J. (1975). Toxicol.Appl.Pharmacol. 34, 102.
- 127- STENGER,R. y JOHNSON,E. (1972). Exp.Mol.Pathol. 16, 147.
- 128- MAY,H. u Mc KAY,P. (1968). J.Biol.Chem. 243, 2296.
- 129- COMPORTI,M., BURDINO,E. y UGAZIO,G. (1971). Italian J.Bio-chem 20, 156.
- 130- COMPORTI,M., BURDINO,E. y UGAZIO,G. (1969). Boll.Ital. Sper 45, 700.
- 131- BENOHR, y WALLE (1975). Klin Woschr. 53, 789.
- 132- GILLETTE,J., WITCHEL,J. y BRODIE,B (1974). Ann.Rev.Pharmacol. 14, 271.
- 133- UEHLEKE,H. (1973).Proc.European Society for the Study of // Drug Toxicity 15, 119.
- 134- YARMOLINSKY,M.B. y DE LA HABA,G.L. (1954).Proc.Natl .Acad. Sci. USA. 45, 1721.

- 135- FERNANDEZ,G., VILLARRUEL,M.C., TORANZO G.de y CASTRO,J.A.
(1982). Res.Comm.Chem.Pathol.and Pharmacol.
- 136- FERREYRA,E.de, CASTRO,J., DIAZ GOMEZ,M., D'ACOSTA,N., CAS-
TRO C.R. de y FENOS,O. de. (1975). Toxicol Appl Pharmacol.
32, 504.