

## 9. Alteraciones en la función celular por la acción de fármacos

AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ y  
LOURDES GOMBAU SUÁREZ

### 1. RESUMEN

Descartar una molécula o introducir posibles modificaciones en su estructura en las etapas iniciales de su desarrollo supone un gran ahorro económico y de tiempo a las compañías farmacéuticas, a la vez que evita riesgos innecesarios. Sin embargo y a pesar de estos esfuerzos, un gran número de medicamentos son retirados del mercado debido a las reacciones adversas que producen tras su comercialización, en un 31% de los casos, la causa de retirada es su toxicidad hepática. Cabe señalar que muchos de los fármacos que resultan hepatotóxicos durante el desarrollo clínico o posteriormente, no fueron tóxicos cuando se testaron en animales, lo que indica que los resultados obtenidos en estos estudios no son siempre extrapolables a humanos. Una alternativa para evitar la extrapolación de los resultados obtenidos en animales de laboratorio a humanos es el uso de sistemas modelo celulares *in vitro* de origen humano, lo que hace posible realizar estudios en células aisladas del órgano diana. Así pues los modelos celulares derivados del hígado constituyen una herramienta muy atractiva para llevar a cabo estudios de metabolismo energético, biotransformación de fármacos, mecanismos fisiopatológicos y de toxicidad hepática. En este último caso, hemos de considerar un nuevo reto, que consiste en averiguar cuales son los mecanismos implicados en estos procesos tóxicos. Con este fin, en este capítulo revisamos algunos de los ensayos que han sido utilizados en nuestro laboratorio y que nos permiten evaluar como las funciones hepáticas básicas pueden verse afectadas por la acción de fármacos. Así, a nivel citoplasmático valoramos indicadores de disfunción celular como son; el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , la síntesis de proteínas plasmáticas, el metabolismo de carbohidratos etc. Dentro de la célula, la mitocondria

representa un orgánulo clave en su equilibrio, por lo que la evaluación de su funcionalidad resulta un indicador adecuado del posible daño celular. Para estudiar su funcionalidad de modo general utilizamos la valoración de dos parámetros clave como son; los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial. Por último, recientemente ha aumentado el interés en estudiar las interacciones no deseadas que se producen entre fármacos o sus metabolitos y las macromoléculas que se encuentran a su alcance. En concreto destacan por importancia aquellas interacciones que conducen a la unión covalente del fármaco o metabolito a macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos, ya que, una alteración de su funcionalidad precede a un daño celular generalmente irreversible. En este sentido conocer si se producen estas uniones y a que nivel resulta de gran interés. Para llevar a cabo estudios de este tipo proponemos distintas aproximaciones que han sido realizadas satisfactoriamente en nuestro laboratorio.

## 2. INTRODUCCIÓN

El aumento de la inversión necesaria para el desarrollo de nuevos fármacos, ha provocado que las estrategias empresariales se enfoquen a patentar y comercializar nuevas moléculas lo antes posible, por lo que, se persigue minimizar el tiempo y el coste económico en el desarrollo farmacéutico. Afortunadamente, en los últimos años se ha experimentado un gran avance en el campo de la investigación biomédica. La síntesis simultánea de un gran número de compuestos (química combinatoria) (1), la aparición de métodos de cribado ultra rápidos y el desarrollo de nuevos modelos experimentales *in vitro*, son un claro ejemplo de ello. A pesar de todo aún hoy en día se requiere de 10 a 15 años para obtener la aprobación de comercialización de un nuevo fármaco. Resulta obvio, que descartar una molécula o introducir posibles modificaciones en su estructura en las etapas iniciales de su desarrollo supone un gran ahorro económico, de esfuerzo y tiempo a las compañías farmacéuticas.

En la actualidad, dada la funcionalidad de la genómica y la proteómica en la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas, estas disciplinas tienen una aplicación muy importante en los estadios iniciales del desarrollo de un fármaco (2). En concreto en conjunción con la bioinformática, permiten el cribado de decenas de muestras en un solo día mediante el uso de distintas técnicas (3): chips de DNA, electroforesis 2D, espectrometría de masas, etc. En etapas posteriores, la genómica y la proteómica permiten llevar a cabo estudios de mecanismos de acción y toxicidad de nuevas moléculas. Para ello, se comparan

los perfiles de expresión génica y de proteínas entre distintas muestras biológicas expuestas o no a la acción de distintos fármacos (4). En este último aspecto, la más reciente de las *-ómicas*, la metabolómica, también puede jugar un papel importante, ya que permite conocer y comparar metabolomas (perfiles metabólicos endógenos), detectando cualquier cambio en el *status* fisiológico normal tanto *in vivo* como a nivel celular o tisular.

Durante el desarrollo de un fármaco se diferencian fundamentalmente dos etapas: preclínica y clínica. En la primera etapa, moléculas de distinta naturaleza (naturales, sintéticas o semisintéticas), son sometidas a un proceso de cribado en el que se seleccionan aquellas que interaccionan satisfactoriamente con la diana biológica elegida. Posteriormente, se realizan estudios de estabilidad de estas moléculas y se establece su actividad farmacológica determinando posteriormente su relación estructura/actividad (SAR). Esta etapa tiene una duración media de 6 años y en ella también se realizan estudios de toxicidad, farmacocinética (ADME) y farmacodinámica tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el uso de modelos celulares y animales. Una vez que se dispone de la información suficiente se continúa con estudios en humanos, es decir la etapa clínica, donde se llevan a cabo estudios de farmacología humana, estudios terapéuticos de dosis-respuesta, eficacia y seguridad del tratamiento, etc (5).

A pesar de este complejo proceso de criba un gran número de medicamentos son retirados del mercado debido a las reacciones adversas que producen tras su comercialización. Así, entre los años 1975 y 1999, alrededor de 45 fármacos previamente aprobados por las agencias reguladoras de distintos países recibieron la “tarjeta amarilla” por presentar reacciones adversas en humanos. De éstos, 16 se retiraron del mercado por razones de seguridad siendo la causa de su retirada, en un 31% de los casos, la toxicidad hepática (6). Cabe señalar que muchos de los fármacos que resultaron hepatotóxicos durante el desarrollo clínico no fueron tóxicos cuando se testaron en animales, lo que indica que los resultados obtenidos en estos estudios no son siempre extrapolables a humanos. De hecho se observó una alta correlación entre la toxicidad detectada en animales y humanos cuando las pruebas se realizaron a nivel gastrointestinal, hematológico o cardiovascular. En cambio, la toxicidad a nivel hepático tuvo una correlación realmente baja (7). Existen algunos motivos que pueden explicar esta discrepancia como son: 1) que animales de distintas especies no tienen por que metabolizar un fármaco del mismo modo que se metaboliza en humanos, 2) que el estudio se realice en animales sanos frente a pacientes o 3) que el ensayo se realice en una subpoblación de pacientes particularmente sensibles al fármaco (8).

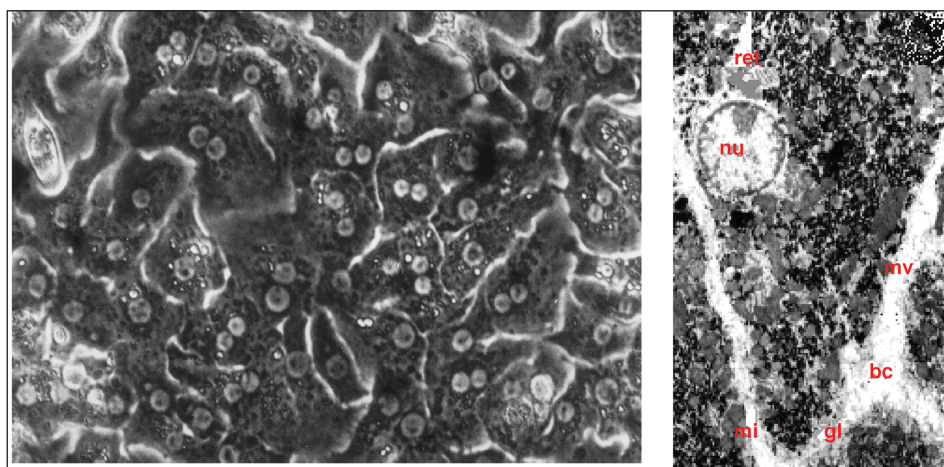


FIGURA 1. Cultivo primario de hepatocitos analizados mediante microscopía de contraste de fases (panel de la izquierda) y microscopía electrónica (panel de la derecha). nu (núcleo), ret (retículo endoplásmico), mv (microvilli), bc (canaliculo biliar), gl (gotas lipídicas) y mi (mitocondrias).

Una alternativa para evitar la extrapolación de los resultados obtenidos en animales de laboratorio a humanos es el uso de sistemas modelo celulares *in vitro* de origen humano, lo que presenta algunas ventajas sobre el modelo animal *in vivo*, ya que es posible realizar dichos estudios en células humanas aisladas del órgano diana. Esto permite generar resultados altamente predictivos.

Si tenemos en cuenta que el hígado es el principal órgano encargado del metabolismo de xenobióticos, es lógico pensar que también resulte el órgano diana de la toxicidad de éstos. Así pues los modelos celulares derivados del hígado constituyen herramientas muy atractivas para llevar a cabo estudios de metabolismo energético, biotransformación de fármacos, mecanismos fisiopatológicos y de toxicidad hepática (9). Los hepatocitos no son indiferentes a los cambios que se producen a su alrededor y muchos fármacos pueden alterar su funciones básicas, lo que motiva que el cultivo primario de hepatocitos sea, hasta la fecha, el modelo celular más utilizado para estudios de biotransformación y hepatotoxicidad (10-12). Las células en cultivo son muy comparables al hígado (figura 1). Un ejemplo de ello, es la superficie celular cubierta de microvilli y el gran número de partículas de glucógeno presentes en el citoplasma, en forma de las características rosetas, lo que garantiza unos niveles de glucógeno intracelular comparables al hígado *in vivo*. También es comparable su capacidad de sintetizar glucosa a partir de lactato o urea a partir de amonio, esto úl-

TABLA 1. *Secuencia de eventos y marcadores de muerte celular por apoptosis y necrosis*

---

Indicadores pre-letales del estrés celular

- Depleción de glutatión
- Transducción de señal del estrés pre-apoptótico/necrótico (ejm: nrf-2 AP-1, translocación del factor de transcripción NFκB)
- Adaptaciones celulares (ejm: enzimas antioxidantes, hiperpolarización de la membrana mitocondrial, biogénesis mitocondrial)
- Alteraciones de ATP y homeostasis del calcio
- Alteraciones de la funcionalidad celular (ejm: proliferación, autofagocitosis de orgánulos intracelulares irregulares)

Muerte celular por apoptosis y activación de caspasas

- Alteraciones de la permeabilidad mitocondrial, liberación del citocromo c y fragmentación y abultamiento de las mitocondrias
- Disgregación del citoesqueleto y digitaciones de la membrana plasmática
- Alteraciones de la homeostasis energética mitocondrial
- Fragmentación de DNA por endonucleasas y condensación de la cromatina
- Localización de fosfatidilserinas en la superficie celular

Muerte celular por necrosis

- Actividad mitocondrial reducida
  - Abultamiento de las células y de los orgánulos subcelulares
  - Lisis celular con liberación de enzimas intracelulares (ejm: lactato deshidrogenasa (LDH))
- 

timo, incluso con mayor eficiencia que el hígado. Así mismo, sintetizan y secretan proteínas plasmáticas también en cultivo (albúmina, fibronectina, fibrinógeno,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, etc). Además los hepatocitos en cultivo mantienen la expresión de los enzimas involucrados en el metabolismo de fármacos (citocromo P450 y enzimas de conjugación, principalmente glucuronil transferasa y glutatión transferasa), aunque su capacidad metabólica disminuye con el tiempo en cultivo.

Además de la relevancia de utilizar el modelo celular adecuado, que nos permita predecir la toxicidad de un fármaco, hemos de considerar un

nuevo reto, que consiste en averiguar cual es el mecanismo implicado en este proceso. Se han descrito diferentes mecanismos (Tabla 1) capaces de generar daño hepático (8, 13), pero ¿como determinar cual de ellos está implicado?. Una aproximación lógica, es; por un lado, testar en paralelo un conjunto de parámetros que indiquen cual es el mecanismo de acción del fármaco o metabolito que produce las alteraciones y por otro lado, comprobar si la célula se ve afectada a nivel de la membrana plasmática o de sus estructuras subcelulares. De la batería de ensayos que se realizan *in vitro* con esta finalidad, algunos tienen una mejor predicción que otros. Así, aquellos que controlan puntos tardíos en el proceso de daño celular, como por ejemplo, la liberación de enzimas citoplasmáticos, rotura celular, digitaciones de la membrana plasmática, degradación de ADN o condensación nuclear, son ensayos con baja sensibilidad ya que todos ellos están asociados a un efecto letal apoptótico o necrótico tardío (14). En cambio, aquellos ensayos que detectan cambios iniciales del proceso citotóxico tienen un mayor poder de predicción y generan resultados que son extrapolables entre distintas especies. A lo largo del tiempo, numerosos investigadores han utilizado distintos ensayos encaminados a valorar los mecanismos pre-letales involucrados en la toxicidad potencial de un fármaco. La formación de intermediarios reactivos, la funcionalidad mitocondrial, el estrés oxidativo, la homeostasis del calcio, o la unión a macromoléculas son algunos de estos indicadores más empleados. Todos estos ensayos tienen la ventaja adicional de que nos permiten trabajar con concentraciones del fármaco próximas a la concentración terapéutica.

En este capítulo revisamos algunas de estas herramientas utilizadas para evaluar la acción de nuevos fármacos sobre las funciones hepáticas básicas.

### 3. ALTERACIONES A NIVEL CITOPASMÁTICO

Algunos fármacos son electrófilos por naturaleza y otros son bioactivados en el hígado a metabolitos altamente reactivos, en algunos casos mucho más tóxicos que los compuestos padre. Ambos casos son la clave y el proceso inicial de muchos fenómenos tóxicos. Para minimizar estos efectos adversos los hepatocitos presentan mecanismos efectivos de defensa de modo que es en última instancia el balance entre estos mecanismos de bioactivación, detoxificación y defensa/reparación lo que determina que el compuesto tenga o no un efecto tóxico (15).

La esteatosis, la colestasis o la fosfolipidosis son claros ejemplos de hepatotoxicidad inducida por fármacos. La acción de compuestos como la aspirina, tetraciclina, amiodarona, ácido valpróico o agentes antivirales causan la esteatosis o acumulación de ácidos grasos de cadena larga en el citoplasma, inhibiendo el proceso de  $\beta$ -oxidación que tiene lugar en la mitocondria (16, 17). Además de este mecanismo de acción, estos fármacos también actúan bloqueando el transporte de electrones de la cadena respiratoria, lo que produce la formación de especies reactivas de oxígeno que reaccionan con los lípidos acumulados dando lugar a su peroxidación (18).

La alteración en la síntesis de ácidos biliares y/o de su flujo resulta en el síndrome comúnmente conocido como colestasis. El espectro de fármacos inductores de esta alteración incluye estrógenos, esteroides anabólicos, clorpromazina, eritromicina, oxipenicilinas, terfenadina, ibuprofeno, etc (19). La secreción de la bilis es dependiente de la función de proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas basolaterales y canaliculares de los hepatocitos por lo que la inhibición de la actividad de estas proteínas es de esperar que pueda tener consecuencias tóxicas (20, 21). Cuando la concentración de ácidos biliares excede la capacidad de unión a proteínas transportadoras se inicia un proceso apoptótico y necrótico resultado del daño ocasionado a nivel mitocondrial (22). No solo la mitocondria juega un papel clave en la toxicidad de los ácidos biliares sino que en el caso de la colestasis inducida por fármacos, diversos parámetros relacionados con el estado oxidativo se encontraron alterados, ejm: formación de radicales libres, peroxidación lipídica y niveles de glutathione (23)

La fosfolipidosis se define como un exceso de fosfolípidos en las células. Fármacos catiónicos anfifílicos como la amiodarona y la desipramina son capaces de inducir este fenómeno *in vivo* (24, 25). Si bien, la acumulación de fosfolípidos no es *per se* tóxica, si que lo es el hecho de que favorece el acúmulo del fármaco o de su metabolitos en la célula.

Los fármacos además de alterar mecanismos relacionados con el estado oxidativo de la célula, también pueden actuar sobre algunas de las funciones más características de los hepatocitos, como; la síntesis de proteínas plasmáticas y el metabolismo de carbohidratos. La exposición a fármacos antiinflamatorios (benorilato, butibufeno, ibuprofeno o flurbiprofeno) utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, osteoartritis, tendinitis, etc, a cultivos primarios de hepatocitos, resulta en una disminución de la síntesis de albúmina y de la gluconeogénesis, además de en un acúmulo neto de glucógeno (26, 27).

### 3.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se origina por compuestos capaces de sufrir repetidos ciclos de oxidación-reducción en el interior de la célula. El metabolismo hepático de xenobióticos incluye, fundamentalmente, dos tipos de reacciones (11, 15):

1. Las catalizadas por el sistema enzimático de monooxigenasas dependientes del citocromo P450, que modifican los compuestos lipofílicos por oxidación y/o reducción, proporcionando grupos polares.
2. Las de conjugación que unen moléculas polares (ácido glucurónico, grupos sulfato, glutatión, etc.) para lograr compuestos más hidrosolubles, fácilmente excretables.

El primer tipo de reacciones produce, de forma fisiológica, especies oxidantes como consecuencia de pequeños desacoplamientos en los procesos oxidativos. Estos agentes oxidantes son muchos y variados pero por su importancia destaca el anión-radical superóxido ( $O_2^-$ ), que mediante reacciones espontáneas o catalizadas por metales (Fe o Cu), genera otros compuestos más reactivos y con mayor potencial toxicológico. Para hacer frente a estas moléculas reactivas, la célula está dotada de un sistema de enzimas y agentes reductores que evitan el daño celular. Cuando los procesos pro-oxidativos y anti-oxidativos se encuentran compensados, la célula no se ve afectada, pero si debido a la presencia de un fármaco se produce un exceso de especies reactivas de oxígeno, aparece el llamado estrés oxidativo y en último término la muerte celular. Las consecuencias más inmediatas asociadas al estrés oxidativo son la peroxidación lipídica y cambios en el estado de oxidación de los grupos tiol de las proteínas (28, 29).

De entre las técnicas utilizadas para cuantificar el estrés oxidativo, existe un método fiable, eficiente y que además permite el cribado de un gran número de compuestos. Esta técnica utiliza como marcador la 5-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA). Debido a su carácter apolar y a su estructura no iónica, DCFH-DA se difunde bien a través de la membrana plasmática. Una vez en el interior del citoplasma es hidrolizada por las esterasas de la célula a diclorofluorescina (DCFH), y en presencia de especies reactivas de oxígeno a su forma fluorescente (DCF), que puede cuantificarse en un fluorímetro (30-32). Este método, no sólo permite determinar la potencia prooxidante de un fármaco sino también evaluar la eficacia de un agente antioxidante para combatir el estrés oxidativo que sufren las células. A petición de una compañía farmacéutica, realizamos un estudio tipo en el que determinamos el potencial antioxidante de un grupo de



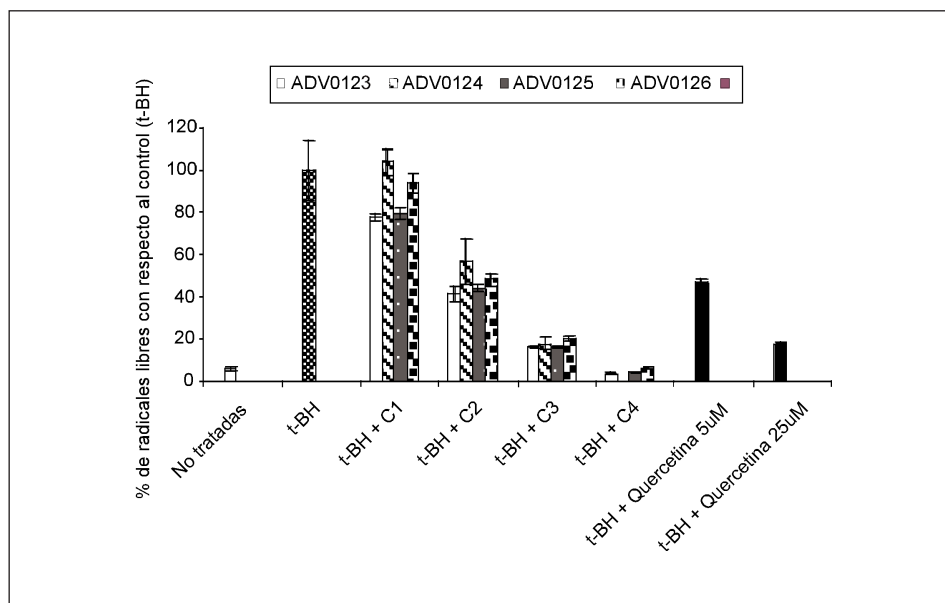


FIGURA 2. Valoración del estrés oxidativo en hepatocitos tratados con antioxidantes potenciales. Hepatocitos de rata en cultivo se preincubaron conjuntamente con la sonda 5-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA) y con los fármacos ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126, a distintas concentraciones ( $C_1$ - $C_4$ ). Finalizado el tiempo de preincubación las células recibieron un estímulo oxidativo (*t*-butilhidroperóxido 250  $\mu$ M) en presencia de los compuestos y la fluorescencia emitida se leyó a intervalos de 30 min durante 2 horas a 485 nm (excitación) y 527 nm (emisión).

Células no tratadas se utilizaron como controles negativos de oxidación

Células tratadas con el estímulo oxidativo, en ausencia de los compuestos, se corresponden con el 100% de formación de radicales libres.

4 fármacos pertenecientes a la misma familia (ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126). Para ello, hepatocitos de rata sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron conjuntamente con la sonda DCFH-DA y con los compuestos a testar, a distintas concentraciones ( $C_1$ - $C_4$ ) y durante un corto período de tiempo. El objetivo de preincubar las células también con los fármacos fue el de preparar a la célula al estímulo oxidativo (*t*-butilhidroperóxido) al que sería sometida posteriormente. Finalizado el período de preincubación, las células fueron expuestas a la acción del *t*-butilhidroperóxido, en presencia de los fármacos, y se procedió inmediatamente a leer la fluorescencia emitida ( $t_0$ ) a 485 nm (excitación) y 527 nm (emisión). Finalmente, las células se incubaron a 37°C y la fluorescencia se leyó cada 30 min durante un período de 2 h. Como control positivo del ensayo se utilizaron células tratadas con quercetina, un flavonoide con conocida actividad

antioxidante (33). La cuantificación se expresó en % radicales libres con respecto al control (células inducidas con el estímulo oxidativo en ausencia de compuestos). Tal como muestra la figura 2 la capacidad antioxidante de cada uno de los fármacos resultó dosis-dependiente y además comparable entre ellos. Así mismo, una administración de los fármacos, a la concentración más elevada ( $C_4$ ), consiguió bloquear completamente la formación de radicales libres.

### 3.2. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los procesos más frecuentemente implicados en la hepatotoxicidad provocada por fármacos. Se trata de una reacción radicalaria que conduce a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular (triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos insaturados, colesterol, etc). La oxidación de los lípidos da lugar a la formación de un gran número de productos de degradación (hidroperóxidos, aldehidos, incluyendo malondialdehido, cetonas, etc) (34). La primera consecuencia de este proceso es la profunda alteración de las propiedades fisicoquímicas de las membranas (fluidez) y en consecuencia, de la funcionalidad de los enzimas allí ubicados.

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para detectar la peroxidación lipídica es la cuantificación del malondialdehido (MDA), uno de los productos finales de la acción de los radicales libres sobre los lípidos. Existen distintos métodos para su cuantificación. Los más sensibles y específicos son los directos y cromatográficos que, sin embargo, presentan grandes dificultades técnicas (35). Los métodos derivativos o indirectos se basan en la gran capacidad del MDA de reaccionar con otras moléculas, dando lugar a compuestos secundarios con alguna característica especial (fluorescencia, volatilidad, color, etc) que permite cuantificar. El más utilizado de los métodos derivativos es el TBARS, reacción del MDA con ácido tiobarbitúrico (TBA), y medición por fluorimetría aunque presenta como inconveniente la capacidad del TBA de reaccionar con otros compuestos distintos del MDA, lo que disminuye su especificidad (36). A pesar de todo es una técnica ampliamente utilizada por su simplicidad y fácil manejo.

Siguiendo con el ejemplo de estudio tipo descrito en el apartado 3.1, donde se demostraba el potencial antioxidante de un grupo de fármacos, se planteó estudiar si esta reducción en la formación de radicales libres correlacionaba con una disminución en la formación de hidroperóxidos, ya que como se ha mencionado anteriormente, la peroxidación lipídica es una consecuencia inmediata

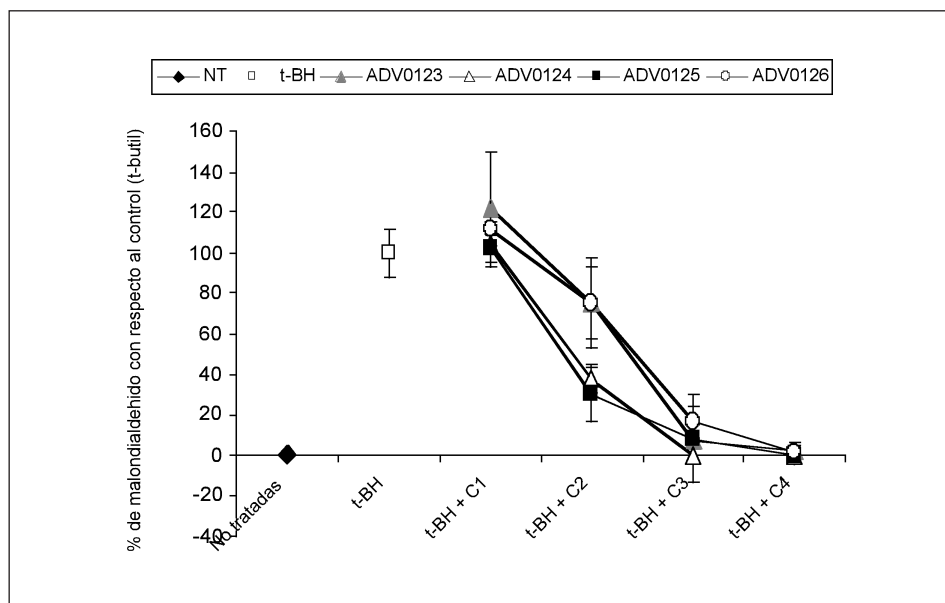


FIGURA 3. Cuantificación de malondialdehído (MDA) en hepatocitos tratados con los fármacos ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126.

Hepatocitos de rata en cultivo, se preincubaron con 4 fármacos de una misma familia (ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126), a distintas concentraciones ( $C_1$  a  $C_4$ ). Finalizado el tiempo de preincubación, las células recibieron un estímulo oxidativo (*t*-butilhidroperóxido 250 ( $\mu$ M) en presencia de los compuestos. El MDA liberado al medio de cultivo se cuantificó mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y la extracción con butanol de sus derivados fluorescentes.

Células no tratadas se utilizaron como controles negativos de peroxidación

Células tratadas con el estímulo oxidativo, en ausencia de los compuestos, se correspondieron con el 100% de formación de MDA.

del estrés oxidativo. Para ello, hepatocitos sembrados en placas de 24 pocillos se preincubaron durante 24 horas con los distintos fármacos a las mismas concentraciones ( $C_1$ - $C_4$ ) descritas en el apartado 3.1, período tras el cual se administró el agente oxidante (*t*-butilhidroperóxido) en presencia de los compuestos. Tras un tiempo de exposición de 24 horas se recogieron los medios condicionados y se centrifugaron para eliminar los posibles restos celulares. Posteriormente, se incubaron los sobrenadantes a 100. $^{\circ}$ C durante 60 min con un tampón que contenía SDS al 7%, HCl 0.1N, ácido fosfotúngstico al 1% y ácido tiobarbitúrico al 0.67%. Finalmente, las muestras se sometieron a extracción con butanol y tras su centrifugación se leyó la fase orgánica (superior) a 530 nm (excitación) y 595 nm (emisión) lo que determinó la formación de MDA en las distintas condiciones experimentales. Los valores de las muestras se interpola-

ron en una curva de calibrado de MDA. Las células no tratadas se utilizaron como controles negativos de peroxidación lipídica, siendo las células que recibieron el estímulo oxidativo en ausencia de los compuestos, los controles positivos de formación de hidroperóxidos.

Tal como muestra la fig 3 la formación de MDA se vio disminuida de forma dosis dependiente en aquellas células tratadas con los compuestos problema. Estos datos correlacionaban con los obtenidos en el apartado 3.1 (figura 2), y al igual que sucedió en la valoración del estrés oxidativo, no se produjo la formación de MDA en aquellas células incubadas con la concentración más elevada de los compuestos ( $C_4$ ), lo que ratifica el efecto hepatoprotector de los fármacos testados.

### 3.3. Glutation

El glutatión celular (GSH) es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) de elevada nucleofilia que protege a las células del daño producido por radicales libres, agentes oxidantes, etc (28, 37, 38). Fundamentalmente, los mecanismos de defensa endógenos de la célula que involucran a este tripéptido son: 1) la reacción catalizada por el enzima glutatión peroxidasa, donde el glutatión actúa a expensas de pasar a su forma oxidada (GSSG), como cofactor para eliminar los hidroperóxidos formados durante el proceso oxidativo en la célula, 2) la conjugación e inactivación de los metabolitos reactivos producidos durante las oxidaciones dependientes de las monooxigenasas del citocromo P450 por la acción de la glutatión-S-transferasa (28, 39-41).

En ambos procesos existe una depleción de GSH por lo que para evitar que esto ocurra bien se activa la síntesis de *novο* de glutatión, bien se convierte GSSG en GSH, a expensas del consumo de NADPH. El enzima que cataliza esta reacción es la glutatión reductasa, el cual por saturación genera un acumulo de GSSG. Para evitar que éste sea tóxico para la célula, el GSSG es expulsado al exterior perdiéndose de forma irreversible (28, 40)

Mientras se mantenga el equilibrio GSH/GSSG el estado redox de la célula es óptimo. Si por el contrario se produce inhibición de la síntesis de glutatión (fármacos que actúan como inhibidores específicos) (42, 43) o un consumo excesivo (estrés oxidativo) (44, 45) se produce una disminución importante de la forma reducida lo que provoca la oxidación de los grupos tiol de las proteínas. Estos grupos están con frecuencia presentes en el centro catalítico de los enzimas, y contribuyen a la estructura terciaria y cuaternaria de

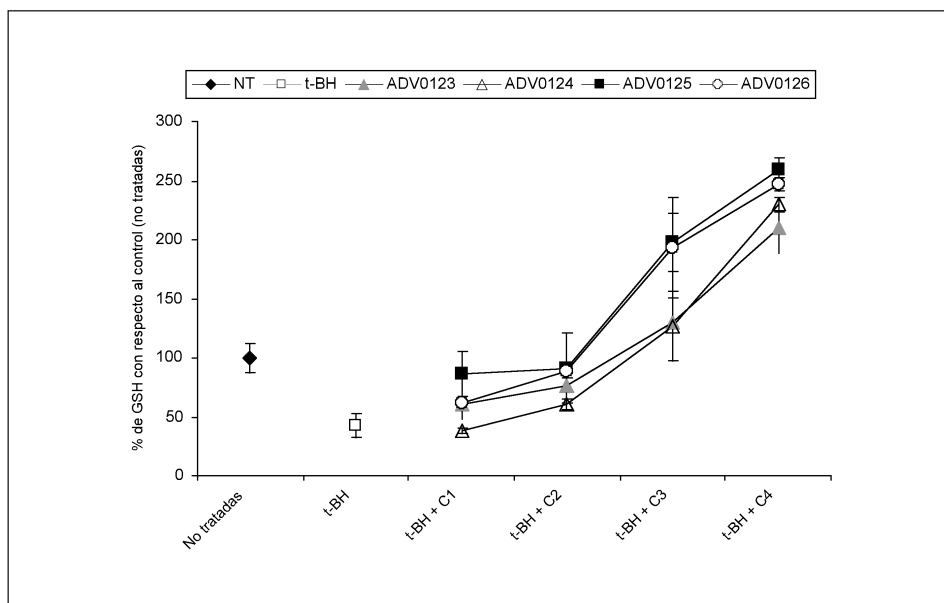


FIGURA 4. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) en hepatocitos tratados con los fármacos ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126.

Cultivos primarios de hepatocitos de rata, se preincubaron con los fármacos ADV0123, ADV0124, ADV0125 y ADV0126, a las concentraciones  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  y  $C_4$ . Finalizado el tiempo de preincubación, las células recibieron un estímulo oxidativo (*t*-butilhidroperóxido 250  $\mu$ M) en presencia de los compuestos. Los niveles de GSH en cada una de las condiciones experimentales se cuantificaron de acuerdo a la reacción GSSG-reductasa-DNTB.

Células no tratadas determinaron los niveles de GSH en condiciones basales

Células tratadas con el estímulo oxidativo, en ausencia de los compuestos, se correspondieron con el 100% de los niveles de GSH.

las proteínas, por lo que su oxidación suele ser causa de su disfunción o inactivación, causando un progresivo e irreversible deterioro de las estructuras celulares (46). Dado que la depleción de la forma reducida del glutatión (GSH) es un importante marcador de hepatotoxicidad se sobreentiende que su valoración sea un indicador importante en los estudios de toxicidad celular. En los apartados 3.1 y 3.2 hemos podido comprobar el potencial antioxidante de un grupo de fármacos por su capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica. En base a estos resultados, investigamos también, si el efecto antioxidante de estos compuestos estaba ligado a un incremento de los niveles de GSH en la célula. Aunque existen numerosos protocolos (químicos, enzimáticos, cromatográficos, etc) para cuantificar la forma oxidada y reducida del glutatión (47-50) el método basado en la

GSSG-reductasa-DNTB es considerado un ensayo rápido, fiable y específico para su cuantificación (37,51, 52). Para ello, hepatocitos sembrados en placas de 24 pocillos se preincubaron durante 24 horas con los distintos fármacos a las mismas concentraciones ( $C_1$ - $C_4$ ) empleadas en los ensayos anteriores, período tras el cual se administró el agente oxidante (*t*-butilhidroperóxido) en presencia de los compuestos. A las 24 horas de incubación se eliminaron los medios y tras el lavado de las monocapas con PBS se lisaron las células con HCl 10mM. Las muestras desproteinizadas con ácido sulfosalicílico (SSA) al 6,5% se centrifugaron y los sobrenadantes se incubaron con tampón fosfato pH 7,4 que contenía 0,73 mM DTNB, 0,24 mM NADPH, 0,09% SSA y 1,2 UI/ml de GSSG reductasa. La cinética de la reacción enzimática se leyó durante 2 min a 415 nm. Los valores de las muestras se interpolaron en una curva de calibrado de GSH. Las células no tratadas se utilizaron para determinar los niveles basales de GSH y las tratadas con *t*-butilhidroperóxido, en ausencia de los compuestos, indicaron los niveles de GSH que alcanzan las células en presencia de un agente oxidante.

En la figura 4 se muestra un incremento de GSH con concentraciones crecientes de los fármacos. De las concentraciones testadas, la más elevada, incrementa los niveles de GSH en casi 2,5 veces los niveles alcanzados por las células no tratadas.

### 3.4. Homeostasis del $Ca^{2+}$ intracelular

Se ha caracterizado de forma exhaustiva la importancia que la homeostasis del  $Ca^{2+}$  tiene en las células dado que actúa como regulador de muchas enzimas y como efector de un gran número de hormonas y factores de crecimiento implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos (53).

La concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular es aproximadamente  $10^{-3}$  M en el espacio extracelular, mientras que en el interior de la células es de 10.000 a 100.000 veces inferior. Esta diferencia de concentraciones comporta un flujo pasivo de  $Ca^{2+}$  del exterior al espacio intracelular, que se equilibra mediante un proceso activo de extrusión liderado por bombas dependientes de ATP y por bombas acopladas a la entrada de  $Na^+$  (bombas *antiport*), situadas ambas, en la membrana plasmática (54-57). Los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular no solo se mantienen mediante el intercambio entre el espacio extracelular y el interior de la célula, a través de la membrana plasmática, sino que también participan orgánulos subcelulares como las mitocondrias o el retículo endoplasmático. La in-

ternalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos orgánulo está mediada por bombas dependientes de ATP y en el caso de la mitocondria participa, además, una proteína específica transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (28, 55, 58). La alteración de este equilibrio, no siempre está asociada a un efecto citotóxico sino que puede ir asociada a la fisiología de la propia célula. Un ejemplo de ello, son las células somatotrópicas de la adenohipófisis, donde las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular correlacionan con un incremento en la liberación de la hormona del crecimiento (59) o la secreción de enzimas proteolíticos por las células pancreáticas acinares (60, 61). Pero a pesar de las numerosas funciones celulares en las que se encuentra implicado, el  $\text{Ca}^{2+}$  también está ligado a los mecanismos de hepatotoxicidad de innumerables fármacos. La inactivación de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como las fosfolipasas, proteasas no lisosomales y endonucleasas causan daños irreversibles a la estructura o funcionalidad celular. (62-64). En algunos de estos procesos hepatotóxicos no es la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  el desencadenante de la hepatotoxicidad sino una consecuencia del mecanismo inicial, la identificación del cual es a veces controvertida. Así, Comporti y cols (65) observaron que la exposición de hepatocitos a bromobenceno y acetaminofeno producía una disminución de los niveles de GSH. Ésto resultaba en la formación de grupos SH libres, que afectaban el mecanismo catalítico de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas e indirectamente ocasionaba una depleción en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por el contrario Masubuchi y cols (66) apuntaban al estrés oxidativo y a una disminución de los niveles de ATP para explicar el mecanismo de acción del acetaminofeno.

Otro ejemplo de la alteración de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  como un efecto tardío de la hepatotoxicidad inducida por fármacos, es el del diclofenaco. Este compuesto se administra como antiinflamatorio y en múltiples casos se ha reportado su carácter hepático adverso. Nuestro laboratorio se planteó identificar cual era el mecanismo de acción implicado en el proceso hepatotóxico del diclofenaco. Para ello, cultivos primarios de hepatocitos se expusieron a una concentración subletal del fármaco. Finalizada la exposición se estimaron diversos parámetros bioquímicos para determinar cual/es de ellos actuaban en los estadios tempranos de toxicidad. Uno de los parámetros cuantificados fue el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la sonda fluorescente Fluo-3 (63, 68). Las células previamente tratadas con diclofenaco se incubaron conjuntamente con Fluo-3 y con el detergente F-127 que media su internalización. Una vez en el citoplasma, Fluo-3 es hidrolizado por las esterasas celulares dando lugar a la forma ácida capaz de unir  $\text{Ca}^{2+}$ . La fluorescencia total (F) se cuantificó a 485 nm (excitación) y 530 nm (emisión), tras el lavado de las monocapas con tampón Krebs-Ringer/BSA al 1%. Pos-

teriormente, las células se lisaron con digitonina en un medio que contenía  $\text{CaCl}_2$  2mM y se midió nuevamente la fluorescencia ( $F_{\text{max}}$ ). Una última lectura ( $F_{\text{min}}$ ) se realizó tras añadir al medio EGTA, un quelante del  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron el resultado de aplicar la siguiente ecuación:

$$(\text{Ca}^{2+})_i = K_d \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F), \text{ siendo } K_d = 400 \text{ nM para los complejos Fluo3- } \text{Ca}^{2+}$$

Tal como muestra la figura 5, no se incrementaron los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  después de exponer las células al diclofenaco durante períodos cortos de tiempo. Solo tiempos largos de exposición al fármaco fueron capaces de incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esto ocurría, simultáneamente, con la liberación de enzimas citoplasmáticos, un marcador indiscutible de un efecto tóxico tardío. Por el contrario, el tratamiento de hepatocitos con *t*-butilhidroperóxido si produjo cambios tempranos en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tal como muestra la figura y de acuerdo a lo descrito en la literatura (68).

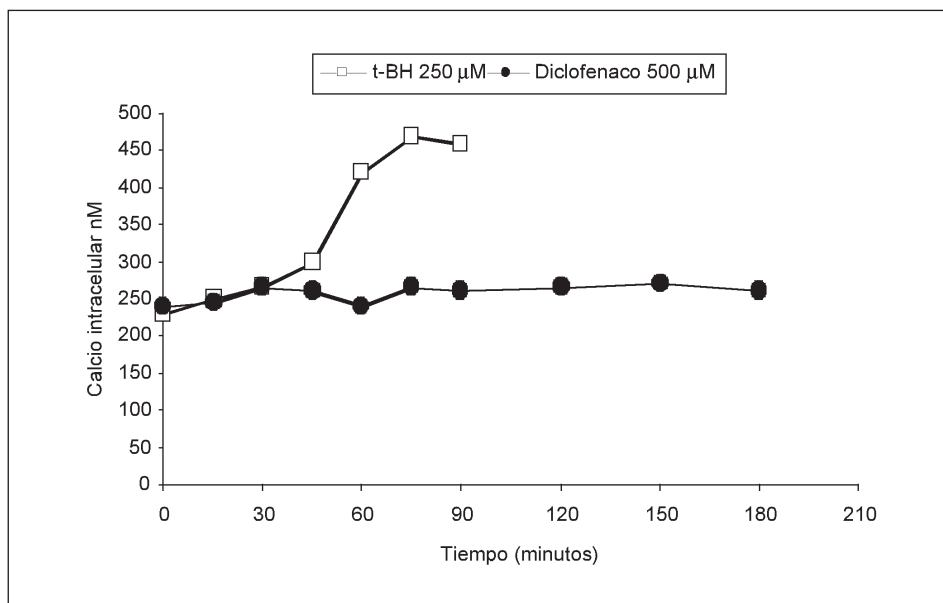


FIGURA 5. Efecto del diclofenaco sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La concentración del calcio intracelular se midió fluorimétricamente a períodos de tiempo regulares en hepatocitos de rata incubados con diclofenaco o *t*-butilhidroperóxido (*t*-BH).



### 3.5. Proteínas plasmáticas

Los hepatocitos en cultivo retienen su capacidad de sintetizar y secretar proteínas plasmáticas al medio de cultivo, como por ejemplo,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_1$ -antiquimotripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, fibronectina, fibrinógeno, albúmina, etc (15). Estas proteínas se producen en cantidades importantes, y en el caso de la albúmina, su producción es comparable a la del hígado humano (69). La tasa de síntesis de las proteínas plasmáticas se ve alterada en procesos fisiológicos como la regeneración hepática (70, 71) o la inflamación (72-74), y modificada por la acción de fármacos (hepatotoxicidad) (75, 76) e incluso durante el proceso de optimización de modelos celulares en cultivo (77, 78). Esto motiva que la cuantificación de las síntesis de las proteínas plasmáticas se emplee como un indicador de la respuesta celular ante las causas referenciadas. Un ejemplo de la acción de los fármacos sobre la síntesis de las proteínas plasmáticas es el de un grupo de fármacos administrados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas: ibuprofeno, butibufeno y flurbiprofeno (27). Este estudio realizado en nuestro laboratorio, utilizó la valoración de la síntesis de albúmina como un marcador del potencial efecto adverso de estos fármacos en el hígado. Para ello, cultivos primarios de hepatocitos se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de estos fármacos a distintos tiempos. La velocidad de la síntesis de albúmina para cada condición experimental se cuantificó mediante un ELISA indirecto competitivo desarrollado en nuestro laboratorio. Tal como muestra la figura 6, solo el butibufeno disminuyó significativamente la producción de albúmina, a concentraciones terapéuticas.

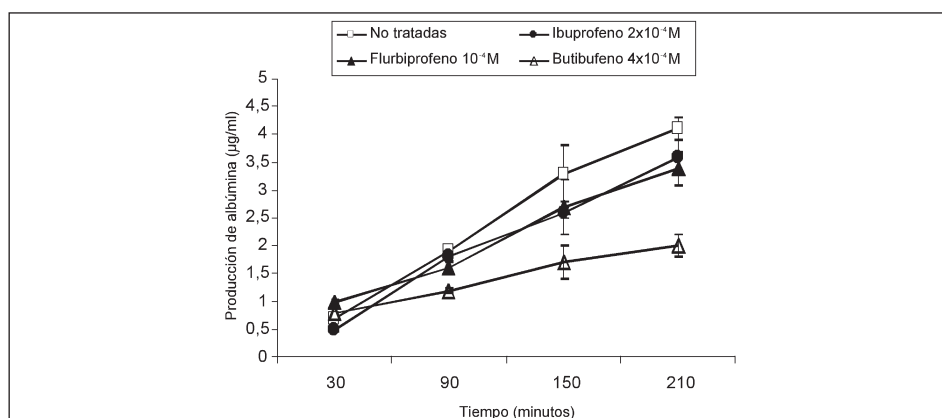


FIGURA 6. Síntesis y secreción de albúmina en hepatocitos tratados con ibuprofeno, flurbiprofeno y butibufeno. Hepatocitos en cultivo fueron tratados durante 6 horas con ibuprofeno  $2 \times 10^{-4} M$ , flurbiprofeno  $10^{-4} M$  y butibufeno  $4 \times 10^{-4} M$  (2x la concentración terapéutica de los fármacos). Finalizada la incubación se determinó la velocidad de la síntesis de albúmina para cada condición experimental mediante un ELISA indirecto competitivo.

### 3.6. Metabolismo de carbohidratos

El hígado juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre, siendo el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno una de sus funciones principales. Esta función se mantiene, en hepatocitos en cultivo, motivo por el cual se los considera un buen modelo celular para estudiar las alteraciones que sufre el metabolismo de carbohidratos (15). Se ha descrito que el contenido de glucógeno intracelular en hepatocitos humanos es muy comparable al descrito *in vivo* en el hígado humano alimentado (1980 nmoles glucosa/mg proteína) (15, 79). La movilización del glucógeno almacenado en hepatocitos humanos no se realiza espontáneamente sino que es necesaria la acción del glucagón para que esto ocurra. Del mismo modo, la recarga de las reservas de glucógeno también necesita de la acción de una hormona, la insulina. Además de su capacidad de almacenar y movilizar glucógeno los hepatocitos en cultivo también sintetizan glucosa a partir de sustratos gluconeogénicos, siendo su capacidad de hidrolizar glucosa superior a la estimada para el hígado humano *in vivo*.

Son diversas las causas que pueden alterar la homeostasis de la glucosa en humanos. Además de un grupo de enfermedades conocidas como la Diabetes Mellitus (80), existen otros factores o agentes capaces de interferir en este equilibrio. Un ejemplo de ello son los compuestos químicos o farmacéuticos. La literatura ha descrito numerosos casos en los que se correlaciona la administración de compuestos con el síndrome metabólico, es decir con alteraciones en la homeostasis de la glucosa, la hipertrigliceridemia, el colesterol, etc (81, 82). Así mismo, se han descrito efectos colaterales que ocurren sobre el metabolismo de carbohidratos en pacientes tratados con fármacos antipsicóticos (83). Otros fármacos que también provocan este tipo de alteraciones son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) siendo algunos de los más conocidos el paracetamol, la aspirina, el naproxeno, el diclofenaco, el ibuprofeno o el butibufeno (84-86).

Las compañías farmacéuticas emplean enormes esfuerzos en identificar fármacos capaces de bloquear estos efectos adversos, que como hemos descrito, se producen por causas endógenas o inducidas. A continuación se describe un estudio realizado en nuestro laboratorio, a petición de una compañía especializada en el desarrollo de antidiabéticos, en el que se demuestra como la acción del fármaco ADV0077 disminuye los niveles de glucosa favoreciendo el almacenamiento de glucógeno y la glucólisis. Para ello, hepatocitos huma-

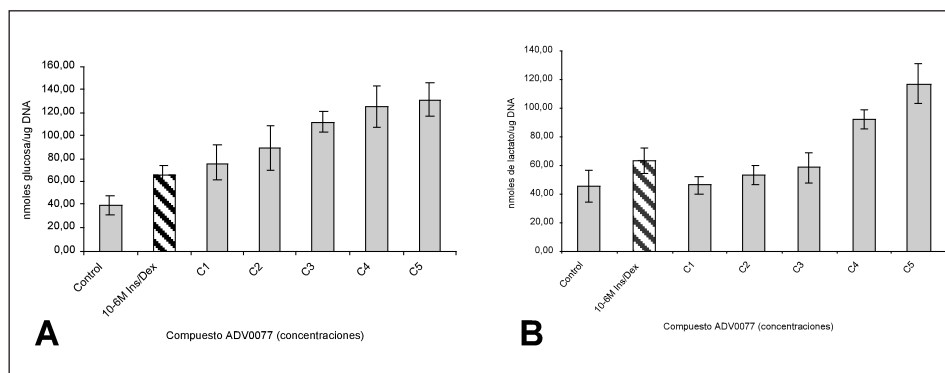


FIGURA 7. Valoración del efecto del compuesto ADV0077 sobre la glucólisis y la síntesis de glucógeno. Hepatocitos humanos en cultivo, no deplecionados con glucagón, se incubaron con concentraciones crecientes (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) del fármaco ADV0077 durante 4 h. Finalizado el tiempo de incubación se cuantificó el glucógeno intracelular (Panel A) y la producción de lactato (Panel B), mediante la reacción de la glucosa oxidasa y el método de conversión de lactato a piruvato por el enzima lactato deshidrogenasa, respectivamente.

Células no tratadas se utilizaron para determinar el glucógeno y el lactato basal.

Células tratadas con Insulina/Dexametasona se corresponden con los niveles de glucógeno y lactato inducido.

nos no deplecionados con glucagón, se incubaron con concentraciones crecientes del fármaco ADV0077, en ausencia de insulina y dexametasona. Tras un corto período de exposición, se valoró el glucógeno almacenado en las células y la liberación de lactato al medio de cultivo. Se utilizaron como controles, células no tratadas o tratadas conjuntamente con insulina/dexametasona. El contenido de glucógeno se determinó mediante la reacción colorimétrica de la glucosa oxidasa previa hidrólisis con amiloglucosidasa. La producción de lactato se cuantificó de acuerdo al método descrito por Gutmann y Wahlefeld (87) basado en la conversión de lactato a piruvato por el enzima lactato deshidrogenasa.

La figura 7; Panel A, demuestra que existió una respuesta dosis dependiente del fármaco relativa al incremento en el almacenamiento de glucógeno. De hecho esta respuesta duplicó, a la concentración más elevada, el efecto sinérgico que sobre el glucógeno producen la insulina y la dexametasona (88). La producción de lactato (figura 7; Panel B) correlacionó con los datos anteriores, aunque aquí el lactato liberado a concentraciones bajas del fármaco fue comparable a las obtenidas en células tratadas con insulina/dexametasona. Sólo las dos concentraciones más elevadas incrementaron la glucólisis que se produjo en el control positivo.

#### 4. ALTERACIONES A NIVEL MITOCONDRIAL

En células eucariotas diferenciadas, las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, actúan por tanto, como centrales energéticas. Gran parte de la energía química se genera en forma de ATP a expensas de carburantes metabólicos (glucosa, ácidos grasos y proteínas). Según la teoría quimiosmótica de Mitchell, los protones ( $H^+$ ) son bombeados de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, a medida que los electrones se mueven a través de la cadena transportadora, localizada en la membrana mitocondrial interna. Cada par de electrones cruza la membrana tres veces, transportando en cada una de ellas dos protones hacia el espacio intermembrana. Se genera de este modo un gradiente de protones (provoca diferencia de pH) y una diferencia de potencial eléctrico (PMM), efectos que originan un movimiento inverso de protones hacia la matriz mitocondrial. Este retorno de protones tiene lugar a través de canales de difusión formados por la ATPasa (ATP sintetasa). A medida que los protones pasan a través de la ATP sintetasa, la energía libre liberada potencia la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato ( $P_i$ ).

Una disfunción en la producción de ATP causa la alteración de las funciones celulares dependientes de energía y por tanto puede originar la muerte celular (89, 90). Se han descrito diferentes situaciones que pueden conducir a un deterioro de la función mitocondrial (91), como son; la dieta o enfermedad, alteraciones genéticas, o la inducción química (fármacos). Estas situaciones desencadenan la disfunción fundamentalmente por tres procesos, 1) por la pérdida de la producción de ATP, 2) por la alteración del potencial de membrana (PMM) y la estabilidad osmótica, 3) por la pérdida de la transferencia electrónica y del consumo de oxígeno. A lo largo del tiempo, se han descrito un gran número de interacciones específicas entre agentes químicos (incluidos los fármacos) y la mitocondria. Algunos ejemplos incluyen compuestos que pueden actuar como sustratos suicidas (oligomicinas), como inhibidores de algunas enzimas mitocondriales (pieridina A), como ionóforos, o desacopladores (gramicidina) o aquellos que interactúan directamente con proteínas transportadoras (91).

##### 4.1. Medidas del Potencial de Membrana Mitocondrial y Niveles de ATP como Indicadores de Toxicidad

La utilización de hepatocitos en cultivo primario ha demostrado ser un sistema modelo *in vitro* adecuado para el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad, que generan tanto algunos fármacos como sus metabolitos (63). Den-

tro del hepatocito, la mitocondria es con frecuencia una diana de éstos, lo que provoca una alteración de la función mitocondrial. El efecto inmediato de esta acción es un desequilibrio del balance energético de las células, lo que constituye un fenómeno clave en el inicio de la necrosis hepática. Se puede establecer una relación entre la integridad mitocondrial, por tanto la funcionalidad celular, y parámetros adecuados como son el PMM y los niveles de ATP (92). A continuación se explica de un modo general como llevar a cabo la valoración de ATP y PMM, en cultivos primarios de hepatocitos, como indicadores de disfunción mitocondrial (93).

#### *Medida de los Niveles de ATP*

Los niveles de ATP producidos por la mitocondria se miden después de exponer los hepatocitos a distintas concentraciones de un fármaco durante uno o varios períodos de tiempo. Las incubaciones se llevan a cabo en Hepes salino que contiene glucosa como única fuente de energía. Finalizada la exposición, las monocapas de hepatocitos son homogeneizadas con ácido perclórico (extrae el ATP), y tras su neutralización con KOH se centrifugan, para recuperar los sobrenadantes. El contenido en ATP se mide con un luminómetro utilizando el sistema enzima/sustrato (luciferasa/ luciferina). Este sistema se basa en una reacción química que necesita la concurrencia de cuatro elementos que son; oxígeno, luciferina; luciferasa y ATP. El mecanismo de reacción es el siguiente, el oxígeno oxida la luciferina, la luciferasa acelera la reacción y el ATP proporciona la energía para que esta se convierta en una nueva sustancia (luciferina oxidada), capaz de descomponerse para volver a su estado inicial. En este último proceso se libera el exceso de energía captado, esta vez, en forma de luz (94, 95). Como control positivo se utiliza CCCP (carbonil cianida *m*-clorofenilhidrazona) un desacoplador de la fosforilación oxidativa y por tanto de la síntesis de ATP que viene por esta vía, pero no del ATP que viene de la glucólisis anaeróbica de la glucosa que se produce en el citosol. En la figura 8 se muestra un esquema general del diseño experimental que se utiliza para medir los niveles de ATP mitocondrial (97).

#### *Potencial de Membrana Mitocondrial*

El PMM se puede cuantificar indirectamente en cultivos primarios de hepatocitos, mediante la valoración de la distribución de un colorante catiónico

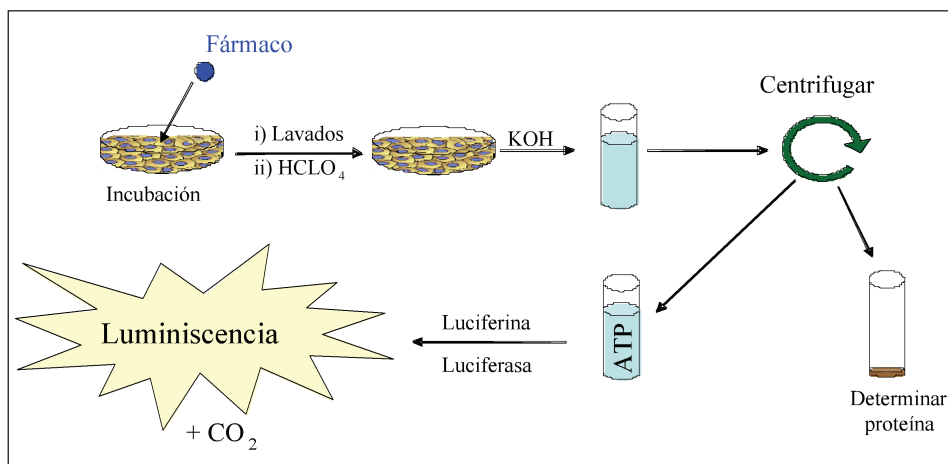


FIGURA 8. Esquema general para la cuantificación de ATP en cultivo primario de hepatocitos mediante el sistema luciferina/luciferasa.

fluorescente (rodamina-123), este fluoróforo se acumula de modo selectivo en el interior de las mitocondrias activas, atraído por el potencial de membrana mitocondrial (98-100). Después de exponer los hepatocitos a diferentes concentraciones de fármaco por un determinado periodo de tiempo se añade rodamina-123 y se incuba durante 30 min. A continuación, se toma una alícuota de sobrenadante con el fin de medir la fluorescencia no capturada por las células. Posteriormente, se lavan las células y se permeabiliza la membrana plasmática con digitonina/succinato, se recoge una alícuota y se mide la fluorescencia en el citosol ( $F_c$ ). Por último se vuelven a lavar las células y se tratan con Hapes que contiene el detergente Triton X-100 (permeabiliza las membranas de los orgánulos subcelulares). La lectura de la fluorescencia de una alícuota de dicho tampón corresponde a la fluorescencia intramitocondrial ( $F_{im}$ ). El PMM se calcula por medio de una aproximación de la ecuación de Nerst's ( $\psi = -59 \log (F_{im}/F_c)$ ), donde ( $\psi$  representa el potencial de membrana (figura 9). Las uniones no específicas de la rodamina 123 se determina incubando para cada experimento células muertas en presencia del fluoróforo catiónico.

Un ejemplo tipo de estos estudios fue el llevado a cabo en nuestro laboratorio por Bort y col. (63), donde utilizaron cultivos primarios de hepatocitos, con el fin de estudiar los posibles mecanismos de toxicidad del diclofenaco. Para ello tras la incubación de los hepatocitos con el fármaco midieron los niveles de ATP, PMM y en paralelo, la viabilidad celular a partir de la liberación al medio del enzima lactato-deshidrogenasa (101). Los resultados obtenidos indica-

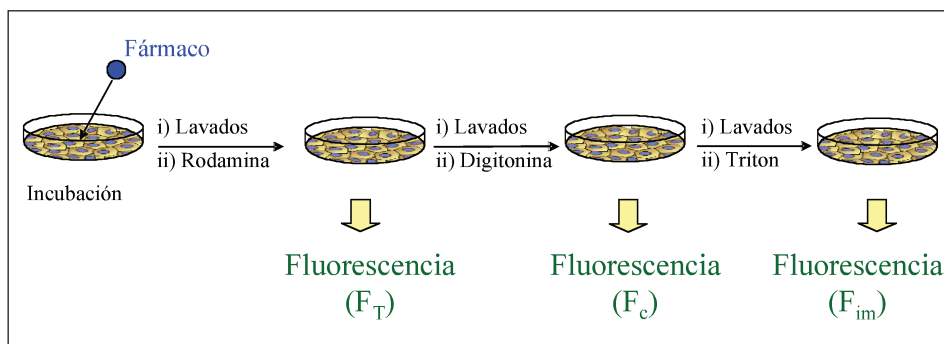


FIGURA 9. Esquema general para la cuantificación del PMM en cultivo primario de hepatocitos mediante la utilización de un colorante catiónico fluorescente (Rodamina-123).

ron que la depleción de ATP y los cambios del PMM preceden al daño irreversible de la célula, ya que la variación de ambos no correlaciona en el tiempo con la liberación de LDH, un parámetro que indica muerte celular (figura 10).

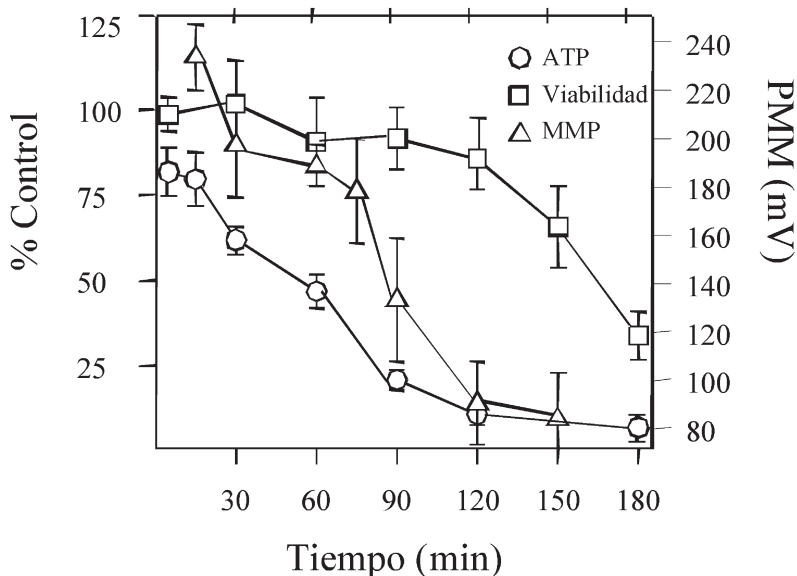


FIGURA 10. Efecto del Diclofenaco sobre la funcionalidad mitocondrial. Medida de ATP y PMM como indicadores de disfunción mitocondrial, en correlación con la viabilidad celular.

## 5. UNIÓN COVALENTE DE FÁRMACOS A PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS

Un tema que preocupa a la industria farmacéutica y al que cada vez dedica más esfuerzos es al estudio de la capacidad que tienen determinados fármacos *per se* o sus metabolitos de interactuar con las macromoléculas presentes en su entorno (proteínas y ácidos nucleicos), quizás, uniéndose a ellas. Estas uniones pueden ser de tipo reversible (no-covalente) o irreversible (covalente), ocasionando en el último caso un efecto permanente sobre la funcionalidad de las moléculas a las que se une, llegando incluso a conducir a la muerte celular. A pesar de todo, la biotransformación de un fármaco no siempre va ligada a efectos nocivos, un ejemplo de ello es la conversión de un pro-fármaco inactivo en su forma activa o la aplicación terapéutica que tienen algunos agentes antitumorales, los cuales actúan a través de su unión covalente al ADN (102). Sin embargo, en esta sección revisaremos como estudiar las uniones de tipo covalente como un efecto colateral no deseado (103).

### *Aductos fármaco-proteína*

Debido a las características químicas de los grupos funcionales que se encuentran en las proteínas, estas macromoléculas son la diana más frecuente para fármacos y sus metabolitos. Las reacciones más frecuentes son con grupos -SH de la cisteína o metionina, -NH<sub>2</sub> de la lisina o arginina, y -NH- de la histidina, que pertenecen a las proteínas. Dependiendo del lugar donde se forme y de la naturaleza de la especie reactiva el aducto fármaco-proteína puede encontrarse en distintas localizaciones subcelulares. Por ejemplo, es frecuente encontrar estos aductos en el retículo endoplasmático ya que es el lugar donde se localiza el CYP450, y por tanto donde se produce la biotransformación de los fármacos (104). En alguna ocasión, estos aductos han sido detectados en la membrana plasmática, hecho que puede ser consecuencia de una bioactivación en la membrana o debido a un transporte de esta proteína modificada a la membrana. La formación de aductos fármaco-proteína juega un papel importante en la funcionalidad de la célula, en tanto que el fármaco o su metabolito pueden unirse a proteínas que desempeñan funciones vitales para el correcto funcionamiento celular. En este sentido, se han identificado pocas proteínas como dianas específicas de fármacos o metabolitos, las más frecuentes, como hemos mencionado antes, son los CYP/450 (105), aunque también se han descrito como dianas específicas otras enzimas como la Ca<sup>+2</sup>-ATPasa, carboxil esterasa, GSH transfera-



sa, etc (106, 107). Por otro lado, se sabe que la unión fármaco-proteína, es con frecuencia un prerrequisito en el disparo inmunológico y puede provocar la aparición de una respuesta de tipo alérgico (108).

### *Aductos fármaco-ácidos nucleicos*

Como se ha mencionado anteriormente los ácidos nucleicos (DNA, RNA) también constituyen una diana para fármacos y metabolitos, no en vano gran parte de los antitumorales basan su funcionalidad terapéutica en su unión covalente al ADN. Un ejemplo prototipo es la mitomicina C, compuesto que para ser activo necesita la reducción de sus grupos  $-oxo$ , liberando metanol y uniéndose posteriormente al ADN. Los ácidos nucleicos son moléculas susceptibles de sufrir ataques nucleofílicos, que reaccionan con ciertos carbonos, como los C5 y C6 de las bases, también pueden reaccionar con los grupos amino de las bases púricas (109). La interacción con estas macromoléculas es de gran importancia ya que puede interferir en la transcripción (expresión de genes y síntesis de proteínas), en la replicación del DNA y por tanto en el funcionamiento celular. El daño inmediato está ligado a la muerte celular y a posibles efectos carcinógenos, aunque también puede provocar efectos teratógenos cuando los cambios afectan a futuras generaciones celulares. En este sentido, aquellos tejidos que presentan una mayor relevancia son los que tienen un mayor recambio celular, como la mucosa intestinal o la médula ósea.

### **5.1. Modelos experimentales para determinar la unión covalente a macromoléculas**

Clásicamente, la detección de la unión covalente de fármacos a macromoléculas se ha llevado a cabo por métodos radioquímicos (que implican la utilización de fármacos marcados) o inmunológicos (uso de anticuerpos específicos). Como es natural, cada método tiene sus ventajas y sus desventajas. Los métodos radioquímicos presentan ciertas desventajas como, la dificultad en diferenciar si quien queda unido a la macromolécula es el fármaco o el metabolito de éste, además no aportan información estructural de los aductos formados. Por el contrario, la desventaja fundamental de las técnicas inmunológicas es que debido a la especificidad de los anticuerpos, con un solo anticuerpo resulta difícil cuantificar la totalidad de los aductos que pueden llegar a formarse si el fármaco se une por distintos lugares a la macromolécula, ya que si sucediese esto el epitopo que queda accesible al anticuerpo es diferente en cada caso (110-112).

*Monitorización de aductos mediante la utilización de fármacos marcados*

El uso de fármacos marcados permite valorar en cultivos primarios de hepatocitos la marca incorporada de forma irreversible a macromoléculas. Para ello lo que se hace es medir la radioactividad no extraíble de las células que previamente han sido expuestas al fármaco marcado. Normalmente se utilizan fármacos marcados con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$  y con una radioactividad específica que se encuentra entre 50-100 MBqmmol $^{-1}$ . Una vez incubadas las células con el fármaco durante un determinado periodo de tiempo, se lavan las monocapas con PBS, con el fin de eliminar el fármaco no unido, es decir la radiactividad libre. A continuación, las células se rascan, se sonicán, y se mide la radioactividad de una alícuota del homogenado que corresponde con la radioactividad total unida (covalente y no covalente). Posteriormente se precipitan las proteínas, se centrifuga las muestras y los pellets obtenidos son sometidos a distintos lavados con disolventes de distinta polaridad (serie eluotrópica). La radioactividad extraída en estos lavados corresponde al fármaco o metabolito que no está unido covalentemente y que por tanto puede ser extraído. Posteriormente los pellets se disuelven en tampón solubilizador de donde tomamos una alícuota para medir la radioactividad y otra para determinar el contenido en proteína. De este modo finalmente obtenemos un resultado que podemos expresar en cpm /mg de proteína (fármaco unido/mg proteína).

Una variante del ensayo anterior permite determinar si el fármaco se une a ácidos nucleicos o lo hace a proteínas nucleares. Para ello se incuba el fármaco en presencia de las células como se ha descrito anteriormente. Una vez que se obtiene el homogenado celular en solución hipotónica se somete a una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, de este modo separamos los núcleos (114), del citosol y de los restos celulares. A continuación se mide la radioactividad en ambas fracciones. Una vez que hemos separado los núcleos se les añade una solución fenol/cloroformo (1:1), con el fin de separar los ácidos nucleicos de las proteínas nucleares, después de la centrifugación se forman dos fases. En la fase superior se encuentran los ácidos nucleicos y en la fase inferior (orgánica) las proteínas (115). Por último, se mide la radioactividad de estas fases y se establece una correlación marca/fase y por tanto unión fármaco/macromolécula. En la figura 11 se muestra un esquema general del ensayo.

Como se ha comentado anteriormente una de las limitaciones que presenta esta técnica que usa fármacos marcados es que no aporta información concreta de si se trata del fármaco o de un metabolito de este, quien en última instancia queda unido a la macromolécula. Con el fin de abordar este problema se pueden re-

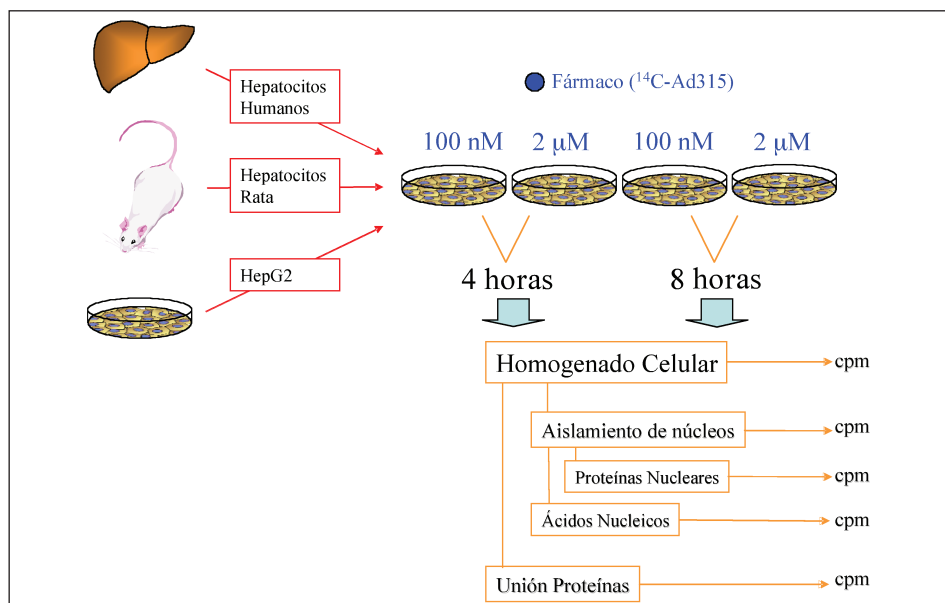


FIGURA 11. Esquema general de la valoración de la unión de fármacos a macromoléculas en cultivos celulares, mediante la utilización de fármacos marcados.

alizar incubaciones en paralelo en cultivos primarios de hepatocitos y con células de origen hepático que tengan mermada su capacidad metabólica (por ejemplo la línea celular HepG2). Aplicando la técnica descrita anteriormente y con una sencilla comparación de los resultados puede establecerse una aproximación de si es el fármaco o su metabolito el que queda unido preferentemente a la macromolécula. En la figura 12 se representan los valores obtenidos en un estudio de este tipo, llevado a cabo en nuestro laboratorio, para una compañía farmacéutica. En este estudio se demostró que el fármaco (Ad-0315) se unía a hepatocitos humanos y de rata. También pudimos deducir que la unión tenía lugar a través de un mecanismo de biotransformación, ya que la marca se perdía cuando incubábamos con células sin capacidad metabólica. Por último, se pudo demostrar que este compuesto se unía de forma preferente a los ácidos nucleicos.

#### *Detección de aductos por métodos inmunológicos*

El uso de anticuerpos específicos puede ayudar a detectar la formación de aductos fármaco-proteína. Ello requiere la utilización de técnicas muy sensibles

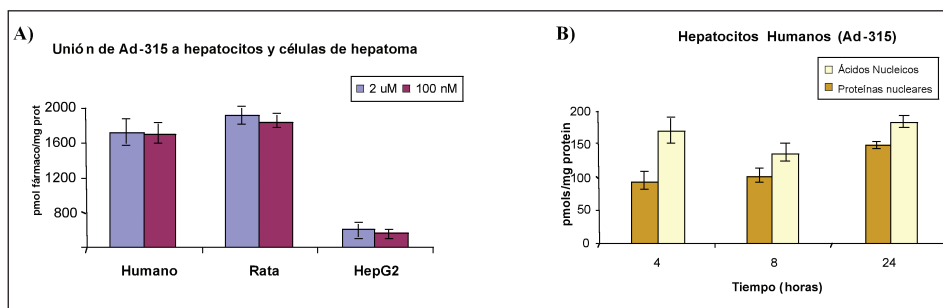


FIGURA 12. A) Unión de Ad-315 a hepatocitos y a la línea celular de hepatoma humano (HepG2), después de incubar estas células durante 8 horas con el fármaco. El hecho de que se una a hepatocitos y no a células sin capacidad metabólica (HepG2), pone de manifiesto que se produce la biotransformación del fármaco antes de su unión a las células. B) El fármaco tiende a acumularse en el núcleo, presentando una unión preferente a los ácidos nucleicos.

y anticuerpos específicos capaces de reconocer epítomos del fármaco una vez unido a la proteína (116). Obviamente, resulta importante conocer el mecanismo de unión del fármaco o metabolito a la proteína. Un ejemplo ilustrativo, es el que fue llevado a cabo con el diclofenaco por Hargus y colaboradores (figura 13),

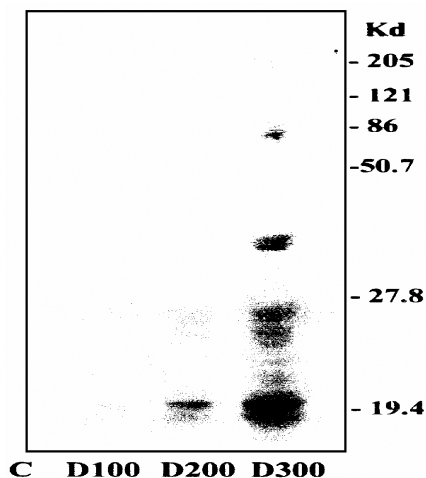


FIGURA 13. Unión del Diclofenaco a proteínas de hepatocitos de rata incubados con el fármaco durante 24h. La fracción S9 fue separada por un SDS-PAGE. Las proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con IgG anti-Diclofenaco y con IgG marcada con peroxidasa de cabra anti conejo IgG. La incubación de los blots con luminol y la exposición a papel fotográfico permitió la visualización de los adutos fármaco-proteína.

donde el uso de técnicas inmunológicas y de cultivo primarios de hepatocitos permitió identificar los aductos fármaco-proteína. En este caso la unión a las proteínas ocurre por un lado, a través de la formación de un enlace amida con la proteína y por otro a través de la formación de bases de Schiff entre el conjugado con ácido glucurónico y los grupos amino de la proteína (117, 118). En ambos casos la identificación de los aductos diclofenaco-proteína fue llevada a cabo usando anticuerpos que reconocían epitopos específicos. Esta técnica consiste en incubar cultivos primarios de hepatocitos con el fármaco en estudio, obtener la fracción S9 que contiene los microsomas. A continuación, se separan las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS, 2-mercaptoetanol) y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente y previo bloqueo de la membrana para evitar la unión no específica, ésta se incuba con el anticuerpo específico contra los distintos epitopos. Por último y con el fin de detectar el anticuerpo primario unido a proteína, se incuba con un segundo anticuerpo que a su vez se halla unido a enzimas u otros marcadores, que permiten (tras incubación con los sustratos adecuados) identificar las proteínas que han quedado unidas al fármaco. Generalmente estos ensayos tanto de radioactividad como inmunológicos se llevan a cabo utilizando varias concentraciones de fármaco y diferentes períodos de tiempo, de este modo, comprobamos si la unión es un proceso dependiente del tiempo y la concentración.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lazo JS and Wipf S. (2000). Combinatorial chemistry and contemporary pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **293**: 705-709.
2. Debouck C and Metcalf B. (2000). The impact of genomics on drug discovery. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* **40**:193-207.
3. Carere A, Stamatii A and Zucco F. (2002). *In vitro* toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. *Toxicol Lett* **127**:153-160.
4. Littlehales C. (1999). Modern drug discovery **21**.
5. Ley 25/1990 del medicamento , de 20 de Noviembre. B.O.E. de 22 de Diciembre de 1990.
6. Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM and Bor DH. (2002). Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *JAMA* **287**:2215-2220.

7. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B and Heller A. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**:56-67.
8. Xu JJ, Díaz D and O'Brien PJ (2004). Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potencial. *Chemico-Biological Interactions* **150**:115-128.
9. Hawksworth GM. (1994). Advantages and disadvantages if using human cells for pharmacological and toxicology studies. *Hum Exp Toxicol* **13**:568-573.
10. Gómez-Lechón MJ, Donato MT and Castell JV. (1997). Use of cultured hepatocytes to investigate drug metabolism and toxicity. *In Vitro Toxicology* **10**:63- 70.
11. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, Bort R and Castell JV. (2001). The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity *ATLA* **29**:225-231.
12. Gómez-Lechón MJ and Castell JV. (1998). Primary cultured of human hepatocytes. In:Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. Ed. JB. Griffiths, A. Doyle and D.G. Newell. ISBN: 0471928526. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, England; 12B:15.1-15.7.
13. Lee WM (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* **349**:474-485.
14. Bernardi P, Scorrano L, Colona R, Petronilli V and Di Lisa F (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J. Biochem* **264**:687-701.
15. Gómez-Lechón, Donato MT, Castell JV and Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. (2003) *Current Drug Metabolism* **4**:292-312.
16. Fromentry B and Pessayre D (1995). Inhibition of mitochondrial (-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther* **67**:101-154.
17. Fromentry B and Pessayre D (1997). Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J. Hepatol* **26** (suppl 2):43-53.
18. Berson A, De Veco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromentry B and Pessayre D (1998).. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* **114**:764-774.
19. Chitturi S and Farrell GC (2001). Drug-induced cholestasis. *Semin Gastrointest Dis* **12**:113-124.

20. Trauner M, Meier PJ and Boyer JL (1998). Molecular pathogenesis of cholestasis. *New England J of Medicine* **339**:1217-1227.
21. Trauner M, Fickert P and Stauber RE (1999). New molecular aspects of cholestatic liver disease. *Z Gastroenterol* **37**:639-647.
22. Palmeira CM and Rolo AP (2004). Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology* **203**:1-15.
23. Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C, Bujalance I, Briceno J, Gallardo JI, Marchal T, Caballero R, Tunez I, Muntane J, Montilla P and Pera-Madrazo C (2004). Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Radic Res* **38**:697-704.
24. Sirajudeen KN, Gurumoorthy P, Devaraj H and Devaraj SN (2002). Amiodarone-induced phospholipidosis: an in vivo <sup>14</sup>C-acetate uptake study in rat. *Drug Chem Toxicol* **25**:247-254.
25. Scuntaro I, Kientsch U, Wiesmann UN and Honegger UE (1996). Inhibition by vitamin E of drug accumulation and of phospholipidosis induced by desipramine and other cationic amphiphilic drugs in human cultured cells. *Br J Pharmacol* **119**:829-834.
26. Castell JV, Montoya A, Larrauri A, Lopez P and Gómez-Lechón MJ (1985). Effects of benorylate and impacina on the metabolism of cultured hepatocytes. *Xenobiotica* **15**:743-749.
27. Castell JV, Larrauri A and Gómez-Lechón MJ (1988). A study of the relative hepatotoxicity *in vitro* of the non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen and butibufen. *Xenobiotica* **18**:737-745.
28. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X and Bort R (1997). *In vitro* investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. *In vitro* methods in pharmaceutical research. Edited by Castell JV and Gómez-Lechón MJ. ISBN0-12-163390-X Academic Press London. Chapter **16**:375-410.
29. Sies H (1991). Oxidative stress: introduction. In Seis H (ed). Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. Academic Press, London.
30. Lebel P, Ischiropoulos H and Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**:227-231.
31. Lautraite S, Bigot-Lasserre D, Bars R and Carmichael N (2003). Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicol in vitro* **17**:207-220.
32. Wang H and Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **27**:612-616.

33. Boots AW, Bast A and Haenen GR. No role of DT-diaphorase (NQO1) in the protection against oxidized quercetin. *FEBS Lett* **579**:677-682.
34. Vila A, Levchenko VV, Korytowski W and Girotti AW (2004).. Sterol carrier protein-2 facilitated intermembrane transfer of cholesterol- and phospholipid-derived hydroperoxides. *Biochemistry* **43**:12592-12605.
35. Largilliere C (1988) Ferec malondialdehyde determination in human plasma by HPLC. *Anal Biochem* **170**:123-126.
36. Janero DR (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol. Med* **9**:515-540.
37. Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B and Lorenzon G (1994). A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol and Toxicol* **10**:415-421.
38. Poli G (1993). Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull* **49**:604-620.
39. Ross D (1988). Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol* **37**:231-249.
40. Reed DJ (1990) Glutathione: toxicological implications *Ann. Rev Pharmacol Toxicol* **30**:603-631.
41. Meister A (1982) Glutathione. In Arias, I.M., Popper, H., Schachter, D. Ad Shafritz, D.A. (eds) *The liver: Biology and Pathobiology*, pp.297-308, Raven Press, New York.
42. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ and Lu SC (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **42**:219-225.
43. Friesen C, Kiess Y and Debatin KM (2004) A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ* **11** Suppl 1:S73-85.
44. Fouin-Fortunet H, Letteron P, Tinel M, Degott C, Fish C and Pessayre D (1984) Mechanisms for isaxonine hepatitis II. Protective role of glutathione and toxicological studies in mice. *J. Pharmacol. Exp Ther* **229**:851-858.
45. Bathia AL and Jain M. Spinacia oleracea L. Protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. *Phytomedicine* **11**:607-615.
46. Thomas JA and Park EM (1988). Oxy radical-initiated S-thiolation and enzymic dethiolation. *Basic Life Sci* **49**:365-368.



47. Awasthi S, Ahmad F, Sharma R and Ahmad H (1992). Reverse-phase chromatographic method for specific determination of glutathione in cultured malignant cells. *J. Cromatogr Biomed Appl* **584**:167-178.
48. Slordal L, Andersen A, Dajani L and Warren DJ (1993). A simple HPLCC-method for the determination of cellular glutathione. *Pharmacol Toxicol* **73**:124-126.
49. Thompson DC, Barhoumi R and Burghard (1998). Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicol Appl. Pharmacol* **149**:55-63.
50. Lilius H, Haestbacka T and Isomaa B (1996). A combination of fluorescent probes for evaluation of cytotoxicity and toxic mechanisms in isolated rainbow trout hepatocytes. *Toxicol In vitro* **10**:341-348.
51. Baker MA, Cerniglia GJ and Zaman A (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* **190**:360-365.
52. Anderson ME (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**:548-555
53. Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:552-565
54. Speeding M and Paoletti R (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol Rev* **44**:363-376
55. Kraus-Friedmann N (1990). Calcium sequestration in liver cells. *Cell. Calcium* **11**:625-640
56. Claphan DE (1995). Calcium signalling. *Cell* **80**:259-268
57. Yokomori H, Oda M, Kamegaya Y, Ogi M, Tsukada N and Ishii H (2001). Bile canalicular contraction and dilatation in primary cultured hepatocytes-possible involvement of two different types of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>- Mg<sup>2+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-pump-ATPase. *Med Electron Microsc* **34**:115-122
58. Weis M, Kass GEN, Orrenius S and Moldéus P (1992). N-acetyl-para-benzoquinone imine induces Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria by stimulating pyridine nucleotide hydrolysis. *J. Biol. Chem* **267**:804-809
59. Petit A, Bleicher C and Lussier BT (1999). Intracellular calcium stores are involved in growth hormone-releasing hormone signal transduction in rat somatotrophs. *Can J Physiol Pharmacol* **77**:520-528
60. Kruger B, Albrecht E and Lerch MM (2000). The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol* **57**:43-50

61. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R and Petersen OH (2000). Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **97**:13126-13131
62. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Seonarain MD, Makusky AJ, Apon-te AM, Esquer-Blanco R and Anderson NL (2001). Cholesterol biosynthesis regu-lation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin. *Toxi-col Lett* **120**:369-377
63. Bort R, Ponsoda X, Jover R, Gómez-Lechón MJ and Castell JV (1999). Diclofe-nac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *JPET* **288**:65-72
64. Kaplowitz N, Aw TY, Simon FR and Stolz A (1986) Drug-induced hepatotoxicity. *Ann Intern Med* **104**:826-839
65. Comporti M. (1987) Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* **45**:143:169
66. Masubuchi Y, Suda C and Horie T (2005). Involvement of mitochondrial permeabi-lity transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol* **42**:110-116
67. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ and Castell JV (1993). Cocaine hepato-toxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-in-duced rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **46**:1967-1974
68. Kim JA, Kang YS, Lee SH and Lee YS (2000). Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchan-ger prevent oxidant-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> increase and apoptosis in a human hepatoma cell line. *Free Radic Res* **33**:267-277
69. Schmucher DL (2001). Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. *Drugs Aging* **18**:837-851
70. Shih CC, Wu YW, Hsieh CC and Lin WC (2004). Effect of *Anoectochilus formo-sanus* on fibrosis and regeneration of the liver in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**:620-625
71. Wang J, Clark JB, Rhee GS, Fair JH, Reid LM and Gerber DA (2003). Prolifera-tion and hepatic differentiation of adult-derived progenitor cells. *Cells Tissues Or-gans* **173**:193-203
72. Thomas S, Wolf SE, Chinkes DL and Herndon DN (2004). Recovery from the he-patic acute phase response in the severely burned and the effects of long-term growth hormone treatment. *Burns* **30**:675-679
73. Kang YH, Berthiaume F and Yarmush ML (2002). Long-term stable cultures of rat hepatocytes: an *in vitro* model to study acute and chronic hepatic inflammation. *Tissue Eng* **8**:681-693

74. González-Ramón N, Hoebe K, Alava MA, Van Leengoed L, Pineiro M, Carmona S, Iturralde M, Lampreave F and Pineiro A (2000). Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* **267**:1878-1885
75. Ilyin GP, Rissel M, Malledant Y, Tanguy M and Guillouzo A (1994). Human hepatocytes express teifluoroacetylated neoantigens after *in vitro* exposure to halothane. *Biochem Pharmacol* **48**:561-567
76. Isozaki M, Ito K, Masubuchi Y and Horie T (2002). Plasma retinol binding protein for monitoring the acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* **17**:540-545
77. Sosef MN, Baust JM, Sugimachi K, Fowler A, Tompkins RG and Toner M (2005). Cryopreservation of isolated primary rat hepatocytes: enhanced survival and long-term hepatospecific function. *Ann Surg* **241**:125-133
78. Burra P, Tomat S, Conconi MT, Macchi C, Russo FP, Panigotto PP, Naccarato R and Nussdorfer GG (2004). Acellular liver matrix improves the survival and functions of isolated rat hepatocytes cultured *in vitro*. *Int J Mol Med* **14**:511-515
79. Gómez-Lechón MJ, López P, Donato T, Montoya A, Larrauri A, Giménez P, Trullenque R, Fabra R and Castell JV (1990) Culture of human hepatocytes from small surgical biopsies: Biochemical characterization and comparison *in vivo*. *In Vitro Cell Biol Dev* **26**:67-74
80. Davies M (2004). The reality of glycaemic control in insulin treated diabetes: defining the clinical challenges. *Int J Obes Relat Metaab Disord* **28** Suppl 1:S14-22
81. Natali A and Ferrannini E (2004). Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **33**:417-429
82. Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP and Elisaf M (2004). Prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Angiology* **55**:589-612
83. Melkersson KI, Dahl ML and Hulting AL (2004). Guidelines for prevention and treatment of adverse effects of antipsychotic drugs on glucose-insulin homeostasis and lipid metabolism. *Psychopharmacology* **175**:1-6
84. O'Brien PJ, Slaughter MR, Swain A, Birmingham JM, Greenhill RW, Elcock F and Bugelski PJ. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system (2000). *Hum Exp Toxicol* **19**:277-283
85. Palayoor ST, Tofilon PJ and Coleman CN (2003). Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha and HIF-2alpha in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**:3150-3157
86. Dragomir E, Manduteanu I, Voinea M, Costache G, Manea A and Simionescu M (2004). Aspirin rectifies calcium homeostasis, decreases reactive oxygen species,

- and increases NO production in high glucose-exposed human endothelial cells. *J Diabetes Complications* **18**:289-299
87. Gutmann I and Wahlefeld AW (1974). Determination of L-(+)-lactate with lactate dehydrogenase and NAD En: *Methods of enzymatic Análisis* **4**:1464-1468 Academic Press, New York
  88. Lopez MP, Gómez-Lechón MJ and Castell JV (1984). Glycogen síntesis in serum-free cultured hepatocytes in response to insulin and dexamethasone. *In Vitro* **20**:923-93189.
  89. Lemasters J.J., DiGuseppi J., Nieminen A. L., and Herman B. (1987). Blebbing free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* **325**: 78-81.
  90. Bernardi P. (1998) Mitochondria in cell death (preface). *Biochim. Biophys Acta*. **1366**: 1-2
  91. Lawrence H. Lash, Dean p. Jones (1993). Mitochondrial Dysfunction. *Methods in Toxicology* Vol **2**: 1-8.
  92. Wu Y E., Smith M T., Bellomo G., Di Monte D. (1990). Relationships between the Mitochondrial Transmembrane Potential, ATP Concentration, and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **282**: 358-36
  93. Nieminen A. L., Saylor A. K., Tesfai S. A., Herman B. and Lemasters J. J. (1995). Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochemical Journal* **307**: 99-106.
  94. De Luca M., McElroy, W. D. (1978). Purification and properties of firefly luciferase. *Methods. Enzimol.* **57**: 3-14
  95. Manfredi G, Yang L, Gajewski CD, Mattiazzi M. Measurement of ATP in mammalian cells. (2002) *Methods* **26**: 317-326.
  96. Ponsoda X., Bort R., Jover R., Gómez-Lechón M. J. and Castell J.V. (1995). Molecular mechanisms of diclofenac hepatotoxicity: cell injury is associated to the metabolism of the drug and is precluded by a decrease in ATP levels. *Toxicology in Vitro* **9**: 439-444.
  97. Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Fármacos y hepatotoxicidad: mecanismos moleculares de la hepatotoxicidad por fármacos. *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo*. Ed. María Cáscales Angosto, ISBN: 84-920968-4-5. Real Academia de Farmacia, monografía IV, 1997
  98. Emaus, R. K, Grunwald, R. Lemasters, J. J (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochem. Biophys. Acta.* **850**: 436-448.

99. Nieminen A.L., Gores G.J, Dawson T.L., Herman B, Lemasters J.J (1990) Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **265**: 2399-2408.
100. Toescu EC, Verkhatsky A, (2000) Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Instruments and Techniques*. **440**: 941-947
101. Ponsoda, X., Jover, R., Castell, J.V., and Gómez-Lechón M.J., (1991) Measurement of intracellular LDH activity in 96 well plates cultures: a rapid and automated assay for cytotoxicity studies. *J. Tissue. Methods* **13**: 21-24
102. Hinson J.A., and Roberts D.W. (1992). Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annu. Reviews in Pharmacology and Toxicology* **32**: 471-510.
103. Nelson, S.D. and Pearson P.G. (1990). Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. *Annu. Reviews in Pharmacology and Toxicology* **30**: 169-195
104. Holtzman J. L. (1995). The role of covalent binding to microsomal proteins in the hepatotoxicity of acetaminophen. *Drug Metabolism Reviews* **27**: 277-297
105. Bourdi, M., Tinel, M., Beaune, P. H. and Pessayre, D. (1994). Interaction of dihydralazine with cytochromes P4501A: possible explanation of the appearance of anti-cytochrome P4501A2 auto antibodies. *Mol. Pharmacol* **45**: 1287-1295.
106. Boelsterli U. A. (1993). Specific targets of covalent drug-protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug-induced liver injury. *Drug Metabolism Reviews* **25**, 395-451.
107. Pelt F. N. and Kenna J. G. (1994). Formation of trifluoroacetylated protein antigens in cultured rat hepatocytes exposed to halothane in vitro. *Biochemical Pharmacology* **48**, 461-471
108. Tsutsui H., Terano Y., Sakagami C. et al. (1992). Drug-specific T cells derived from patients with drug-induced allergic hepatitis. *Journal of Immunology* **149**,706-716.
109. Paz MM, Kumar GS, Glover M, Waring MJ, Tomasz M (2004) Mitomycin dimers polyfunctional cross-linkers of ADN. *J Med Chem*. **47**: (12), 3308-3319
110. Gómez-Lechón MJ, Carrasquer J, Berenguer J, Castell JV. Evidence of antibodies to erythromycin in serum of a patient following an episode of acute drug-induced hepatitis. (1996) *Clin Exp Allergy* **26**: 590
111. Grossweiner, S. I., and Smith, K. C. (1989) *Photochemistry*. In the Science of Photobiology (Smith, K. C., Ed.) 2nd ed., pp 47-78, Plenum Press, New York.
112. Barratt, M. D., and Brown, K. R. (1995) Photochemical binding of photoallergens to human serum albumin: a simple in vitro method for screening potential photoallergens. *Toxicol. Lett.* **24**: 1-6.

113. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol red reagent. *J. Biol.Chem* **193**: 265-272.
114. Jover R., Lindberg R. L. P. and Meyer U. A (1996) Role of Heme Cytochrome P450 Transcription and Function in Mice Treated with Lead Acetate. *Molecular Pharmacology* **50**: 474-481.
115. Ausebel et al (Eds) (1987) Current Protocols in Molecular Biology Wallace, Donald M. (1987) Methods in Enzymology **152**: 33-
116. Lahoz A, Hernández D, Miranda MA, Pérez-Prieto J, Morera IM, Castell JV. (2001). Antibodies directed to drug epitopes to investigate the structure of drug-protein photoadducts. Recognition of a common photobound substructure in tiaprofenic acid/ketoprofen cross-photoreactivity *Chem Res Toxicol.* **14** (11), 1486-1491.
117. Kretz-Rommel A. and Boelsterli U. A. (1994). Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac in rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety. *Drug Metabolism and Disposition* **22**: 956-961.
118. Hargus, S. J., Amouzedeh H. R., Pumford N. R. et al. (1994). Metabolic activation and immunochemical localization of liver protein adducts on the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol* **7**: 575-582.