



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Artritis adyuvante y citocromo P-450 hepático

Juan José Moreno Aznárez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

ARTRITIS ADYUVANTE Y CITOCROMO P-450 HEPATICO

Memoria presentada por Juan José Moreno Aznárez para optar al Grado de Doctor.

Este trabajo ha sido dirigido por los Drs. M. Cristina Castellote Bargalló y Josep Queralt Regué.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por una ayuda de la CAICYT.

Barcelona, Mayo de 1988.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084070

Mi más cariñoso agradecimiento a la Dra. M. Cristina Castellote y al Dr. Josep Queralt, directores de esta Tesis Doctoral, por su constante interés y orientación que ha hecho posible este trabajo.

Asimismo, agradezco al Dr. Antonio Torralba Rodríguez, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Farmacia, la magnífica oportunidad que me ofreció al poder realizar esta Tesis en su Departamento.

Me gustaría agradecer la eficaz colaboración y apoyo de la Dra. Margarida Castell Escuer, Dña. Montserrat Rosich Carreras, Dña. Anna Escofet Pujol, D. J. Carlos Oliva Morera, así como al resto de compañeros del Departamento.

Agradezco a las Unidades de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Farmacia las facilidades que me han brindado para la utilización de sus instalaciones.

También quiero agradecer el interés y las facilidades de trabajo ofrecidas por el Servicio de Espectroscopía de la Universidad de Barcelona, así como a todas aquellas personas que tanto cariño y apoyo me han ofrecido.

INDICE	Página
OBJETO	1
PARTE TEORICA	
1. INTRODUCCION	5
1.1. <u>METABOLISMO DE FARMACOS: INTRODUCCION</u>	26
1.2. <u>FACTORES QUE AFECTAN AL METABOLISMO DE FARMACOS</u>	26
1.2.1. FACTORES INTERNOS	26
1.2.1.1. <u>Diferencias en el metabolismo de fármacos debidas a la especie</u>	28
1.2.1.2. <u>Diferencias debidas a factores genéticos</u>	32
1.2.1.2.1. Interrelación entre los factores genéticos y ambientales.	35
1.2.1.2.2. Mecanismos que regulan las diferencias interespecie e interindividuales del metabolismo de fármacos.	38
1.2.1.3. <u>Modificaciones con la edad del metabolismo de fármacos.</u>	40
1.2.1.3.1. Posible contribución de las células parenquimatosas al metabolismo de fármacos. Efecto de la edad.	46
1.2.1.3.2. Flujo sanguíneo hepático y capacidad	

1.2.1.3.2.	Flujo sanguíneo hepático y capacidad de unión a proteínas. Efecto de la edad.	47
1.2.1.3.3.	Efecto de la edad sobre los enzimas metabolizadores de fármacos y las hemoproteínas.	48
1.2.1.3.4.	Efecto de la edad sobre la biosíntesis o degradación del citocromo P-450.	48
1.2.1.3.5.	Efecto de la edad sobre la NADPH citocromo c reductasa hepática.	50
1.2.1.3.6.	Efecto de la edad sobre la cinética de la NADPH cit. c reductasa.	50
1.2.1.3.7.	Efecto de la edad sobre la membrana microsomal.	51
1.2.1.4.	<u>Diferencias en el metabolismo de fármacos debidas al sexo.</u>	56
1.2.1.5.	<u>Control hormonal del metabolismo de fármacos.</u>	58
1.2.1.5.1.	Efecto de la hipófisis sobre el metabolismo de fármacos.	60
1.2.1.5.2.	Influencia de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de fármacos.	61
1.2.1.5.3.	Influencia del tiroides sobre el metabolismo hepático de fármacos.	62
1.2.1.5.4.	Influencia del páncreas sobre el metabolismo de fármacos.	63

1.2.1.5.5.	Visión integrada del efecto hormonal sobre el metabolismo de fármacos.	64
1.2.1.5.6.	Metabolismo hepático de fármacos y gestación.	64
1.2.1.6.	<u>Efecto de diferentes patologías sobre el metabolismo hepático de fármacos.</u>	66
1.2.1.6.1.	Cirrosis hepática de etiología alcohólica.	67
1.2.1.6.2.	Hepatitis viral.	69
1.2.1.6.3.	Hepatomas.	69
1.2.1.6.4.	Porfirias.	70
1.2.2.	FACTORES EXTERNOS	71
1.2.2.1.	<u>Factores dietéticos.</u>	71
1.2.2.1.1.	Proteínas.	72
1.2.2.1.2.	Lípidos.	73
1.2.2.1.3.	Hidratos de carbono.	74
1.2.2.1.4.	Vitaminas.	75
1.2.2.1.5.	Minerales.	79
1.2.2.2.	<u>Factores ambientales.</u>	82
1.2.2.2.1.	Tabaco y metabolismo de fármacos.	82
1.2.2.2.2.	Contaminantes ambientales y su efecto sobre el metabolismo de fármacos.	83
1.2.2.2.3.	Temperatura ambiental y metabolismo de fármacos.	85

2. MATERIAL Y METODOS	86
2.1. <u>MATERIAL</u>	87
2.1.1. REACTIVOS BIOLOGICOS	87
2.1.2. REACTIVOS BIOQUIMICOS	88
2.1.3. FARMACOS	91
2.1.3.1. <u>Indometacina.</u>	91
2.1.3.2. <u>Dexametasona.</u>	96
2.2. <u>METODOS</u>	100
2.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE AISLAMIENTO MICROSOMAL.	100
2.2.1.1. <u>Aislamiento por ultracentrifugación.</u>	100
2.2.1.2. <u>Aislamiento por precipitación con cloruro cálcico.</u>	102
2.2.1.2.1. Determinación de proteínas en la fracción microsomal.	102
2.2.1.2.2. Valoración de la actividad aminopirina N-demetilasa (AND).	104
2.2.1.2.3. Valoración de la actividad anilina p-hidroxilasa.	109
2.2.1.3. <u>Efecto del calcio sobre las actividades del citocromo P-450.</u>	110

2.2.2.	EVALUACION DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CONSERVACION DEL HIGADO O LA FRACCION MICROSOMAL SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL CITOCROMO P- 450.	112
2.2.3.	INDUCCION DE LA ARTRITIS ADYUVANTE. ESTUDIO DE LAS CINETICAS ENZIMATICAS DE LAS ACTIVIDADES AND Y APH EN RATAS CONTROL Y ARTRITICAS.	113
2.2.4.	ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE CITOCROMO P-450 Y SUS ACTIVIDADES AND Y APH EN RATAS POR EFECTO DE LAS MODIFICACIONES EN LA INGESTA DURANTE EL DESARROLLO DE LA ARTRITIS.	114
2.2.4.1.	<u>Determinación de grupos SH séricos.</u>	115
2.2.4.2.	<u>Valoración de los niveles de cit. P-450.</u>	119
2.2.5.	ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS Y DE LA RESTRICCION DIETETICA SOBRE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS SERICOS MARCADORES DE HEPATOTOXICIDAD.	120
2.2.6.	DETERMINACION DE LOS NIVELES HEPATICOS DE GLUTATION EN ANIMALES SANOS, ARTRITICOS Y CON DIETA RESTRINGIDA.	121
2.2.7.	LIPIDOPEROXIDACION HEPATICA.	126
2.2.7.1.	<u>Puesta a punto de la valoración de la lipíperoxidación hepática.</u>	126

2.2.8.	VALORACION DE LOS NIVELES DE COBRE Y ZINC EN HIGADO. CORELACION CON LOS NIVELES SERICOS DE COBRE Y ZINC.	135
2.2.8.1.	<u>Método para la valoración de cobre y zinc en hígado.</u>	135
2.2.8.2.	<u>Método para la valoración de cobre y zinc en suero.</u>	142
2.2.9.	EFECTO IN VITRO DEL COBRE Y ZINC SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS AND Y APH.	147
2.2.10.	TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS ADYUVANTE CON ANTIINFLAMATORIOS.	147
2.2.10.1.	<u>Tratamiento curativo con indometacina.</u>	148
2.2.10.2.	<u>Tratamiento curativo con dexametasona.</u>	154
2.2.11.	EFECTO DEL <u>M. BUTYRICUM</u> SOBRE EL METABOLISMO MICROSOMAL HEPATICO EN EL RATON. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROFILACTICO Y CURATIVO CON INDOMETACINA Y DEXAMETASONA.	155
2.2.12.	CRITERIOS ESTADISTICOS APLICADOS.	159
2.2.12.1.	<u>Indices del grado de dispersión.</u>	159
2.2.12.2.	<u>Correlación y regresión.</u>	159
2.2.12.3.	<u>Pruebas de comparación entre dos grupos.</u>	160
2.2.12.4.	<u>Cálculo estadístico.</u>	161

3. RESULTADOS

163

- 3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE AISLAMIENTO MICROSOMAL. METODO DE ULTRACENTRIFUGACION Y DE PRECIPITACION CON CALCIO. 163
- 3.2. EFFECTO DEL CLORURO CALCICO "IN VITRO" SOBRE LAS ACTIVIDADES AND Y APH. 165
- 3.3. VALORACION DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL CITOCROMO P-450. 167
- 3.4. ESTUDIO DE LAS CINETICAS ENZIMATICAS DE LAS ACTIVIDADES AND Y APH DE RATAS CONTROL Y ARTRITICAS. 169
- 3.5. ANALISIS DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS SOBRE LOS NIVELES DE CITOCROMO P-450 Y ACTIVIDADES AND Y APH EN ANIMALES SANOS, ARTRITICOS Y SANOS CON INGESTA RESTRINGIDA. 172
- 3.6. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS Y DE LA RESTRICCION EN LA INGESTA DURANTE ESTE MODELO EXPERIMENTAL, SOBRE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS SERICOS MARCADORES DE HEPATOTOXICIDAD. 177

3.7.	<u>DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION Y LA LIPIDOPEROXIDACION HEPATICA EN RATAS ARTRITICAS Y SANAS CON INGESTA CONTROLADA.</u>	177
3.8.	<u>VALORACION DE LOS NIVELES DE COBRE Y ZINC EN HIGADO. RELACION CON LOS NIVELES SERICOS DE COBRE Y ZINC EN RATAS CONTROL Y ARTRITICAS.</u>	187
3.9.	<u>EFECTO "IN VITRO" DEL COBRE Y ZINC SOBRE LAS ACTIVIDADES AND Y APH.</u>	188
3.10.	<u>TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS ADJUVANTE. EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE FARMACOS.</u>	198
3.10.1.	TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS ADJUVANTE CON INDOMETACINA.	198
3.10.2.	TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS CON DEXAMETASONA.	204
3.11.	<u>EFECTO DEL M. butyricum SOBRE EL METABOLISMO MICROSOMAL HEPATICO DE RATON. EFECTO DE LA ADMINISTRACION PROFILACTICA Y TERAPEUTICA CON INDOMETACINA Y DEXAMETASONA.</u>	207
4.	DISCUSION.	214
5.	CONCLUSIONES.	236
6.	BIBLIOGRAFIA.	240

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.1.	Esquema básico del papel del citocromo P-450.	8
Figura 1.2.	Principales vías de eliminación de sustancias extrañas al organismo.	10
Figura 1.3.	Principales rutas de metabolización de fármacos de fase I.	12
Figura 1.4.	Rutas de metabolización de fase II.	13
Figura 1.5.	Esquema de obtención de la fracción microsomal por el método de ultracentrifugación.	16
Figura 1.6.	Cadenas de transporte de electrones del sistema de la monooxigenasa.	18
Figura 1.7.	Esquema del citocromo b_5 .	19
Figura 1.8.	Acción del citocromo P-450 sobre los fármacos.	20
Figura 1.9.	Cadena de transporte de electrones hacia el citocromo P-450.	22
Figura 1.10.	Metabolismo de fase III.	23
Figura 1.11.	Tipos de unión de los sustratos al citocromo P-450.	24
Figura 1.12.	Modificaciones del espectro del citocromo P-450 al unirse a sustratos tipo I y II.	25
Figura 1.13.	Inducción del citocromo P-450 por hidrocarburos aromáticos policíclicos.	27
Figura 1.14.	Metabolismo del etilbiscumacetato.	28
Figura 1.15.	Metabolismo de la anfetamina.	29
Figura 1.16.	Esquema representativo de la relación entre los factores genéticos y ambientales que inciden sobre el metabolismo de fármacos.	36
Figura 1.17.	Factores que influyen el control genético del metabolismo de fármacos.	37

Figura 1.18.	Acción de diferentes isoenzimas del citocromo P-450 sobre los fármacos.	39
Figura 1.19.	Rutas de biosíntesis y degradación del citocromo P-450.	49
Figura 1.20.	Diferenciación sexual del metabolismo de fármacos.	59
Figura 1.21.	Efecto del sistema endocrino sobre el metabolismo de fármacos.	65
Figura 2.1.	Estructura química de la indometacina.	92
Figura 2.2.	Efecto de la indometacina sobre los mediadores de la inflamación.	94
Figura 2.3.	Estructura química de la dexametasona.	97
Figura 2.4.	Efecto de la dexametasona sobre los mediadores de la inflamación.	99
Figura 2.5.	Métodos de aislamiento microsomal.	101
Figura 2.6.	Curva estándar para la valoración de proteínas microsomales.	105
Figura 2.7.	Fundamento de la valoración de la actividad AND.	106
Figura 2.8.	Curva de calibración estándar de la actividad AND.	108
Figura 2.9.	Fundamento de la valoración de la actividad APH.	106
Figura 2.10.	Curva de calibración estándar externa e interna de la actividad APH.	111
Figura 2.11.	Fundamento de la valoración de los niveles de grupos SH séricos.	116
Figura 2.12.	Curva de calibración media para la valoración de los grupos SH séricos.	118
Figura 2.13.	Pauta experimental usada para valorar parámetros bioquímicos durante la artritis.	122
Figura 2.14.	Pauta experimental utilizada para la valoración de la lipidoperoxidación y el glutatión hepático en ratas con artritis adyuvante.	123

Figura 2.15.	Curva estándar media usada en la valoración del glutatión hepático.	125
Figura 2.16.	Método de valoración de la lipidoperoxidación.	127
Figura 2.17.	Valoración de la lipidoperoxidación usando diferentes cofactores.	130
Figura 2.18.	Efecto del tiempo de incubación con los cofactores sobre la lipidoperoxidación.	131
Figura 2.19.	Efecto del pH de la solución de TBA en la valoración de la lipidoperoxidación.	132
Figura 2.20.	Efecto del tiempo de incubación del TBA con MDA.	134
Figura 2.21.	Pauta experimental para la valoración del cobre y zinc en suero e hígado en animales control y artríticos.	136
Figura 2.22.	Curva estándar media para la valoración de cobre en hígado.	141
Figura 2.23.	Curva estándar media para la valoración de zinc en hígado.	141
Figura 2.24.	Curva estándar media para la valoración de cobre en suero.	145
Figura 2.25.	Curva estándar media para la valoración de zinc en suero.	145
Figura 2.26.	Pauta experimental para la valoración del efecto del tratamiento con indometacina sobre la artritis adyuvante.	151
Figura 2.27.	Pauta experimental para la valoración del efecto del tratamiento con dexametasona sobre la artritis adyuvante.	157
Figura 2.28.	Pauta experimental para valorar el efecto de la administración de <u>M. butyricum</u> sobre el metabolismo de fármacos en ratón.	158
Figura 3.1.	Efecto "in vitro" del CaCl_2 sobre las actividades AND y APH.	166
Figura 3.2.	Representación de Lineweaver-Burk de la actividad AND en ratas control y artríticas.	170

Figura 3.3.	Representación de Lineweaver-Burk de la actividad APH en ratas control y artríticas.	171
Figura 3.4.	Peso corporal y consumo de comida en ratas control, artríticas y control con ingesta controlada.	175
Figura 3.4b.	Análisis del proteinograma de ratas control, control ingesta y artríticas.	180
Figura 3.5.	Curva ponderal y consumo de comida.	181
Figura 3.6.	Niveles de glutation hepático en ratas artríticas y control con ingesta controlada.	183
Figura 3.7.	Lipidoperoxidación hepática en ratas artríticas y control con ingesta controlada.	184
Figura 3.8.	Evolución de la inflamación en las extremidades de ratas control y artríticas.	189
Figura 3.9.	Cobre sérico en ratas control y artríticas	190
Figura 3.10.	Zinc sérico en ratas control y artríticas.	191
Figura 3.11.	Niveles de cobre y zinc en sangre de ratas control y artríticas.	192
Figura 3.12.	Evolución de cobre hepático en ratas control y artríticas.	193
Figura 3.13.	Evolución del zinc hepático en ratas control y artríticas.	194
Figura 3.14.	Efecto "in vitro" del cobre y zinc sobre la actividad AND.	195
Figura 3.15.	Efecto "in vitro" del cobre y zinc sobre la actividad APH.	196
Figura 3.16.	Efecto del tratamiento con indometacina sobre la inflamación.	199
Figura 3.17.	Efecto de la dexametasona sobre la inflamación.	205
Figura 3.18.	Efecto de la dexametasona sobre los niveles de grupos SH séricos.	208

Figura 3.19.	Modificaciones del metabolismo de fármacos tras la administración s.c. o i.p. de <u>M. butyricum</u> .	209
Figura 3.20.	Efecto de la administración profiláctica y terapéutica con indometacina y dexametasona sobre el metabolismo de fármacos, valorado "in vivo", en ratones a los que se administró <u>M. Butyricum</u> .	211
Figura 3.21.	Efecto de la administración profiláctica y terapéutica con indometacina y dexametasona sobre el metabolismo de fármacos valorado "in vitro", en ratones a los que se administró <u>M. butyricum</u> .	212

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.1.	Diferencias entre el REL y RER.	15
Tabla 1.2.	Polimorfismo genético en las reacciones de acetilación.	32
Tabla 1.3.	Polimorfismo genético en el metabolismo de la debrisoquina.	34
Tabla 1.4.	Fármacos con glucuronoconjugación disminuida.	40
Tabla 1.5.	Alteraciones del metabolismo de fármacos por la edad en ratón.	42
Tabla 1.6.	Alteraciones del metabolismo de fármacos por la edad en la rata.	43
Tabla 1.7.	Modificaciones del metabolismo de tipo II por efecto de la edad.	44
Tabla 1.8.	Cambios en el cociente entre el peso del hígado/peso corporal con la edad.	45
Tabla 1.9.	Efecto de la edad sobre los enzimas que forman parte del sistema hepático metabolizador de fármacos.	53
Tabla 1.10.	Cambios en el contenido de fosfolípidos y colesterol microsomal con la edad en la rata y el ratón.	54
Tabla 1.11.	Cambios en la composición en ácidos grasos en microsomas hepáticos con la edad en rata y ratón.	55
Tabla 2.1.	Condiciones utilizadas para la determinación de cobre y zinc por absorción atómica (AAS).	146
Tabla 2.2.	Condiciones utilizadas para la determinación de cobre i zinc por plasma acoplado por inducción (ICP).	146
Tabla 3.1.	Efecto del método de aislamiento microsomal sobre las actividades AND y APH.	164
Tabla 3.2.	Efecto de las condiciones de almacenamiento de las de las muestras sobre las actividades AND y APH.	168

Tabla 3.3.	Incremento del volumen de las extremidades ipsilateral, contralateral y grupos SH séricos en ratas control, artríticas y control ingesta.	173
Tabla 3.4.	Efecto de la artritis adyuvante y de la restricción en la ingesta sobre las actividades enzimáticas metabolizadoras de fármacos.	176
Tabla 3.5.	Cambios bioquímicos séricos durante la artritis (I).	178
Tabla 3.6.	Cambios bioquímicos séricos durante la artritis (II).	179
Tabla 3.7.	Peso de hígado y niveles de glutatión y lipidoperoxidación hepática en ratas control, artríticas y con ingesta controlada.	185
Tabla 3.8.	Efecto de la artritis adyuvante sobre la actividad de los enzimas microsomales hepáticos metabolizadores de fármacos.	186
Tabla 3.9.	Efecto "in vitro" del cobre y zinc sobre las actividades AND y APH.	197
Tabla 3.10.	Efecto del tratamiento con indometacina sobre las proteínas plasmáticas.	200
Tabla 3.11.	Efecto de la indometacina sobre el metabolismo de fármacos en la artritis adyuvante.	201
Tabla 3.12.	Actividad APH durante la fase primaria de la artritis adyuvante.	203
Tabla 3.13.	Efecto de la dexametasona sobre el metabolismo de fármacos en la artritis adyuvante.	206

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín 5'-difosfato.
AHH	Aril hidrocarbano hidroxilasa.
Ala sintetasa	Alanino amino sintetasa.
ALP	Fosfatasa alcalina.
ALT	Alanina amino transferasa.
AMP	Adenosín 5'-monofosfato.
AND	Aminopirina N-demetilasa.
APH	Anilina p-hidroxilasa.
AST	Aspartato amino transferasa.
Cit.P-450	Citocromo P-450.
CMC	Carboximetilcelulosa.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
DTNB	Acido 5,5'ditio-bis-(2-nitrobenzoico).
Dxt	Dexametasona.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
FAD	Flavín adenín dinucleótido.
FMN	Flavín mononucleótido.
GSH	Glutation.
γGT	Gama-glutamyltransferasa.
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanosulfónico.
HETE	Acido hidroxieicosatetranoico.
IL1	Interleukina 1.
Ind	Indometacina.
LP	Lipidoperoxidación.

LTs	Leucotrienos.
3-MC	3-Metilcolantreno.
MDA	Malondialdehido.
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido 3'-fosfato.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido 3'-fosfato reducida.
PCB	Bifenilos policlorados.
PGs	Prostaglandinas.
PMN	Polimorfonucleares.
PUFA	Acidos grasos poliinsaturados.
REL	Retículo endoplasmático liso.
RNA	Acido ribonucleico.
RER	Retículo endoplasmático rugoso.
TBA	Acido 2-tiobarbitúrico.
TCA	Acido tricloroacético.
TNB	Acido 5-tio-2-nitrobenzoico.
UDP	Uridina difosfato.

OBJETIVO

11/03/20

OBJETO

El hígado es el principal responsable de las biotransformaciones que sufren los fármacos antes de poder eliminarse por la orina o por la bilis. Por este motivo de su buen funcionamiento depende el comportamiento de los fármacos en el organismo.

El metabolismo oxidativo de muchos fármacos y sustancias endógenas es mediado por enzimas localizados en la fracción microsomal hepática, concretamente por el sistema enzimático del cit-P450.

En determinados estados patológicos con lesión hepatocelular directa como en la hepatitis o la cirrosis hepática, el metabolismo de fármacos se altera por lo que la vida media de numerosos fármacos se halla incrementada, con el consiguiente riesgo de toxicidad que ello supone.

Se ha observado que en pacientes con artritis reumatoide la vida media de determinados fármacos se halla aumentada. A nivel de hipótesis puede pensarse que como consecuencia de la artritis se produce una depresión de la capacidad hepática metabolizadora de fármacos, lo cual no se ha podido estudiar en muestras procedentes de biopsias hepáticas de pacientes artríticos por razones éticas obvias.

La artritis experimental inducida por M. butyricum en rata tiene muchas similitudes desde el punto de vista clínico,

bioquímico e inmunológico con la artritis reumatoide humana. En este modelo se pretende estudiar, en primer, lugar la relación entre las alteraciones clínicas, los cambios bioquímicos séricos y las actividades enzimáticas microsomales ligadas al citocromo P-450.

Una vez estudiado y definido el grado de lesión hepática que se produce en la artritis experimental, se pretenden analizar los posibles mecanismos patológicos implicados.

Así, se ha descrito que la malnutrición puede ser responsable de la inhibición del metabolismo de fármacos. Se ha observado que en la artritis hay anorexia, por este motivo, analizaremos como influye ésta en las actividades del sistema microsomal.

Durante la fase aguda del proceso inflamatorio se produce un aumento en la síntesis de las denominadas "proteínas de fase aguda"; se admite que estas sustancias tienden a contrarrestar los efectos de la inflamación. Algunas de ellas transportan cobre y zinc, metales con actividad antiinflamatoria clínicamente reconocida. Por ello, también se estudiarán los cambios hepáticos y séricos de estos cationes durante el proceso artrítico y su influencia sobre la actividad del cit-P450.

Por otra parte, diversos autores han comprobado que durante el periodo inflamatorio se producen radicales oxidantes muy reactivos, los cuales activan la lipidoperoxidación. Para valorar su influencia sobre la patología hepática se determinarán

los niveles de glutatión y la lipidoperoxidación hepática durante el proceso artrítico.

Por último, se intentará establecer si existe paralelismo entre los cambios patológicos a nivel articular y a nivel de cit-P450. Para ello se estudiará, en primer lugar, la cronología de su aparición y en segundo lugar, la capacidad de determinados compuestos antiinflamatorios, para reducir la inflamación articular y para revertir el posible daño microsomal hepático que se evidencia durante la artritis.

1. INTRODUCCION

1.1.- METABOLISMO DE FARMACOS: INTRODUCCION.

La actividad terapéutica de los fármacos se halla en función de los factores que regulan su concentración en el compartimiento en que se encuentran los puntos de acción, es decir, la biofase. La concentración de un fármaco en la biofase viene determinada, fundamentalmente, por la relación entre la absorción, la distribución y la eliminación.

La velocidad con que la mayoría de los fármacos son eliminados del organismo depende de la velocidad con la cual son metabolizados y excretados. El metabolismo puede convertir un compuesto sin actividad, llamado "profármaco", en un metabolito activo, aunque en la mayoría de los casos, los fármacos son transformados en sustancias menos activas o inactivas. Esta reducción en la actividad puede deberse a la pérdida de su actividad intrínseca para estimular al receptor, o bien, a la disminución de su liposolubilidad, con la consiguiente reducción de su capacidad para atravesar las membranas biológicas y alcanzar la biofase correspondiente.

Una característica general del metabolismo de fármacos en los vertebrados es su conversión a sustancias más polares. En consecuencia, la distribución de éstas sustancias se limitará más al líquido extracelular que sus precursores. Así, las sustancias extrañas al organismo se ponen a disposición de los mecanismos de excreción. Por otro lado, el incremento de la hidrofilia puede producir una disminución de la proporción y afinidad con que los fármacos se fijan a las proteínas, a otros constituyentes orgánicos, o bien, modificar su almacenamiento en

el tejido adiposo.

Generalmente, el metabolismo de fármacos reduce su carácter liposoluble, produciendo una menor reabsorción tubular y por consiguiente, se ve favorecida la excreción urinaria. Los fármacos hidrosolubles son eliminados normalmente, sin sufrir cambios, por vía renal y tienen un período de permanencia corto en el organismo.

El metabolismo de los fármacos no equivale exactamente a una detoxificación en todos los casos. Algunos compuestos son transformados en sustancias sin actividad farmacológica pero con actividad tóxica. En la figura 1.1 se observa un esquema básico del papel del sistema metabolizador del citocromo P-450 en la transformación de los fármacos.

Las biotransformaciones de los compuestos extraños al organismo se lleva a cabo fundamentalmente en el hígado, aunque la mayor parte de los tejidos del organismo tienen actividad metabólica. Las enzimas responsables se hallan presentes en gran variedad de especies, como por ejemplo, en el hígado de peces, anfibios, reptiles y aves (Garfinfel, 1963 y Strittmater y Umberger, 1969). También se han hallado en numerosas plantas (Murphy y West, 1969), así como, en levaduras, hongos y bacterias (Berg y col., 1976). En los insectos, desempeñan un papel destacado en el metabolismo de insecticidas y plagicidas. En los mamíferos, se han encontrado en las células de la mucosa intestinal (Takesue y Sato, 1968), pulmón (Estabrook, 1963), piel (Poland y col., 1974), testículos (Betz y col., 1976), placenta (Meigs y col., 1968), y sistema nervioso (Cohn y col., 1977). En

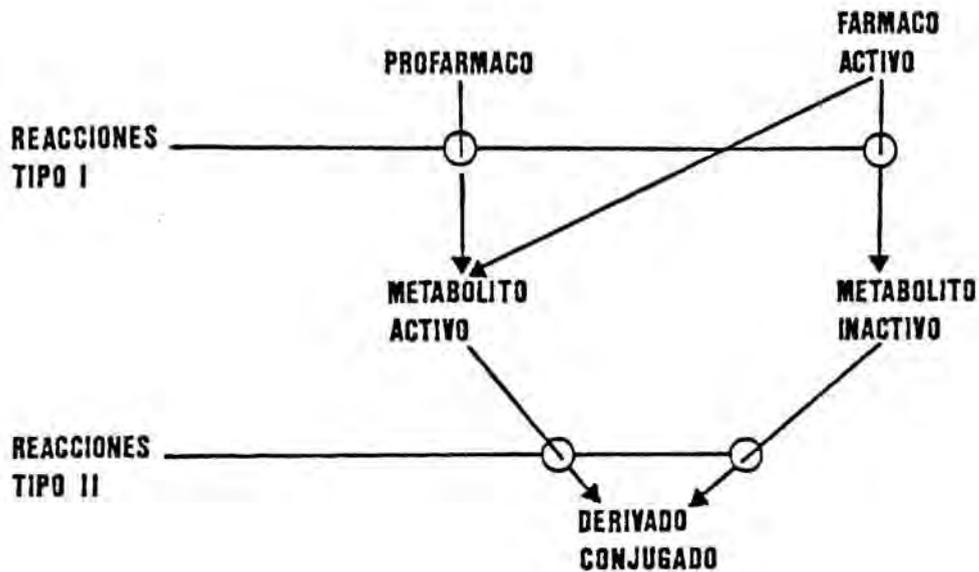


Figura 1.1. Esquema básico del papel del sistema hepático metabolizador de fármacos del citocromo P-450.

las glándulas suprarrenales e hígado es donde se hallan en mayor proporción (Ellin y col., 1972). En la figura 1.2 se observan las principales vías metabólicas de los fármacos, de vital importancia, puesto que proporcionan al organismo los medios necesarios para su eliminación. Estas vías, en ocasiones, constituyen rutas metabólicas de detoxificación para otros agentes extraños que penetran en el organismo.

En el hígado, al igual que en otros tejidos, existen una serie de sistemas enzimáticos, encargados de regular el metabolismo general de la célula. En su origen, estos sistemas se hallaban dirigidos a metabolizar sustancias endógenas, como esteroides, bilirrubina y ácidos grasos, sin embargo, en ocasiones, su capacidad enzimática se destina al metabolismo de sustancias extrañas, entre las que se incluyen los fármacos, Ullrich y Kremers (1977) han conferido un carácter evolutivo a este cambio de sustratos. Así, estos sistemas enzimáticos hepáticos se hallan, aparentemente, menos desarrollados en vertebrados inferiores como peces y pueden haber evolucionado en los vertebrados terrestres, frente a las necesidades de eliminar del organismo toxinas y sustancias extrañas (xenobiontes).

Entre las funciones fisiológicas del sistema enzimático microsomal hepático podemos destacar: diversas etapas en la conversión del colesterol a ácidos biliares (Haugen, 1976 y Hansson y Wilvall, 1979); metabolismo de hormonas esteroideas como la testosterona (Hansson y Wilvall, 1982 y Waxman y col., 1982); hidroxilación de las prostaglandinas (Vatsis y col., 1982) y recientemente, se ha encontrado que la prostaciclín-sintetasa y la tromboxano-sintetasa de las plaquetas forman parte

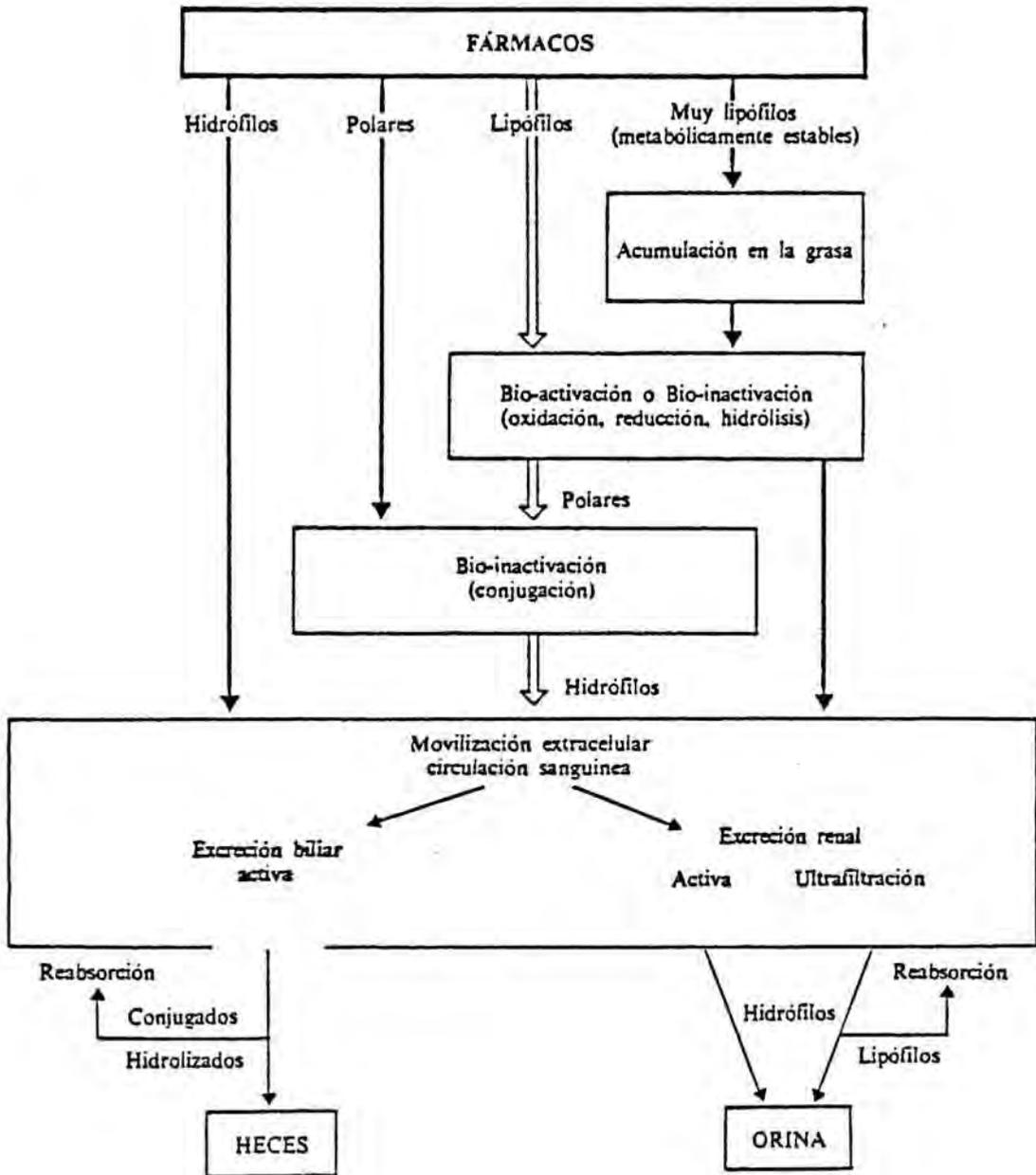


Figura 1.2. Principales vías de eliminación de las sustancias extrañas al organismo.

del sistema metabolizador microsomal de fármacos (Ullrich y Haurand, 1982 y Graf y col., 1983). En el tejido renal este sistema participa en la transformación del calciferol a su forma activa fisiológica, la vitamina D₃ (Bhattacharya y De Luca, 1974). Por otro lado, el sistema microsomal tiene un papel importante en el metabolismo de sustancias carcinogénicas (Gelboin, 1980 y Wattenberg, 1982). Su análogo en el reino vegetal interviene en la síntesis de giberrelinas (Murphy y West, 1969), en la formación de ligninas, taninos y flavonoides en el sorgo (Potts y col., 1974) y en la síntesis de alcaloides y la hidroxilación del geraniol en el género Roseu.

A pesar de las múltiples funciones fisiológicas del sistema microsomal hepático y extrahepático, la capacidad metabolizadora de xenobiotas en el hígado es una de sus funciones más importantes y se ejerce a través de dos tipos de reacciones: reacciones de tipo I en las que se produce un cambio en la molécula del fármaco (oxidación, reducción) (Figura 1.3) y reacciones de tipo II, que implican la formación de un conjugado con el xenobiotas transformado previamente por las reacciones de tipo I. En la figura 1.4 se muestra un esquema de ambos tipos de reacciones.

A las reacciones del tipo I constituidas, principalmente, por oxidaciones, las podemos dividir, a su vez, en catalizadas por el sistema enzimático microsomal y en oxidaciones no microsomales. Así, cuando el tejido hepático es homogeneizado, centrifugado a 10.000 g durante 15 min y el sobrenadante es centrifugado de nuevo durante 60 min a 105.000 g,



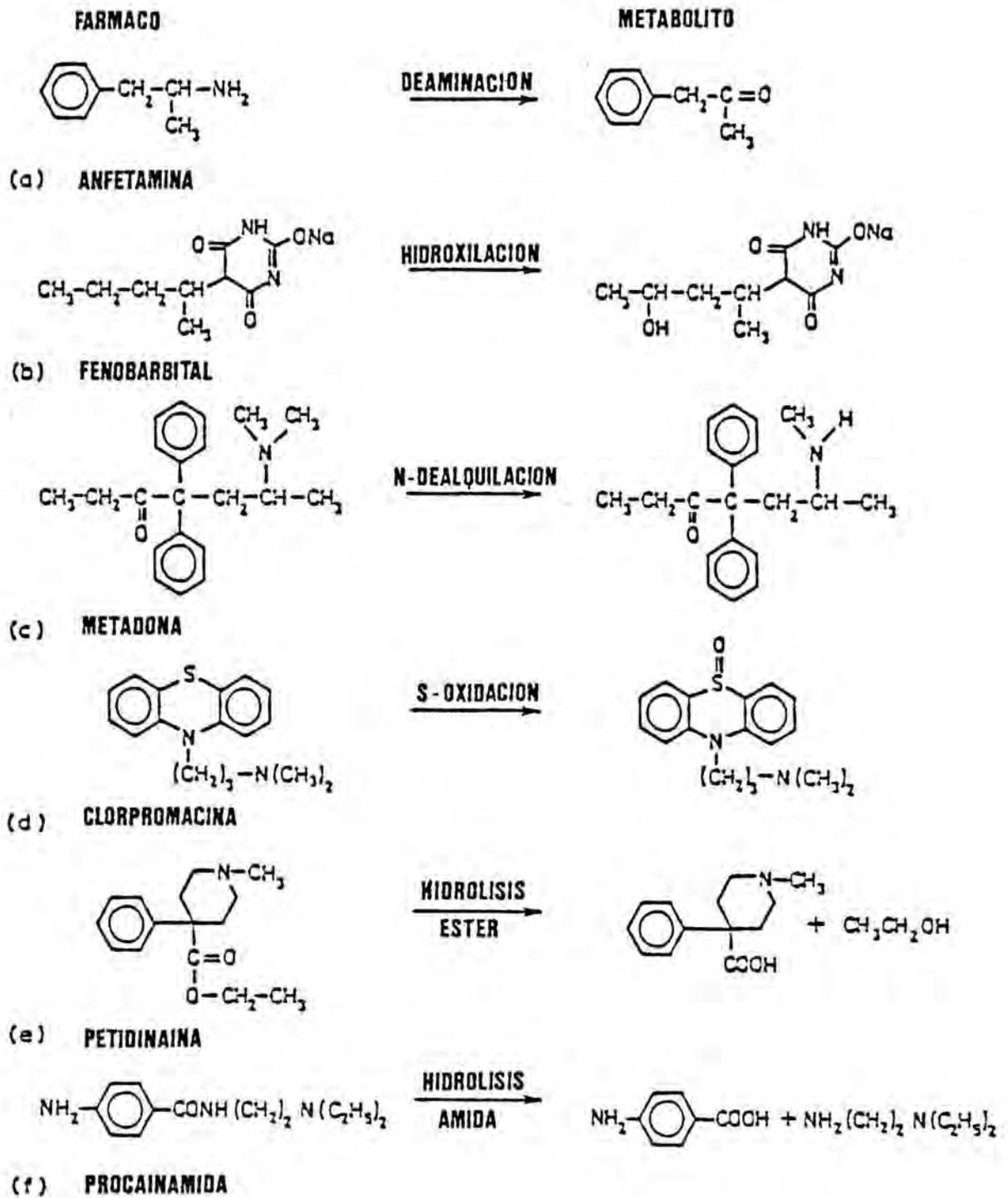


Figura 1.3. Principales rutas de metabolización de fase I.

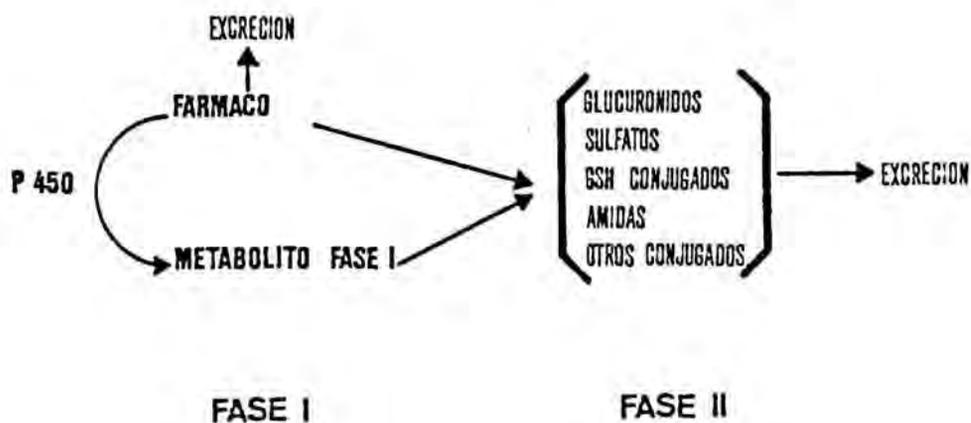


Figura 1.4. Esquema representativo de las reacciones de metabolización de fase II.

se obtiene un sedimento que constituye la fracción microsomal y en la cual se encuentran la mayoría de las enzimas metabolizadoras de fármacos (Fig. 1.5.).

Los microsomas son vesículas formadas por fragmentos del retículo endoplasmático roto durante la homogeneización. Este retículo se halla formado por una trama de túbulos de lipoproteínas, unidos tanto a la membrana nuclear como a la celular y que se encuentran por todo el citoplasma en dos formas, el retículo liso (REL) y el rugoso (RER), el último de los cuales contiene los ribosomas.

Las enzimas metabolizadoras de fármacos están asociadas, principalmente, al retículo endoplasmático liso, Así, a excepción de la glucuroniltransferasa, implicada en la formación de glucurónido, el resto de los enzimas se hallan firmemente sujetas a la estructura reticular.

La asociación con el entramado de lipoproteínas puede ser el factor que confiere al sistema microsomal hepático, su especificidad para los compuestos extraños, ya que éstos, frecuentemente son más liposolubles que los metabolitos endógenos. Así, por ejemplo, mientras que la anfetamina es desaminada por el sistema microsomal hepático, la tiramina, sustancia más hidrosoluble, no es sustrato para el sistema microsomal.

En la tabla 1.1, se indican las características diferenciales entre el REL y el RER.

Tabla 1.1. Comparación entre el retículo endoplasmático rugoso y liso.

RER	REL
Posee ribosomas.	No presenta ribosomas.
Hay síntesis de proteínas.	No hay síntesis de proteínas.
No presenta actividad glucosiltransferasa apreciable.	Presenta actividad glucosiltransferasa. Síntesis de glucoproteínas.
Síntesis sistema del cit.P-450.	Presencia cit.P-450 activo.

La actividad metabolizadora de fármacos se localiza en los microsomas del retículo endoplasmático liso. Así de la misma forma que el hígado es el órgano detoxificador del organismo, los microsomas del REL son los orgánulos detoxificadores a nivel celular.

La certeza en la localización mayoritaria del sistema microsomal metabolizador de fármacos en los microsomas de los hepatocitos es relativamente reciente. Fue Holtzman, en 1972 quien lo demostró por primera vez aunque, simultáneamente otros autores, como Cantrell y Dresnick, (1972) señalaban la posibilidad de que las células estromales, células del tejido conjuntivo, también tuvieran actividad enzimática metabolizadora de fármacos. Los trabajos de Sato y Kato (1982) y de Ishizuki y col. (1983), con aminopirina marcada, demuestran, de modo concluyente, que son los microsomas del retículo endoplasmático localizado en las células parenquimales (hepatocitos), los que poseen la capacidad de metabolizar fármacos y sólo, raramente,

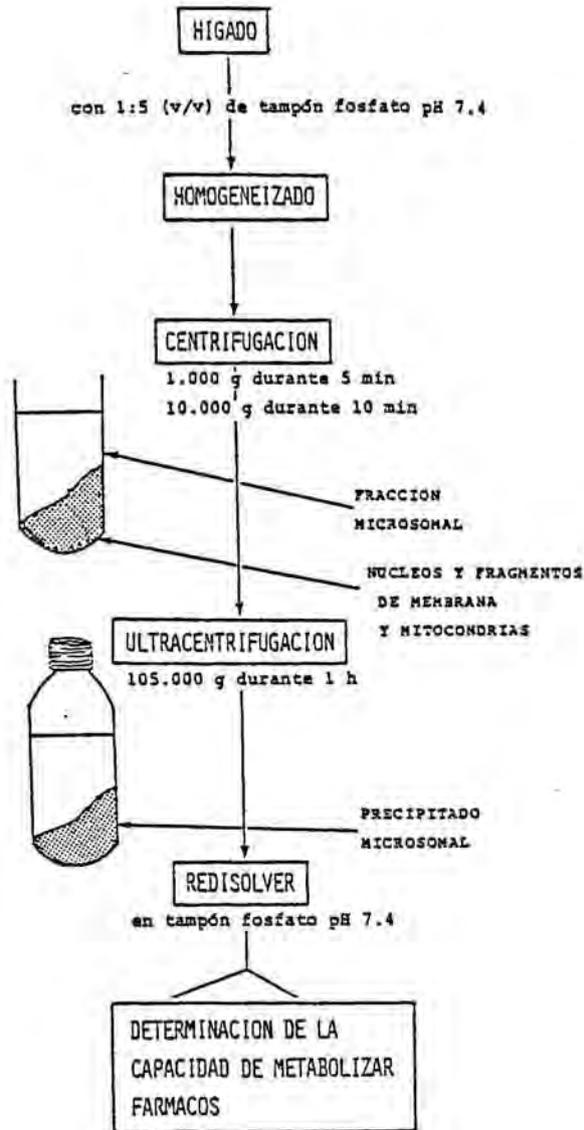


Figura 1.5. Esquema del método de obtención de la fracción microsomal por ultracentrifugación.

las células no parenquimales exhiben una actividad débil.

El sistema enzimático del citocromo P-450 es dependiente de NADPH y oxígeno molecular, por lo que se conoce como oxidasa de función mixta. El sistema está compuesto de dos proteínas: una proteína llamada citocromo P-450 y una flavoproteína, la NADPH citocromo P-450 reductasa. El citocromo P-450 es el lugar de unión del sistema enzimático al sustrato y al oxígeno, mientras que la reductasa actúa como transportador de oxígeno, transfiriendo electrones desde el NADPH al complejo formado por la unión del sustrato y el cit.P-450. Cuando se pudo solubilizar mediante detergentes el sistema enzimático microsomal hepático se separaron cromatográficamente tres componentes que se identificaron como cit.P-450, NADPH cit.-450 reductasa y fosfolípidos (Fig. 1.6). Otra hemoproteína, el citocromo b_5 , se encuentra en los microsomas hepáticos y parece ser que participa en la biotransformación de fármacos y sustratos endógenos. Su función es la de hacer llegar electrones al cit.P-450 desde el NADPH, participando una molécula de FAD por molécula de proteína (Fig. 1.7)

El cit.P-450 debe su nombre al hecho de que su forma reducida se une al monóxido de carbono, formando un complejo con una absorbancia máxima a 450 nm. Las reacciones de oxidación dependientes del cit.P-450 se han denominado oxidaciones de función mixta, porque la forma reducida de la hemoproteína cataliza la utilización de una molécula de oxígeno, apareciendo un átomo de oxígeno en la forma oxidada del sustrato y el otro átomo de oxígeno se reduce formándose agua (ver figura 1.8). Inicialmente se forma un complejo con la unión del sustrato y la

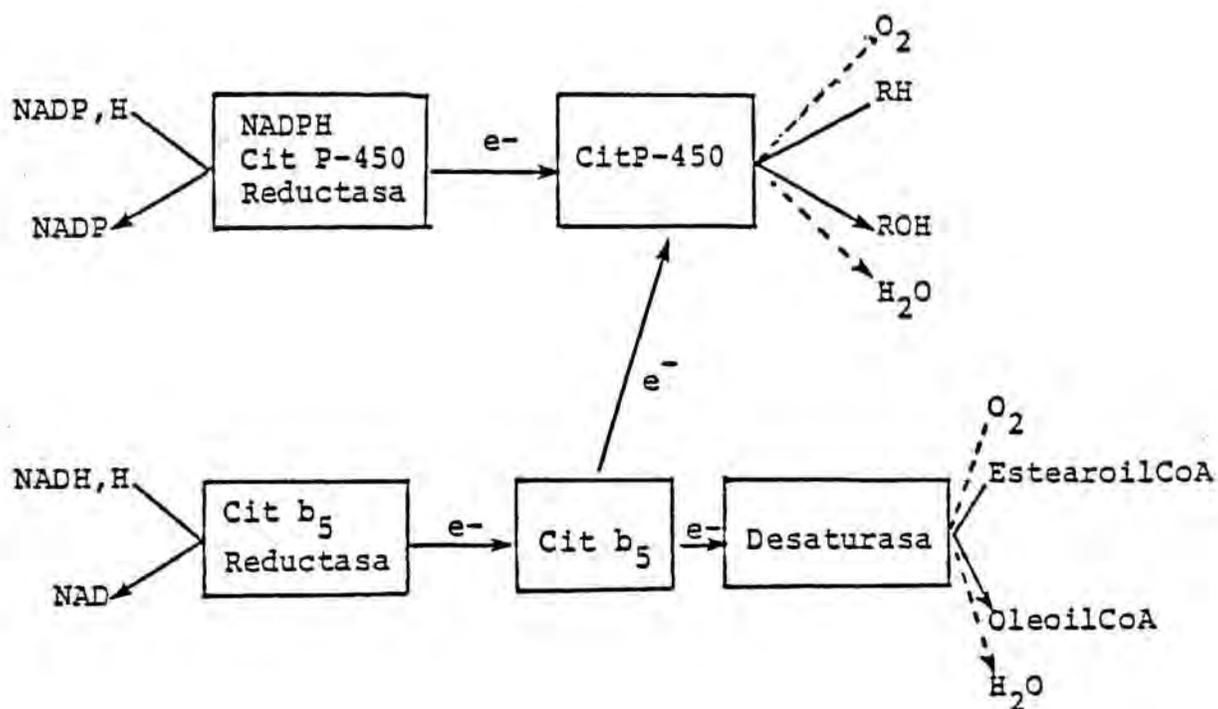


Figura 1.6. Esquema representativo de las dos cadenas de transporte de electrones y las proteínas que conforman el sistema metabolizador de fármacos del citocromo P-450.

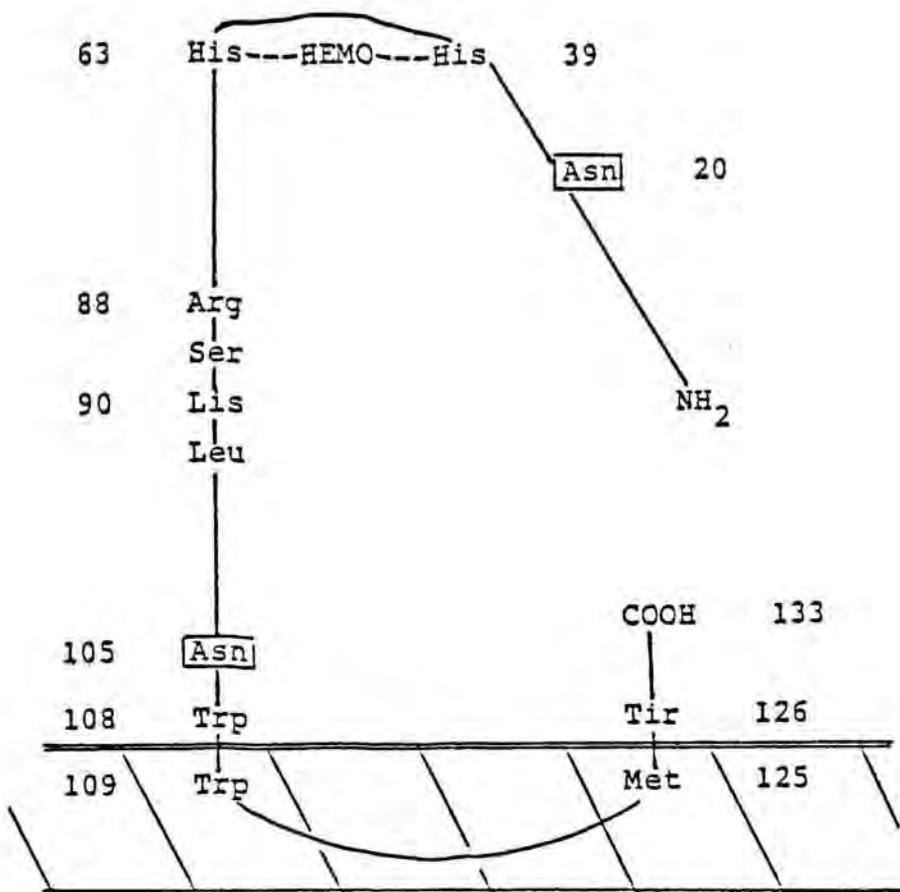


Figura 1.7. Relación molecular entre el citocromo b_5 y la membrana del retículo endoplasmático (extraído de Tajima y col., 1978).

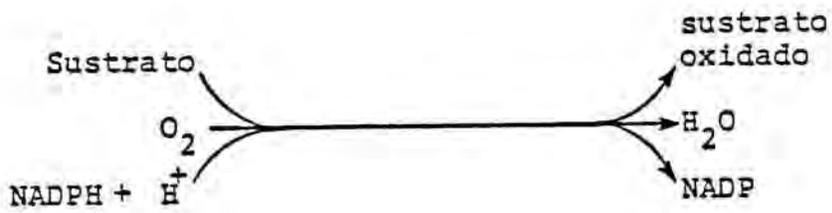


Figura 1.8. Esquema que resume la acción del citocromo P-450 sobre los fármacos.

forma férrica de la hemoproteína. El complejo toma un electrón, a través de la cadena de transporte dependiente de NADPH, formándose el complejo sustrato-hemoproteína (forma ferrosa). El complejo interacciona con el oxígeno molecular para formar un intermedio oxigenado. Seguidamente, este intermedio toma un segundo electrón y un átomo de oxígeno se reduce a agua, mientras que el otro átomo se une al sustrato (figura 1.9).

El metabolismo de fármacos se clasifica en: metabolismo de fase I (cuando se modifica la molécula de sustrato) y de fase II (reacciones de conjugación). Recientemente se ha postulado la existencia del metabolismo de fase III que se refiere al metabolismo de conjugación por la flora intestinal y su subsecuente reabsorción y metabolismo (Rafter y col., 1983) (Fig. 1.10).

El lugar de unión al cit.P-450, de los denominados sustratos tipo I, está localizado en la porción hidrofóbica de la apoproteína. Los llamados sustratos tipo II, se unen al hierro del cit.P-450 y forman un ligando muy fuerte que mantiene al hierro en su estado de "bajo espín" y también hay sustratos que se pueden unir, indistintamente, por ambos lugares (figura 1.11). Los sustratos de tipo I y II se caracterizan por las propiedades espectrales que se ilustran en la figura 1.12 .

La presencia de más de un sistema microsomal hepático de monooxigenación de fármacos fue demostrado por Axelrod (1956), quien observó diferencias entre especies en la N-demetilación de la metadona y meperidina. Posteriormente, se demostró que el hígado de una única especie puede contener más de un sistema

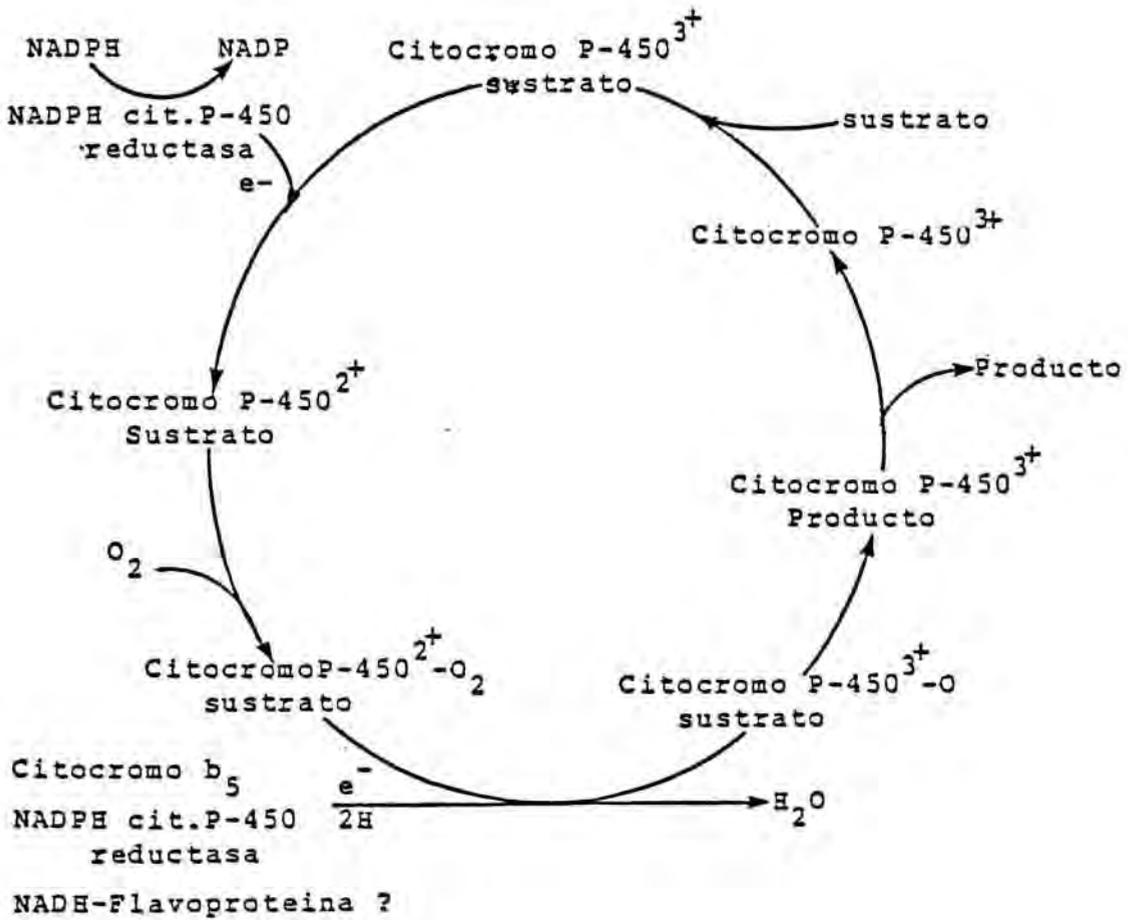


Figura 1.9. Localización y funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones en el sistema del citocromo P-450.

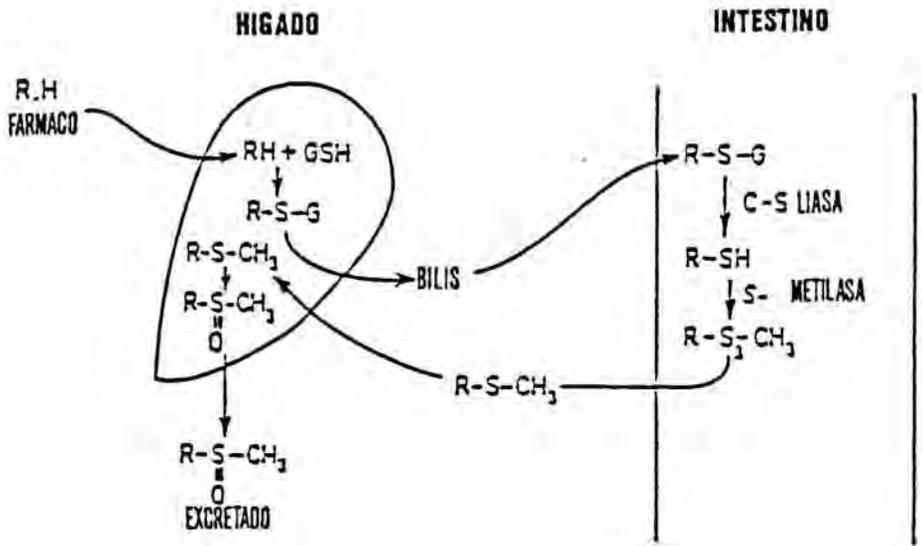


Figura 1.10. Esquema representativo del metabolismo de fase III, debido a la acción de la flora bacteriana sobre los fármacos.

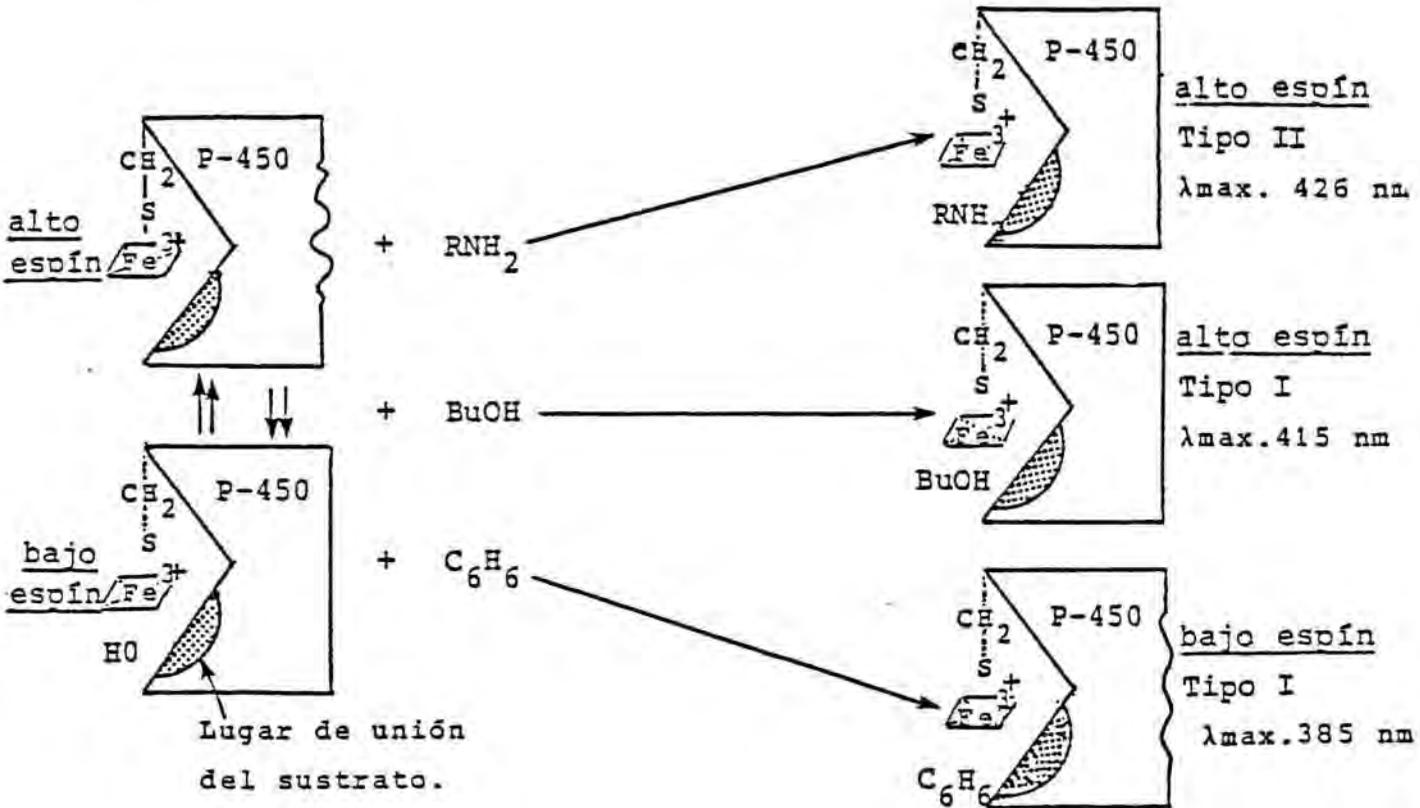


Figura 1.11. Unión de los diferentes tipos de sustrato al citocromo P-450 y modificaciones que produce en éste.

Tipo I (420 → 415 nm)	Tipo II (420 → 426 nm)
Anfetamina	Alcoholes
Barbitúricos	Acetanilida
Benzo(α)pireno	<u>Anilina</u>
Clorpromazina	Cortisol
Cumarina	Corticoesterona
DDT	Desipramina
Oestradiol	Metirapone
Imipramida	Nicotinamida
Morfina	Pirazol
Naftaleno	Piridina
Fenacetina	
<u>Aminopirina</u>	
SKF 525 A	
Testosterona	

Se han subrayado los dos fármacos que hemos utilizado para determinar la actividad metabolizadora microsomal de fármacos, uno pertenece al grupo de sustratos tipo I y el otro al de sustratos tipo II.

Figura 1.12. Modificaciones espectrales producidas por la unión de los sustratos de tipo I y II al citocromo P-450.

enzimático biotransformador de fármacos (Takemori y Mannering, 1958).

El empleo de inductores enzimáticos microsomales como el fenobarbital y el 3-metilcolantreno en ratas, demostró la existencia de, como mínimo, al menos dos formas del cit.P-450 microsomal, con diferencias en sus propiedades espectrales y catalíticas (Alvares y col., 1967) (Fig. 1.13). En la actualidad, se conoce una gran cantidad de isoenzimas de cit.P-450 aislados de diferentes especies y tejidos, con un peso molecular entre 48.000 y 56.000; todos ellos poseen propiedades espectrales, catalíticas e inmunológicas características.

1.2.-FACTORES QUE AFECTAN AL METABOLISMO DE FARMACOS.

Los factores que modifican el metabolismo de los fármacos se clasifican en dos grandes grupos: los factores internos o endógenos y factores externos o exógenos.

1.2.1.- FACTORES INTERNOS.

Entre los factores internos que influyen en el metabolismo de fármacos destacan: los factores genéticos (diferencias debidas a la especie, al individuo), el sexo, la edad, el equilibrio hormonal, el embarazo y la enfermedad.

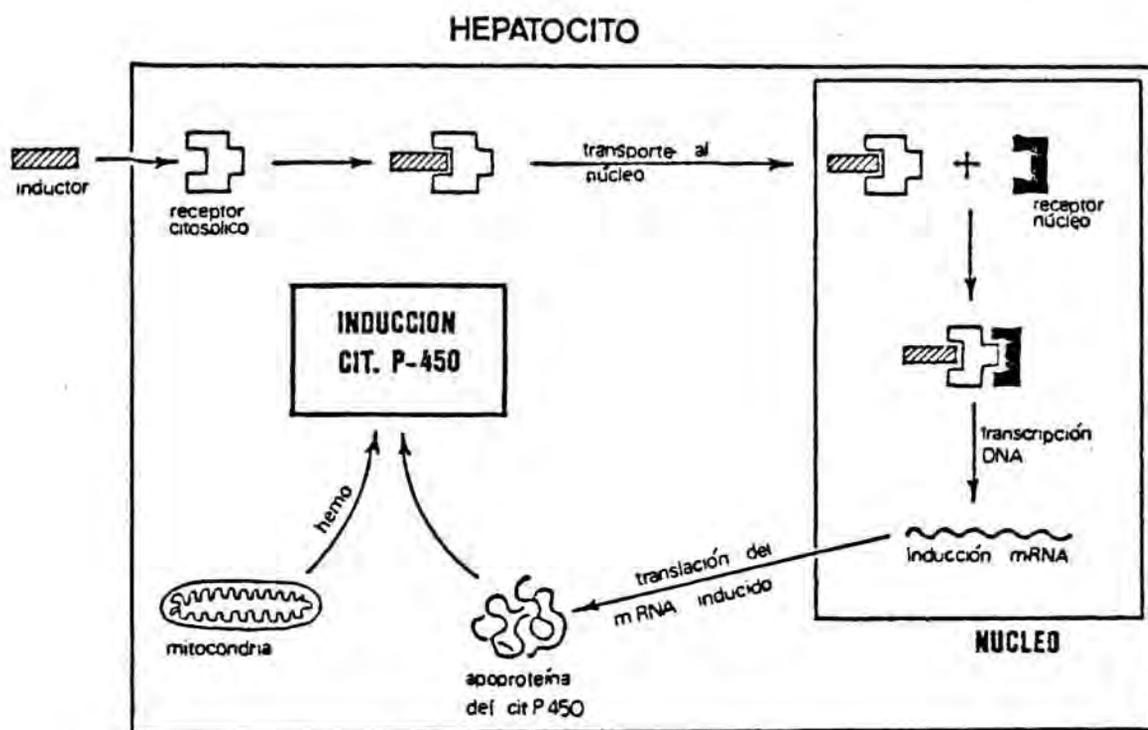


Figura 1.13. Inducción del citocromo P-450 por la unión a un receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos (adaptado de Nebert y col., 1984).

1.2.1.1.- DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO DE FARMACOS DEBIDAS A LA ESPECIE.

Las diferencias debidas a la especie influyen en el metabolismo de fármacos de fase I y II tanto de forma cualitativa (diferente ruta metabólica) como cuantitativa (misma ruta de metabolización pero a diferente velocidad).

Ya en 1958, Quinn y col. observaron que según la especie utilizada (ratón, rata, perro) se presentaban variaciones en la vida media y en la duración de los efectos biológicos del hexobarbital. Asimismo, Burns y col. (1962) comprobaron que la oxifenilbutazona es metabolizada rápidamente por el perro ($t_{1/2}$ =30 minutos), mientras que en el hombre dicha velocidad es sensiblemente inferior ($t_{1/2}$ = 3 días).

Ejemplos ilustrativos de diferencias cualitativas en el metabolismo de fármacos de fase I en relación a la especie, los encontramos en los anticoagulantes. Así la 7-hidroxilación de la cumarina se produce en el hígado, en cobayo, gato y conejo, mientras que en la rata y ratón se metaboliza a nivel extrahepático. El anticoagulante, etilbiscumacetato, es metabolizado rápidamente por el hombre y el conejo, pero los metabolitos resultantes son diferentes en ambas especies tanto el metabolito hidroxilado formado por el hombre como el ácido libre formado en el conejo son inactivos (figura 1.14).

También se han hallado diferencias cualitativas en el metabolismo de fase II. Así, la sulfadimetoxina se conjuga con el ácido glucurónico en el hombre, mientras que en la rata, cobayo o conejo no se forma el glucuronoconjugado.

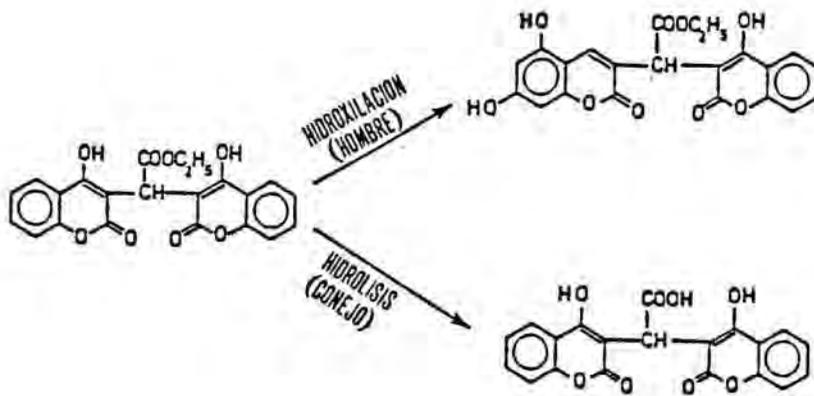


Figura 1.14 Rutas metabólicas del etilbiscumacetato en el hombre y el conejo.

Todos los ejemplos anteriores son muestras de la acción de uno o dos enzimas sobre un fármaco. El proceso es más complejo cuando en el metabolismo de un fármaco intervienen numerosas reacciones enzimáticas como es el caso de la anfetamina (figura 1.15). Así, la rata hidroxila la anfetamina, mientras que el conejo, cobayo y el hombre, desaminan la anfetamina. El cobayo posteriormente oxida el grupo cetónico hasta ácido benzoico que se excreta como glucuronoconjugado. El conejo reduce la cetona y excreta el correspondiente conjugado del alcohol resultante.

Como se observa, las diferencias interespecie pueden ser consecuencia tanto de la presencia de diferentes rutas de metabolización, como a cambios en la velocidad de metabolización en una misma ruta metabólica. Aunque la mayor parte de la información disponible al respecto hace referencia a mamíferos, los animales inferiores (Garfinkel, 1963 y Strittmater y Umberger, 1969) e incluso los microorganismos (Berg y col., 1976) tienen la capacidad de metabolizar xenobiontes. Así se ha observado que los peces tienen una capacidad de metabolizar fármacos inferior a la de los pájaros que, a su vez, es inferior que la capacidad que poseen los mamíferos.

Las diferencias en el metabolismo de fármacos debidas a la especie deben ser tomadas en consideración cuando se planifican estudios de toxicidad de nuevos fármacos, intentando emplear aquellas especies animales que posean unas rutas y velocidades de metabolización del nuevo producto lo más semejante posible a las del hombre.

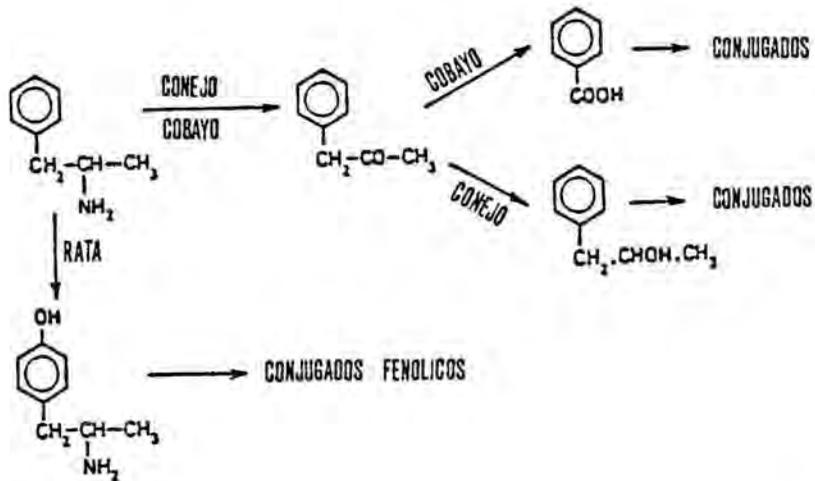


Figura 1.15 Rutas metabólicas de la anfetamina en el conejo, cobayo y rata.



1.2.1.2.- DIFERENCIAS DEBIDAS A FACTORES GENETICOS.

La regulación genética del metabolismo de fármacos se ha estudiado utilizando rutas metabólicas que poseen polimorfismo genético como la acetilación de la isoniácida, la hidrólisis del suxametonio y la oxidación de la debrisoquina. Para estos fármacos la distribución de las velocidades de metabolización de estos fármacos en la población, sigue una distribución bimodal o trimodal.

El ejemplo de polimorfismo genético más estudiado es la acetilación de la isoniácida. La distribución de las vidas medias de su eliminación es bimodal (Breimer, 1983), hecho constatado con anterioridad al dividir a la población en acetiladores rápidos y lentos en función de su respuesta al tratamiento antituberculoso (Price Evans y col., 1960).

Este fenómeno es aplicable también a la N-acetilación de la hidralacina, procainamida y varias sulfonamidas.

Tabla 1.2. Polimorfismo genético en la acetilación de fármacos.

Cafeína	Grant y col.	(1984)
Clonazepam	Miller y col.	(1981)
Dapsona	Lumbe y col.	(1977)
Fenelcina	Lumbe y col.	(1977)
Hidralacina	Lumbe y col.	(1977)
Isoniácida	Evans y col.	(1960)
Nitrazepam	Lumbe y col.	(1977)
Procainamida	Das y col.	(1973)
Sulfadimidina	Lumbe y col.	(1977)
Sulfapiridina	Lumbe y col.	(1977)

La N-acetilación la efectúa el enzima N-acetiltransferasa, un enzima citosólico que se encuentra en el hígado y en menor cantidad en la mucosa del intestino grueso (Jenne, 1965). La actividad menor de este enzima en la población de acetiladores lentos se debe a que poseen menos cantidad de enzima que los acetiladores rápidos y no a una modificación de la afinidad del enzima por el sustrato (Jenne, 1965).

En la mayoría de los países europeos el 40 % de la población es acetiladora rápida, mientras que el porcentaje se dobla en los países asiáticos. Entre los esquimales casi el 96 % son acetiladores rápidos. El carácter acetilador está implicado en la susceptibilidad a los efectos adversos de los fármacos. En el caso de la isoniacida, los acetiladores lentos suelen desarrollar neuropatías, mientras que los acetiladores rápidos son más susceptibles a toxicidad hepática (Devadatta, 1960; Mitchell y col., 1976). Para la hidralacina la dosis antihipertensiva efectiva es menor en los acetiladores lentos, pero la aparición de efectos adversos es más frecuente en este grupo (Sjoquist y col., 1980).

Una gran parte de los fármacos que se metabolizan por oxidación muestran polimorfismo en su metabolismo con una distribución normal en la población, como es el caso de la nortriptilina (Alvan, 1978); estos fármacos se encuentran bajo un control poligénico. Sin embargo, en la población se observa una distribución bimodal para la oxidación de la debrisoquina (Mahgoub y col., 1977; Idle y Smith, 1979). Así como para los fármacos que se relacionan en la tabla 1.3 .

Tabla 1.3 . Fármacos con polimorfismo metabólico asociado al de la debrisoquina.

Alprenolol	Alvan y col.	(1982)
Amitriptilina	Mellstrom y col.	(1983)
Captopril	Oates y col.	(1982)
Desipramina	Bertilson y col.	(1983)
Dextrometorfano	Kupfer	(1984)
Esparteína	Eichelbaum y col.	(1982)
Fenacetina	Sloan y col.	(1978)
Fenformina	Oates y col.	(1978)
Nortriptilina	Mellstrom y col.	(1983)
Perhexidina	Shah y col.	(1982)
Propranolol	Lennard y col.	(1978)

Kahn y col. (1982) y Meier y col. (1983) observaron que la cantidad de citocromo P-450 en la población hidroxiladora rápida y lenta es similar. Esto sugirió que la anomalía podía localizarse en un isoenzima que constituyera una pequeña fracción del cit. P-450 total, fracción que sería la responsable del polimorfismo observado en el metabolismo de dichos fármacos. Larrey y col. (1984) en ratas Sprague-Dawley han identificado el isoenzima P-450 UT-H como la fracción más activa en la hidroxilación de la debrisoquina, aunque sólo constituye el 6 % del cit. P-450 total. También se ha demostrado que en las ratas hidroxiladoras lentas esta fracción se encuentra disminuida.

En la hidroxilación de la fenitoína (Vasko y col., 1980), tolbutamida (Scott y Poffenbarger, 1977), mefenitoína (Kupfer y Preisig, 1984), carbocisteína (Waring y col., 1982) y nifedipina (Kleinbloesen y col., 1984) también se ha observado polimorfismo genético entre diferentes individuos.

Por último, la glucuronoconjugación es una de las principales rutas de biotransformación de fármacos y sustancias endógenas como la bilirrubina, hormonas sexuales y ácidos biliares (Boutin y col., 1981). La alteración hereditaria de la glucuroconjugación de la bilirrubina es un ejemplo de polimorfismo genético, así, la actividad del enzima bilirrubina-UDP-glucuronosiltransferasa disminuye en la enfermedad de Gilbert y de Grigler-Najjar de tipo II (Arias y col., 1969; Billing, 1978). En estas enfermedades hereditarias el metabolismo de fármacos se halla muy alterado (ver Tabla 1.4).

El mecanismo que explica la deficiencia en la actividad de la bilirrubina-UDP-glucuroniltransferasa se ha estudiado en el hombre (Arias y col., 1969; Outin y col., 1981 y Bock y col., 1984) y animales (Bock y col., 1982) y se considera debido a alteraciones en la cantidad de determinados isoenzimas o a variaciones en la estructura del retículo endoplasmático que soporta al enzima.

1.2.1.2.1.- Interrelación entre los factores genéticos y ambientales

Los factores genéticos y ambientales que afectan el metabolismo de fármacos suelen estudiarse separadamente, como si no estuvieran relacionados. Sin embargo, para la expresión de los factores genéticos se requiere la participación de varios

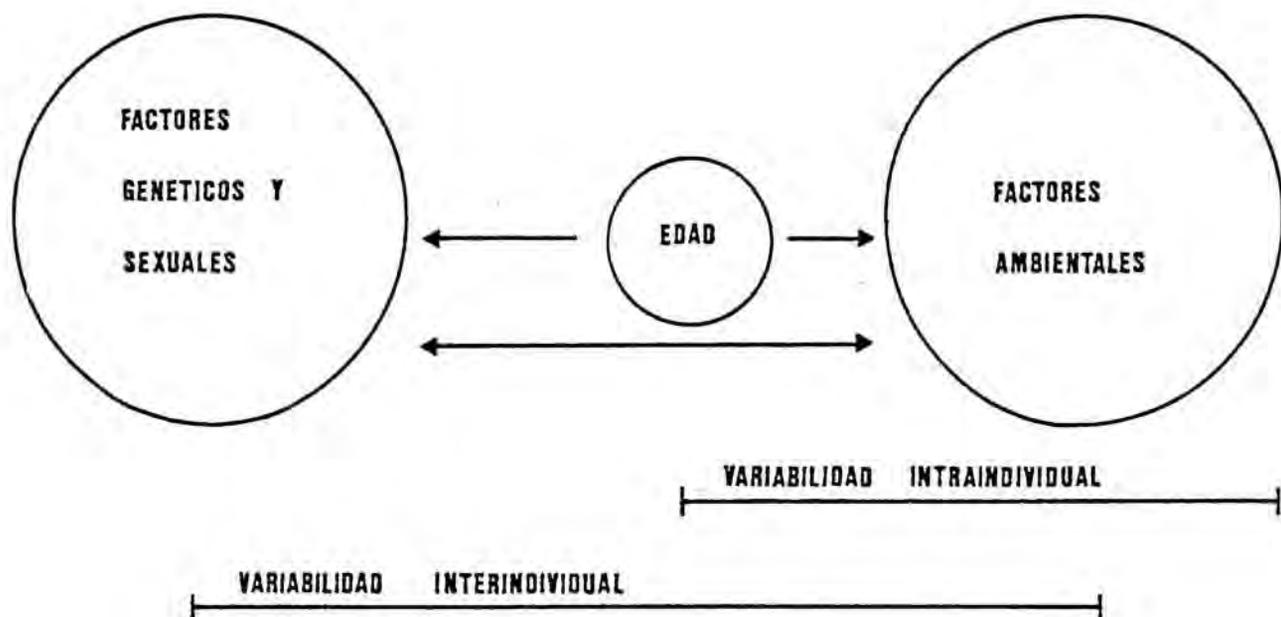


Figura 1.16. Esquema que representa la relación entre los factores genéticos y ambientales que inciden sobre el metabolismo de fármacos

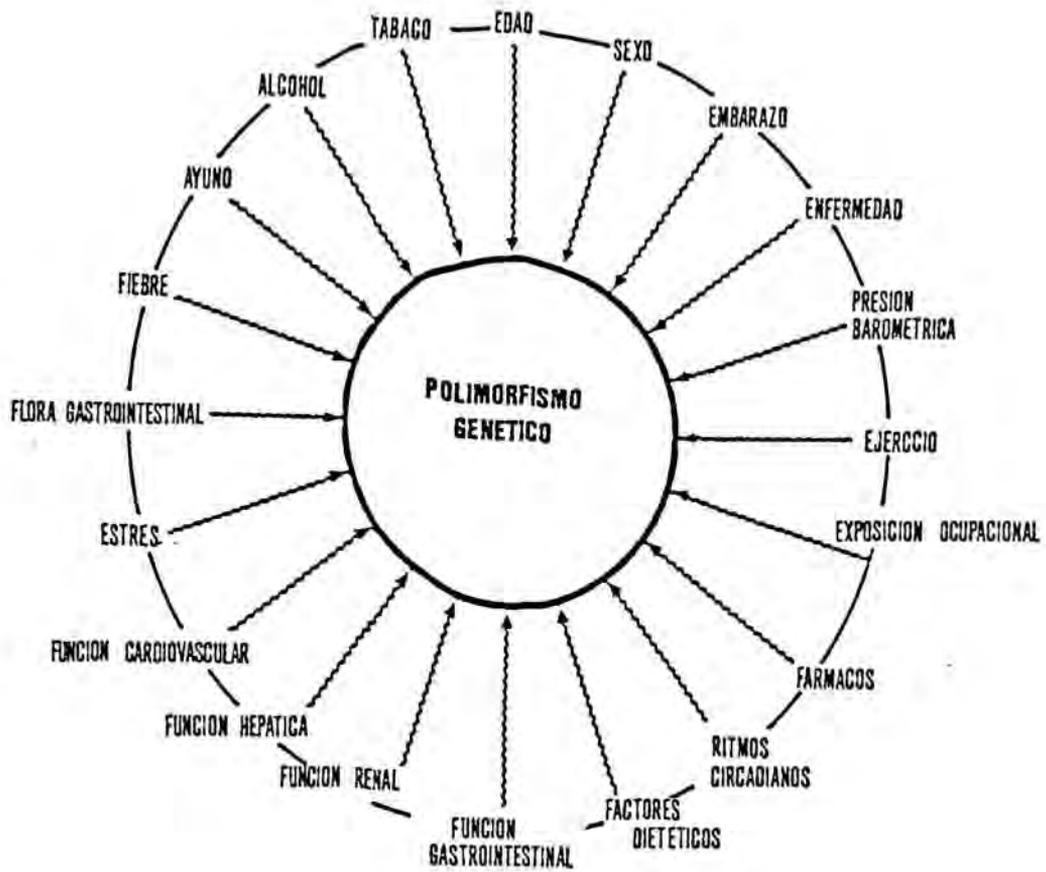


Figura 1.17. Esquema que representa los diferentes factores que pueden modificar el polimorfismo genético del metabolismo de fármacos

factores ambientales (Vesell, 1980). En la figura 1.16 y 1.17 se representa esquemáticamente la relación entre dichos factores. Los factores ambientales junto con la edad pueden ser causantes de la variabilidad intraindividual, ya que el fumar, el contraer una enfermedad o tomar o no fármacos, puede provocar cambios en el metabolismo de fármacos. Se ha comprobado que la variabilidad intraindividual es mucho menor que la interindividual en condiciones basales (Conney, 1980).

1.2.1.2.2.- Mecanismos que regulan las diferencias interespecie e interindividuales del metabolismo de fármacos.

La oxidación de la mayoría de los fármacos se efectúa por el sistema multienzimático del citocromo P-450. Esta hemoproteína se encuentra en múltiples órganos, pero principalmente en el hígado. En el hombre (Wang y col., 1983) y en los animales (Guengerich, 1979; Guengerich y col., 1982) se ha demostrado que el citocromo P-450 está compuesto de diferentes isoenzimas y todos ellos poseen un mismo centro activo en el grupo hemo, al cual se fija el oxígeno que oxidará los sustratos. Los isoenzimas difieren en la estructura de la apoproteína; cada uno de ellos tiene propiedades inmunológicas diferentes (Guengerich, 1979; Guengerich y col., 1982 y Wang y col., 1983) y propiedades catalíticas propias. Estas diversas apoproteínas tienen distinta afinidad por los sustratos liposolubles. Dos isoenzimas pueden tener afinidad diferente por dos sustratos y

dos sustratos y pueden oxidar en distintas posición al sustrato, dependiendo de como éste se una a la apoproteína del isoenzima (figura 1.11.).

La síntesis de los diferentes isoenzimas del citocromo P-450 es regulada independientemente. Así, un inductor enzimático no aumenta la cantidad de todos los isoenzimas del cit.P-450, sino sólo de algunos de ellos (Guengerich y col. 1982). Inductores como el fenobarbital, la rifampicina (Larrey y Branch, 1983), la troleandomicina (Pessayre y col., 1982) o la eritromicina (Larrey y col., 1983), alteraran el metabolismo hepático de fármacos modificando la síntesis de diferentes isoenzimas.

El estudio de los mecanismos genéticos implicados en las variaciones del metabolismo de fármacos se complica, si consideramos que un fármaco se puede transformar en varios metabolitos con la participación de diferentes isoenzimas y que, a su vez, un mismo isoenzima puede biotransformar un fármaco en varios metabolitos diferentes (Fig 1.18.).

Cualquier variación cuantitativa o cualitativa de la dotación isoenzimática del citocromo P-450 puede provocar cambios en el metabolismo y aclaramiento hepático de fármacos.

La aparición de polimorfismo genético en el metabolismo de fármacos también se puede producir por cambios en la cantidad o naturaleza de los inhibidores o activadores endógenos, por la cantidad o accesibilidad de los cofactores y por la presencia o ausencia de enzimas reversibles.

Tabla 1.4 . Fármacos cuya glucuroconjugación está disminuida

Enfermedad de Gilbert

Clofibrato	Kutz y col.	(1977)
Estradiol	Adlercoreutz y col.	(1973)
Mentol	Macklon y col.	(1979)
Paracetamol	Douglas y col.	(1978)
p-Nitrofenol	Auclair y col.	(1976)

Enfermedad de Grigler-Najjar

Aminofenol	Arias y col.	(1969)
Mentol	Arias y col.	(1969)
Paracetamol	Axelrod y col.	(1967)
p-Nitrofenol	Kreek y col.	(1968)
Salicilatos	Childs y col.	(1959)
Tricloroetanol	Childs y col.	(1959)

1.2.1.3.- MODIFICACIONES CON LA EDAD DEL METABOLISMO DE FÁRMACOS.

El estudio de las modificaciones en el metabolismo de fármacos con la edad es de particular interés para adecuar los regímenes de dosificación y evitar la aparición de efectos adversos, sobre todo en poblaciones de alto riesgo, niños y ancianos, con gran susceptibilidad a padecer los efectos adversos de los fármacos (Crooks y Stevenson, 1979). Morselli (1976) ha demostrado que los recién nacidos o prematuros metabolizan el

diazepam más lentamente, probablemente debido a un menor desarrollo del sistema metabolizador de fármacos. En los ancianos la eliminación también es menor que en los adultos (Klotz y col., 1975). Por el contrario, el lorazepam y oxacepam que se conjugan con el ácido glucurónico y el sulfato, no sufren cambios en su velocidad de eliminación con la edad del individuo (Wilkinson, 1977; Greenblatt y col., 1979). El metabolismo de otros fármacos como la antipirina, clorometiazol, fenilbutazona o quinina, también es menor en los ancianos (Stevenson y col., 1979) (Tablas 1.5., 1.6. y 1.7.)

Los cambios en el peso del hígado con la edad juegan un papel importante en la capacidad de este órgano para metabolizar fármacos. El porcentaje del peso del hígado con respecto al peso corporal oscila entre 2.2 % y 4.4 %, dependiendo de la cepa, sexo y edad de la rata (tabla 1.8). Se ha encontrado correlación entre este parámetro y la capacidad metabolizadora de xenobiontes (Van Benzooijen, 1984).

El retículo endoplasmático liso (REL) es la estructura intracelular directamente responsable de la capacidad hepática metabolizadora de fármacos. Los resultados obtenidos sobre la cantidad de REL en ratas a diferentes edades fueron muy variables. Pieri y col. (1975) observaron un incremento en el volumen citoplasmático ocupado por el REL entre el 12 y 17 mes de vida del animal. Sin embargo, Schmucker y col. (1977) demostraron la existencia de una disminución en la cantidad del REL entre el 10 y 30 mes de edad. Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en el método experimental utilizado, cepa y sexo de las ratas empleadas.

Tabla 1.5. Cambios en las actividades metabolizadoras de fármacos con la edad en diferentes cepas de ratón

Cepa	Sexo	Edad (meses)	Enzima	Cambio con edad	Referencia
Swiss-Webster	H	6, 9, 12, 15, 18	7-etoxicumarin O-demetilasa	▼	Stohs y col. (1980)
Swiss-Webster	H	6, 9, 12, 15, 18	Aril hidrocarbón hidroxilasa	▼	Stohs y col. (1980)
Swiss-Webster	H	3, 6, 12, 15, 18	Anilina p-hidroxilasa	▼	Stohs y col. (1980)
C57B1/6J	M	12, 25, 30	Piroxidal kinasa	—	Fonda y col. (1980)
C57B1/6J	M	12, 25, 30	Piridoxamina peroxidasa	—	Fonda y col. (1980)
C57B1/6J	M	3, 12, 26	Epóxido hidratasa	▲	Birnhaum y col. (1979)
C57B1/6J	M	3, 12, 26	Benzofetamina N-demetilasa	▼	Birnhaum (1980)
C57B1/6J	M	3, 12, 26	Etilmorfina N-demetilasa	▼	Birnhaum (1980)
C57B1/6J	M	3, 12, 26	Zoxazolamina hidroxilasa	▼	Birnhaum (1980)
C57B1/6J	M	3, 12, 26	Benzopireno hidroxilasa	▲	Birnhaum (1980)

(—) no varía, (▲) aumenta y (▼) disminuye.

Tabla 1.6. Cambios en las actividades de los enzimas metabolizadores de fármacos con la edad en diferentes cepas de ratas

Cepa	Sexo	Edad(meses)	Enzima	Cambios con edad	Referencia
Wistar	M	1, 3, 10, 20	Hexobarbital hidroxilasa	▼	Kato y col. (1968a y 1968b)
Fischer 344	M	3, 6, 12, 24, 28	Hexobarbital hidroxilasa	▼	Fujita y col. (1982)
Fischer 344	H	3, 6, 12, 24, 28	Hexobarbital hidroxilasa	-	Birnbaum y col. (1978)
Wistar	M	1, 3, 10, 20	Aminopirina N-demetilasa	▼	Kato y col. (1968a y 1968b)
Wistar	H	3-24	Aminopirina N-demetilasa	▼	Platt (1977)
Fischer 344	M	3, 6, 12, 24, 28	Aminopirina N-demetilasa	▼	Fujita y col. (1982)
Fischer 344	H	3, 6, 12, 24, 28	Aminopirina N-demetilasa	-	Fujita y col. (1982)
Wistar	M	3-24	Aminopirina N-demetilasa	▼	Gold y col. (1974)
Wistar	M	1, 3, 10, 20	Anilina p-hidroxilasa	▼	Kato y col. (1968a y 1968b)
Fischer 344	M	4-24	Anilina p-hidroxilasa	▼	Rikans y col. (1982)
Fischer 344	M	3, 6, 12, 24, 28	Anilina p-hidroxilasa	▼	Fujita y col. (1982)
Fischer 344	H	3, 6, 12, 24, 28	Anilina p-hidroxilasa	▼	Fujita y col. (1982)
Wistar	M	1, 3, 10, 20	Estrignina oxidasa	▼	Kato y col. (1968a y 1969b)
Wistar	M	1, 3, 10, 20	ácido p-nitrobenzoico reductasa	▼	Kato y col. (1968a y 1968b)
Wistar	M	1, 3, 10, 20	p-dimetilaminobenceno reductasa	▼	Kato y col. (1968a y 1968b)
CFN	M	1, 2, 3, 12, 20, 30	Zoxazolamina hidroxilasa	▼	Baird y col. (1975)
CFN	M	3, 12, 27	Etilmorfina N-demetilasa	▼	Birnbaum y col. (1978)
Fischer 344	M	16-27	Etilmorfina N-demetilasa	▼	Schmucker y col. (1980)
CFN	M	3, 12, 27	Benzopireno hidroxilasa	▼	Birnbaum y col. (1978)
Fischer 344	M	4-24	Benzofetamina N-demetilasa	▼	Rikans y col. (1982)
CFN	M	3, 12, 27	Epóxido hidratasa	▼	Birnbaum y col. (1978)
Fischer 344	M	3-23	7-etoxicumarina O-demetilasa	▼	Kao y col. (1980)
Fischer 344	M	3, 6, 12, 24, 28	Nitroanisol-O-demetilasa	▼	Fujita y col. (1982)

(-) no varía, (▲) aumenta y (▼) disminuye.

Tabla 1.7. Cambios con la edad del metabolismo de fase II.

Especie	Cepa	Sexo	Edad(meses)	Característica	Cambio	Referencia
Rata	Wistar	M	8-30	glucuronocojugación del 4 nitrofenol	▼	Ali y col. (1979)
Rata	Wistar	M	8-30	glucuronocojugación de fenolftaleína	▼	Ali y col. (1979)
Rata	CFN	M	3,12,27	Glutación-S-transferasa	-	Birnbaum (1979)
Rata	CFN	M	3,12,27	Contenido de glutatión	-	Birnbaum (1979)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	Contenido de glutatión	▼	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	UDP glucuronil transferasa	▲	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	UDP glucuronil transferasa	▲	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	GSH reductasa	▲	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	GSH peroxidasa	▲	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	GSH-S-transferasa a CDNB	-	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	GSH-S-transferasa a DCNB	-	Kitahara (1982)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	γ glutamiltranspeptidasa	▲	Kitahara (1978)
Rata	Fischer 344	M	4,12,24	UDP glucuroniltransferasa	-	Fujita y col. (1982)
Ratón	C57B1/6J	M	3,12,24,28	GSH-S-transferasa	-	Birnbaum (1979)
Ratón	C57B1/6J	H	3,12,26	GSH peroxidasa	-	Su y col. (1979)
Ratón	C57B1/6J	M	2,5,9,12,18	Contenido de GSH	▲	Birnbaum (1979)
Ratón	CBF-1	M	3,12,26	Contenido de GSH	-	Stohs y col. (1980)
Ratón	Swiss-Webster	H	3,9,12,15,18,21,24	Contenido de GSH	-	Al-turk y col. (1981)
Ratón	Swiss-Webster	H	3,9,18	Contenido de GSH	-	Al-turk y col. (1981)

(-) no varía, (▲) aumenta y (▼) disminuye.

Tabla 1.8. Cambios en el cociente peso hígado (PH)/peso corporal (PC) con la edad.

Especie	Cepa	Sexo	Edad (meses)	PH/PC (%)	Referencia
Rata	Wistar	H	3-20	4.2	Kato y takanaka (1983)
Rata	Wistar	M	3-20	4.1	Kato y takanaka (1983)
Rata	Wistar	M	3-24	3.9	Kitani y col. (1978)
Rata	Wistar	M	3-30		Ali y col. (1979)
Rata	Wistar	M	7-31	2.7	McMartin y col. (1980)
Rata	RU	H	3-27	3.1	De Leeuw-Israel (1971)
Rata	WAG/RIJ	H	3-36	4.3	Van Bezooijen (1978)
Rata	WAG/RIJ	H	3-30	3.3	Kitani y col. (1981)
Rata	WAG/RIJ	M	3-20	3.2	Kitani y col. (1981)
Rata	BN/BI	H	3-12	2.7	Kitani y col. (1982)
Rata	BN/BI	H	3-24	2.7	Kitani y col. (1982)
Rata	Fischer	M	1-27	2.9	Schmucker y col. (1982)
Rata	Sprague-Dawley	M	2-16	4.5	Weigand y col. (1980)
Ratón	NIH White Swiss	M	-	6.6	Jones (1967)
Ratón	NIH White Swiss	H	-	6.4	Jones (1967)

1.2.1.3.1.-Posible contribución de las células parenquimales al metabolismo de fármacos. Efecto de la edad.

El hígado de los mamíferos está formado por varios tipos de células: parenquimales y no-parenquimales. El último grupo de células está constituido, principalmente, por células endoteliales y células de Kupffer, formando parte del sistema retículo endotelial. La capacidad funcional del sistema retículo endotelial se pudo determinar estudiando su capacidad para conseguir el aclaramiento de partículas procedentes del torrente circulatorio. Dicha capacidad se ha visto reducida con la edad en el ratón (Hoki y col., 1965; Jaroslow y Larrick, 1973) y en rata (Bilder, 1975); sin embargo, la mayoría de estos estudios no incluyeron animales viejos, por lo que no se conoce como responde el sistema retículo endotelial en edades avanzadas (Brouwer y Knook, 1983).

Algunos autores (Knook y col., 1982) han atribuido un cierto papel a las células sinusoidales en el metabolismo de fármacos. La N-acetiltransferasa, un enzima que cataliza la acetilación de algunos fármacos como la isoniacida o sulfametacina, se ha visto que se localiza, casi exclusivamente, en las células sinusoidales hepáticas en la rata (Notter, 1973). La gamaglutamiltransferasa (γ GT) es otro enzima implicado en el metabolismo de ciertos fármacos. Este enzima se ha detectado en las células sinusoidales hepáticas, en una cantidad dos veces superior a la de las células parenquimales (Lamp y Butschak,

1978). También se ha observado un incremento de los niveles de este enzima con la edad.

1.2.1.3.2.- Flujo sanguíneo hepático y capacidad de unión a proteínas. Efecto de la edad.

Los cambios en el flujo sanguíneo hepático con la edad tienen especial incidencia en el metabolismo de fármacos con un cociente de extracción elevado, como son clorometiazol, lignocaína, morfina, nortriptilina, pentazocina, petidina, propoxifeno o propranolol.

Los cambios en la capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas de determinados fármacos, puede condicionar su velocidad de metabolismo y por consiguiente, su eliminación. La unión de fármacos a las proteínas del plasma viene determinada, principalmente, por la concentración de albumina. Dicha concentración no varía con la edad en la rata (De Leeuw-Israel, 1971; Horback y col., 1983) mientras que disminuye con la edad en el ratón (Pardón y col., 1977). Por lo tanto, no se producen cambios en el aclaramiento hepático de fármacos con la edad en la rata, debido a cambios en el contenido de albúmina. Pese a esto se han observado cambios estructurales en la molécula de albúmina con la edad (Horbach y col., 1983), alteraciones que podrían modificar su capacidad de unión.

1.2.1.3.3.- Efecto de la edad sobre los enzimas metabolizadores de fármacos y las hemoproteínas.

Kato y Takanaka (1968 a y b) han demostrado que con la edad se reduce la cantidad de varios constituyentes del sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos (Baird y col., 1971; Kao y Hudson, 1980), así como, hay una disminución en sus actividades.

1.2.1.3.4.- Efecto de la edad sobre la biosíntesis o degradación del cit.P-450.

Los niveles de cit. P-450 en seres humanos y animales de experimentación varían con la edad (Adelman y Freeman, 1972).

La edad afecta de forma diferente a los enzimas encargados de la síntesis o degradación del grupo hemo. La alanina-amino sintetasa, enzima que interviene en la síntesis del grupo hemo (Fig. 1.19.), se encuentra en menor cantidad con la edad; por el contrario, la alanina-amino dehidratasa no se modifica. La actividad de la hemooxigenasa (Fig. 1.19.), enzima que interviene en la degradación del cit.P-450, aumenta con la edad, hecho que se podría explicar por la mayor concentración de metales pesados que se adquieren con la edad (Freedman y Marcus, 1980).

Aunque sólo hay una ligera disminución del contenido

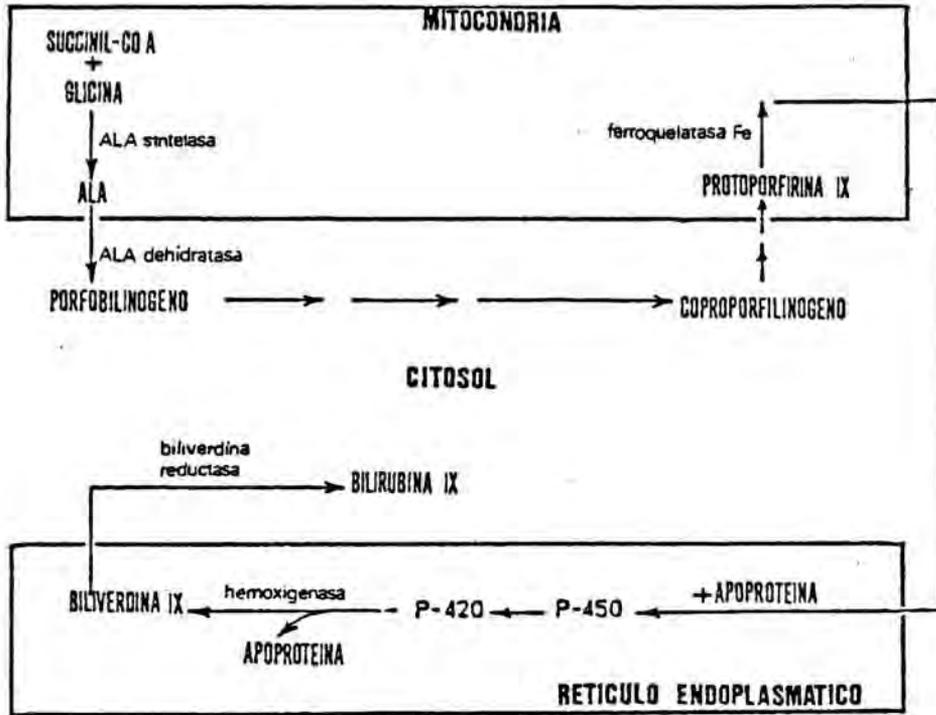


Figura 1.19 Rutas de biosíntesis y degradación del citocromo P-450. ALA, ácido δ -aminolevulinico. (Adaptado de Testa y Jenner, 1981).

del cit.P-450 con la edad, las ratas viejas sufren una marcada reducción en las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa. Estos resultados pueden ser consecuencia de una disfunción en el transporte de electrones, debidos a alteraciones de la membrana microsomal o una deficiencia selectiva en algún isoenzima del cit.P-450 (Abraham y col., 1985).

1.2.1.3.5.- Efecto de la edad sobre la NADPH cit.c reductasa hepática.

Se ha observado que hay una disminución en la actividad específica de la NADPH cit.c reductasa con la edad (Schumucker, 1986), en la rata. De la misma forma, se produce una reducción del cociente entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína enzimática de NADPH cit.c reductasa; a pesar de ello no se han encontrado variaciones en las propiedades electroforéticas y punto isoeléctrico de la proteína. Las modificaciones indicadas pueden ser debidas a cambios intrínsecos de la molécula proteica que se producen con la edad, como puede ser el aumento de su termoestabilidad.

1.2.1.3.6.- Efecto de la edad sobre la cinética de la NADPH cit.c reductasa.

La Km de la NADPH cit.c P-450 reductasa en presencia de

diferentes concentraciones de NADPH y con microsomas procedentes de ratas de varias edades, oscila entre 6 y 6.9 μ moles, lo cual indica que la afinidad por el sustrato no se modifica con la edad. La disminución de los valores de V_{max} para el cit. c reductasa fué de 4.0, 2.9 y 2.2 μ mol en ratas de 3, 16 y 27 meses de edad, respectivamente; por consiguiente, la cantidad de NADPH cit.c reductasa disminuye con la edad (Schmucker, 1986).

1.2.1.3.7.- Efecto de la edad sobre la membrana microsomal.

La edad produce modificaciones en el metabolismo microsomal hepático de fármacos, "in vivo" e "in vitro", en varias especies (Richney y Bender, 1977; Schmucker, 1979 y Schmucker, 1983). No obstante, no se ha aclarado porqué mecanismo ocurren estas modificaciones. Una explicación a este hecho podría ser la observación de Schmucker y col. (1977 y 1978) según la cual con la edad se produce una disminución del 50 % en la superficie del REL de los hepatocitos, es decir del locus primario del sistema metabolizador de fármacos.

Varios autores han observado que la actividad, "in vitro", del sistema microsomal hepático se halla influenciada por la composición y/o fluidez de los lípidos que componen el REL (Strobel y col., 1970; Yang, 1977). Strobel y col. (1970) demostraron, que para conseguir una actividad óptima en sistemas reconstituídos, se requiere la presencia de fosfatidilcolina, mientras que la fosfatidiletanolamina inhibe el metabolismo de fármacos "in vitro".

Con la edad hay una pérdida de fosfolípidos, un aumento del cociente colesterol/fosfolípidos y una disminución del cociente fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina en microsomas de rata y ratón (Hawcroft y Martin, 1974 y Grinna, 1977) (tabla 1.10.). Asimismo, se ha observado un aumento dependiente de la edad en ácidos grasos insaturados (ácido decosahecanoico) y una disminución de ácidos grasos saturados en microsomas hepáticos de rata (tabla 1.11.). Hawcroft y Martin (1974) observaron que existe una disminución de la concentración de ácidos grasos insaturados en microsomas aislados de ratones viejos.

Sin embargo los resultados que correlacionan la reducción en la eficacia metabolizadora de fármacos y la composición de los lípidos del REL, no son definitivos. Así, Hegner y Patt (1975) y Vorbeck y col. (1982) observaron que, con la edad, hay una disminución de la fluidez de las membranas plasmática y mitocondrial.

Más recientemente, Schmucker y col. (1984) al estudiar la composición lipídica del REL han comprobado que, con la edad, se produce una disminución de la fluidez de las membranas microsomales, hecho que podría explicar la disminución de la actividad del sistema hepático biotransformador de fármacos.

TABLA 1.9. Efecto de la edad sobre el metabolismo de fármacos.

Especie	Cepa	Sexo	Edad (meses)	Citocromo P-450	Citocromo b ₅	NADPH reductasa	referencia
Rata	Wistar	M	1, 3, 10, 20	▼	-	▼	Kato y Takana (1968)
Rata	Wistar	M	7-31	▼	-	▼	McMartin (1980)
Rata	Wistar	M/H	3, 16, 24	-	-	-	Adelman (1971)
Rata	S.D.*	M	2-24	▼	-	▼	Uchida y col. (1982)
Rata	S.D.	M	6-24	▼	-	▼	Grinna (1972)
Rata	CFN	M	3-16	-	-	▼	Stier (1982)
Rata	CFN	M	1, 2, 3, 12, 20, 30	-	-	▼	Baird y col. (1978)
Rata	CFN	M	3, 12, 27	▼	-	-	Birnbaum y col. (1978)
Rata	CFN	M	3-24	▼	▼	-	Birnbaum y col. (1978)
Rata	CFN	H	3-24	▼	▼	-	Platt (1977)
Rata	Fisher 344	M	16-27	▼	▼	▼	Schmucker y col. (1980)
Rata	Fisher 344	M	3-23	▼	▼	▼	Rikans y col. (1982)
Rata	Fisher 344	M	4-24	▼	▼	▼	Fujita y col. (1982)
Rata	Fisher 344	H	3, 6, 12, 24, 28	▼	▲	▼	Kitahara y col. (1982)
Rata	Fisher 344	M	3, 6, 12, 24, 28	▼	▲	▼	Gold y col. (1974)
Rata	Fisher 344	M	4, 12, 24	▼	▲	▼	Stohs y col. (1980)
Ratón	C57A	M	3-10	▲	▲	-	Hawcroft (1982)
			10-20	▲	▲	-	

* Sprague-Dawley; (-) no varía, (▲) aumenta y (▼) disminuye.

TABLA 1.10. Cambios en el contenido de fosfolípidos y colesterol microscmal con la edad en rata y ratón.

Especie	Cepa	Edad (meses)	Colesterol	Fosfolípidos totales	Col/Fosf	PC	Fosfolípidos ^b			Referencias
							SPH	PS	PE	
Rata	S.D. ^a	6-24	-	Y	Δ	-	-	-	-	Grinna (1977)
Rata	S.D.	3-16		Y		Δ	-	-	Y	Stier y col. (1982)
Rata	CFN	3,12,27		Y						Birnbaum (1978)
Rata	Fisher 344	4,14,24		Y						Rikans (1982)
Rata	Fisher 344	3,16,27	Δ	Y	Δ	-				Schnucker (1982)
Ratón	C57B1/6J	3,12,26		-						Birnbaum (1980)
Ratón	C57	3,8,10,14,16 19,22		Y		Y	Y	Y	-	Havcroft (1974)
Ratón	C57	3,8,10,14,16 19,22		Y		Y	Y	Y	-	Jones y col. (1982)

* Sprague-Dawley

(Y) disminuye con la edad; (-) no hay variación y (Δ) incremento con la edad.

b) PC = fosfatidilcolina; SPH = esfingomielina; PS = fosfatidilserina; PE = fosfatidiletanolamina; PI = fosfatidilinositol.

TABLA 1.11. Cambios en la composición de los ac. grasos con la edad en microsomas hepáticos de rata y ratón.

Especie	Cepa	Edad (meses)	Ácidos Grasos						Referencias
			16:0	18:0	18:1	18:2	20:4	22:6	
Rata	S.D.*	6-24	▼	-	-	▼	-	▲	Grinna (1977)
Rata	Fisher 344	4, 14, 24	-	▲	▼	▼	-	▼	Rikans (1982)
Rata	Fisher 344	3, 16, 27				▼	▼	▲	Schmucker (1982)
Ratón	C57	3, 8, 10, 14 16, 19, 24	▼	▼	▼	▼	▼	▼	Hawcroft (1974)

* Sprague-Dawley
 (▼) disminución, (-) no varía y (▲) aumenta con la edad.

1.2.1.4.- DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO DE FARMACOS DEBIDAS AL SEXO.

Las variaciones del metabolismo de fármacos entre ambos sexos, no es debida exclusivamente a un factor genético, sino que involucra influencias hormonales. Las diferencias en el metabolismo de fármacos debidas al sexo fueron observadas, por vez primera, por Nicholas y Barron en 1932, quienes constataron que las ratas hembras requieren sólo la mitad de la dosis de barbitúricos de los machos, para dormirse.

Posteriormente, Gillette y Gram (1968) y Kato y Kamataki (1982), confirmaron, en la rata, la presencia de una diferencia debida al sexo en la actividad basal del sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos. El primer mecanismo que explica estas alteraciones fue la hipótesis de Kato (1974), quien relacionó las variaciones en los niveles de cit.P-450 y andrógenos y los componentes lipídicos microsomales. Recientemente, se ha comprobado que muchas de las diferencias en el metabolismo hepático de fármacos se pueden relacionar con la actividad anabólica de los esteroides, ya que estas sustancias estimulan la biosíntesis de determinados isoenzimas del cit. P-450 microsomal (Kato y Kamataki, 1982 y Rumbaugh y col., 1984). Se ha demostrado que el tratamiento con andrógenos reduce, específicamente, el contenido hepático del cit.P-450 en ratas e inhibe la actividad microsomal del cit.P-450 (El Defrawry y col., 1974). Kato y Kamataki (1982) observaron que el tratamiento con estrógenos produce la inducción de determinados isoenzimas del cit.P-450.

Los andrógenos, no sólo ejercen un efecto regulador sobre la concentración de cit.P-450, sino que se ha demostrado que modifican la actividad de la ALA sintetasa, el enzima involucrado en el primer paso y además paso limitante, en la biosíntesis del cit.P-450 (Granick, 1966). En cultivos celulares de hepatocitos, el tratamiento con 5 α y 5 β androstanos reducidos, produce la inducción de la ALA sintetasa (Edwards y Elliott, 1975). Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con estrógenos disminuye la actividad de la ALA sintetasa hepática en la rata (Held y Przeawa, 1976). Las hormonas esteroideas no parecen estar relacionadas con la regulación de la hemooxigenasa, encargada de la biodegradación del cit.P-450. Las alteraciones en el equilibrio hormonal de la rata no parecen influir en la actividad hemooxigenasa hepática (Mainess, 1984).

En estudios de inducción enzimática con bifenilos policlorados (Narbonne, 1979), flumecinol (Kulcsar, 1981), tolueno (Pyykko, 1983), acetilmetanol (Beierschmitt y col., 1984) y mirex (Ebel, 1984), se ha observado que el efecto es dependiente del sexo de los animales. Así, Kamataki y col. (1983) han demostrado que cada sexo tiene una dotación isoenzimática del cit.P-450 diferente, por lo cual poseen una susceptibilidad diferente a la inducción, represión y/o inhibición. De esta manera, Skett y Paterson (1985) observaron diferencias en la inducción enzimática del cit.P-450 por acción del fenobarbital, isosafrol y etanol. El tratamiento con etanol reduce los niveles séricos de testosterona (Badr y Bartke, 1974) y este hecho podría modificar el metabolismo de fármacos como sugiere Skett y col. (1980) (Fig. 1.20.).

Las diferencias sexuales en la cinética de los fármacos depende de la especie. Hay pocos datos clínicos al respecto, pero se ha demostrado que la $t_{1/2}$ del clordiacepóxido es casi dos veces superior en las mujeres y tres veces superior en las mujeres que usan contraceptivos orales (Roberts y col., 1979).

La capacidad para detoxificar los radicales libres parece ser más lenta en el hígado de las hembras que en el de los machos. Se supone que las hembras, probablemente, sean menos vulnerables a los fármacos que poseen una acción hepatotóxica induciendo la formación de radicales libres (Julicher y col., 1984).

1.2.1.5.- CONTROL HORMONAL DEL METABOLISMO DE FARMACOS.

Las hormonas tienen un efecto central que puede jugar un papel importante en el control del metabolismo de fármacos, particularmente las hormonas secretadas por la hipófisis, tiroides y pancreas endocrino y hormonas sexuales.

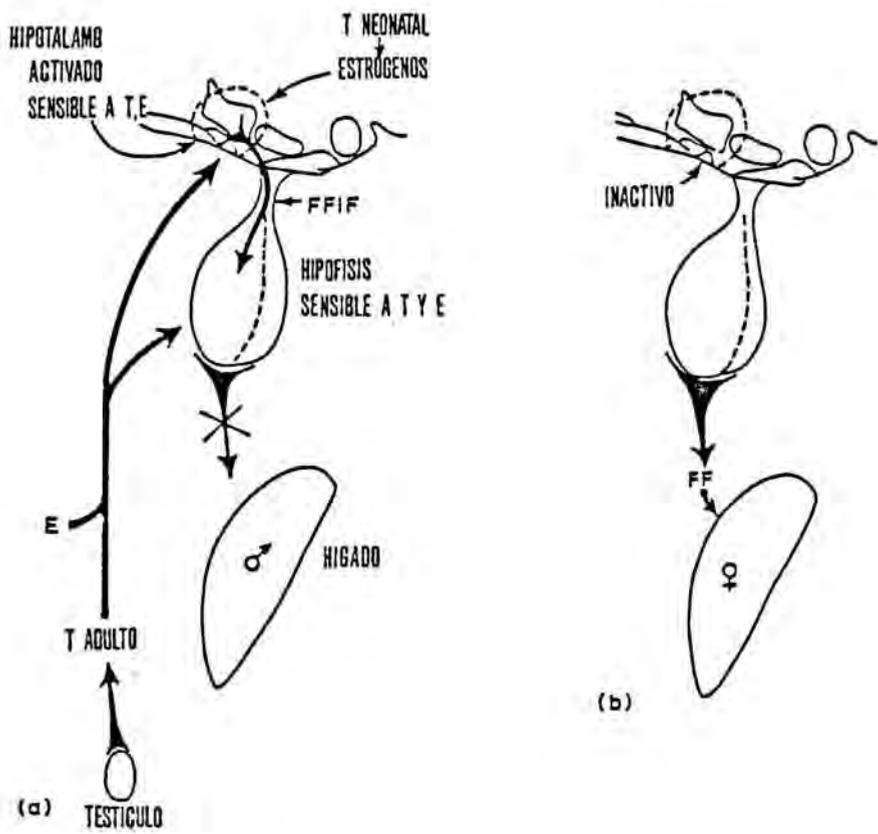


Figura 1.20. Efecto de las diferencias sexuales sobre el metabolismo de fármacos en la rata. a) macho, b) hembra. T = testosterona, E = estradiol, FF = factor feminizante.

1.2.1.5.1.-Efecto de la hipófisis sobre el metabolismo de fármacos.

El dimorfismo sexual en el metabolismo de fármacos y esteroides se ha correlacionado con los niveles de hormonas sexuales (Yates y col., 1958; De Moor y Deneff, 1968 y Gustafsson y Stenberg, 1974). Posteriormente, se observó que dichas hormonas ejercen su influencia sobre el metabolismo de fármacos a través del eje hipotálamo-hipófisis-hígado (Colby y col., 1973; Deneff, 1974 y Gustafsson y Stenberg, 1974). La secreción hipofisaria de la hormona del crecimiento es dependiente del sexo y edad del animal, y se ha demostrado que es un importante regulador del metabolismo de esteroides en el hígado de rata (Eden, 1979 y Mode y col., 1982).

La secreción de hormona del crecimiento en el macho está determinada por influencias hipotalámicas mediadas por una acción combinada de la somatostatina y un factor liberador de la hormona del crecimiento (GH) (Shaffer y col., 1984). Si se suprime esta influencia, la rata macho desarrolla una feminización de su metabolismo hepático de esteroides (Mode y col., 1980). El hígado de ratas macho puede ser feminizado por castración neonatal (Einarsson y col., 1973), por implantación de un injerto ectópico de hipófisis debajo de la cápsula renal (Eneroth y col., 1977) y por infusión de GH mediante minibombas osmóticas (Mode y col., 1981). Blanck y col. (1986) comprobaron que el eje hipotálamo-hipófisis-hígado, además de provocar la diferenciación sexual en el metabolismo de los esteroides, estimula la diferenciación

sexual del metabolismo de los fármacos.

La administración diaria de hormona luteinizante o gonadotropina coriónica humana durante 6 días, a ratas maduras, estimula la producción de testosterona por las células de Leydig (Payne y col., 1980 y O'Shaughnessy y Payne, 1982). El incremento en la producción de testosterona después de este tratamiento se correlaciona con un aumento en las actividades del cit.P-450 metabolizadoras de esteroides (O'Shaughnessy y Payne, 1982). Malaska y Payne (1984) trabajando con cultivos celulares de células de Leydig de ratón, comprobaron que la inducción del cit. P-450 al estimular la secreción de testosterona por un tratamiento con hormona luteinizante, se debía, parcialmente, a un incremento de la síntesis proteica del citocromo P-450.

Estudios con cultivos celulares de corteza adrenal de buey, han comprobado que la hormona adrenocorticotropa es capaz de estimular la inducción de la actividad enzimática del citocromo P-450 mitocondrial (Dubois y col., 1981) y microsomal (Mc Carthy y col., 1983 y Crivello y Grill, 1983).

1.2.1.5.2.- Influencia de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de fármacos.

La influencia de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de fármacos se ha indicado previamente en el apartado 2.1.4., dedicado a las diferencias en el metabolismo de fármacos debidas al sexo.

1.2.1.5.3.-Influencia del tiroides sobre el metabolismo hepático de fármacos.

Las hormonas tiroideas son fundamentales para un funcionamiento óptimo del sistema metabolizador hepático ligado al cit.P-450.

La deplección de hormonas tiroideas por extirpación quirúrgica del tiroides, produce cambios en el metabolismo de fármacos que difieren en función del fármaco estudiado y del sexo de los animales empleados.

Así, el metabolismo de la lignocaína aumenta después de la tiroidectomía en ratas macho y hembras y el metabolismo de la imipramina disminuye sólo en ratas hembras. La administración de L-tiroxina corrige los cambios mencionados (Kato, 1977).

En el hombre el estado hipertiroideo tiene un efecto estimulante sobre el metabolismo de fármacos, mientras que los pacientes hipotiroideos poseen un metabolismo inhibido (Crooks y col., 1973; Eichelbaum y col., 1974 y Vesell y col., 1975).

En función del grado de secreción hormonal de T_4 y T_3 cabe pensar que se produzcan cambios en la proporción de diferentes isoenzimas del cit.P-450 sin cambios es la cantidad de cit.P-450 total.

El metabolismo de fase II también se puede afectar por la tiroidectomía. Así, la conjugación con ácido glucurónico del α -naftol es más lenta en ratas tiroidectomizadas. Además, las hormonas tiroideas como se ha comentado anteriormente, pueden influir en la diferenciación sexual del metabolismo de fármacos.

1.2.1.5.4.- Influencia del páncreas sobre el metabolismo de fármacos.

Desde hace más de dos décadas se conoce la influencia de la diabetes sobre el metabolismo de fármacos (Dixon y col., 1961; Kato y Gillette, 1965; Reinke y col., 1978; Cook y Past, 1979 y Past y Cook, 1983) y se sabe además, que el metabolismo de fármacos en la diabetes se modifica en función del sexo (Dixon y col., 1961 y Kato y Gillette, 1965).

La diabetes inducida en rata por la estreptozotocina es un modelo experimental aceptado (Like y Rossini, 1976 y Rossini y col., 1977), aunque la estreptozotocina pueda tener otros efectos tóxicos directos sobre el hígado (Warren y col., 1983). Sin embargo, las ratas diabéticas espontáneas tienen alteraciones metabólicas similares a las provocadas por la estreptozotocina (Warren y col., 1983).

En el modelo experimental de diabetes el nivel de andrógenos disminuye en las ratas macho y el metabolismo de fármacos se reduce de forma paralela (Skett y col., 1984). recientemente, se ha comprobado que la estreptozotocina y los andrógenos ejercen su efecto sobre el metabolismo de fármacos, modificando los niveles de la hormona del crecimiento (Tannenbaum, 1981 y Gustafsson y col., 1983), tal como se ha comentado anteriormente (apartado 2.1.5.1.).

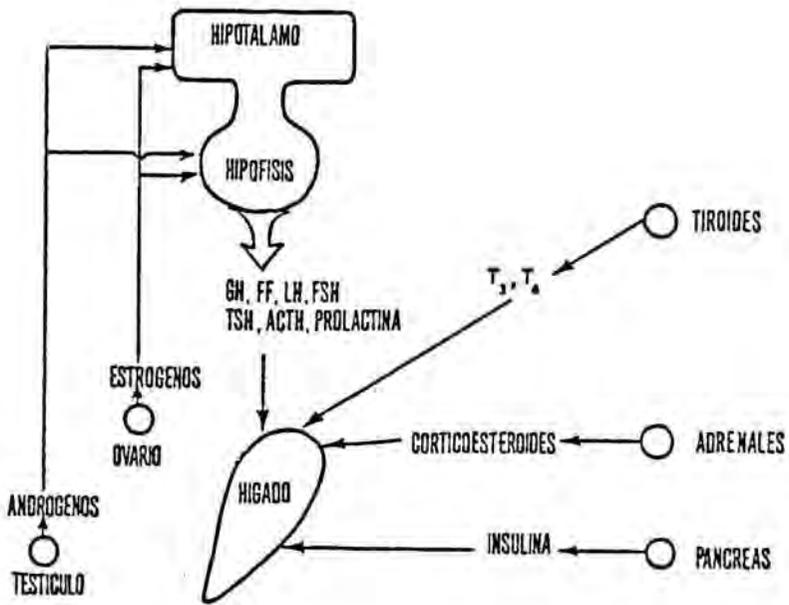


Figura 1.21. Efecto del sistema endocrino sobre el metabolismo de fármacos. GH = hormona del crecimiento, FF factor feminizante, T₃ = triiodotironina, T₄ = tiroxina.

1.2.1.5.5.- Visión integrada del efecto hormonal sobre el metabolismo hepático de fármacos.

Un resumen del posible control hormonal del metabolismo de fármacos se refleja en la figura 1.21. El tiroides, la hipófisis y las adrenales, a excepción de los andrógenos adrenales, y la insulina, actúan directamente sobre el hígado, mientras que los andrógenos y estrógenos ejercen sus efectos sobre el hígado a través de la interacción con el eje hipotálamo-hipófisis, modificando la liberación de las hormonas hipofisarias.

1.2.1.5.6.- Metabolismo hepático de fármacos y gestación.

La gestación es un estado fisiológico de las hembras en el que el sistema endocrino sufre profundos cambios.

El estudio del metabolismo de fármacos durante el embarazo en los seres humanos es difícil por las consideraciones éticas obvias, que impiden la administración de fármacos con objetivos puramente experimentales a mujeres embarazadas. Por ello la mayoría de trabajos se han realizado en animales de experimentación. En la rata, la preñez causa una disminución del metabolismo de fármacos. Estos cambios parecen ser debidos al aumento de los niveles de progesterona y sus metabolitos en sangre durante el embarazo. Este fenómeno también se observa

en los niños lactantes que reciben la progesterona de la madre a través de la leche materna, hecho que puede inhibir el metabolismo de fármacos como ha comprobado Ferrer (1979).

1.2.1.6.- EFECTO DE DIFERENTES PATOLOGIAS SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE FARMACOS.

De entre las diversas patologías que pueden influir sobre el metabolismo de fármacos, las enfermedades del hígado y del tiroides han sido las más estudiadas.

Se emplearon varios modelos experimentales de enfermedades hepáticas para estudiar la farmacocinética en estos cuadros patológicos (Van der Graaff y col., 1984 y Griffeth y col., 1984). Así, se han utilizado ratas con una desviación porto-cava, para observar las rutas metabólicas del hexobarbital y antipirina por separado (Van der Graff, 1984). De esta manera se ha comprobado que la vida media de eliminación es cuatro veces superior en las ratas con desviación porto-cava, que en las ratas control.

La disfunción hepática es una complicación de determinados traumas. Estudios, tanto "in vivo" como "in vitro", (Griffeth y col., 1984) han demostrado que el trauma conlleva una disminución del aclaramiento de fármacos por el hígado, sin cambios en los volúmenes de distribución. Esta disminución es debida a una reducción de los niveles de cit. P-450 hepático. La disminución es diferente para cada isoenzima del cit.P-450 y está

asociada con un aumento en los niveles de cit.P448 (Griffath y col., 1984).

1.2.1.6.1.- Cirrosis hepática de etiología alcohólica.

El efecto de la cirrosis alcohólica sobre el aclaramiento de la antipirina y la formación de sus metabolitos ha sido estudiado en clínica por Teunissen y col. (1984). Estos autores, observaron que el aclaramiento de la antipirina se halla reducido en la cirrosis alcohólica. La formación y aclaramiento de sus principales metabolitos se redujo. Sin embargo, la formación de todos los metabolitos no disminuyó de la misma forma, lo que sugiere una alteración selectiva, durante la cirrosis alcohólica, de los diferentes isoenzimas del cit. P-450.

El aclaramiento del metronidazol se reduce en la cirrosis y se prolonga su vida media de eliminación. Aunque en los pacientes sanos gran parte de los fármacos se recogen en la orina sin metabolizar, en los pacientes con cirrosis se producen cambios en el metabolismo del fármaco sin alterarse la funcionalidad renal (Farell y col., 1984). El glicofuranol, un solvente de algunos fármacos, también muestra una reducción en el aclaramiento y la prolongación de su vida media en la cirrosis (Burry y col., 1984). Por el contrario la farmacocinética de la ranitidina no se ve modificada por enfermedades hepáticas como la cirrosis (Okolicsanyi y col., 1984).

La cimetidina, otro inhibidor de los receptores H_2 de la histamina, ejerce un efecto inhibitorio marcado sobre el metabolismo hepático de otros fármacos, interferencia que ha sido

observada en pacientes con cirrosis. Así, la vida media plasmática de la teofilina casi se duplica en pacientes con cirrosis después de la administración de cimetidina (Guyler y col., 1984).

Las enfermedades hepáticas no sólo afectan a los enzimas encargados de metabolizar fármacos, sino que también producen cambios en la síntesis de las proteínas plasmáticas, alterando la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas. El efecto de la unión a proteínas sobre el aclaramiento de fármacos se ha estudiado usando una perfusión de hígado de rata aislado por Schary y Rowland (1984). Mediante el empleo de tolbutamida se ha comprobado que la eliminación del fármaco y la formación del principal metabolito es proporcional a la fracción de tolbutamida no unida. En la cirrosis, el verapamil se ha incluido en este grupo de fármacos (Giacomini y col., 1984). La ceftriaxona, una nueva cefalosporina, también muestra un aumento en la fracción no unida a proteínas plasmáticas durante la cirrosis. Por tanto, en los pacientes con cirrosis la dosificación deberá ajustarse para reducir la aparición de efectos adversos (Stoeckel y col., 1984 y Stoeckel y Koup, 1984). Aunque la mayor parte de fármacos se unen a la albúmina, hay otras proteínas que tienen la capacidad de unirse a fármacos y su concentración en sangre puede disminuir en la cirrosis. Un ejemplo de ello lo tenemos en la α -1-glicoproteína a la que se une la eritromicina; en pacientes con enfermedades hepáticas se ha observado un aumento de eritromicina libre en plasma (Barre y col., 1984).

1.2.1.6.2.- Hepatitis viral.

Se conoce poco sobre los efectos de la hepatitis viral sobre el metabolismo de fármacos, pero la información actual permite suponer que dicha patología causa una disminución en el metabolismo de fármacos. El aclaramiento del clordiacepóxido está disminuido en la hepatitis viral, al igual que el aclaramiento de la meperidina. El aclaramiento de la lignocaína no se modifica en la hepatitis viral, mientras que la tolbutamida exhibe un aclaramiento aumentado, por encima de los valores obtenidos en sujetos sanos.

1.2.1.6.3.- Hepatomas.

Kato y col. (1963) observaron, hace 20 años, que la implantación de un tumor sólido en un lugar distante del hígado producía una disminución de la actividad metabolizadora de fármacos (Rosso y col., 1971; Litterst y col., 1977 y Kato y col., 1982). Estos cambios incluyen una reducción en los componentes del sistema metabolizador de fármacos (Collins y col., 1982; Pucetti y col., 1982 y Schucter y Kurz, 1982), una disminución de la actividad metabolizadora de fármacos "in vitro" (Rosso y col., 1971; Litterst y col., 1977 y Kato y col., 1982), e "in vivo" (Sladek, 1972 y Beck y col., 1975). La actividad metabolizadora de fármacos se normaliza al extirparse el tumor (Boulos y col., 1971 y Rosso y col., 1971). Todas estas modificaciones no aparecen cuando lo que se implanta es un tejido normal de otro animal (Rosso y col., 1968).

Se ha demostrado que la actividad metabolizadora de fármacos no se modifica, significativamente, hasta que el tumor excede el 2 % del peso corporal y no se observa un descenso importante de la capacidad metabolizadora de fármacos (50 %), hasta que el tumor alcanza el 10 % del peso corporal (Chattopadhyay y col., 1972 y Sladek y col., 1978). Tumores sólidos de estos tamaños rara vez se presentan en el hombre, por lo que no suelen observarse cambios del metabolismo de fármacos con significación clínica. Esta hipótesis fue confirmada por Tschanz y col. (1977) en pacientes con cancer de pulmón. Sin embargo, trabajos clínicos recientes han comprobado que los tumores sólidos que metastatizan al hígado, aunque provengan de un tumor pequeño, pueden producir un descenso importante de la actividad metabolizadora de fármacos.

1.2.1.6.4.- Porfiria.

Las porfirias constituyen un conjunto de alteraciones del metabolismo de las porfirinas, precursoras del grupo hemo. En el caso concreto de las porfirias hepáticas, la alteración enzimática se sitúa a nivel del enzima ALA sintetasa, por lo cual la porfiria puede cursar con trastornos del metabolismo de fármacos al reducirse la síntesis del cit.P-450 (Prescott, 1975).

1.2.2.- FACTORES EXTERNOS.

Son numerosos los factores externos al organismo que pueden tener una profunda influencia sobre el metabolismo de fármacos. El organismo puede estar expuesto a estos factores de forma continuada ó accidental. Los factores externos los podemos dividir en factores dietéticos y factores ambientales.

Factores dietéticos	Factores ambientales
Proteínas	Derivados del petróleo
Grasas	Productos de pirólisis
Carbohidratos	Metales pesados
Vitaminas	Insecticidas
Minerales esenciales	Herbicidas
Minerales trazas	Contaminantes industria
Alcohol	Tabaco
	Temperatura

1.2.2.1.- FACTORES DIETETICOS.

El estado nutricional de un individuo y la ingesta de nutrientes es importante para la regulación del metabolismo de xenobiontes y su eliminación. Los siguientes ejemplos ilustran el efecto del estado nutricional sobre los componentes enzimáticos y los cofactores celulares encargados del metabolismo de los fármacos.

1.2.2.1.1.- Proteínas.

En animales de experimentación se ha demostrado que el cociente proteínas/carbohidratos, en dietas adecuadas calóricamente, afecta al metabolismo de fármacos. Cuando la calidad o la cantidad de las proteínas de la dieta disminuye, el cit.P-450 y el cit.P-450 reductasa reducen su funcionalidad, disminuyendo, por tanto, la capacidad para metabolizar la etilmorfina, anilina e hidrocarburos heptaclorados y arílicos (Campbell y Hayes, 1976; Hietanen, 1980); En estas condiciones la toxicidad del pentobarbital, fenacetina y zoxazolamina aumenta (Kato y col., 1968). La disminución del metabolismo por conjugación, debido al déficit proteico, contribuye a aumentar la toxicidad de estos fármacos.

El déficit proteico disminuye la cantidad de cisteína disponible para la síntesis de PAPS y GSH. Así, los niveles de glutatión se reducen durante un déficit proteico (Glazenburg y col., 1983). Además, una dieta baja en proteínas sin suplementar con cisteína, metionina y sulfato provoca un rápido descenso (50 %) de la excreción urinaria de sulfato (Krijgheld y col., 1981). Por el contrario, durante períodos de restricción proteica, las actividades de la epóxido hidratasa y TGT se incrementan (Campbell y Hayes, 1976; Hietanem, 1980; Woodcock y Wood, 1971).

Sonawane y col. (1983) comprobaron, experimentalmente, que la malnutrición proteica de la madre modifica el metabolismo postnatal de fármacos. En un trabajo posterior, Sonawane y col.

(1983) sugirieron que el aporte proteico en la dieta perinatal influenciara el metabolismo de fármacos en el estado de adulto. Es interesante remarcar que el déficit en proteínas se ha asociado con una disminución, pero no con una ausencia de las actividades metabolizadoras de fármacos. Estos cambios quizás se deban a alteraciones en algunos isoenzimas del sistema microsomal hepático.

En estudios clínicos, se ha observado que dietas ricas en proteínas no modifican el metabolismo de fármacos, pero si lo hacen dietas con déficit proteico, dando lugar a una disminución del metabolismo de la teofilina y antipirina (Kappas y col., 1976; Anderson y col., 1979 y Anderson y col., 1982).

1.2.2.1.2.- Lípidos.

La integridad de la membrana microsomal es esencial para mantener la funcionalidad de la interacción entre el citocromo P-450 y la cit.P-450 reductasa. En estudios, en donde se reconstituye el sistema enzimático microsomal, la inclusión de fosfatidilcolina es determinante para obtener una actividad metabolizadora de fármacos máxima (Strobel y col., 1970); Sin este componente en la dieta, los lípidos de la membrana microsomal se saturan. La administración de una dieta exenta de ácidos grasos ó con ácidos grasos saturados, no afecta los niveles de cit.P-450 reductasa, pero disminuye los de cit.P-450 y algunas de sus actividades (Marschall y McLean, 1971 y Norred y Wade, 1972). La inclusión en la dieta de ácidos grasos

poliinsaturados, no sólo incrementa la actividad del sistema metabolizador de fármacos, sino que puede actuar induciendo al cit. P-450 y sus actividades. También se ha comprobado que la ingestión de lípidos deficitarios en vitamina E puede causar una disminución de la capacidad metabolizadora de fármacos (Rowe y Wills, 1976).

Los estudios clínicos sobre el efecto de la ingesta de lípidos insaturados sobre el metabolismo de fármacos no han aportado resultados significativos en ningún sentido (Anderson y col., 1979 y Mucklow y col., 1980).

1.2.2.1.3.- Hidratos de carbono.

Dietas ricas en sacarosa, glucosa o fructosa producen la disminución del metabolismo de varios fármacos e incrementan el tiempo de sueño inducido en el ratón por barbitúricos (Strother y col., 1971). Este efecto lo observaron Boyd y col. (1970) al comprobar que la toxicidad de la bencilpenicilina se veía potenciada por dietas enriquecidas en sacarosa.

Estudios recientes llevados a cabo en ratas han demostrado que el metabolismo oxidativo de fármacos se halla reducido en los animales que han sido alimentados con una dieta enriquecida en hidratos de carbono y administrada parenteralmente, cuando se compararon con los resultados obtenidos mediante ingestión enteral de la misma dieta y en las mismas condiciones (Knodell y col., 1984). Sin embargo, Pantuck y

col. (1985) indican que estos datos no son extrapolables en clínica.

1.2.2.1.4.- Vitaminas.

Las vitaminas hidrosolubles y las liposolubles tienen efectos diferentes sobre el sistema metabolizador de fármacos en animales de experimentación.

- Vitamina A.

La disminución de la vitamina A almacenada produce un descenso de los niveles de cit.P-450 y una variación de las actividades del sistema microsomal metabolizador de fármacos, lo cual sugiere que la deficiencia de retinol tiene un efecto generalizado sobre el metabolismo de xenobiontes (Colby y col., 1975 y Miranda y col., 1979). Estas alteraciones metabólicas tienen lugar antes de la aparición de cualquier otra sintomatología del déficit de vitamina A. Becking (1973) comprobó que, aunque las actividades N-hidroxilasa y N-demetilasa se reducen en las ratas alimentadas sin vitamina A durante 20-25 días, la actividad reductasa no varía; asimismo, los niveles de proteínas microsomales y la actividad del cit. P-450 reductasa no se modifican, mientras que disminuyen los niveles de cit.P-450 Becking (1973) indicando la posibilidad de que la vitamina A no actúa directamente sobre el sistema microsomal hepático, sino que afecta a la estructura de la membrana del retículo

endoplasmático, que es la matriz sobre la que se sitúa. Con anterioridad Roels y col. (1969) ya habían propuesto esta hipótesis.

Por el contrario, dietas con un contenido elevado en vitamina A pueden alterar el metabolismo de fármacos, incrementando las actividades anilina p-hidroxilasa y O-demetilasa de la 7-etoxicumarina (Miranda y Chhabra, 1981).

- Complejo de vitaminas B.

La deficiencia de una o varias vitaminas del complejo B puede afectar a isoenzimas específicos del cit.P-450, al igual que a la glutamiltranpeptidasa (Miltenberger y Oltersdoef, 1978). Este efecto se debe a su importante papel en la regulación del metabolismo energético de la célula.

El déficit en tiamina produce un aumento en los niveles del cit.P-450 y en el metabolismo del paracetamol, anilina y aminopirina (Grosse y Wade, 1977; Wade y col., 1976; Omaye y col., 1981 y Ruchirawat y col., 1981). El aporte de vitamina B₁ restablece el metabolismo de fármacos a sus valores normales.

Dosis elevadas de tiamina causan una disminución de los niveles del cit.P-450 y del cit.P-450 reductasa y simultáneamente reducen el metabolismo de la anilina y la aminopirina, pero no ejercen efecto alguno sobre la hidroxilación del hexobarbital (Grosse y Wade, 1971 y Wade y col., 1976).

Wade y col. (1973) han sugerido que una dieta deficitaria en vitamina B₁ podría disminuir la cantidad de algunos isoenzimas del cit.P-450 análogos al P₁-450 de Sladek y Mannering (1969). La afinidad y el metabolismo elevado de la anilina, la no modificación de la oxidación del hexobarbital y la cantidad elevada de P₁-450, hicieron postular a Wade y col. (1973), que la tiamina produzca un fenómeno análogo a la inducción enzimática provocada por el 3-metil colantreno (3MC) (Sladek y Mannering, 1969).

El déficit dietético de riboflavina tiene un efecto directo sobre la NADPH cit.P-450 reductasa, la cual contiene un mol de FMN y otro de FAD. Al suplementar la dieta con riboflavina se recuperan los niveles disminuidos de FAD (Yang, 1974). La pérdida de la actividad de la cit.P-450 reductasa es paralela a la disminución del metabolismo de la anilina, aminopirina y etilmorfina. Sin embargo, los niveles de cit.P-450 aumentan. La preincubación del sistema metabolizador de fármacos con FMN ó FAD regenera la actividad reductasa y las actividades asociadas con el sistema microsomal hepático (Hara y Taniguchi, 1982).

Levy y Di Palma han observado que el déficit dietético de niacina produce un incremento en la respuesta al tiopental y sugieren que la reducción parcial de NADPH necesario para el metabolismo del barbitúrico, podría ser la responsable de dicho efecto.

En el cobayo, la deficiencia de vitamina C en su dieta produce un cambio progresivo en la composición del sistema

microsomal metabolizador de fármacos. Durante los primeros 10-12 días de déficit, no se producen alteraciones en los niveles de la cit.P-450 reductasa ó del cit.P-450, pero la capacidad de hidroxilar fármacos se encuentra disminuída. Después de 21 días, necesarios para producir un déficit de vitamina C, tanto los niveles de cit.P-450 como los de cit.P-450 reductasa disminuyen al igual que las reacciones de N- y O-dealquilación (Kuenzig y col., 1977; Sikic y col., 1977; Zannoni y col., 1977 y Rikans, 1982).

Se han llevado a cabo numerosos trabajos para determinar el mecanismo por el cual la vitamina C disminuye los niveles de cit.P-450. Luft y col. (1972) demostraron que la vitamina C interviene en la biosíntesis del grupo hemo del citocromo P-450.

El déficit en vitamina E disminuye las actividades del cit.P-450, y de manera concreta las reacciones de N-dealquilación (Carpenter, 1972 y Horn y col., 1976). Los niveles de cit.P-450 y la cit.P-450 reductasa no se modifica y sus actividades se inducen, normalmente, con fenobarbital y 3-metilcolantreno. Si la dieta se suplementa con vitamina E durante 48 horas se pueden recuperar las actividades normales del cit.P-450. Este efecto indica la posibilidad de que la vitamina E forma parte de la matriz lipídica microsomal, participando en la transferencia de electrones entre el cit.P-450 reductasa y el cit.P-450. Por ello, se considera que esta vitamina debe de formar parte de las matrices lipídicas artificiales, al reconstituir el sistema enzimático metabolizador de fármacos.

1.2.2.1.5.- Minerales.

Los minerales son elementos necesarios para mantener un buen estado de salud. De entre ellos, se ha demostrado que afectan al metabolismo de fármacos, el calcio, el magnesio, el potasio, el hierro, el zinc, el cobre y el yodo.

Dingell y col. (1966) observaron que ratas sometidas a dietas deficitarias en calcio durante 40 días, sufren una disminución de la oxidación del hexobarbital y la aminopirina.

La hipomagnesemia suele coexistir, simultáneamente, con una hipocalcemia (MacIntyre, 1967). Becking y Morrison (1970) demostraron que las dietas deficitarias en magnesio producen una reducción de las actividades enzimáticas, más intensa que la causada por el déficit de calcio. Los niveles de cit.P-450 también se reducen por la falta de magnesio. Peters y Fouts (1970a y 1970b) observaron que, "in vitro", el magnesio altera la estructura de la membrana microsomal, permitiendo una unión mejor entre el cit.P-450 y el sustrato y facilitando así un flujo de electrones mayor.

El déficit en potasio produce cambios en el efecto o en la vida media de numerosos fármacos. Sin embargo, se ha observado que su acción se debe a modificaciones en la eliminación renal y no a cambios producidos en el metabolismo de

fármacos.

Catz y col (1970) comprobaron que un déficit crónico de hierro en ratones adultos aumentaba la capacidad metabolizadora de fármacos, pero no variaba, significativamente los niveles de cit.P-450. Por el contrario, un exceso de hierro en la dieta puede inhibir el metabolismo de fármacos.

Los niveles de hierro en el hígado están relacionados con la lipidoperoxidación dependiente de NADPH (Wills, 1972). La lipidoperoxidación dependiente de hierro, produce la degeneración de la membrana del reticuloendoplasmático, lo cual conlleva una disminución de las actividades microsomales de hidroxilación (Wills, 1969) y demetilación (Wills, 1972).

Se ha comprobado que al añadir hierro en forma de ferritina a suspensiones de microsomas, las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa disminuyen.

El déficit de zinc puede causar alteraciones en algunas actividades del sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos (Becking y Morrison, 1970), efecto que se debe a la disminución de los niveles del cit.P-450.

Moffitt y col. (1972) demostraron que en la rata el pentobarbital produce un incremento en el contenido de cobre en la fracción microsomal y produce, por tanto, alteraciones en las actividades enzimáticas de dicha fracción. Estos estudios han sido corroborados, posteriormente, por otros autores (Fahin y

col. 1970; Lal y Sourkes, 1970 y Hilderbrand y col., 1972). Tanto el exceso como el déficit de cobre da lugar a una disminución de las actividades microsomaes metabolizadoras de fármacos (Moffitt y Murphy, 1973). Los cambios en las cantidades de cobre parecen producir alteraciones en la estabilidad oxidativa de los lípidos de membrana, lo que podría explicar su efecto sobre el metabolismo de fármacos, al variar la composición de los ácidos grasos de las membranas microsomaes.

Las hormonas tiroideas regulan los niveles de flavinas hepáticas (Riulin y Longdon, 1966). Este hecho hizo sugerir a Catz y col. (1970) que una carencia dietética de yodo podría afectar el metabolismo microsomal de fármacos. Hoy día se ha demostrado que el déficit de hormonas tiroideas disminuye el metabolismo de los sustratos tipo I y II (Suzuki y col., 1967; Kato y Takahashi, 1968 y Brunk y col., 1969). Sin embargo, el déficit de yodo en ratones a los que se administra propiltiouracilo, un inhibidor del tiroides, causa un incremento en el metabolismo microsomal de la aminopirina, hexobarbital y anilina, entre otros. Hoy por hoy no se ha formulado ninguna hipótesis que ayude a clarificar estos efectos.

1.2.2.2.- FACTORES AMBIENTALES

1.2.2.2.1.- Tabaco y metabolismo de fármacos.

Fumar es un factor de riesgo de cancer de pulmón ya que el humo del tabaco contiene muchos compuestos carcinogénicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wynder y Hoffman, 1967), los cuales son metabolizados por acción de la actividad aril hidrocarbono hidroxilasa del cit.P-450 (AHH), a intermediarios epoxidados. Los epóxidos son posteriormente metabolizados, por acción de la epóxido hidratasa, a dihidrodioles, o bien, por medio de la glutatión-S-transferasa son conjugados con glutatión o convertidos no enzimáticamente a fenoles (Sims y Grover, 1974). Los dihidroles y fenoles son conjugados con el ácido UDP-glucurónido (Nemoto y Gelboin, 1976). Los dihidrodioles pueden ser, a su vez, metabolizados por la actividad AHH a diolepóxidos (Sims y col., 1974). Epóxidos y diolepóxidos pueden reaccionar covalentemente con macromoléculas, siendo mutagénicos o causando transformaciones celulares o cáncer en los animales de experimentación (Huberman y col., 1976 y Bresnick y McDonald, 1977).

Se ha comprobado que la inhalación de humo de tabaco induce la actividad AHH en el pulmón de diversas especies (Abramson y Hutton, 1975; Uotila y col., 1977 y Van Cantfort y Gielen, 1977), también en los macrófagos alveolares y en la placenta de fumadores (Nebert y col., 1969 y Cantrell y col., 1973). La existencia de una relación entre la inducción de la actividad AHH y la aparición de ciertos tipos de cáncer ha

conferido gran importancia a este enzima (Kouri y col., 1973).

Khanduja y col. (1985) han confirmado que la exposición de ratas y ratones a humo de tabaco induce la actividad microsomal AHH en el pulmón y el hígado; También eleva los niveles de cit.P-450 y las actividades UDP-glucuronil transferasa y glutatión-S-transferasa. Cuando la exposición se prolonga durante varias semanas se llegan a incrementar los niveles de glutatión. Todo ello aumenta la formación de metabolitos activos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos que tienen un efecto carcinogénico.

1.2.2.2.2.- Contaminantes ambientales y su efecto sobre el metabolismo de fármacos.

En los estudios de De Waide (1970 y 1971) se observó una variación estacional en la actividad enzimática metabolizadora de fármacos en especies de peces procedentes del Rin. En los peces recogidos en verano se comprobó que la actividad N-demetilasa aumentaba alrededor del 100 %. Esta diferencia no se explica por cambios en el contenido proteico de la fracción microsomal o variaciones en la temperatura del agua. El aumento en la concentración de agentes químicos inductores enzimáticos en el agua es la causa de las modificaciones del metabolismo de fármacos.

Algunas especies marinas sufren una inducción de su metabolismo de fármacos por agentes polucionantes como los

derivados del petróleo, los aceites y los bifenilos policlorados (PCB) (Yarbrough y Chambers, 1977). Se ha observado un aumento de hasta el 400 % en la actividad AHH debida a los compuestos anteriormente citados (Payne y Penrose, 1975).

Yawetz y col. (1978) han observado un efecto idéntico en varias especies de pájaros al mismo tiempo que constataban que tanto el DDT como los PCBs se acumulan en los tejidos.

La exposición ocupacional crónica a ciertos agentes químicos como el DDT, los PCBs, los hidrocarburos policíclicos, y otros, pueden alterar la actividad enzimática metabolizadora de fármacos en los seres humanos (Vesell, 1980). Aunque sólo se ha hecho un estudio detenido con algunos de estos agentes, se sabe que la exposición crónica a compuestos orgánicos liposolubles induce el metabolismo de fármacos. Por el contrario, la exposición al plomo inhibe las actividades metabolizadoras de fármacos. El efecto de estos agentes depende de la dosis diaria y del tiempo total de exposición.

1.2.2.2.3.- Temperatura ambiental y metabolismo de fármacos.

Se ha observado que la temperatura ambiental modifica la actividad enzimática metabolizadora de fármacos. De Waide (1970) observó que las truchas mantenidas a 5°C durante 2 semanas tienen una actividad hidroxilasa y N-demetilasa dos veces superior a la que poseían las truchas que se mantuvieron a 18°C.

En experimentos similares realizados con hamsters y ratas, mantenidos a temperaturas de 5°C y 23°C, las diferencias en sus actividades metabolizadoras de fármacos fueron de hasta un 150 %

2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- MATERIAL

2.1.1.- REACTIVOS BIOLÓGICOS

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley de ambos sexos y pesos comprendidos entre 100 y 250 g, procedentes del estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. En un experimento se han utilizado ratones albinos Swiss hembras de 18 a 22 g de peso, procedentes de Interfauna Iberica S.A.

Hasta el momento de realizar los ensayos, los animales se mantuvieron con agua y una dieta estándar (UAR-A-04) para rata-ratón "ad libitum", elaborada de acuerdo con las normas del "National Research Council" y del "Bureau National d'Alimentation", de acuerdo con la siguiente composición:

Glúcidos.....	58 %
Proteínas.....	17 %
Lípidos.....	3 %
Celulosa.....	5 %
Minerales.....	5 %
Humedad.....	12 %
Cobre.....	29 mg/kg
Zinc.....	85 mg/kg

Los animales estuvieron alojados en jaulas de material plástico (Makrolon) de 524 x 274 x 150 mm, por lo menos una semana antes de empezar el experimento, para su habituación. Cada jaula albergó un máximo de diez animales del mismo sexo y edad. La temperatura del estabulario se mantuvo constante a $22 \pm 2^{\circ}$ C y la humedad del mismo entre 40 y 60 %, con un ritmo circadiano de

luz de 12 h (desde las 6 h a las 18 h).

2.1.2. REACTIVOS BIOQUIMICOS

- Acido etilendiaminotetraacético Na₂ (Carlo Erba, ref. 405491)
- Acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Fluka, ref. 43760)
- Acido 2-tiobarbitúrico (Fluka, ref. 88481)
- Acido tricloroacético (Merck, ref. 807)
- Adenosin 5'-difosfato (Boehringer, ref. 102164)
- Adenosin 5'-monofosfato (Sigma, ref. 1752)
- Albúmina bovina (Merck, ref. 12018)
- Aminopirina (Sigma, ref. D-8015)
- Anilina (Merck, ref. 1261)
- Citrato sódico (Merck, ref. 6448)
- Cloruro de calcio (Merck, ref. 2388)
- Cloruro de hierro (III) (Merck, ref. 3943)
- Cloruro de magnesio (Carlo Erba, ref. 479687)
- Cloruro de sodio (Merck, ref. 6404)
- Ditionito sódico (Merck, ref. 6507)
- Eter etílico (Merck, ref. 923)
- Formaldehido (Merck, ref. 4001)
- Glicerina (Merck, ref. 4096)
- Glucosa 6-fosfato Na₂ (Fluka, ref. 49280)
- Glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa (Merck, ref. 49280)
- Glutation reducido (Merck, ref. 4090)
- Hidróxido de Bario (Carlo Erba, ref. 322007)
- HEPES (Sigma, ref. H3375)

- Malondialdehído tetraetilacetal (Fluka, ref. 86570)
- Monóxido de carbono
- NADP Na₂ (Boehringer Man., ref. 1088250)
- Nicotinamida (Merck, ref. 24541)
- Nicotinamida adenin-dinucleótido-trifosfato (Merck, ref. 24541)
- O-Cresol (Merck, ref. 809692)
- p- Aminofenol (Merck, ref. 800421)
- Fosfato de hierro (III) (Merck, ref. 3923)
- Reactivo A de Lowry: solución al 2 % de carbonato sódico en hidróxido sódico 0.1 N.
- Reactivo B de Lowry: 100 ml del reactivo A con 2 ml de una solución de sulfato cúprico al 0.5 % y 2 ml de una solución de tartrato sódico potásico al 1 %.
- Reactivo C de Lowry: reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck ref. 9001) diluido al 50 % con agua destilada.
- Reactivo de Nash: 30 g de acetato de amonio (Merck ref. 1116) y 0.4 ml de acetilacetona (Carlo Erba ref. 400305) en agua destilada
- Rojo Ponceau S (Carlo Erba, ref. 476981)
- Sacarosa (Sigma, ref. S-9378)
- Semicarbazida HCl (Merck, ref. 7722)
- Sulfato de cobre (III) (Merck, ref. 2791)
- Sulfato de Zinc (Carlo Erba, ref. 394007)
- Tetracloruro de carbono (Merck, ref. 2208)
- Tricloruro férrico hexahidratado (Merck, ref. 3943)

2.1.2.1. SOLUCIONES

- Solución salina amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4
- Solución salina amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4
- Solución amortiguadora barbital pH 8.6, fuerza iónica 0.08
- Solución de ácido clorhídrico 1 N
- solución de ácido tricloroacético al 20 %
- solución de rojo Ponceau al 0.5 % en ácido tricloroacético al 5 % .
- Solución transparentadora: agua destilada, metanol, ácido acético y alcohol-dicetona en la proporción 500:350:70:80, respectivamente
- Excipiente para la suspensión de fármacos: carboximetilcelulosa 0.1 % y Tween 80 al 0.1 % .

2.1.3.- FARMACOS

A lo largo de este trabajo en los tratamientos farmacológicos se han utilizado la indometacina y la dexametasona.

2.1.3.1.- INDOMETACINA

La indometacina, (ácido 1-(p-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-indol-3-acético) (Fig. 2.1.) , es un inhibidor reversible de la ciclooxigenasa y por consiguiente, de la síntesis de prostaglandinas. Este es uno de los principales mecanismos postulados para explicar su actividad farmacológica (Ferreira y Vane, 1974). Los trabajos de Smith y Willis (1971) y Vane (1974) reconocen a la indometacina como uno de los antiinflamatorios no esteroideos con mayor capacidad para inhibir a la prostaciclín-sintetasa. Recientemente, Wu y Mathews (1983) han comprobado que la indometacina no sólo inhibe la producción de PGs, sino también la producción de 12 HETE (al inhibir la peroxidasa) y de sustancias reactivas de la anafilaxis como los leucotrienos, mediante la inhibición de la glutatión-S-transferasa (fig 2.2.). Las inhibiciones mencionadas pueden explicar el hecho de que la indometacina impida la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio (Ford-Hutchinson y col., 1977). Robinson, Tashjan y Levine (1975) descubrieron que las ratas artríticas poseen en el líquido sinovial una sustancia con una acción estimulante muy intensa de la reabsorción del hueso, sustancia que, sin embargo desaparece, "in vitro", con el tratamiento con indometacina.

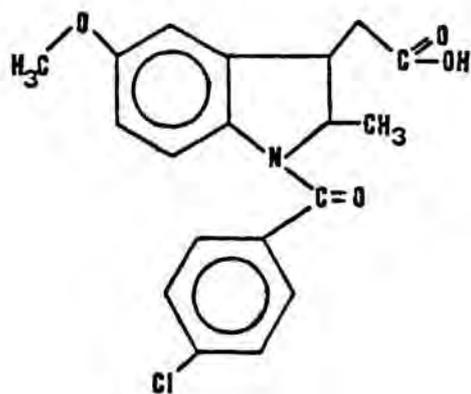


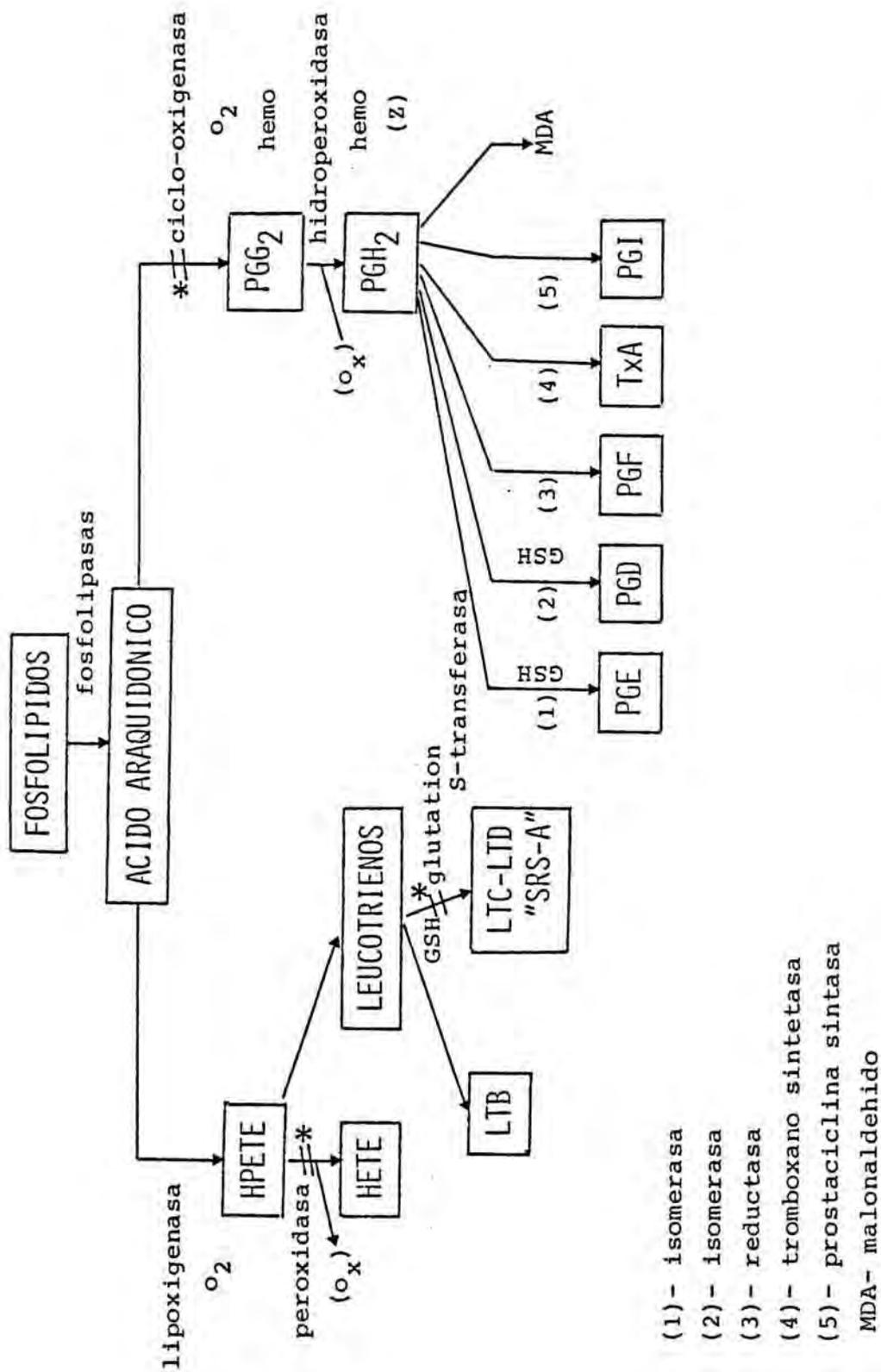
Figura 2.1. Estructura química de la indometacina.

Weiss y Wait (1977) observaron, "in vitro", que la indometacina inhibe la fosfodiesterasa y aumenta los niveles de AMPc intracelular, lo que conducirá a una estabilización de la membrana celular de los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. Este hecho fue comprobado por Damas y Bourdon (1982) al demostrar que la indometacina provoca una disminución en la liberación de enzimas lisosomales y radicales libres superóxido e hidroxilo (Koch-Weser, 1980). Del mismo modo, Punzi y col. (1982) demostraron que la indometacina aumenta los niveles de AMPc en el fluido sinovial y ello conlleva una acción antiflogística, al inhibir la liberación de enzimas lisosomales de los PMN durante la fagocitosis (Weissmann y col., 1971) y al disminuir la activación de los linfocitos T y secreción de linfoquinas (Bourne y col. 1974).

La indometacina, tanto en la rata como en el hombre, se absorbe rápidamente, alcanzándose los niveles plasmáticos máximos entre 20 min y 2 h después de la administración oral. La vida media es dosis dependiente, oscilando entre 2.5 y 11 h (Alvan y col., 1975; Rimbau y Forn, 1983).

Este fármaco circula fijado a las proteínas plasmáticas en un 90 %. Zini y col. (1979) demostraron que hay dos tipos de lugares de unión de la indometacina a la albúmina, pero sólo uno de ellos es de alta afinidad ($K_m = 10$) para fármacos ácidos como la indometacina.

Sus efectos adversos son dosis dependiente (Boarman y Hait, 1967). Se producen alteraciones gastrointestinales como náuseas, anorexia, dolor abdominal y úlceras pépticas; también se



- (1) - isomerasa
 - (2) - isomerasa
 - (3) - reductasa
 - (4) - tromboxano sintetasa
 - (5) - prostaciclina sintetasa
- MDA - malonaldehido

* - lugares de acción de la indometacina en la cascada del ácido araquidónico.

Figura 2.2. Esquema de los lugares de acción de la indometacina en la cascada del ácido araquidónico.

ha descrito la producción de diarreas y pancreatitis aguda. Asimismo, puede causar neutropenia, trombocitopenia y con menor frecuencia anemia. A dosis elevadas actúa sobre el sistema nervioso central produciendo vértigo, dolor de cabeza y confusión mental (Baber y col., 1974).

Hasta ahora su efecto sobre el hígado no ha sido apenas descrito, aunque se ha observado que a niveles terapéuticos, la indometacina produce una disminución en la síntesis de albúmina y de alfa-glucoproteínas (Jamieson y Kutryx, 1980 y Jamieson y col., 1982).

En nuestros experimentos hemos utilizado indometacina a dosis profilácticas o terapéuticas de 1 mg/kg/día, por vía oral, administrada de 10 a 11 de la mañana, como suspensión extemporánea en carboximetilcelulosa (CMC) al 0.1 % y Tween 80 al 0.1 % .

2.1.3.2.- DEXAMETASONA

La dexametasona (DXT) (Fig. 2.3.) es un glucocorticoide esteroideo con efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. La capacidad de la DXT para producir sus efectos biológicos depende de una serie de factores relacionados con el transporte del fármaco a través de la membrana celular hacia el núcleo y por la unión a un receptor citoplasmático y del núcleo (Baxter y Tomkins

1970 y 1971; Rousseau y col., 1972 y Gehring y Tomkins, 1974). Una vez la DXT ha llegado al núcleo se une al DNA y puede iniciar la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Thompson, 1976), mediadores de sus efectos biológicos.

Aunque sus mecanismos de acción no se conocen totalmente, numerosos estudios indican que alguno de sus efectos (antiinflamatorios) se debe a la inhibición de la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Flower y Blackwell, 1976; Nijkamp y col., 1976 y Danon y Assouline 1978). Este efecto de la DXT se debe a que el fármaco es capaz de inducir la síntesis de una proteína no dializable e inhibidora de la fosfolipasa (Blackwell y col., 1980; Hirata y col., 1980; Blackwell y col., 1982) y por tanto, impide la liberación y degradación de los fosfolípidos de membrana. Se ha observado que la DXT y otros glucocorticoides son capaces de inducir dicha proteína anti-fosfolipasa en diferentes tipos de células como: las células renales (Cloix y col., 1983), células del timo (Gupta y col., 1984), leucocitos polimorfonucleares (Hirata y col., 1980) y macrófagos peritoneales (Blackwell y col., 1980 y 1982).

La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por la DXT contribuye a explicar su efecto antiinflamatorio, pero se ha demostrado que la DXT puede ejercer este efecto al ser capaz de inhibir otros mediadores de la inflamación, como la colagenasa (Wahl y Wahl, 1985). También se ha demostrado que la DXT inhibe la fagocitosis en cultivos de macrófagos peritoneales (Grasso y col., 1981, 1982 y 1983). La supresión de esta función de los macrófagos es inhibida por los glucocorticoides esteroideos pero

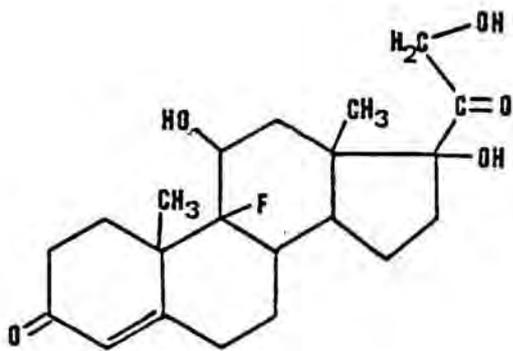


Figura 2.3. Estructura química de la dexametasona.

no por los antiinflamatorios no esteroideos a concentraciones farmacológicas. En estos experimentos, "in vitro", la respuesta inhibitoria de la DXT es dosis dependiente y su efecto máximo tiene lugar a concentraciones de 10^{-6} M.

La DXT inhibe la fagocitosis, impide la estimulación de los macrófagos por microorganismos, adyuvantes, procesos inflamatorios, etc.; esta acción frena la liberación de la interleukina 1 e impide sus efectos, que se recogen en la figura 2.4. Boudy y Bodel, (1971) han demostrado que la DXT puede reducir la producción de Interleukina 1 (IL1), "in vitro e in vivo", mientras que la indometacina sólo es capaz de inhibir la liberación de prostaglandinas ocasionadas por la IL1.

La DXT también inhibe la división celular de los macrófagos aunque el mecanismo por el que se produce no se conoce. Se cree que la supresión de la división de los macrófagos y la fagocitosis de levaduras pueda deberse a una disminución en la fluidez de la membrana de los macrófagos, que es necesaria para ambos procesos. Así, la proteína anti-flogística inducida por la DXT inhibiría la unión de los fosfolípidos a las membranas lo cual podría afectar su fluidez.

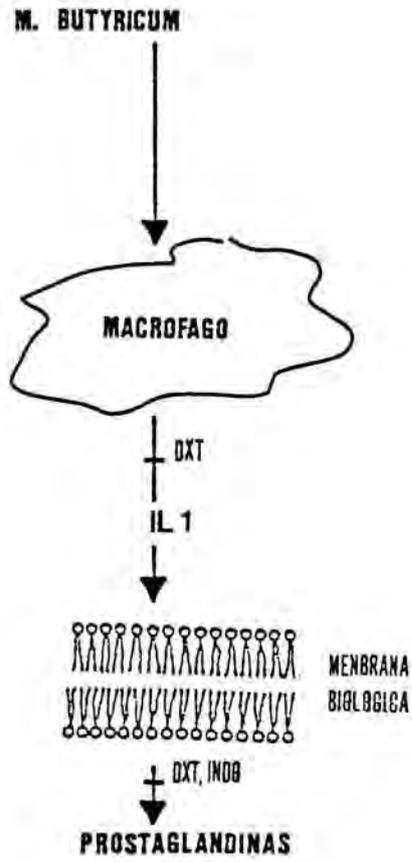


Figura 2.4. Efecto de la dexametasona sobre los mediadores de la inflamación.

2.2.- METODOS

2.2.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE AISLAMIENTO MICROSOMAL

Se han puesto a punto dos métodos para la separación de la fracción microsomal, comparándose su sencillez, sensibilidad y reproductibilidad inter e intraensayo. Estos dos métodos han sido: el método de ultracentrifugación y el de precipitación de los microsomas con cloruro de calcio (Fig 2.5.).

Este experimento se realizó con hígado de ratas Sprague-Dawley, machos, de peso entre 200-250 g. Dichas ratas se dividieron en dos grupos, uno control y otro tratado con CCl_4 (10 ml/Kg de una solución en aceite de oliva al 50 %, i.p). El sacrificio se realizó 24 h después de un día de tratamiento.

Los hígados se lavaron y homogeneizaron con solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4. El homogeneizado resultante se centrifugó a 9.000 g durante 20 min. El sobrenadante postmitocondrial se separó en dos alícuotas a partir de las cuales se continuó el proceso de aislamiento de la fracción microsomal.

2.2.1.1.- AISLAMIENTO POR ULTRACENTRIFUGACION.

Una alícuota de la fracción postmitocondrial se centrifugó durante 60 min a 105.000 g con una ultracentrífuga Beckman L5-65B, rotor Ty-40. Se recogió el precipitado microsomal y se homogeneizó con solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH

ULTRACENTRIFUGACION

PRECIPITACION CON
CLORURO DE CALCIO

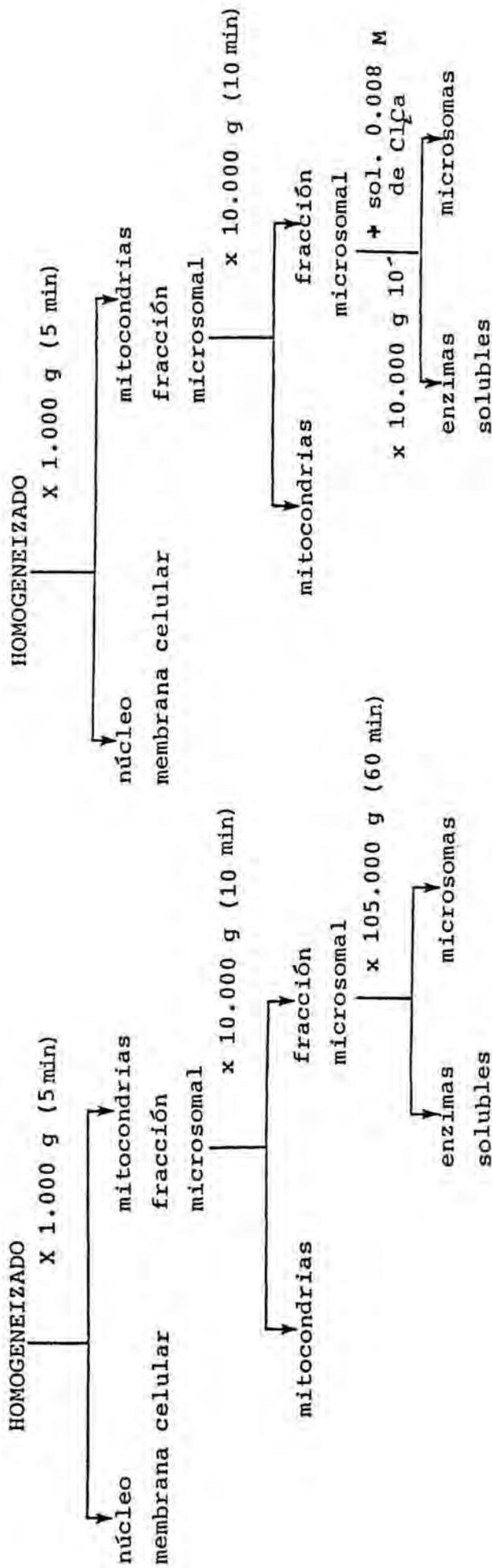


Figura 2.5. Esquema comparativo de los métodos de aislamiento de la fracción microsomal por las técnicas de ultracentrifugación o agregación con CaCl_2 .

7.4 y 1.15 % de KCl, en la proporción de 1 ml de solución amortiguadora por cada 0.25 g de hígado inicial. Todo el proceso se realizó a 4°C.

2.2.1.2.- AISLAMIENTO POR PRECIPITACION CON CLORURO DE CALCIO.

Este método es original de Kamath y col. (1971) y fué aplicado por Kupfer y Levin (1972) al aislamiento de la fracción microsomal para el estudio del metabolismo de fármacos.

La fracción del sobrenadante postmitocondrial se diluyó 1:6 con una solución de CaCl_2 , MgCl_2 y sacarosa hasta llegar a la concentración final de 8 mM de CaCl_2 , 5mM de MgCl_2 y 12.5 mM de sacarosa. El conjunto se centrifugó a 10.000 g durante 15 min en una centrifuga refrigerada Beckman J-21. El precipitado microsomal obtenido se resuspendió en las mismas condiciones que en el método anterior.

El contenido de proteínas de las fracciones microsomales obtenidas por ambos métodos de aislamiento se determinó por el método de Lowry y col. (1951).

2.2.1.2.1.- Determinación de proteínas en la fracción microsomal

Folin y Denis encontraron que un reactivo formado por ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico da un color azul en presencia de sustancias con grupos fenólicos. Folin y Ciocalteau

modificaron el reactivo al sustituir las sales sódicas por sales de litio, que no producían turbidez. Lowry y col. (1951) descubrieron que el pretratamiento de la solución de proteínas, con una solución alcalina conteniendo cobre, incrementaba la sensibilidad del reactivo. El color obtenido en la reacción procede de la reducción del ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico a tungsteno (azul) y molibdeno (azul), por acción del complejo Cu-proteína sobre el triptófano y la tirosina de las proteínas.

La pauta utilizada para la valoración de proteínas fué la siguiente. Se toman 0.1 ml de la solución de proteínas microsomales y se lleva hasta un volumen final de 2 ml con agua destilada, se agita y se toman 0.3 ml de esta dilución a los que se añaden 1.5 ml del reactivo B (100 ml de una solución al 2 % de carbonato sódico en hidróxido sódico 0.1 N con 2 ml de una solución de sulfato de cobre al 0.5 % y 2 ml de una solución de tartrato sódico potásico al 1 %); se agita y deja reposar 10 min. Finalmente, se adicionan 0.15 ml de una solución al 50 % del reactivo de Folin-Ciocalteu agitando de nuevo y preservando las muestras de la luz durante 40 min, pasados los cuales, se lee la absorbancia a 715 nm, en un colorímetro (Espectronic-100).

Paralelamente, se realiza una curva estándar partiendo de una solución de albúmina (1 mg/ml). De esta solución se realizan diluciones sucesivas hasta obtener concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.375 y 0.5 mg de proteína/ml.

Los resultados se expresan en mg de proteína/ml de solución microsomal.

En la figura 2.6. se representa la curva media de calibración obtenida a partir de 18 curvas diferentes, los coeficientes de correlación han oscilado entre $0.9872 < r < 0.9999$ ($p < 0.05$).

Para valorar los dos métodos de aislamiento microsomal se ha determinado la capacidad metabolizadora de fármacos del citocromo P-450. Se escogieron las actividades aminopirina N-demetilasa (AND) y anilina p-hidroxilasa (APH).

2.2.1.2.2.- Valoración de la actividad aminopirina N-demetilasa

El método se basa en la capacidad del citocromo P-450 en biotransformar, por demetilación, la 4-dimetilaminoantipirina (1) a aminoantipirina (2) y formol (Figura 2.7.). La cantidad de formol producido es proporcional a la actividad del citocromo y se determina cuantificando el formol liberado durante la oxidación del fármaco por el método de Nash (1953).

El medio de incubación se coloca en erlenmeyers de 25 ml de capacidad. Dichos medios consistían en :

0.9 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 .
y 1.15 % de cloruro potásico.

0.2 ml solución de cloruro de magnesio 0.3 M.

0.1 ml solución de semicarbazida 0.5 M.

0.2 ml solución de nicotinamida 0.5 M.

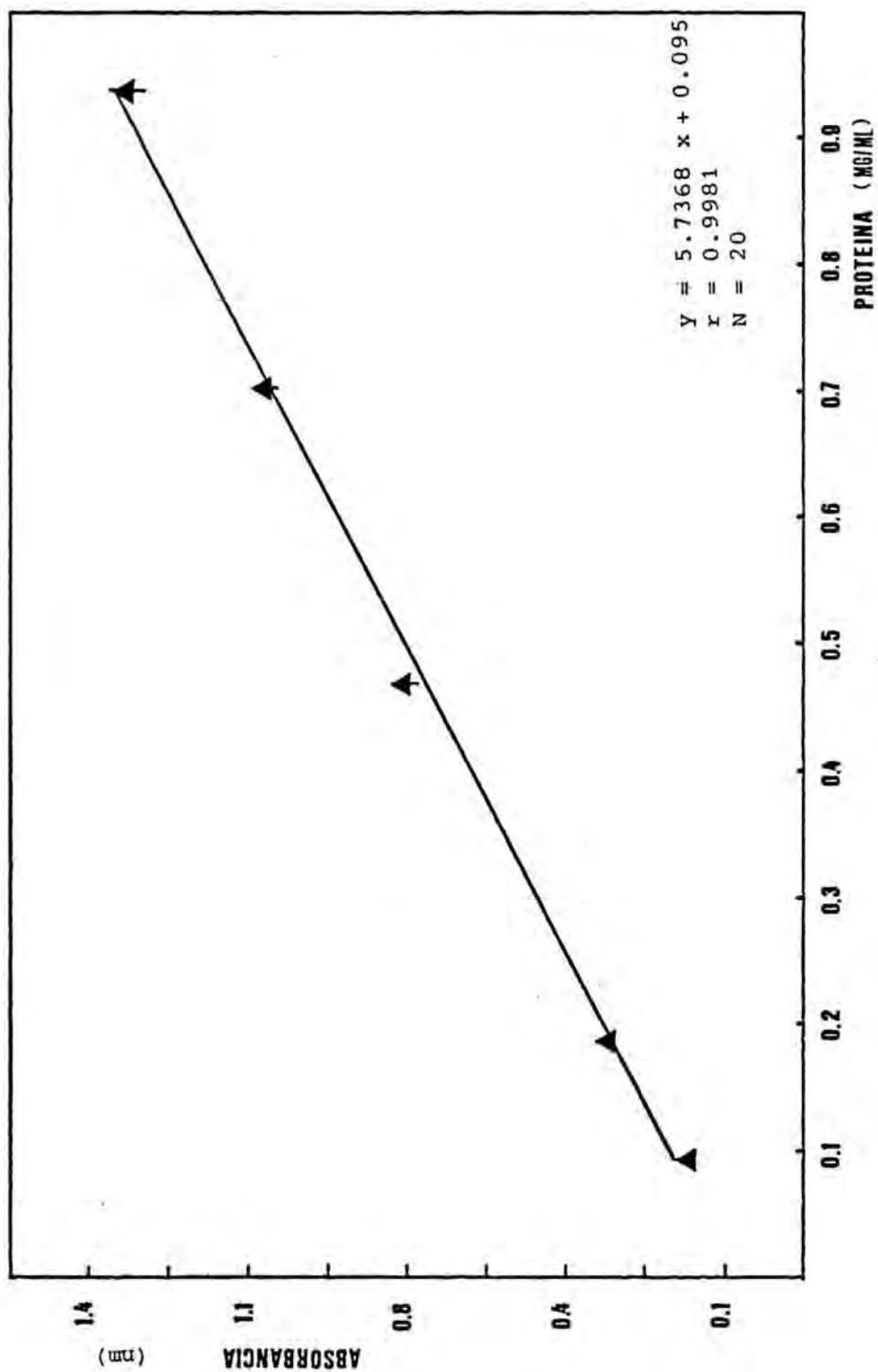


Figura 2.6. Curva de calibración para la determinación de las proteínas de la fracción microsomal.

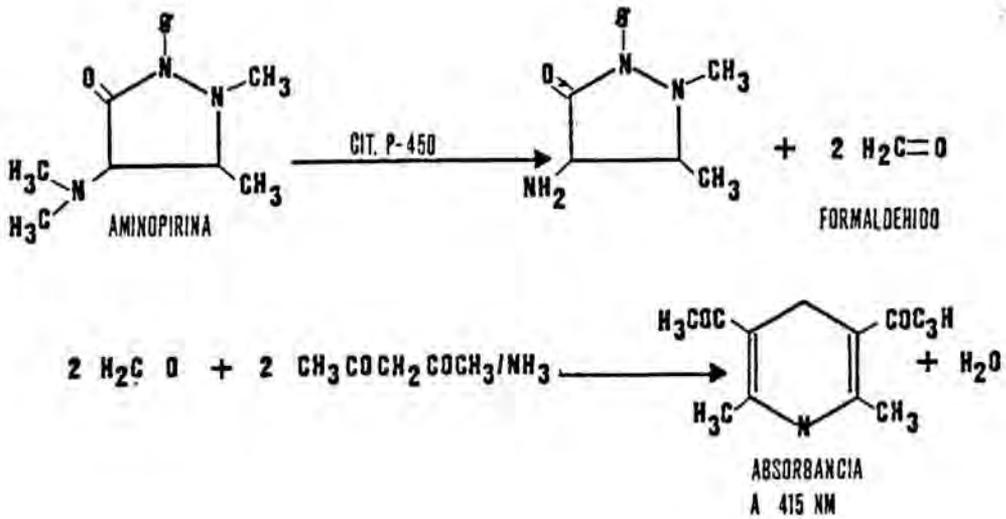


Figura 2.7. Representación del fundamento de la técnica de valoración de la actividad AND.

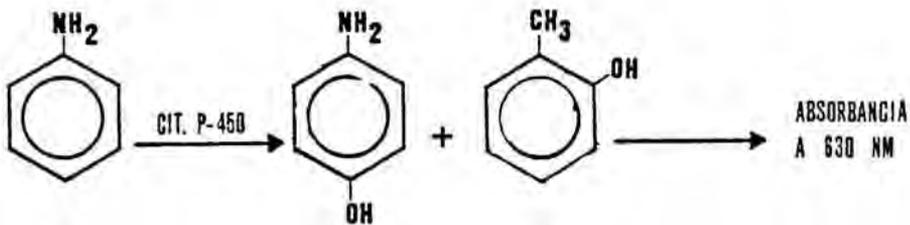


Figura 2.9. Representación del fundamento de la técnica de valoración de la actividad APH.

0.3 ml solución de NADP 5 mM.

0.2 ml solución de glucosa-6-fosfato 0.15 M.

5 U.I. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

3 ml de una suspensión de la fracción microsomal.

Se introdujo el medio de incubación en un baño termostatado a 37°C durante 5 min para conseguir la activación del sistema generador de NADP, al actuar la deshidrogenasa sobre la glucosa-6-fosfato. La reacción se inicia al añadir el sustrato, 0.1 ml de aminopirina 0.1 M. Después de incubar las muestras durante 30 min a 37°C, la reacción se detiene por adición de 2 ml de sulfato de zinc al 15 % y 2 ml de una solución saturada de hidróxido de bario a cada muestra, con lo que precipitan las proteínas.

Se centrifuga durante 10 min a 1.000 g para separar las proteínas precipitadas. Se recogen 5 ml del sobrenadante y se añaden 2 ml del reactivo de Nash, recién preparado; después de agitar se coloca en un baño termostatado donde se mantiene a 60°C durante 30 min. El color que aparece durante la incubación se lee a 415 nm.

La absorbancia obtenida se compara con una curva estándar interna realizada siguiendo el mismo proceso que con las muestras problema pero sustituyendo los cofactores, a excepción de la semicarbazida, por solución amortiguadora de fosfatos y el sustrato por soluciones con 1.816, 0.908, 0.454, 0.227 y 0.1125 μ M de formol. En la figura 2.8. se representa la curva de calibración media obtenida a partir de 20 rectas diferentes. Los coeficientes de correlación han oscilado entre 0.9852 < r < 0.9996 (p < 0.05).

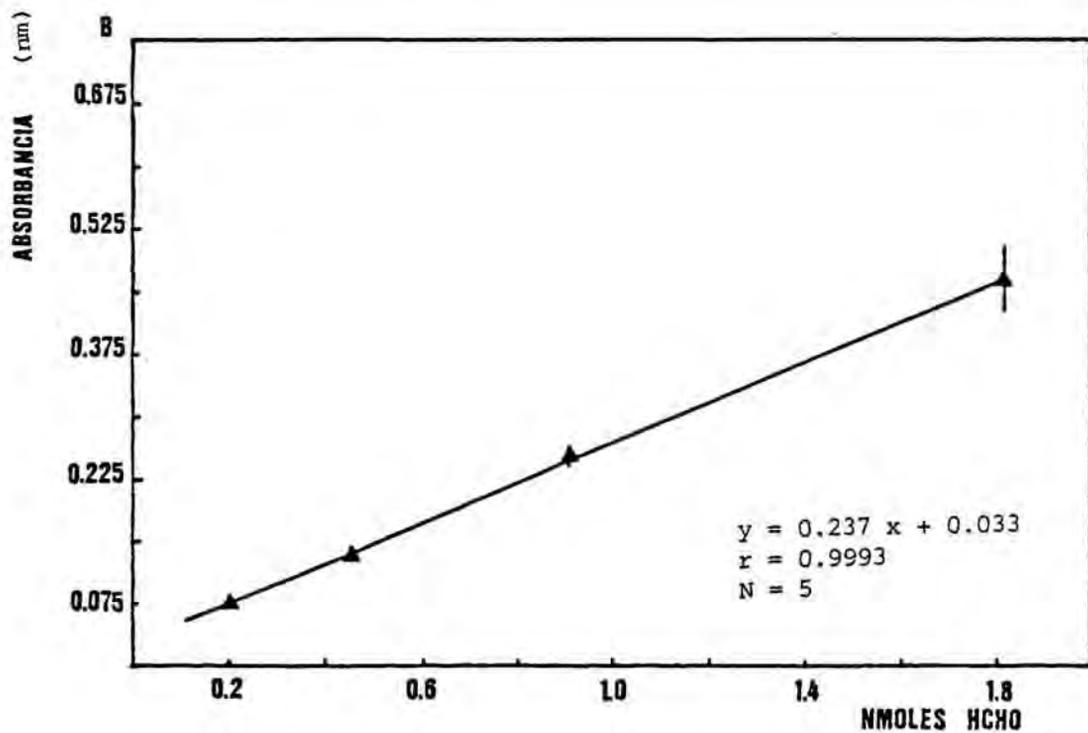
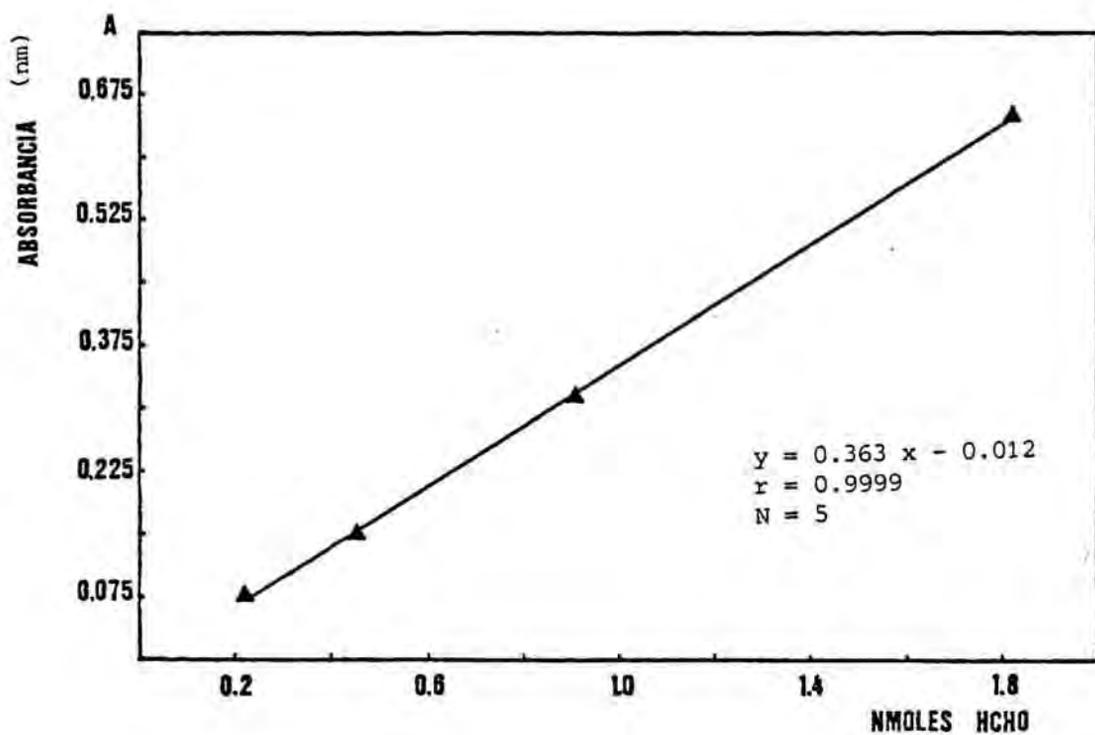


Figura 2.8. Curva de calibración externa (A) e interna (B) para la valoración de la actividad AND.

2.2.1.2.3.- Valoración de la actividad anilina p-
hidroxilasa

Esta medida de la actividad metabolizadora del citocromo P-450 se basa en la determinación de la cantidad de anilina (sustrato de la reacción) que es metabolizada por la fracción microsomal, previamente aislada, a p-aminofenol (fig. 2.9.). La cantidad de p-aminofenol se determina por el método de Mathur y col. (1976).

Para esta determinación el medio de incubación, que se dispuso en erlenmeyers de 25 ml, estaba formado por:

1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 .

0.3 ml de solución de NADPH 5 mM .

0.2 ml solución de glucosa-6-fosfato 0.1 M.

0.2 ml solución de nicotinamida 0.5 M.

0.2 ml solución de cloruro de magnesio 0.3 M.

5 U.I. glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

3 ml suspensión de la fracción microsomal.

El conjunto se coloca en un baño termostático a 37°C durante 5 min, para activar el sistema generador de NADP. La reacción se inicia al añadir el sustrato, 0.1 ml de una solución de anilina 0.1 M.

Después de incubar las muestras durante 30 min a 37°C, la reacción se detiene al añadir 2 g de cloruro sódico y 40 ml de éter en cada muestra. Se agita fuertemente durante 10 min y se separa la fase etérea, a la que se adicionan 6 ml de una solución de o-cresol al 1 %, recién preparado. Se agita en embudo de

decantación y se elimina la fase etérea.

El color aparecido se valora con una lectura a 630 nm. Se realizaron curvas de calibración interna y externa. La curva de calibración externa consistía en adicionar 6 ml de una solución de o-cresol a 5 ml de soluciones de concentraciones crecientes de p-aminofenol.

La curva de calibración interna se realizó con las mismas diluciones de p-aminofenol que en la curva externa, a las que se añadió 3 ml de agua destilada en lugar de la solución microsomal y 1.9 ml de solución amortiguadora de fosfatos en lugar de los cofactores y se siguió una pauta paralela a la de las muestras problema.

En la figura 2.9. se representa la curva de calibración externa, media de cinco curvas distintas. Los coeficientes de correlación oscilaron entre $0.9991 < r < 0.9999$ ($p < 0.05$). En la figura 2.10. se representa la curva de calibración interna media, obtenida a partir de diez curvas estándar diferentes. Los coeficientes de correlación han oscilado entre $0.9942 < r < 0.9997$ ($p < 0.05$).

2.2.1.3.- EFECTO DEL CALCIO SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL CITOCROMO P-450.

Para valorar el posible efecto del calcio sobre las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa microsomales, se estudió la variación de dichas actividades al

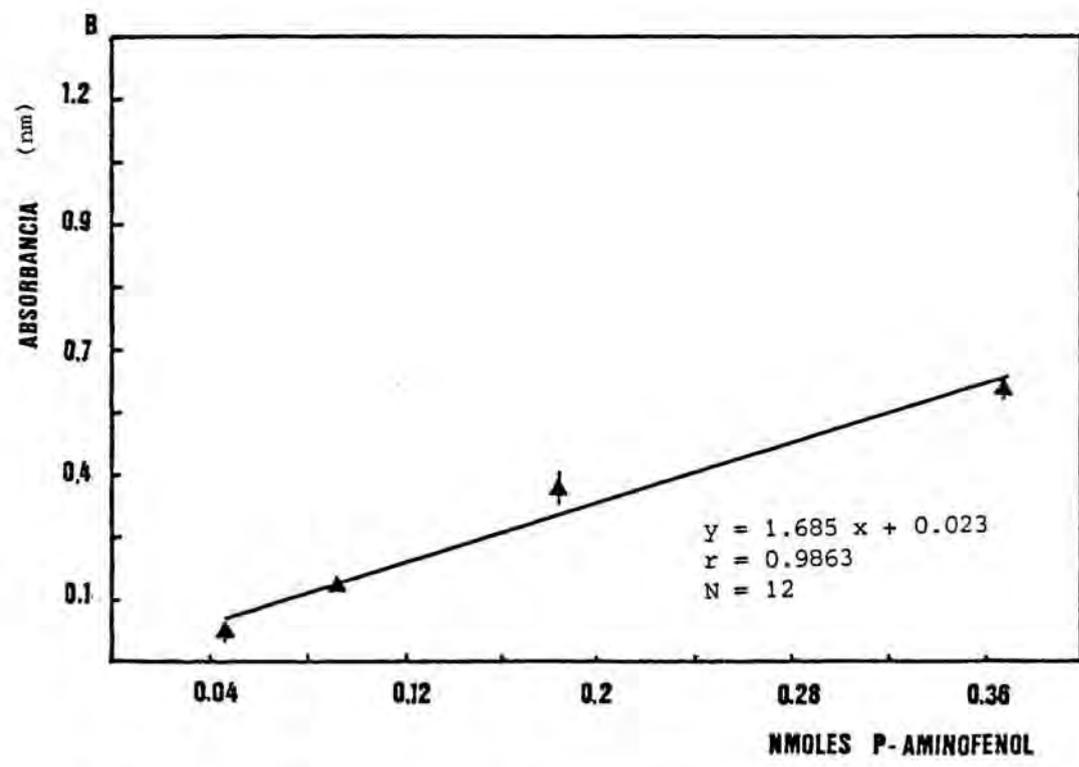
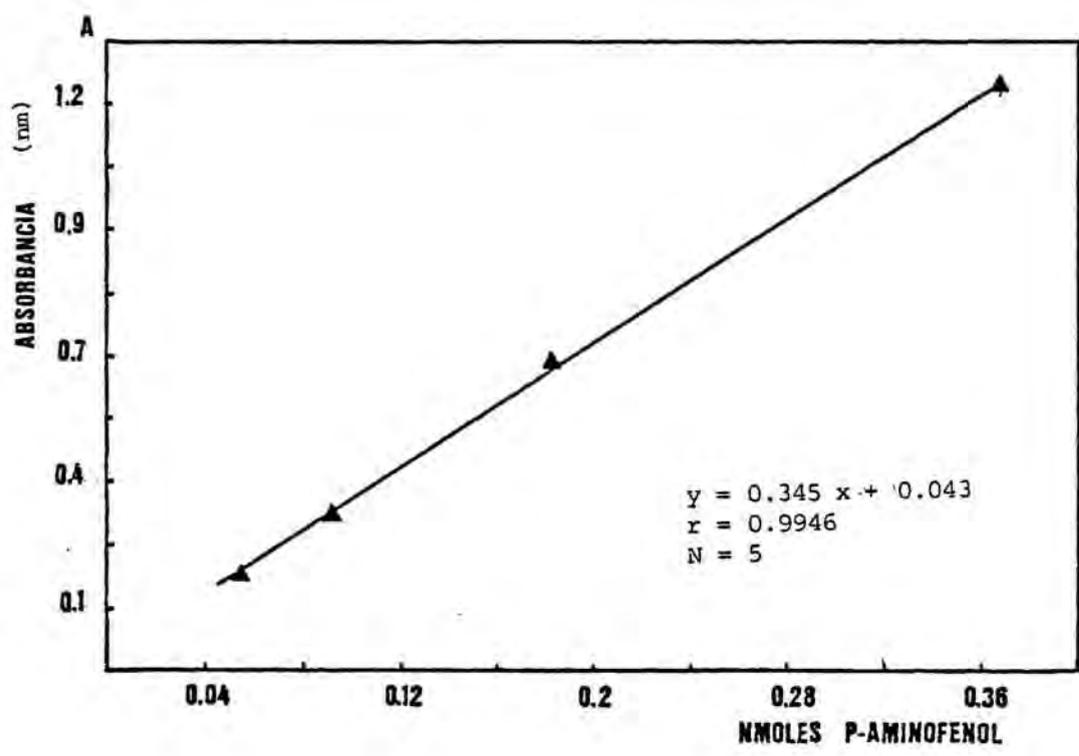


Figura 2.10. Curva de calibración externa (A) e interna (B) para la valoración de la actividad APH.

incubar microsomas aislados con concentraciones crecientes de calcio (de 0 a 54 mM). La sal de calcio utilizada en este estudio fue el cloruro de calcio.

2.2.2.- EVALUACION DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CONSERVACION DEL HIGADO O MICROSOMAS SOBRE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P-450.

El experimento se realizó con el hígado procedente de ratas Sprague-Dawley, machos, de 200-250 g tratadas 24 h antes de su sacrificio con CCl_4 (10 ml/kg de una solución en aceite de oliva al 50 %, i.p.) y ratas control.

Los animales se anestesiaron por inhalación con éter, se desangraron por punción cardíaca directa y se practicó hepatectomía. El hígado una vez lavado con suero fisiológico se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se congeló a -70°C mientras que el resto se homogeneizó. En la fracción homogeneizada se aisló la fracción microsomal por ultracentrifugación. La fracción microsomal se dividió, a su vez, en dos partes ; la primera se almacenó a -70°C cubierta de la solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.4 y glicerol al 10 % . En la fracción restante se valoraron las actividades AND y APH.

Las actividades enzimáticas de los microsomas no congelados se compararon con las obtenidas al utilizar los microsomas provenientes de la fracción microsomal o el hígado

conservado a -70°C .

2.2.3.- ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS ENZIMÁTICAS DE LA AND Y APH EN ANIMALES CONTROL Y ARTRÍTICOS.

La artritis adyuvante se indujo en ratas Sprague-Dawley, hembras, de pesos comprendidos entre 200-250 g, por inyección subplantar en la extremidad posterior derecha de 0.5 mg de Mycobacterium butyricum (Difco lab., Detroit, MI), inactivado por calor, en 0.1 ml de vaselina líquida (día 0). A los animales control se les inyectó sólo vaselina. A los 21 días de la inducción de la artritis, las ratas con inflamación en las cuatro extremidades se seleccionaron como animales artríticos.

Las ratas se anestesiaron con éter y los hígados se extrajeron, lavaron y congelaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de ser analizados. Los hígados fueron homogeneizados con una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 conteniendo sacarosa 0.25 M y HEPES 2.5 mM. La fracción microsomal se aisló por el método de ultracentrifugación. El contenido proteico de la fracción microsomal se determinó por el método de Lowry (1951) usando albúmina bovina como estándar. Las actividades AND y APH se valoraron en la fracción microsomal como se ha descrito previamente. El rango de concentraciones de aminopirina utilizadas en los experimentos fue de 0.275 a 35 mM y las concentraciones de anilina de 0.07 a 60 mM. Todas las valoraciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37°C .

2.2.4.- ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE CITOCROMO P-450,
Y SUS ACTIVIDADES AND Y APH EN RATAS POR EFECTO
DE MODIFICACIONES EN LA INGESTA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA ARTRITIS.

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, de pesos comprendidos entre 170-240 g al inicio del experimento (170-220 g las hembras y 205-275 g los machos). Se establecieron tres lotes de animales cada uno de los cuales incluía un grupo de ratas macho y otro de ratas hembras. El primer lote estaba formado por animales control, con ingesta de comida "ad libitum". El segundo lote lo constituían animales artríticos, con ingesta de comida "ad libitum" y a los que se indujo la artritis con M.butyricum como anteriormente se describió (apartado 2.2.3). En este grupo y transcurridos 14 días, se seleccionaron los animales que habían desarrollado artritis, considerándose como tales, aquellos cuyo aumento de volumen de la extremidad contralateral superaba el incremento medio de los animales control, más dos desviaciones estándar. Por último, el tercer lote estaba integrado por animales sanos sometidos a ingesta restringida, de modo que recibían una cantidad de comida análoga a la ingerida por los animales artríticos.

Los parámetros valorados fueron: ingesta de comida (gramos de comida consumida por Kg de animal y día) y curva ponderal (expresado en porcentaje de incremento). Asimismo, se evaluó la inflamación de las extremidades, determinándose pletismométricamente (Pletismómetro Ugo Basile, Milan, 30 mm ø)

el aumento del volumen (ml) de las extremidades posteriores.

El día 21, después de anestesiar a los animales en cámara de éter, se les extrajo muestras de sangre por punción cardíaca a tórax abierto, se centrifugó y separó el suero (500 g durante 10 min). Asimismo se practicó laparotomía se extrajo el hígado y se dividió en alícuotas que se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su utilización.

A partir de las muestras de suero se determinaron las proteínas séricas totales mediante refractometría y se midió la distribución relativa de las distintas fracciones proteicas por densitometría (Densitometer Digiscan 429, Atom), previa electroforesis y tinción con Rojo Ponceau. Los grupos SH séricos se determinaron inmediatamente después de la obtención del suero, ya que se produce una disminución gradual si se conserva en nevera durante días o semanas antes de su determinación (Hall y Gillan, 1979).

2.2.4.1.- Determinación de grupos SH séricos.

Para la determinación de grupos sulfidrilo se ha utilizado el método de Beutler y col. (1963) modificado por Pickup y Dixon (1980). Dicho método se basa en la reacción del ácido 5,5'ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB), con los grupos sulfidrilo presentes en el suero, dando lugar a un compuesto coloreado (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, TNB), que puede ser valorado espectrofotométricamente a 440 nm (Butler, 1969) (Fig. 2.11.).

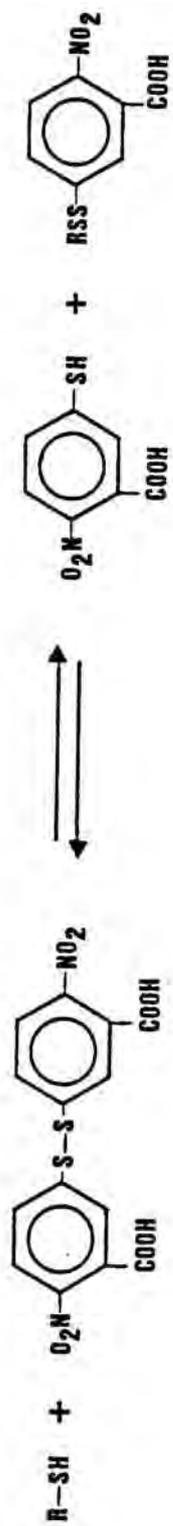


Figura 2.11. Representación del fundamento de la técnica de valoración de grupos SH.

La pauta seguida para la valoración de los grupos SH séricos fué la siguiente. A 1.25 ml del suero problema diluido 1:10 con solución salina amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, se le adiciona 0.25 ml del reactivo DTNB disuelto en solución amortiguadora al 0.8 %, incubándose, a continuación, en baño maría a 37°C durante 15 min.

La lectura se realiza espectrofotométricamente a 440 nm frente a un blanco que contiene 1.25 ml del suero diluido 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, se incuba a 37°C durante 15 min. El espectrofotómetro utilizado ha sido un Spectronic 100 Bausch & Lomb.

La curva estándar se realizó utilizando distintas diluciones de una solución de glutatión reducido al 0.01 % (162.69 μ moles/l) en solución amortiguadora, tratadas de igual forma que el problema. En la figura 2.12. se representa la curva de calibración media obtenida junto a la desviación estándar, que informa sobre su variabilidad. Los coeficientes de correlación han oscilado entre 0.9951 < r < 0.9998 (p < 0.05).

La concentración de grupos sulfidrilo se ha expresado en μ moles de glutatión/l suero.

El hígado se homogeneizó y se aisló la fracción microsomal por ultracentrifugación (El Defrawry y col. 1974). El contenido de proteínas de dicha fracción se determinó por el método de Lowry (1951) (Ver apartado 2.1.1.). Las actividades AND y APH de la fracción microsomal se determinaron por los métodos

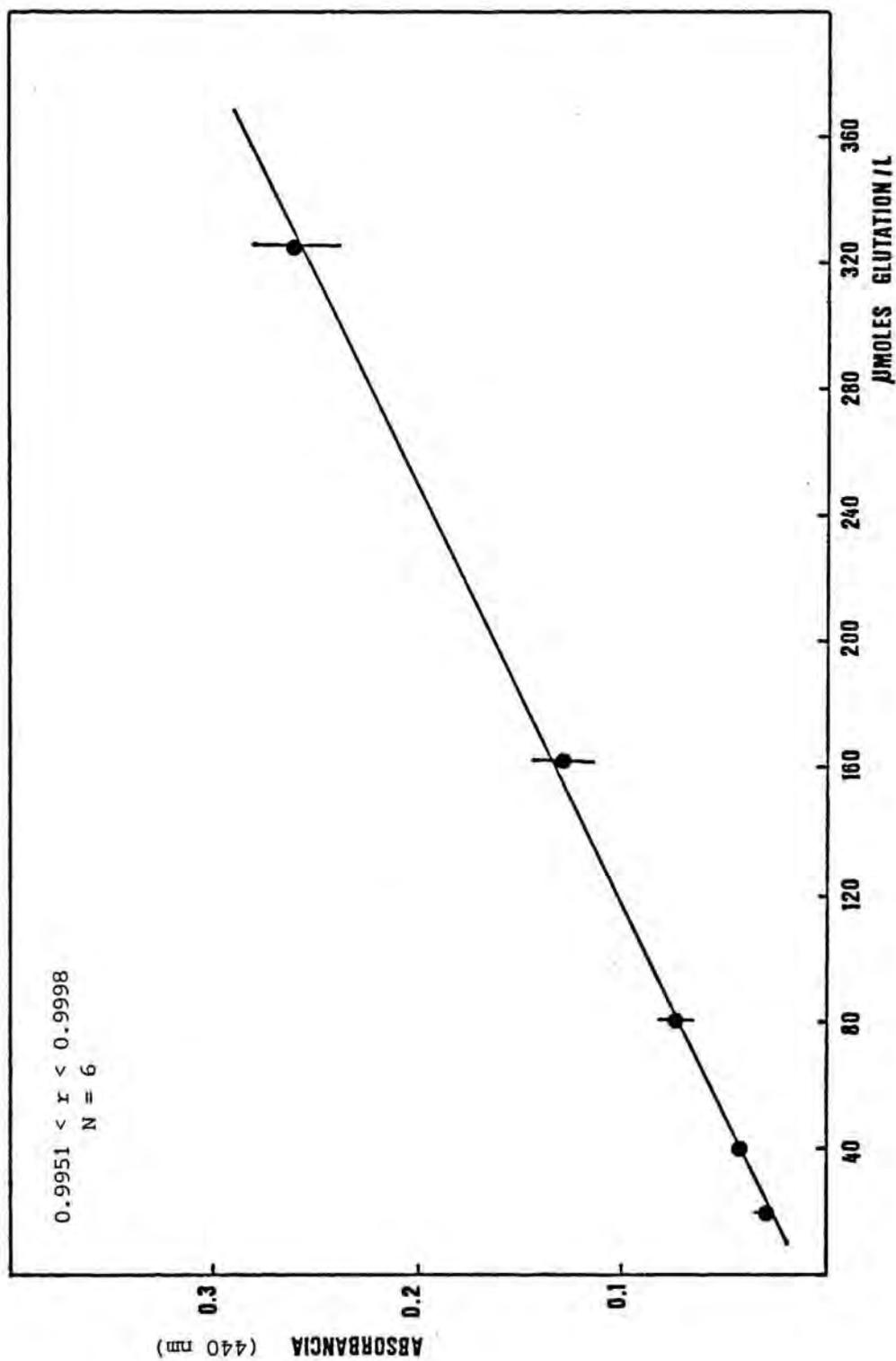


Figura 2.12. Curva de calibración media utilizada para la valoración de los grupos SH séricos.

de Nash (1953) y Omura y Sato (1966), respectivamente (ver apartado 2.1.1.). Los niveles de citocromo P-450 microsomal se valoraron con la técnica desarrollada por Omura y Sato (1964).

2.2.4.2.- Valoración de los niveles de citocromo P-450 (Omura y Sato, 1964)

El método utilizado para la valoración de los niveles de citocromo P-450 fue el de Omura y Sato (1964), basado en la determinación espectrofotométrica del compuesto formado por la unión del CO al citocromo P-450 reducido previamente.

Para valorar el citocromo P-450 se parte de una suspensión microsomal con una concentración proteica de 1 a 2 mg de proteínas/ml. Se adicionan 3 ml de la suspensión microsomal a cada cubeta del espectrofotómetro. Para reducir al citocromo P-450 se añade a las cubetas unos pequeños cristales de ditionito sódico. Después de agitar, se hace circular una corriente de CO por la cubeta problema durante 3 min. El compuesto formado por la unión del CO con el citocromo P-450 reducido posee una absorbancia máxima a 450 nm.

Los resultados se expresaron como nmoles de citocromo P-450/mg proteína microsomal, obtenidos al multiplicar la absorbancia a 450 nm por el coeficiente de extinción 0.091 (Ryan y col., 1975; Haugen y Coon, 1976).

2.2.5.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS Y DE LA
RESTRICCIÓN DIETÉTICA SOBRE LOS PARÁMETROS
BIOQUÍMICOS SÉRICOS MARCADORES DE
HEPATOTOXICIDAD.

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley, hembras, de pesos comprendidos entre 180-240 g. Los animales se dividieron en tres grupos: un grupo de ratas control, un grupo de ratas con artritis inducida como se describe en el apartado 2.3. y seleccionadas según los criterios enunciados en el apartado 2.4., y finalmente, un grupo de ratas sanas que ingerían la misma cantidad de pienso que los animales artríticos. Se utilizaron como control positivo de lesión hepática dos grupos de ratas, el primero había sido administrado con CCl_4 (10 mlkg de una solución de CCl_4 :aceite de oliva, 1:1, i.p.) 24 h antes del sacrificio de los animales. Al segundo grupo se le había administrado alcohol etílico junto con el agua de bebida (10 %) durante 15 días antes del sacrificio.

Se extrajeron muestras de sangre de los animales por punción cardíaca a nivel del ápice según el método de Schermer (1967). La sangre extraída se centrifugó durante 5 min (Microfuge mod. 54145) para la obtención del suero. El suero obtenido se guardó en nevera, a 4°C , hasta la determinación de los parámetros bioquímicos, realizada en un plazo máximo de 24 h.

Se efectuó un estudio de los parámetros bioquímicos séricos haciendo especial hincapié en los indicadores de la función hepática. Como signos de daño hepatocelular se

valoraron los enzimas aspartato y alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina. Además, se han determinado los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa. Los métodos utilizados se indican a continuación. La aspartato aminotransferasa se determinó por el método del α -cetoglutarato (Bergmeyer y Horder, 1977) y se expresó como U.I./dl. La alanina aminotransferasa también se determinó por el método de Bergmeyer y Horder (1980) y se expresó en U.I./dl. La fosfatasa alcalina se valoró por el método estándar optimizado de la "Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie" y se expresó como U.I./dl. Los niveles de colesterol sérico se determinaron por el método de Siedel y col. (1981), expresándose en mg/dl suero. Los triglicéridos se valoraron por hidrólisis enzimática y posterior determinación del glicerol formado, según el método modificado por Waniefelig y Bergmeyer (1974), expresándose los resultados en mg/dl. Finalmente, los niveles de glucosa sérica se determinaron según el método GOD-PAP (Trinder, 1969), expresándose los resultados en mg/dl. Las determinaciones se realizaron con un multianalizador HITACHI mod 705 (Fig. 2.13.).

2.2.6.- DETERMINACION DE LOS NIVELES HEPATICOS DE GLUTATION EN ANIMALES SANOS, ARTRITICOS Y CON DIETA RESTRINGIDA.

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley, hembras, de pesos comprendidos entre 180-240 g. Los animales se dividieron en ratas control, ratas artríticas (inducidas como se describió en el apartado 2.2.3. y seleccionadas según los criterios

MATERIAL BIOLÓGICO RATAS SPRAGUE - DAWLEY	
DÍA 0	INDUCCIÓN ARTRITIS 
7	INFLAMACIÓN LOCAL 
14	INFLAMACIÓN SISTÉMICA 
21	

INFLAMACIÓN DE LAS EXTREMIDADES

SUERO :

- COLESTEROL
- GLUCOSA
- TRIGLICERIDOS
- FOSFATASA ALCALINA
- GOT
- GPT

Figura 2.13. Pauta experimental utilizada para valorar el efecto de la artritis y la restricción dietética sobre los parámetros bioquímicos séricos marcadores de hepatotoxicidad.

MATERIAL BIOLÓGICO RATAS SPRAGUE-DAWLEY

DIA 0	INDUCCION ARTRITIS 	
7	INFLAMACION LOCAL 	INFLAMACION DE LAS EXTREMIDADES
14	INFLAMACION SISTEMICA 	MIGADO : GLUTATION LIPIDOPEROXIDACION
21		

Figura 2.14. Pauta experimental utilizada para valorar el efecto de la artritis y la restricción dietética sobre los niveles de glutación hepático.

aplicados en el apartado 2.2.4) y finalmente, un grupo de ratas sanas que ingerían la misma cantidad de pienso que los animales artríticos (Fig. 2.14.).

En la valoración de los niveles de glutatión hepático se ha seguido el mismo método que el utilizado para valorar los niveles de grupos SH séricos (apartado 2.4.). Para ello se parte de 0.5-1.0 g de hígado que se homogeneizan con 6 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 (homogeneizador Andermann & col. L.T.D., Londres). Para precipitar las proteínas, al homogeneizado se le añaden 2 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 18 % y 5 mM de EDTA y se centrifuga a 3.000 g durante 15 min .

El sobrenadante obtenido se diluye hasta 10 ml con la solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 y una alícuota de la dilución anterior se diluye, a su vez, posteriormente, con la misma solución amortiguadora (dilución 1:10). En esta última dilución es en la que se determinan los grupos sulfidrilo no proteicos, por adición de una solución acuosa de DTNB 2 mM (5:1). Se incuba durante 30 min a 37°C en baño maría y finalmente, se determina la absorbancia del color aparecido a 440 nm. Paralelamente, se realiza una curva estándar, a partir de una solución madre de glutatión reducido de 162.69 µM, por diluciones 1:2 hasta obtener un total de seis concentraciones. Los valores medios obtenidos en las diferentes curvas estándar se representan en la figura 2.15. .

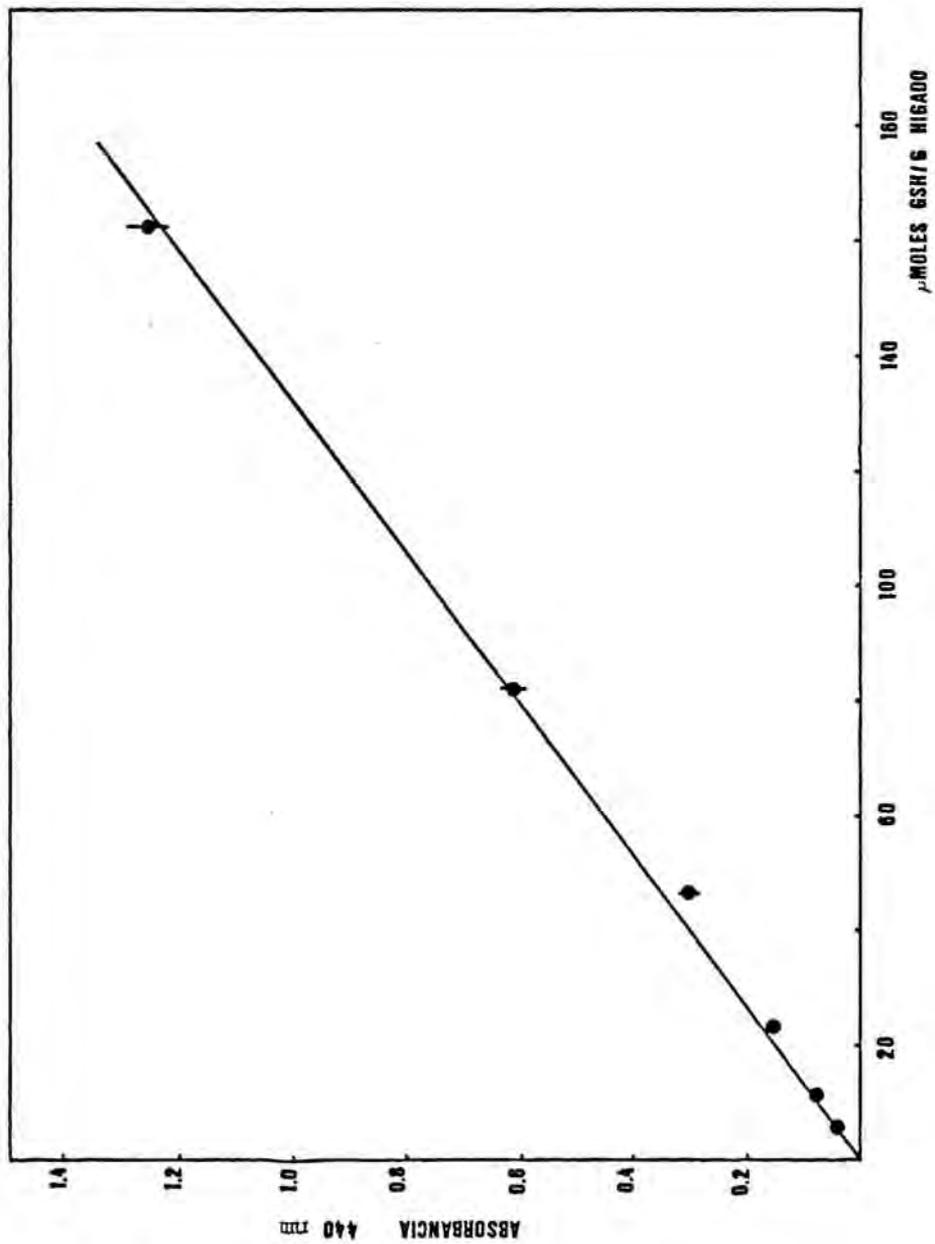


Figura 2.15 Curva estándar media usada para la valoración de los niveles de glutathion hepático.

2.2.7.- LIPIDOPEROXIDACION HEPATICA.

La lipidoperoxidación (LP) puede valorarse cuantificando el malondialdehído (MDA) producido por degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Para ello se utiliza el método de Beuge y Aust (1978), que consiste en hacer reaccionar el MDA con ácido tiobarbitúrico y valorar espectrofotométricamente a 532 nm el compuesto coloreado producido (Fig. 2.16).

2.2.7.1.- PUESTA A PUNTO DE LA VALORACION DE LA LIPIDOPEROXIDACION HEPATICA.

Para poder cuantificar la LP, "in vitro", en la fracción postmitocondrial (fracción microsomal y fracción soluble) hace falta reproducir las condiciones fisiológicas del tejido vivo; para ello es preciso adicionar al medio de incubación los cofactores de la lipidoperoxidación.

Con esta finalidad se valoró la eficacia de distintos activadores:

FeCl_3 (0.1, 0.5 y 10 mM) con y sin ADP 4 mM.

$\text{Fe}(\text{PO}_4)_2$ 1 mM y citrato sódico 4 mM.

MgCl_2 10 mM y NADP 0.25 mM.

Para poner a punto el método fue necesario disponer de un control positivo, es decir, una fracción postmitocondrial procedente de animales tratados con un tóxico hepático (CCl_4) capaz de activar la lipidoperoxidación.

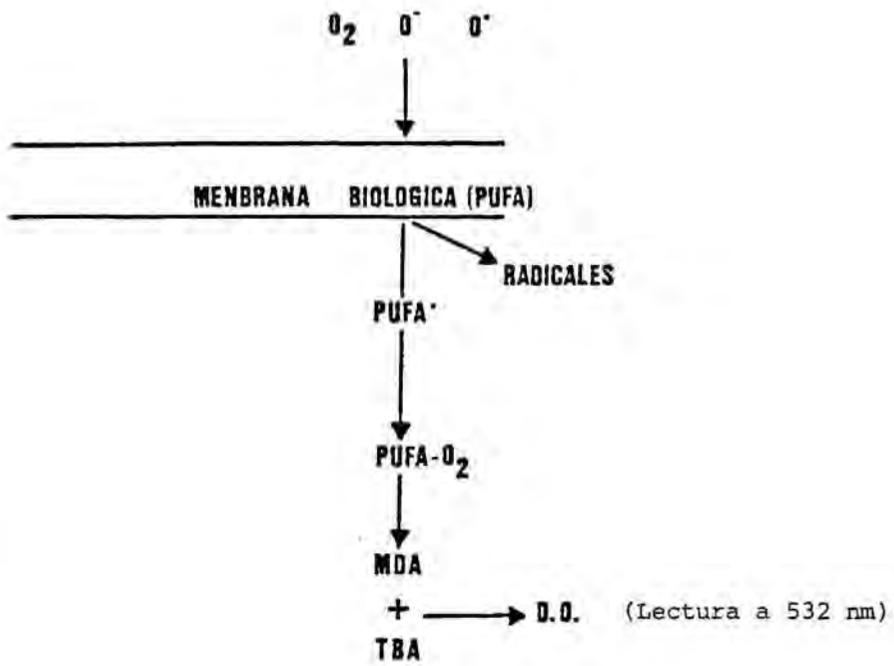


Figura 2.16. Valoración de la lipidoperoxidación.

El pretratamiento con CCl_4 consistió en la administración i.p. de una solución de CCl_4 /aceite de oliva (1:1) a razón de 10 ml/Kg de peso. Los animales control recibieron análogo volumen del excipiente. Transcurridas 24 h se sacrificaron las ratas y se preparó la fracción postmitocondrial. Para ello se toma aproximadamente 1 g de hígado, que se homogeneizan con 6 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M a pH 7.4. El homogeneizado se centrifuga a 10.000 g durante 15 min. Se recoge el sobrenadante, que se utiliza directamente para las determinaciones de lipidoperoxidación. Todo el proceso se realiza entre 0 y 4 °C.

A la fracción postmitocondrial (0.5 ml) se le adicionaron 0.5 ml de cada uno de los activadores y solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 hasta un volumen final de 2 ml. La incubación se realiza a una temperatura de 37 °C y en baño maría, a distintos tiempos: 10, 15, 20, 30 y 45 min, para poder valorar la evolución del proceso.

El MDA formado durante la incubación se valora mediante reacción con una solución de TBA en TCA al 5 %. La proporción entre el medio de incubación y la solución de TBA fue de 1:10.

Se ensayaron distintas concentraciones de la solución de TBA (0.1875 %, 0.375 %, 0.750 % y 1.5 %), así como distintos pH de la misma solución (0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0 y 2.25) con el fin de conseguir las condiciones de máxima sensibilidad del método.

Una vez añadida la solución de TBA, se incubaba nuevamente a 100 °C. Asimismo se ensayaron distintos tiempos de incubación: 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min, para poder precisar el

tiempo mínimo necesario a partir del cual ya no se produce un aumento de absorbancia.

Las condiciones para la valoración de la lipidoperoxidación hepática que resultaron óptimas para mejorar la sensibilidad del método fueron las siguientes: De los diferentes cofactores de la LP utilizados, los que permitieron obtener una mayor diferencia entre la LP hepática entre ratas control y tratadas fueron el FeCl_3 con ADP. Sólo a concentraciones de FeCl_3 de 0.5 y 1 mM se obtuvieron diferencias significativas a los 30 min de incubación (fig. 2.17.). La concentración final usada de FeCl_3 fué de 0.5 mM y de ADP 4 mM.

El tiempo de incubación de la fracción postmitocondrial con FeCl_3 0.5 mM y ADP 4 mM se estableció en 15 min (fig. 2.18.), ya que fué a este tiempo cuando se observó una mayor formación de MDA, tanto en las muestras procedentes de animales control como de animales tratados, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos. La formación de MDA disminuyó cuando el tiempo de incubación fué superior a 15 min; esta reducción fué particularmente importante en los animales tratados. A los 45 min, los niveles de MDA formados fueron muy bajos y prácticamente, no hubo diferencia entre los valores de las ratas control y tratadas.

A concentraciones de TBA superiores a 0.375 % (0.75 y 1.5 %) se produjo turbidez en la solución de TBA que interfirió la lectura espectrofotométrica. Así pues y aunque la absorbancia fué similar, es aconsejable emplear soluciones de concentraciones iguales o inferiores a 0.375 % (fig. 2.19.).

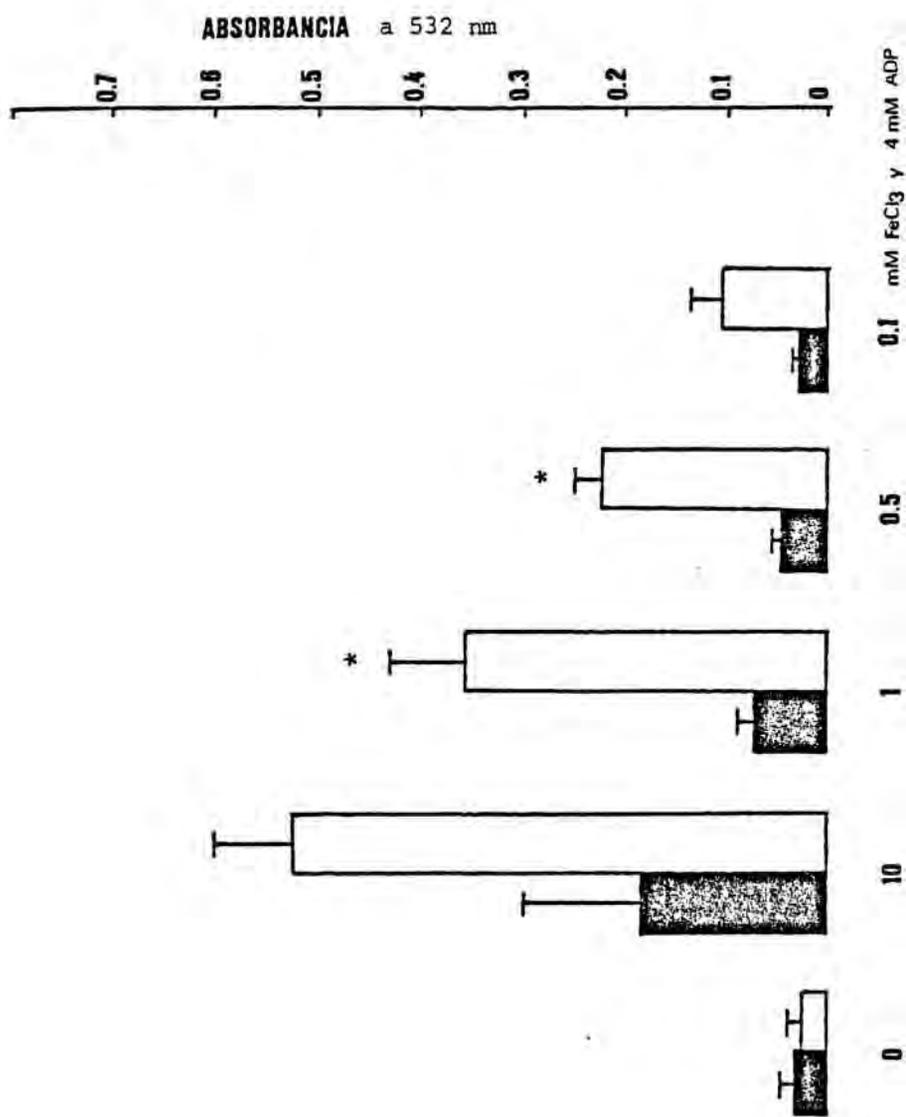


Figura 2.17. Efecto sobre la lipídoperoxidación de la incubación durante 30 min con diferentes concentraciones de FeCl₃ y ADP. (■) animales control, (□) animales tratados con CCl₄. * p < 0.05 respecto al control (test t-Student).

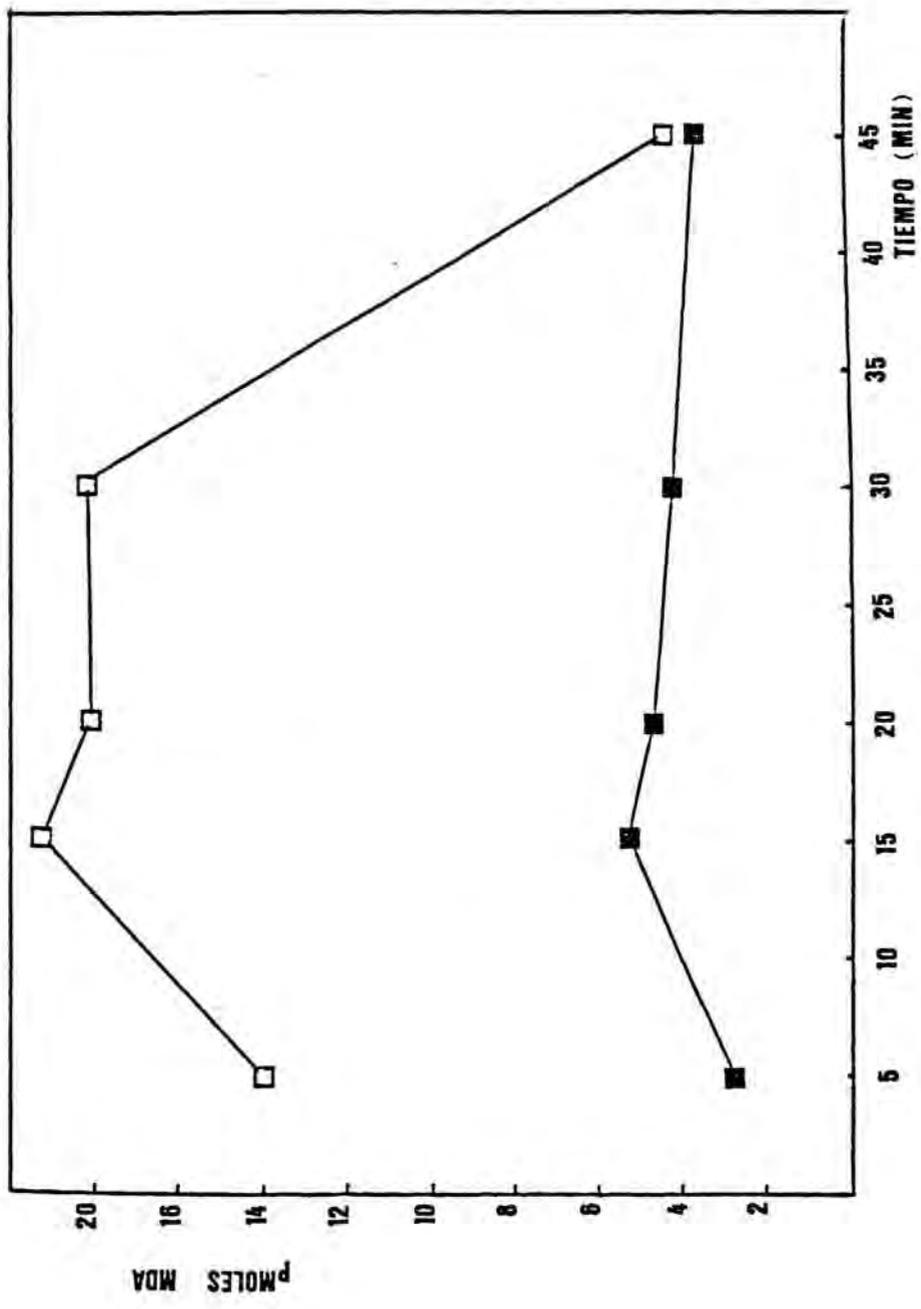


Figura 2.18. Efecto del tiempo de incubación de la fracción post-mitocondrial con FeCl₃ 0.5 mM y ADP 4 mM sobre la lipíperoxidación. Ratitas control (■), ratitas tratadas con CCl₄ (□).

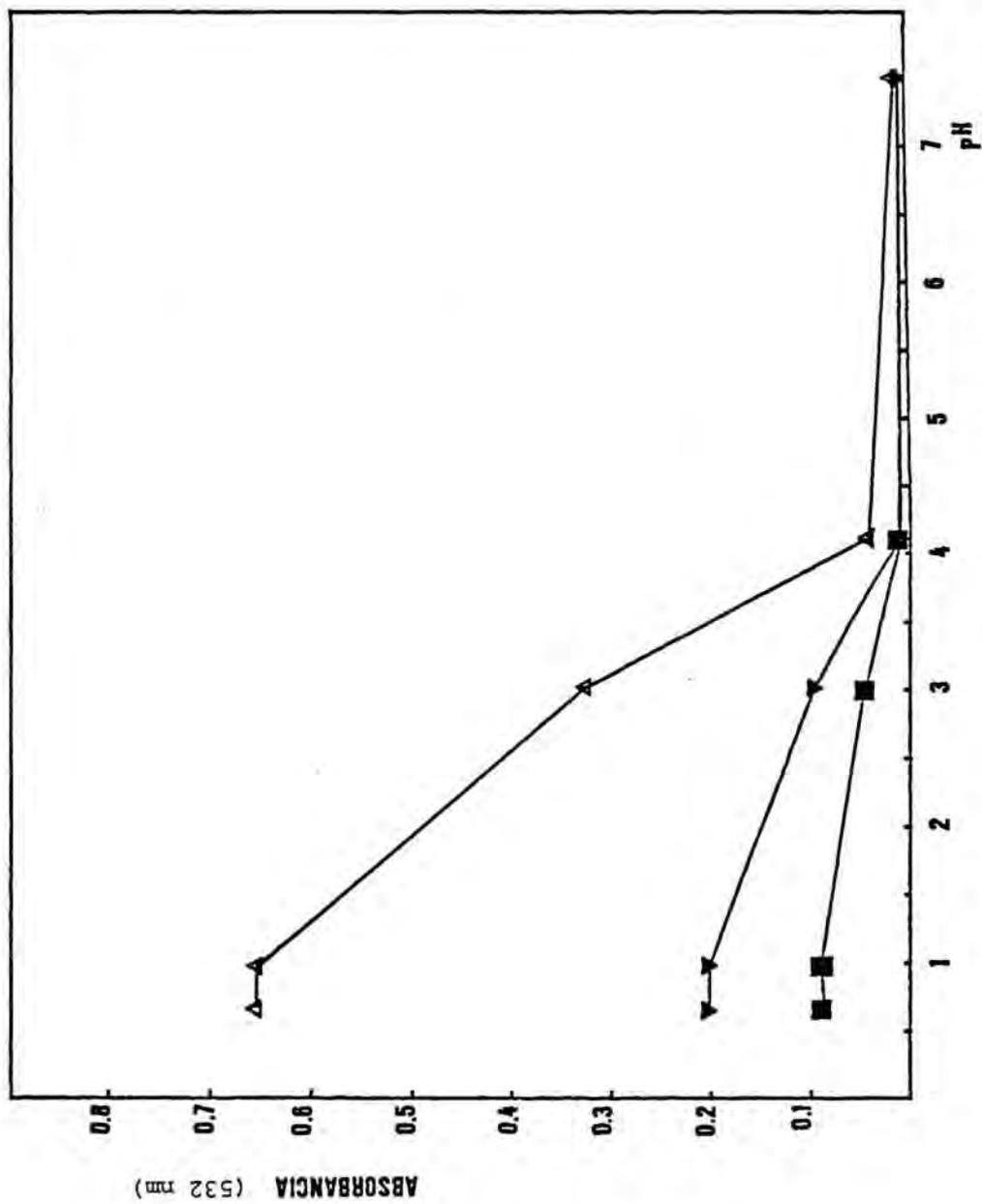


Figura 2.19. Absorbancia obtenida a partir de una curva estándar de MDA que se hizo reaccionar con diferentes concentraciones de TBA: (Δ) 0.1875 %, (◻) 0.375 %, (▽) 0.75 % y (■) 1.5 %.

Respecto al pH de la solución de TBA, en las curvas estándar se observó una disminución progresiva de la absorbancia cuando el pH fue superior a 1-2. A partir de pH 4 no hubo diferencias importantes en la absorbancia de las distintas concentraciones de MDA (fig. 34). Teniendo en cuenta que entre el pH 1 y 1.5 la absorbancia de la curva estándar, prácticamente, no varió y que la máxima diferencia de absorbancia entre los animales control y tratados se observó a pH 1.5 se consideró este pH como el más idóneo para la solución de TBA.

Finalmente, se apreció un incremento de la absorbancia al aumentar el tiempo de incubación con la solución de TBA al 0.375 %. La absorbancia fué máxima a los 60 min, manteniéndose constante, al menos, hasta los 90 min, tiempo máximo de incubación ensayado. Así pues, el tiempo mínimo de incubación a 100°C, con el que se consiguen resultados adecuados, fue de 60 min (fig. 2.20.).

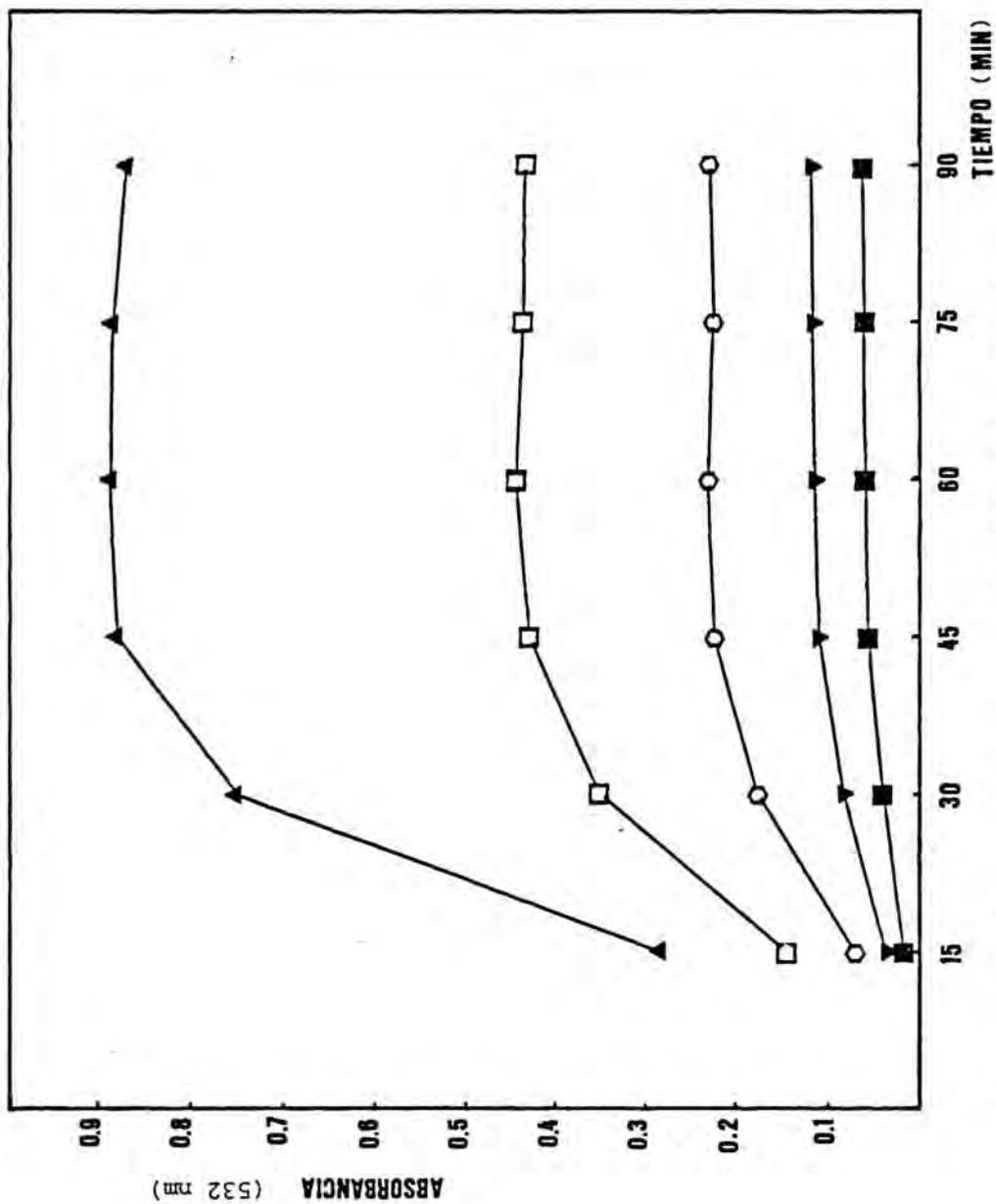


Figura 2.20. Tiempo óptimo de incubación de una solución de TBA (0.375 %) y TCA (5 %) a 100 con MDA: (▲) 125 nM, (□) 62.5 nM, (○) 31.25 nM, (▼) 15.62 nM y (■) 7.812 nM.

2.2.8.- VALORACION DE LOS NIVELES DE COBRE Y ZINC EN HIGADO. RELACION CON LOS NIVELES SERICOS DE COBRE Y ZINC.

El estudio de las modificaciones de los niveles de cobre y zinc inducidas por el proceso artrítico se ha llevado a cabo en ratas hembras de pesos comprendidos entre 180-220 g, con artritis adyuvante. La artritis se indujo según la pauta descrita en el apartado 2.2.3. La medida del grado de inflamación y el criterio de selección de los animales que habían desarrollado artritis se han indicado en el apartado 2.2.4. (Fig. 2.21.).

2.2.8.1.- METODO PARA LA VALORACION DE COBRE Y ZINC EN HIGADO.

Para la determinación de cobre y zinc en hígado se eligió el método de espectroscopía de absorción atómica por tratarse de una técnica sensible y precisa.

Se utilizó una espectrofotómetro de absorción atómica, modelo SP 1900 PYE UNICAM y las determinaciones se efectuaron en el Servicio de Espectroscopía de la Universidad Central de Barcelona.

La técnica espectroscópica de absorción atómica, se basa en la medida de la absorción que presenta un plasma de átomos libres de un elemento en su más bajo estado energético, al ser atravesado por un haz de radiación monocromática emitida por el mismo elemento que se pretende analizar. La concentración de

MATERIAL BIOLÓGICO RATAS SPRAGUE - DAWLEY

DIA 0	INDUCCIÓN ARTRITIS 	
7	INFLAMACIÓN LOCAL 	INFLAMACIÓN DE LAS EXTREMIDADES SUERO: COBRE ZINC
14	INFLAMACIÓN SISTÉMICA 	HIGADO: COBRE ZINC
21		

Figura 2.21. Pauta experimental utilizada para valorar los niveles de cobre y zinc en suero e hígado de animales artríticos.

metal en la muestra es proporcional a la absorción detectada (Valls, 1979).

Para evitar la contaminación de las muestras biológicas analizadas, el material utilizado para la recogida, almacenamiento y tratamiento de dichas muestras fué sometido a un proceso de lavado especial. El material de vidrio se mantuvo, antes de ser utilizado, en una solución de HNO_3 al 20 % v/v durante un período superior a las 24 h. Inmediatamente antes de su empleo se lavó tres veces con agua destilada y tres veces más con agua destilada-desionizada. El material de plástico utilizado se enjuagó, repetidamente, antes de su uso con la solución ácida indicada y posteriormente, se lavó con agua destilada y agua desionizada. Para el reciclado del material de vidrio, éste se mantuvo un mínimo de 12 h en la solución ácida y se sometió al proceso de lavado descrito.

En la determinación de cobre y zinc, el material biológico se sometió a un proceso en varias etapas constituidas por la desecación, la maceración y la digestión de los hígados.

Los hígados se descongelaron durante un período de 30 min. Posteriormente se pesó 1.5 g de hígado en un erlenmeyer de 100 ml de capacidad previamente tarado. La desecación del material biológico se realiza durante un período de 8 h a 110-115°C. En el mismo erlenmeyer se añaden 5 ml de HNO_3 concentrado y el hígado desecado se mantiene en maceración una noche a 60°C.

Antes de iniciar la digestión de la muestra en un baño de arena, se añadieron 3 ml de ácido concentrado (90 %) en el

mismo erlenmeyer. La temperatura de digestión aumenta progresivamente hasta los 100 °C. Aproximadamente 2 h después de iniciar la calefacción se añaden 4 ml de ácido y la temperatura se mantiene constante a 160 °C. La digestión finaliza cuando el digerido desprende humos blancos. El líquido resultante debe ser de color amarillo, totalmente transparente.

La digestión se efectúa en una campana cerrada extractora de humos. Durante todo el período de maceración y digestión se tomaron todas las precauciones necesarias para evitar pérdidas del material biológico.

Para el análisis de cobre todo el líquido resultante de la digestión se lleva a 10 ml. La lectura de este metal se realiza directamente en esta solución. Para el análisis del zinc se efectúa una dilución 1:5 de la solución anterior con agua destilada-desionizada.

En cada experimento se realizó una curva estándar de cobre y otra de zinc, preparando distintas soluciones a partir de una solución madre de cobre y de zinc, respectivamente.

Para preparar la solución madre de cobre se partió de cobre del 98 % de riqueza (Ferosa), se pesa una cantidad de metal en polvo, que se desengrasó con acetona. Posteriormente, se pesaron 200 mg de cobre que se disolvieron en 10 ml de ácido concentrado y 3 ml de agua destilada-desionizada. Tras la disolución completa del metal, la solución resultante se enrasa a 1000 ml, teniendo la disolución final una concentración de 200 mg/l.

En el momento de preparar las soluciones patrón, se

tomaron 5 ml de la solución madre y se enrasaron a 100 ml con agua destilada-desionizada, siendo su concentración final de 10 mg de cobre/l. De esta solución se tomaron 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4 ml que se enrasaron hasta 10 ml. Las concentraciones finales de cobre fueron de 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4 mg/l. Estas soluciones fueron leídas directamente en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Cada día de lectura se realizó un blanco, compuesto de 0.1 ml de HNO_3 concentrado enrasado a 10 ml con agua destilada-desionizada. La adición de ácido en el blanco pretende igualar la acidez de esta solución a la de los problemas y las soluciones patrón.

En la figura 2.22. se representa la curva estándar y el estudio de las regresiones correspondientes a un día de lectura. La concentración de cobre en hígado se obtiene por extrapolación en la curva estándar y se expresa como μg de cobre/g de tejido fresco.

Para la preparación de la curva patrón de zinc se utilizó zinc granulado del 99 % de riqueza (Merck), cuyos gránulos de este metal se sometieron a una disolución parcial previa con ácido nítrico diluido, para eliminar así el óxido que pudiera existir en su superficie. Posteriormente, se pesaron 200 mg del metal que se disolvieron en 10 ml de ácido concentrado y la solución resultante se enrasa hasta 1000 ml. La concentración final de esta solución madre de zinc fué de 200 mg/l. La preparación de los puntos de trabajo y el blanco se elaboraron de igual modo que para el cobre, siendo las concentraciones de las soluciones finales de 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4 mg/l.

En la figura 2.23. se representa la curva estándar y el estudio de las regresiones correspondientes a un día de lectura. Las concentraciones de zinc hepático se obtuvieron por extrapolación en la curva estándar y se expresaron como μg de zinc/g de tejido fresco.

La lectura de las soluciones problema y las soluciones patrón se efectuó en un espectrofotómetro de absorción atómica SP 1900 PYE UNICAM de doble haz. Las condiciones de trabajo del aparato para el análisis de cobre y zinc se resumen en la tabla 2.1.

Un tratamiento similar al llevado a cabo con el hígado, se realizó sobre muestras de sangre extraídas el día 21, momento de máxima inflamación. Las condiciones de procesamiento de las muestras y de lectura, son similares a las ya indicadas y los resultados se expresan en μg de metal/g de sangre.

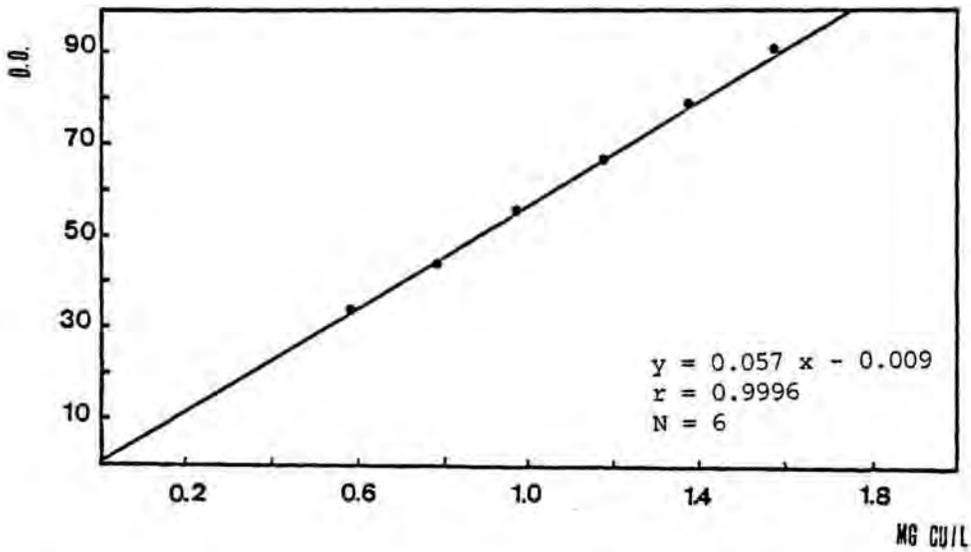


Figura 2.22. Curva de regresión utilizada para la valoración de los niveles de cobre en hígado.

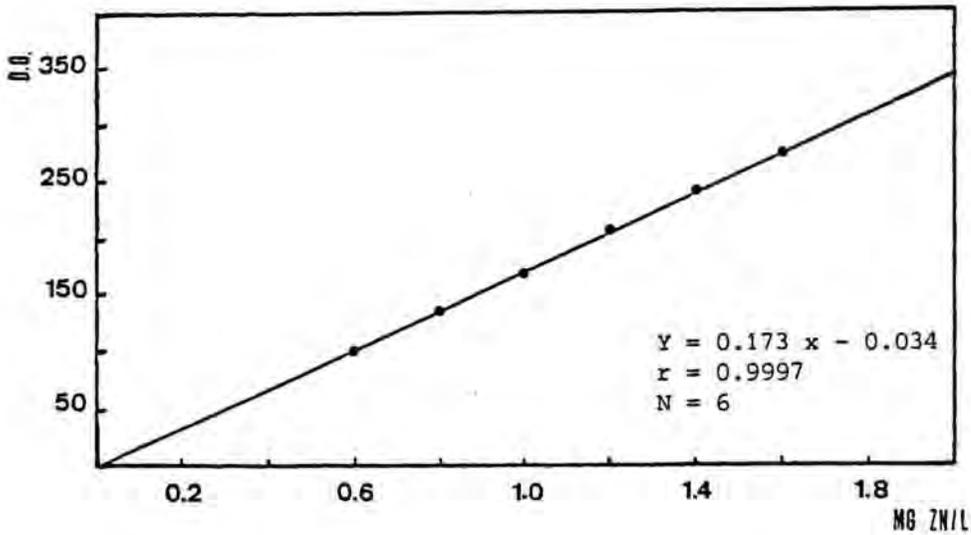


Figura 2.23. Curva de regresión utilizada para la valoración de los niveles de zinc en hígado.

2.2.8.2.- METODO PARA LA VALORACION DE COBRE Y ZINC EN SUERO.

Para la determinación de cobre y zinc en suero se utilizó una técnica de espectrometría de plasma acoplado por inducción, asistido por ordenador.

El método analítico para la determinación de metales mediante la técnica de la generación de un plasma acoplado por inducción (ICP), se fundamenta en la observación del espectro de emisión atómica del metal cuando éste es excitado térmicamente (Fassel y Kniseley, 1974).

La peculiaridad de esta técnica radica en el sistema de atomización y excitación de la muestra que, básicamente, consiste en la formación de un plasma de argón u otro gas noble, capaz de excitar térmicamente la muestra sin las interferencias que originan las llamas de combustión (Faires, 1983).

Los plasmas, por definición, son gases en los que una gran parte de sus átomos o moléculas se encuentran ionizados, de forma que el plasma puede interactuar fácilmente con campos magnéticos.

Para la generación del plasma, se hace circular flujo de argón dentro de un cilindro de cuarzo rodeado por un serpentín conectado a un generador de alta frecuencia. El argón se somete a una descarga eléctrica (cebado) que ioniza el gas, formándose espontáneamente el plasma (Fassel y Kniseley, 1974). Los iones y los electrones desprendidos en la fase de cebado se someten a un campo magnético variable, que los acelera, formando una corriente de torbellino ("eddy current"). Estas partículas eléctricas

encuentran una resistencia a su flujo, aumentando la temperatura del gas y originando la ionización del argón que accede al cilindro de cuarzo.

Con este sistema se consiguen temperaturas que oscilan entre los 1000 y los 6000°K según la región del plasma (Fassel,1979).

La muestra líquida en forma de aerosol, se inyecta dentro del plasma mediante un flujo de argón que actúa como transportador. Las partículas de la muestra alcanzan una temperatura de aproximadamente 7000°K y su permanencia dentro del plasma es, aproximadamente, de 2 ms. De esta forma se consigue un grado de atomización e ionización prácticamente total en un medio químicamente inerte (Fassel, 1979).

Una vez que la muestra ha sido excitada y emite la radiación, se elige la banda de lectura del metal a cuantificar (monocromador), se amplifica la señal (fotomultiplicador) y se detecta.

Mediante un ordenador, que controla en cada instante las condiciones de trabajo, se conoce la intensidad de la radiación y la concentración del metal en la muestra previa calibración.

Para la determinación del cobre y zinc en suero el lavado del material empleado en el experimento se realizó de la forma que se describió en el apartado 2.8.1.

El cobre y el zinc fueron analizados en una solución de suero diluido 1:13 veces. Esta solución se leyó directamente en el espectrofotómetro de emisión atómica (ICP).

La curva de calibración para el análisis de cobre y de zinc séricos se efectuó como se describe en el apartado 2.8.1. En este caso, a partir de la solución de concentración de 1 mg/l de los metales, se tomaron 2.5, 5.0 y 10.0 ml que se llevaron hasta 50 ml. Las concentraciones de los puntos estándar fueron de 0.05, 0.1 y 0.2 mg/l para los dos metales. A estas soluciones, antes de enrasar se les añadió 3.5 ml de una solución de NaCl.

Las curvas de calibración y el estudio de las regresiones correspondientes a un día de lectura para el cobre y el zinc se representan en las figuras 2.24 y 2.25 respectivamente.

Las concentraciones de estos metales en el suero se obtienen por interpolación en la curva de calibración y se expresaron como μg de metal por ml de suero.

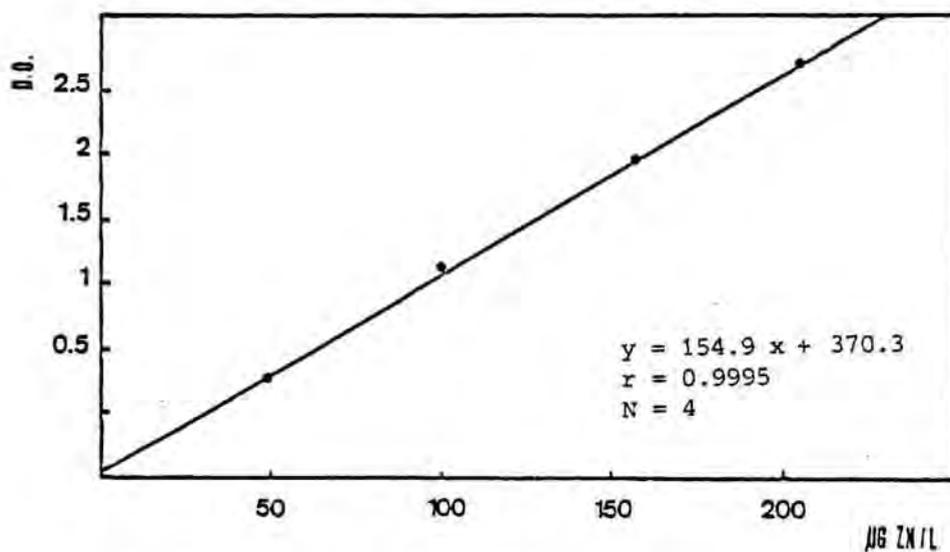


Figura 2.24. Curva de regresión utilizada para la valoración de los niveles de cobre sérico.

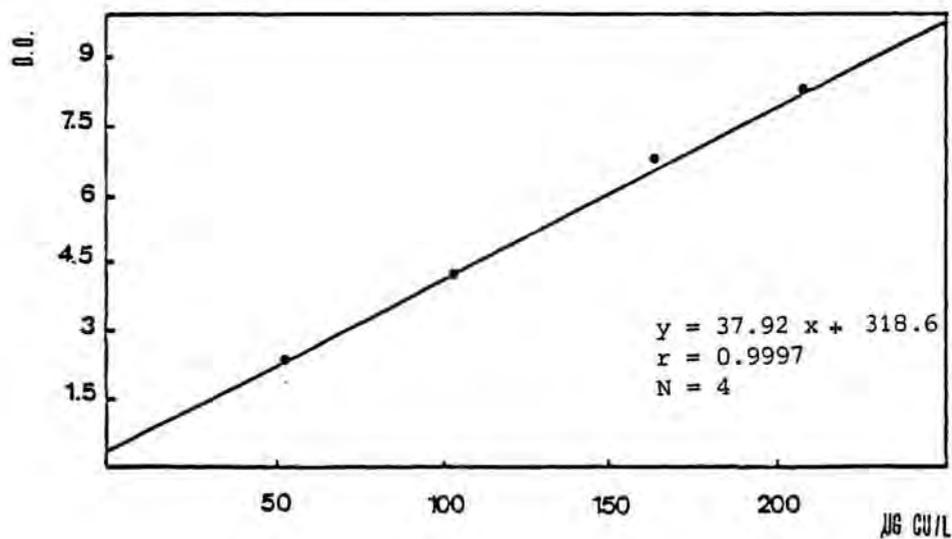


Figura 2.25. Curva de regresión utilizada para la valoración de los niveles de zinc sérico.

Tabla 2.1. Condiciones utilizadas para la determinación de cobre y zinc por absorción atómica (AAS).

	Cobre	Zinc
Longitud de onda	324.8 nm	213.9 nm
Rendija	0.1 mm	0.2 mm
Intensidad de la lámpara	4 mA	4 mA
Flujo de aire	5 l/min	5 l/min
Flujo de acetileno	0.8 l/min	0.9 l/min
Presión de acetileno	0.7 Kg/cm ²	0.7 Kg/cm ²

Tabla 2.2. Condiciones utilizadas para la determinación de cobre y zinc por plasma acoplado por inducción (ICP).

Longitud de onda para el Cobre	324.8	nm
Longitud de onda para el Zinc	213.9	nm
Flujo de plasma ("outer")	20	l/min
Flujo de arrastre ("inner")	0.3	l/min
Rendija de entrada	30	µm
Rendija de salida	40	µm
Red de difracción holográfica	3600	trazos/nm
Distancia focal	1	m
Generador de radiofrecuencia	1	Kw 277 MHz

2.2.9.- EFFECTO IN VITRO DEL COBRE Y ZINC SOBRE LAS ACTIVIDADES AND Y APH.

Para valorar el posible efecto del cobre y el zinc sobre las actividades AND y APH microsomales, se estudió el efecto de estos metales, sobre dichas actividades, al incubar la fracción microsomal con concentraciones crecientes de cobre ($1\mu\text{M}$ - $100\ \mu\text{M}$) o zinc ($20\ \mu\text{M}$ - $350\ \mu\text{M}$). La sal de cobre utilizada fué el CuSO_4 y la sal de zinc utilizada fué el ZnSO_4 . Se escogieron estas sales por ser solubles en medio acuoso y por haberse comprobado con anterioridad que el ión sulfato apenas produce modificaciones significativas en las actividades del cit.P-450.

2.2.10.- TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS CON ANTIINFLAMATORIOS.

Para estudiar la existencia o no de relación entre el proceso inflamatorio desarrollado durante la artritis adyuvante y los cambios producidos en la capacidad metabolizadora de fármacos se utilizaron dos fármacos antiinflamatorios de probada actividad antiinflamatoria, como son la indometacina y la dexametasona. El desarrollo del modelo de artritis adyuvante y la selección de los animales artríticos se realizó de acuerdo a lo expuesto en los apartados 2.2.3. y 2.2.4., respectivamente.

2.2.10.1.- TRATAMIENTO CURATIVO CON INDOMETACINA.

Se utilizaron ratas hembras de 190 a 250 g de peso, que se distribuyeron en los siguientes lotes: un primer grupo de animales control, administrados por vía oral con 10 ml/Kg/día de una solución de carboximetilcelulosa 0.1 % y Tween 80 al 0.1 % (excipiente). El número total de animales fue de 24, distribuidos en grupos de 8 animales. Un segundo grupo de animales artríticos, a los que se administró por vía oral 10 ml/Kg/día del excipiente al igual que con el lote anterior. El número de animales utilizados fue de 30, distribuidos en lotes de 10 animales. Por último, un lote de animales artríticos sometidos a tratamiento farmacológico con indometacina, 1 mg/Kg/día en un volumen correspondiente a 10 ml/Kg. El número de animales empleados fue de 30, distribuidos en grupos de 10 animales.

Los animales de los tres lotes se sacrificaron semanalmente, los días 14, 21 y 28 después de la inducción. Se determinó el peso del hígado y se tomaron muestras de sangre e hígado que se conservaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Paralelamente, se intentó observar cual era el efecto de la indometacina, "per se", sobre la síntesis de proteínas plasmáticas y la actividad metabolizadora de fármacos ligada al cit.P-450. Para ello se usaron ratas hembras de 100-190 g y 1.5 meses de edad que se distribuyeron de la siguiente forma:

Un lote de animales control, a los que se les administró el excipiente (C.M.C. y Tween al 0.1 %) 10 ml/Kg/día. Al lote de animales administrados con indometacina se les administró el fármaco a razón de 1 mg/Kg/día en un volumen

correspondiente a 10 ml/Kg. A los animales, previa anestesia con éter, se les practicó toracotomía, se separó el pericardio y extrajo sangre por punción cardíaca a nivel del ápice, según el método descrito por Schermer (1967). Se obtuvieron aproximadamente 8 ml de sangre, que fué rápidamente introducida en tubos de plástico en baño a 37°C hasta la formación completa del coágulo. Para la obtención del suero, los tubos se centrifugaron a 300 g durante 10 min (centrífuga Beckman mod. TJ-6). Alícuotas del suero fueron congeladas a -70°C hasta su análisis (Fig. 2.26.).

De los mismos animales se extrajo el hígado, se pesó y congeló inmediatamente a -70°C hasta su uso.

Como parámetros de evolución clínica se determinaron la curva ponderal, la inflamación local y sistémica y el peso de órganos.

2.2.10.1.1.- Inflamación local y sistémica.

Dos veces a la semana, mediante pletismómetro de mercurio, se valoró el volumen de las extremidades posteriores ipsi y contralateral, según el método descrito por Spector y Willoughby (1968).

MATERIAL BIOLÓGICO RATAS SPRAGUE-DAWLEY

DÍA 0	INDUCCIÓN ARTRITIS 	
7	INFLAMACIÓN LOCAL 	INFLAMACIÓN DE LAS EXTREMIIDADES SUERO : PROTEINOGRAMA GRUPOS SULFIDRIL
14	INFLAMACIÓN SISTÉMICA 	
21	TRATAMIENTO TERAPÉUTICO INDOMETACINA 	HIGADO : CITOCROMO P-450 ANO APH
28		

Figura 2.26. Pauta experimental utilizada para valorar el efecto del tratamiento con indometacina sobre la artritis adyuvante.

2.2.10.1.2.- Parámetros somatométricos.

Se siguió la evolución del peso corporal semanalmente. Para la valoración se utilizó una balanza Sauter KM 1.000. También se determinó el peso del hígado con una balanza Sartorius mod. 1.212 MP (0.001-0.005).

2.2.10.1.3.- Proteínas séricas: proteinograma.

Para la determinación de las proteínas séricas totales y la cuantificación de sus diferentes fracciones se utilizó la técnica mencionada en el apartado 2.2.4.

2.2.10.1.4.- Cuantificaciones de los niveles de grupos SH.

Para la valoración de los niveles de grupos sulfidrilo séricos en los animales control, artríticos y artríticos tratados con indometacina, se siguió el mismo método anteriormente descrito en el apartado 2.2.4.

2.2.10.1.5.- Niveles de cit.P-450 y actividades AND y APH.

Los niveles de cit.P-450 hepático se determinaron según el método descrito en el apartado 2.2.4. . La cuantificación de las actividades AND y APH se realizó tal como se describe en el apartado 2.2.1.2.

2.2.10.2.- TRATAMIENTO CURATIVO CON DEXAMETASONA.

Se utilizaron ratas hembras (Interfauna Ibérica S.A.) de 130-160 g de peso, que se distribuyeron en los siguientes lotes: un grupo de animales control, administrados por vía oral con 10 ml/kg/día de una solución de carboximetilcelulosa 0.1 % y Tween 80 al 0.1 % (excipiente). Otro grupo estaba formado por de animales artríticos (la inducción y selección se realizó como se recoge en los apartados 2.2.3. y 2.2.4., respectivamente), a los que se les administró por vía oral 10 ml/kg/día del excipiente al igual que el grupo control. Por último, un lote de animales artríticos tratados farmacológicamente, a los que se les administró dexametasona a la dosis de 0.3 mg/kg/día en un volumen de 10 ml/kg. El tratamiento curativo con dexametasona se inició el día 14 y se administró diariamente hasta el día 28 postinducción. El efecto de la Dxt sobre los parámetros estudiados se valoró en un grupo de ratas control a las que se administró la Dxt.

El peso corporal y la inflamación de las extremidades se midió los días 0, 3, 10, 14, 21, 24 y 28. El día 28, las ratas se anestesiaron con éter y se extrajo una muestra de sangre por punción cardíaca. Una vez separado el suero se valoraron los niveles de grupos SH séricos por el método de Ellman (1959). El hígado también se extrajo, se lavó y pesó, antes de ser congelado a -70°C hasta su uso.

Posteriormente, el hígado fue homogeneizado según la técnica ya descrita de ultracentrifugación. El contenido en proteínas de la fracción microsomal aislada, fué determinado por

el método de Lowry y col. (1951). En la fracción microsomal se valoraron los niveles de cit. P-450 de acuerdo al método de Omura y Sato (1964). La actividad AND se determinó por el método de Littert y col. (1975). La cantidad de formaldehído producido se determinó por el método de Nash (1953). La actividad APH se midió según la técnica de Imai y col. (1966) (Fig. 2.27.).

2.2.11.- EFEECTO DEL M. butyricum SOBRE EL METABOLISMO MICROSOMAL HEPATICO EN EL RATON.

Se utilizaron ratones Swiss hembras de 22-25 g de peso.

En primer lugar se realizó un ensayo para determinar la vía de administración óptima del M. butyricum, con el fin de obtener alteraciones del metabolismo de fármacos sin la producción de inflamación, como ocurre en la artritis adyuvante.

Para ello, se agruparon los animales en diferentes lotes: A un grupo de ratones se les administró el M. butyricum por vía i.p. a razón de 0.1 ml de una suspensión que contenía 5 mg de M. butyricum en vaselina líquida. A otro grupo se le administró la misma cantidad de M. butyricum por vía subcutánea. Estos dos lotes se compararon con un tercero, de animales control. A los 7, 14, 21, 28 y 35 días de la administración se valoró el tiempo de dormición de cada animal después de la administración de pentobarbital sódico (60 mg/kg). De las dos vías ensayadas se eligió la vía i.p.. Una vez inducida la alteración en el metabolismo de fármacos se estudió el efecto de

la administración de indometacina (1 mg/kg/día) o dexametasona (0.3 mg/kg/día) como preventivo (7 días antes de la administración del M. butyricum) o como terapéutica (se inicia 24 h después de administrarse el M. butyricum) prolongándose durante dos semanas posteriores al día de administración del M. butyricum.

A los 14 días de la administración del M. butyricum, se valoró el efecto de la administración profiláctica y terapéutica, determinando el tiempo de dormición usando pentobarbital sódico. Posteriormente, se sacrificó a los animales y se extrajo el hígado que se conservó a -70° C. Una vez homogeneizado el hígado se separó la fracción microsomal por el método de El Defrawry el Masry y col. (1974). En la fracción microsomal se valoraron las actividades AND y APH del cit. P-450 por los métodos de Nash (1953) y Imai y col. (1966), respectivamente (Fig. 2.28.).

MATERIAL BIOLÓGICO RATAS SPRAGUE-DAWLEY

DIA 0	INDUCCIÓN ARTRITIS 	
7	INFLAMACIÓN LOCAL 	INFLAMACIÓN DE LAS EXTREMIDADES SUERO : PROTEINOGRAMA GRUPOS SULFIDRIL
14 21 28	INFLAMACIÓN SISTÉMICA  TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DEXAMETASONA 	RIGADO : CITOCROMO P-450 AND APH

Figura 2.27. Pauta experimental utilizada para valorar el efecto del tratamiento con dexametasona sobre la artritis adyuvante.

MATERIAL BIOLÓGICO RATON ALBINO SWISS

DIA -3	 ADMINISTRACION DE M. BUTYRICUM	PRUEBA "IN VIVO": TIEMPO DE DURMISION
0		
3		
7	TRATAMIENTO PREVENTIVO	PRUEBAS "IN VITRO": CITOCROMO P- 450 AND APR
14	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> TRATAMIENTO CURATIVO </div>	

Figura 2.28. Pauta experimental utilizada para valorar el efecto de la administración de M. butyricum sobre el metabolismo de fármacos en ratón.

2.2.12. CRITERIOS ESTADISTICOS APLICADOS.

2.2.12.1. INDICES DEL GRADO DE DISPERSION.

Como índices del grado de dispersión de los resultados experimentales, se ha utilizado la desviación estándar, efectuando la corrección de Sheppard si el número de valores observados era inferior a diez .

De los valores medios obtenidos se han establecido sus límites fiduciales, admitiendo un riesgo de error del 5 %, en aquellas poblaciones de distribución normal. El cálculo de los límites de confianza del valor medio observado se ha realizado en función del tamaño de la muestra: si $N > 30$, viene definido por $m \pm st$.

Paralelamente se ha realizado el cálculo de los límites para un sujeto, $m \pm 1.96 s$, intervalo que concierne a un individuo y que permite detectar los estados patológicos.

2.2.12.2. CORRELACION Y REGRESION

Se han efectuado estudios de la relación o dependencia entre dos variables cuantitativas, basadas en el cálculo de un índice "r" .

2.2.12.3. PRUEBAS DE COMPARACION ENTRE DOS GRUPOS.

Para el análisis de la posible significación de la diferencia entre dos medias es preciso que las distribuciones de los conjuntos, de donde proceden las medias sean normales o logarítmico-normales y por otra, que ambos grupos tengan la misma varianza. Debe considerarse, asimismo, cuando $N > 30$, cuya comparación se efectúa con la ayuda del valor tabulado z , a partir de la ecuación de la curva normal reducida para el valor aceptado de α . Si $N > 30$, el valor "t" de Student hallado, teniendo en cuenta el riesgo consentido y los grados de libertad, se compara con el valor de "t" tabulado según la ley de Student-Fisher. En todos los casos el riesgo α aceptado ha sido igual a 0.05 .

Conviene puntualizar que si se observa una diferencia significativa entre dos medias, aún cuando el número de casos sea reducido, este dato tiene valor absoluto, de manera que, en otras condiciones experimentales se podrá, como máximo, elevar al grado de significación, pero nunca se observa una ausencia de significación.

2.2.12.4. CALCULO ESTADISTICO.

El cálculo estadístico se ha efectuado con la ayuda de un programador ATAI0 COMPUCORD 327 Scientist y un computador TEKTRONIK 4051, provisto de "interactive digital plotter" Tektronik 4662, "hard copy unit" Tektronik 4631 y salida impresa de datos Tektronik 4641-1. Asimismo se ha utilizado un computador SHARP MZ-80B, provisto de "floppy disk" Sharp MZ-80B y salida impresa de datos Sharp MZ-80 p5 .



3. RESULTADOS

3.1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE AISLAMIENTO
MICROSOMAL. METODO DE ULTRACENTRIFUGACION Y
DE PRECIPITACION CON CALCIO.

En el grupo de animales control y tratados con CCl_4 el contenido en proteínas de la fracción microsomal obtenido por el método de agregación con calcio fue significativamente superior al obtenido después de aplicar el método de aislamiento microsomal con ultracentrifugación. Así, se aislaron 11.51 ± 0.69 (media \pm error estándar) y 16.68 ± 1.67 mg de proteína microsomal/g de hígado a partir de muestras de animales control, utilizando el método de aislamiento con ultracentrifugación o agregación con calcio, respectivamente. A partir de las muestras de hígado de ratas tratadas con CCl_4 los valores obtenidos fueron 11.04 ± 1.12 y 18.63 ± 1.22 mg proteína microsomal/g hígado, respectivamente.

En la tabla 3.1. se recogen los valores de la actividad AND de la fracción microsomal obtenida por ambos métodos de aislamiento. Los valores de la actividad AND fueron inferiores cuando la fracción microsomal se aisló por agregación con calcio respecto a los obtenidos en la fracción microsomal aislada por ultracentrifugación. Estos resultados se obtuvieron tanto en ratas control como en las tratadas con CCl_4 , siendo la actividad AND de los microsomas aislados por agregación con calcio, inferior un 28.6 % y 24.1 %, respectivamente.

En el caso de la actividad APH, los valores obtenidos en la fracción microsomal aislada por agregación con calcio

Tabla 3.1. Efecto de los diferentes métodos de aislamiento microsomal sobre las actividades AND y APH.

	AND*		APH*	
	Ultracentrifugación	Agregación-Ca	Ultracentrifugación	Agregación-Ca
Control	208.9 ± 13.8	149.2 ± 18.6	20.7 ± 0.4	19.5 ± 1.3
CCl ₄	79.2 ± 16.2	60.1 ± 13.6*	4.1 ± 0.3*	3.5 ± 0.3*

Cada valor es la media ± S.E.M. de 4-6 determinaciones.

a) nmoles HCHO/30 min incubación/mg proteína microsomal.

b) μmoles p-aminofenol/30 min incubación/mg proteína microsomal.

* p < 0.01 con respecto al grupo control.

fueron inferiores a los obtenidos en la fracción aislada por ultracentrifugación. Esta diferencia fue de 5.79 % en el caso de las ratas control y de 14.6 % en el grupo de animales tratados con CCl_4 , en ambos casos las diferencias no fueron significativas.

El tratamiento con CCl_4 produce alteraciones del citocromo P-450 que se traducen en una disminución de la actividad APH, del mismo orden: 62.1 % por ultracentrifugación y 59.7 % por agregación con calcio. La tabla 3.1. muestra también que la disminución de la actividad APH después de la administración de CCl_4 es similar al utilizar los diferentes métodos de aislamiento microsomal. Así, se produce una disminución del 80.2 % en la actividad APH en los microsomas obtenidos por ultracentrifugación, mientras que la disminución de la actividad APH fue de 82.1 % cuando se valoró en microsomas obtenidos por precipitación con CaCl_2 .

3.2.- EFEECTO DEL CaCl_2 "IN VITRO" SOBRE LAS ACTIVIDADES AND Y APH.

En microsomas obtenidos por el método de ultracentrifugación, la adición a los medios de incubación de concentraciones crecientes de CaCl_2 , induce una disminución, dosis dependiente, de la actividad APH a concentraciones superiores a 6.7 mM. Concentraciones de CaCl_2 superiores a 26.8 mM causan una depresión de la actividad enzimática estadísticamente significativa (fig. 3.1.). Por el

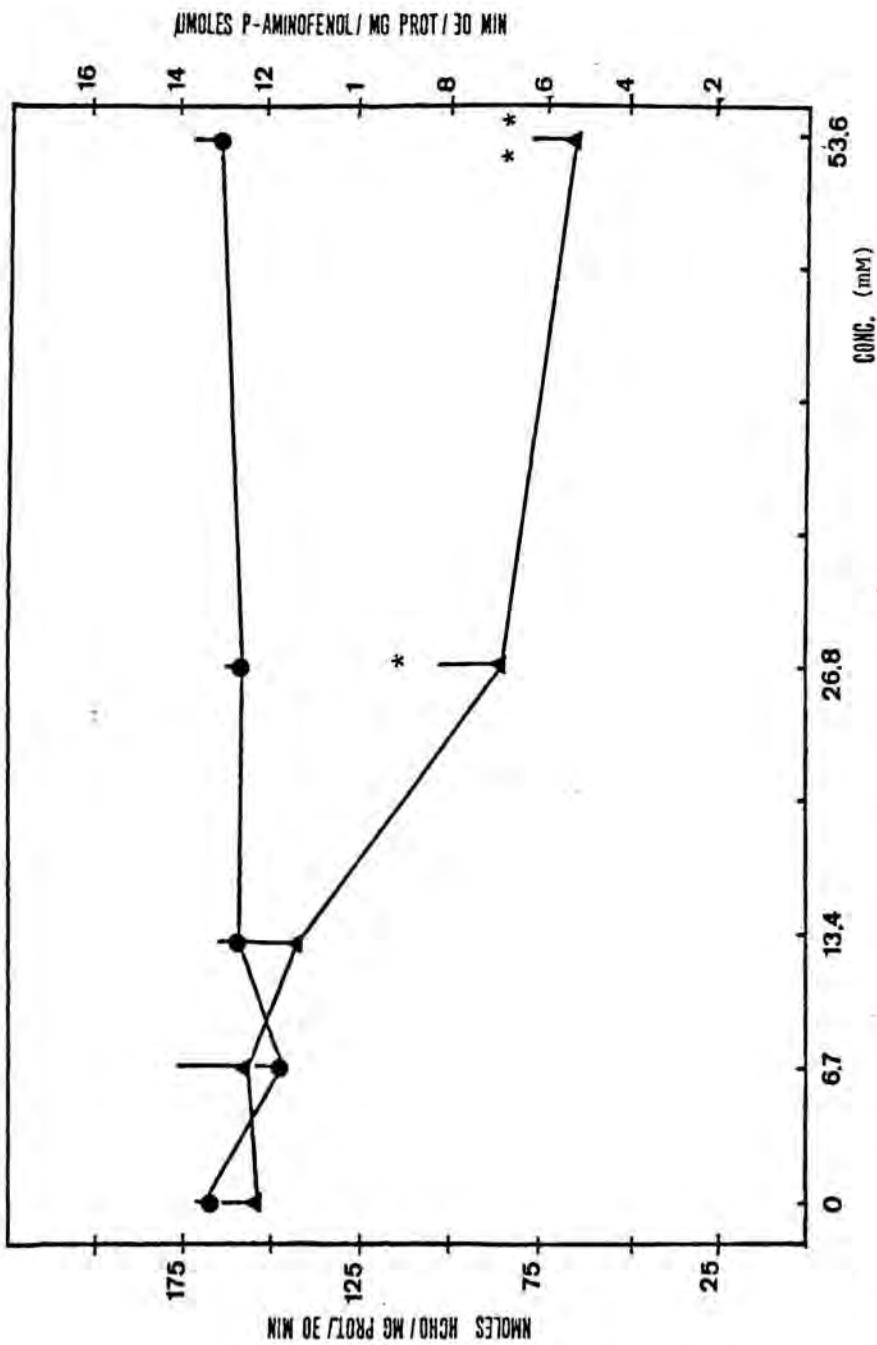


Figura 3.1. Efecto "in vitro" de concentraciones crecientes de CaCl_2 sobre la actividad AND (\blacktriangle) y APH (\bullet). Cada valor representa la media \pm S.D. de 4 experimentos. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al control (test t-Student).

contrario, la adición a los medios de incubación de CaCl_2 a concentraciones que fueron de 6.7 mM a 53.6 mM no produjo variaciones en la actividad AND.

3.3.- VALORACION DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL CIT.P-450.

En la tabla 3.2. se resumen los valores obtenidos al estudiar el efecto de diferentes métodos de almacenamiento de la fracción microsomal sobre las actividades del cit.P-450, AND y APH. La actividad AND valorada en microsomas que se habían mantenido a -70°C durante un período máximo de 1 mes, fué muy semejante a la obtenida en microsomas aislados inmediatamente después del sacrificio. Cuando se mantuvieron porciones de hígado congelado durante un tiempo análogo, la actividad AND se redujo un 21.25 %. De forma análoga la actividad APH se reducía en un 10 % en microsomas mantenidos congelados durante un período máximo de un mes, mientras que la reducción era superior cuando se procesaron las muestras de hígado congeladas. Ambas reducciones no fueron estadísticamente significativas.

La administración de CCl_4 produce una disminución de las actividades AND y APH. Esta disminución fué del mismo orden independientemente de la forma de conservar la fracción microsomal. Así, la disminución de la actividad AND osciló entre el 49.33 % y el 62.08 %, mientras que la pérdida de actividad APH varió entre un 73.91 % y un 80.67 % .

Tabla 3.2. Efecto de las condiciones de conservación sobre las actividades AND y APH.

	Aminopirina N-demetilasa ^a Control	CCl ₄	Anilina p-hidroxilasa ^a Control	CCl ₄
Muestra sin conservar	208.9 ± 13.8	79.2 ± 16.2*	20.7 ± 0.4	4.0 ± 0.3*
Microsomas a -70°C	232.5 ± 10.7	117.8 ± 6.9*	18.4 ± 0.9	4.8 ± 0.2*
Hígado a -70°C	164.5 ± 15.5	82.2 ± 8.6*	13.8 ± 0.6	3.5 ± 1.1*

Cada valor representa la media ± S.E.M. de 4-6 experimentos.

a) nmoles HCHO/30 min incubación/mg proteína microsomal.

b) μmoles p-aminofenol/30 min incubación/mg proteína microsomal.

* p < 0.001 con respecto al control.

3.4.- ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS ENZIMÁTICAS DE LAS ACTIVIDADES AND Y APH DE RATAS CONTROL Y ARTRÍTICAS.

Se han estudiado las variaciones en las cinéticas de metabolización de sustratos tipo I y II por el citocromo P-450, en ratas a las que se indujo la artritis adyuvante. Las representaciones de Lineweaver-Burk de las cinéticas de metabolización de la aminopirina y la anilina se recogen en las figuras 3.2. y 3.3., respectivamente.

Los valores de la V_{max} de la actividad AND se expresan como nmoles HCHO/mg proteína/10 min incubación, mientras que la actividad APH se expresa como μ moles p-aminofenol/mg proteína microsomal/10 min incubación. Como se puede observar se produce una reducción significativa de la V_{max} en ambas actividades enzimáticas en los animales artríticos con respecto a los controles.

Los valores obtenidos de K_m para la actividad AND fueron de 804 μ M y de 452 μ M para animales control y artríticos, respectivamente. Los valores de K_m para la actividad APH fueron de 406.5 μ M para ratas control y 421.9 μ M para ratas artríticas. No hubo diferencia significativa en la K_m de la actividad APH entre ambos grupos de animales, pero si se apreció una reducción significativa de la K_m de la actividad AND en las ratas artríticas.

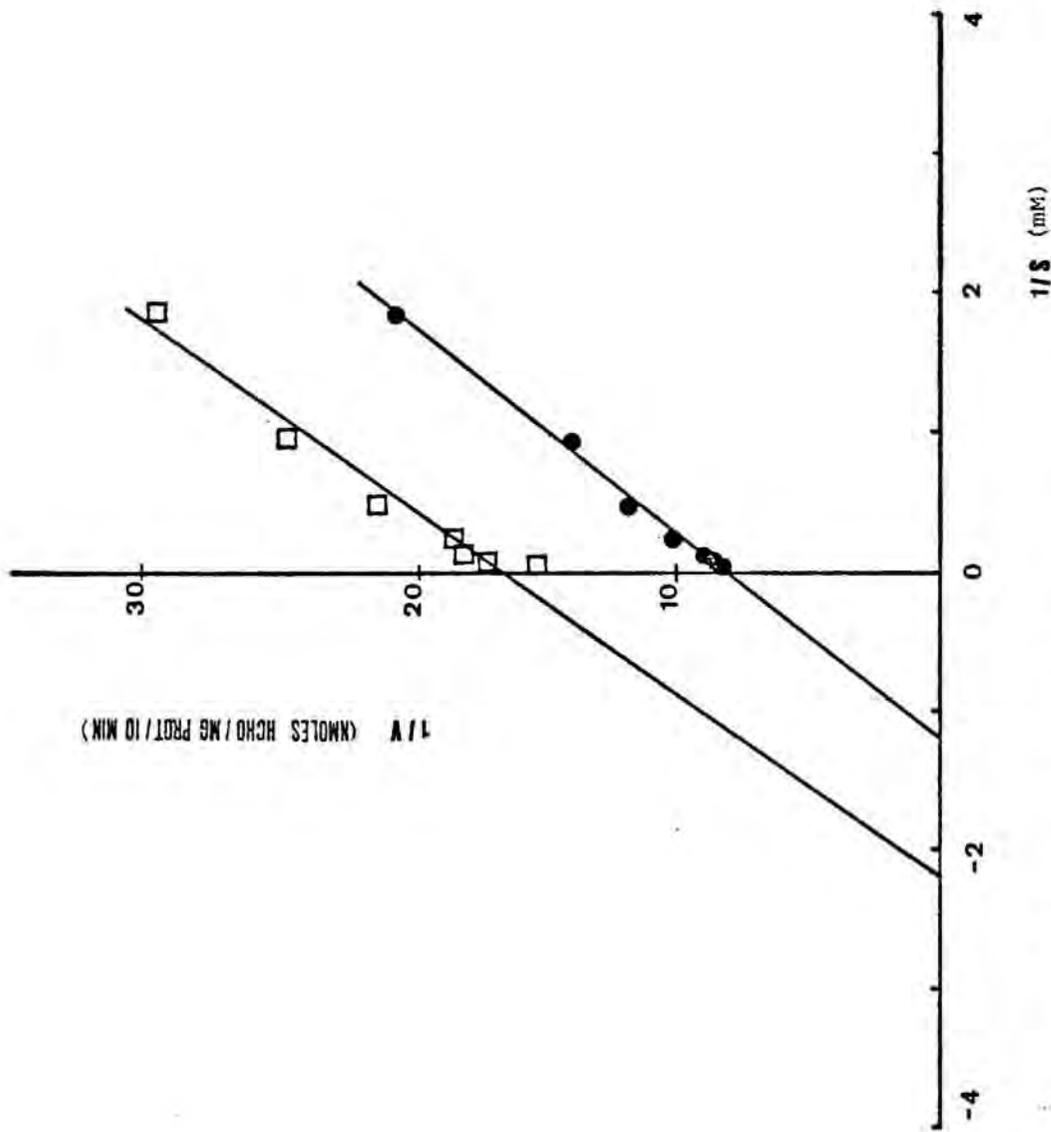


Figura 3.2. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad AND de la fracción microsomal de ratas control (●) y artríticas (□). Cada punto representa de 4-6 experimentos diferentes.

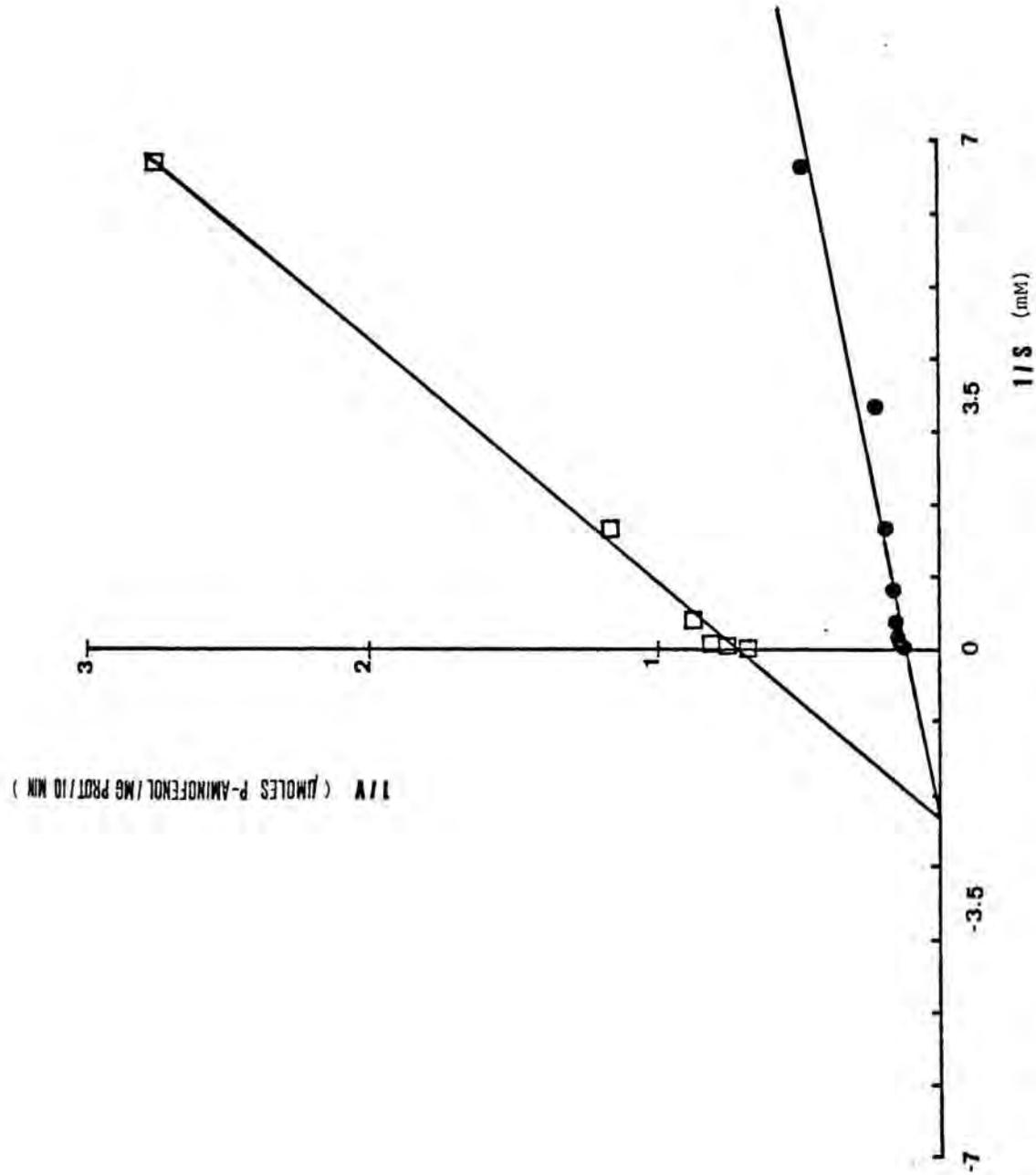


Figura 3.3. Representación de Lineweaver-Burk de la actividad APH de la fracción microsomal de ratas control (●) y artríticas (□). Cada punto representa de 4-6 experimentos diferentes.

3.5.- ANALISIS DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS SOBRE LOS NIVELES DE CIT.P-450, AND Y APH EN ANIMALES SANOS, ARTRITICOS Y CON INGESTA RESTRINGIDA.

La patología inducida en los animales artríticos se caracteriza por una inflamación articular que se acompaña de la reducción de los niveles de grupos SH séricos y alteraciones en el perfil del proteinograma.

En la tabla 3.3. se muestra el grado de inflamación de las articulaciones ipsilateral y contralateral (artritis primaria y secundaria, respectivamente) el día 21 después de la inducción. La inflamación en la extremidad contralateral siempre fué más marcada en las ratas hembra que en los machos. En la misma tabla, se recogen los valores de los niveles de grupos sulfidrilo séricos que se encuentran reducidos en los animales artríticos en un 39.4 % en las ratas macho y un 25.6 % en ratas hembra. Aunque la cantidad de proteínas plasmáticas totales son similares en los animales control y artríticos, existen modificaciones características de la patología artrítica que se evidencian por cambios en las diferentes fracciones del proteinograma (fig. 3.4.b). Así, la albúmina se encuentra reducida un 33.9 % (machos) y un 47.6 % (hembras), las α -1 y α -2-globulinas aumentadas un 45.8 % y 68.9 % (machos) y 70.1 % y 260.1 % (hembras), respectivamente. Y las β globulinas se encuentran aumentadas un 52.2 % (machos) y un 58.3 % (hembras). No se aprecian cambios en los niveles de τ globulinas en los animales artríticos.

En los animales control que ingirieron una dieta

Tabla 3.3. Incremento del volumen de las extremidades ipsilateral (1) y contralateral (2) y niveles grupos SH séricos.

TRATAMIENTO	SEXO	INFLAMACION DE LAS EXTREMIDADES (1) (1)	INFLAMACION DE LAS EXTREMIDADES (2) (2)	NIVELES-SH (μ moles glutation)
CONTROL	M	0.92 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.07	327.01 \pm 6.71
	H	0.38 \pm 0.03	0.13 \pm 0.07	373.78 \pm 11.58 ^T
ARTRITIS	M	4.60 \pm 0.24*	1.22 \pm 0.34*	243.78 \pm 8.63*
	H	4.75 \pm 0.17*	2.26 \pm 0.50*	226.03 \pm 10.71*
CONTROL INGESTA RED.	M	-	-	341.35 \pm 10.80
	H	-	-	378.15 \pm 5.04

a) todos los resultados se expresan como media \pm S.E.M. de 8 animales

* p < 0.001 en relación al grupo control.

T p < 0.05 entre ambos sexos.

similar a la de los animales artríticos no se apreció ningún cambio significativo en ninguno de los parámetros anteriormente indicados.

En los animales artríticos se aprecia una reducción en el porcentaje de aumento de peso y un menor consumo de comida (27.2 % en machos y 25.1 % en hembras), respecto a los animales control. La evolución de ambos parámetros se recoge en la fig 3.4.

Se ha observado que existe correlación entre el incremento de peso corporal y la ingesta de comida ($r = 0.727$, $p < 0.001$), durante todo el período estudiado.

El metabolismo microsomal hepático en las ratas artríticas sufre notables alteraciones en la capacidad metabolizadora de fármacos. Así, se observa una disminución en la actividad AND del 60 % en ratas machos y del 29 % en animales hembras, respectivamente. De manera análoga, la actividad APH se halla reducida en un 34 % y 39 % en los animales machos y hembras, respectivamente. Los niveles de cit. P-450 se encuentran disminuidos en un 35 % en las ratas artríticas macho y un 28 % en las ratas artríticas hembra (tabla 3.4.).

En los animales sometidos a ingesta restringida, no se han detectado cambios en la actividad microsomal hepática (tabla 3.4.).

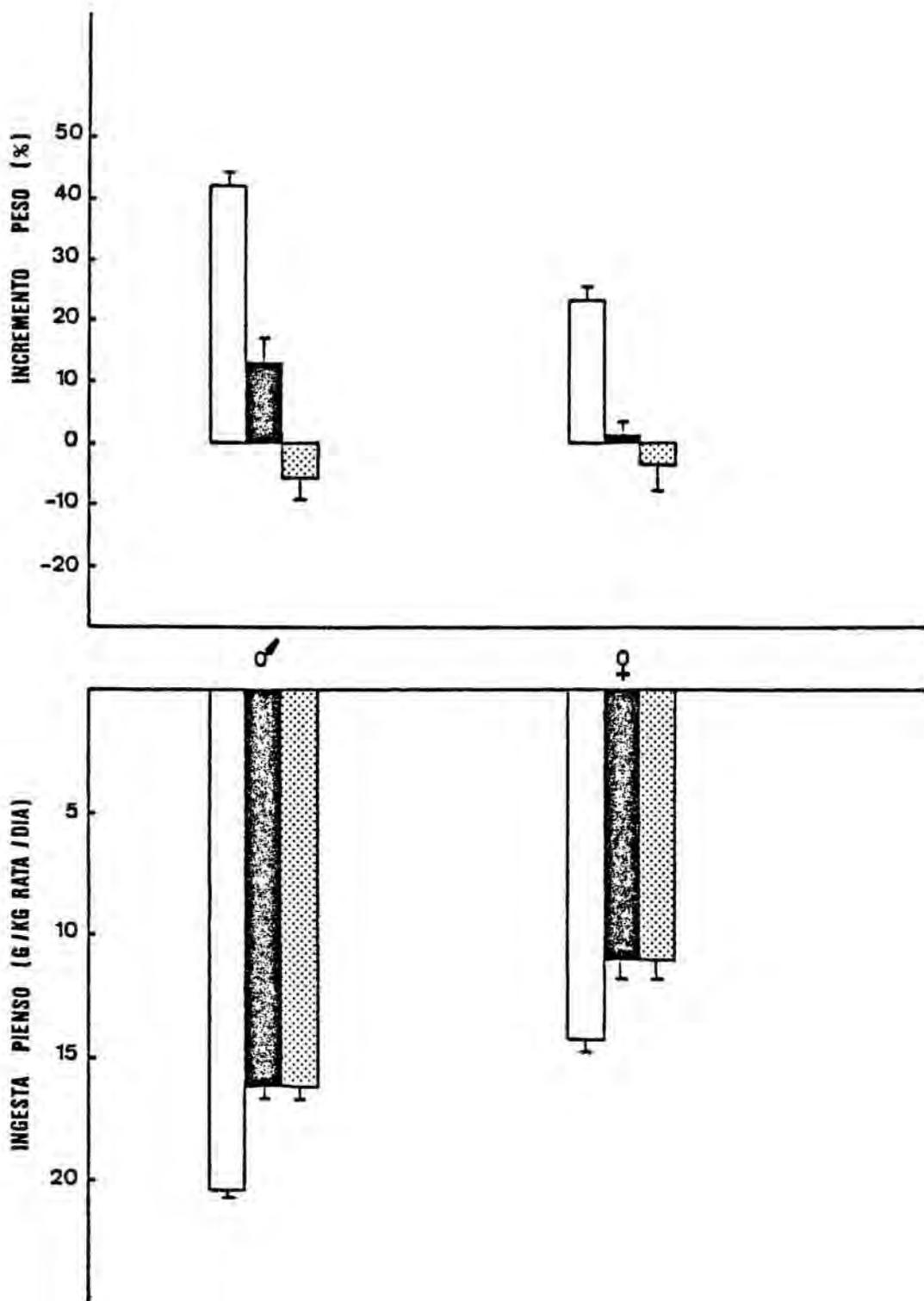


Figura 3.4. Incremento del peso corporal y consumo de comida en ratas control (□), artríticas (■) y control con ingesta controlada (▨). Cada barra representa la media ± error estándar de 4-8 animales.

Tabla 3.4. Efecto de la artritis adyuvante y la restricción en la ingesta sobre las actividades enzimáticas metabolizadoras de fármacos.

Tratamiento	sexo	Peso hígado (%)	AND ^a	APH ^b	Cit.P-450 ^c
Control	M	3.31 ± 0.06	140.24 ± 14.00	5.95 ± 0.94	0.43 ± 0.03
	H	3.66 ± 0.05	85.14 ± 4.48 ^ø	8.73 ± 0.47 ^ø	0.36 ± 0.04
Artritis	M	3.25 ± 0.11	54.79 ± 9.74 [*]	3.35 ± 0.42 [*]	0.28 ± 0.01
	H	3.82 ± 0.13	66.48 ± 3.76 [*]	5.27 ± 0.16 [*]	0.26 ± 0.02
Ingesta-Reduc.	M	3.32 ± 0.11	122.49 ± 9.49	5.78 ± 0.73	0.54 ± 0.09
	H	3.18 ± 0.05 [†]	98.43 ± 6.77	7.97 ± 0.39	0.33 ± 0.39

Todos los resultados se expresan como media ± S.E.M. de 6-8 animales.

a) nmoles HCHO/mg proteína microsomal/30 min.

b) µmoles p-aminofenol/mg proteína microsomal/30 min.

* p < 0.05 respecto al grupo control.

ø p < 0.05 entre ambos sexos.

† p < 0.001 entre el grupo control y animales sanos con ingesta reducida.

3.6.- ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ARTRITIS Y DE LA RESTRICCIÓN DIETÉTICA SOBRE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS MARCADORES DE HEPATOTOXICIDAD.

En la tabla 3.5. y 3.6. se indican los valores medios e índices de dispersión de algunos parámetros bioquímicos séricos indicadores de lesión hepática. De todos los resultados obtenidos cabe destacar que las ratas artríticas sufren una disminución estadísticamente significativa de la ALT (alanina-aminotransferasa) y un aumento de la ALP (fosfatasa alcalina), tanto respecto al grupo control como al control ingesta. Asimismo, en los animales artríticos se observa una disminución significativa de los triglicéridos séricos, respecto al grupo control ingesta.

3.7.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION Y LA LIPIDOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA EN RATAS ARTRÍTICAS Y CON INGESTA RESTRINGIDA.

En la fig 3.5. se indica el consumo de comida en cada lote de animales, expresado en g pienso/kg rata/día. El consumo de pienso de los animales artríticos fué menor que el de los animales control. La reducción en la ingesta fué más acusada los primeros días después de la inducción de la artritis (del día 0 al 4 del experimento) (45 %, respecto a la ingesta control) y durante el período de aparición de los signos de la artritis

TABLA 3.5. Parametros bioquímicos séricos.

GRUPO	n	TGL	COL	GLU
Control	12	88.88 ± 6.65	78.72 ± 3.76	148.89 ± 9.14
Control ingesta	8	103.00 ± 6.65	75.00 ± 3.75	145.00 ± 4.92
Artritis	8	72.00 ± 11.69	78.83 ± 6.80	133.17 ± 6.80
Etanol	10	85.91 ± 11.37	75.24 ± 4.53	174.27 ± 7.99
CCl ₄	4	117.00 ± 12.74* ^ø	94.66 ± 8.37	132.67 ± 8.37

Los resultados se expresa por la media ± S.E.M.
TGL = triglicéridos (mg/dl); COL = colesterol (mg/dl) y GLU = glucosa (mg/dl).

* p < 0.01 respecto al grupo control. ø p < 0.01 respecto al grupo control ingesta.

TABLA 3.6. Parámetros bioquímicos séricos.

GRUPO	n	ALT	AST	ALP
Control	12	48.4 ± 1.6	94.7 ± 3.6	165.0 ± 19.1
Control ingesta	8	44.4 ± 2.1	80.9 ± 8.3	225.0 ± 28.3
Artritis	8	30.1 ± 1.3* ϕ	83.4 ± 5.0	400.4 ± 20.7* ϕ
Etanol	10	62.3 ± 8.75	99.5 ± 7.8	506.0 ± 40.6* ϕ
CCl ₄	4	272.0 ± 71.28* ϕ	707.7 ± 231.5* ϕ	509.3 ± 132.0* ϕ

Los resultados se expresan como media ± S.E.M.

ALT = alanina aminotransferasa (U.I.); AST = aspartato aminotransferasa (U.I.); ALP = fosfatasa alcalina (U.I.).

* p < 0.01, respecto al grupo control. ϕ p < 0.01, respecto al grupo control ingesta.

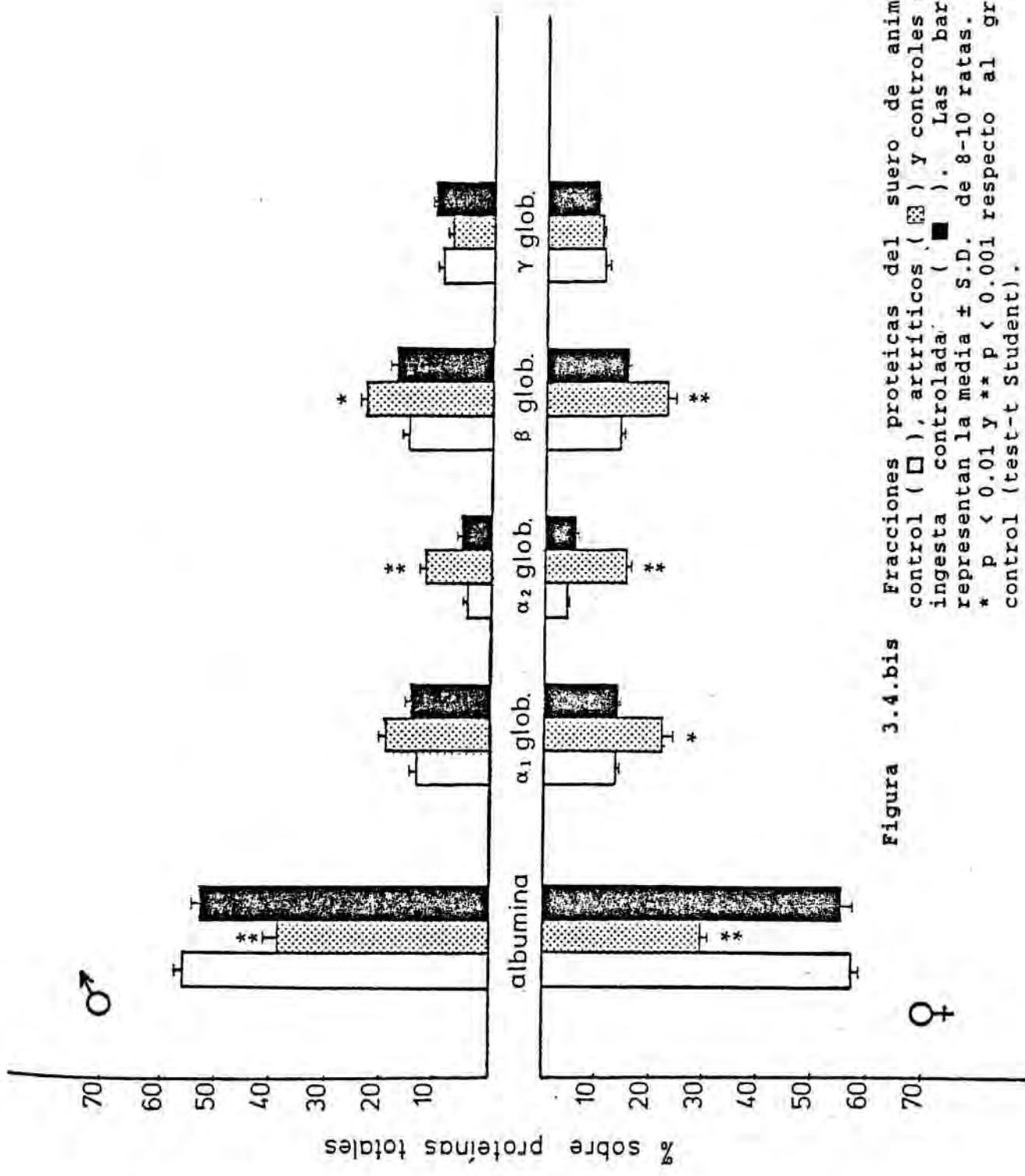


Figura 3.4.bis Fracciones proteicas del suero de animales control (□), artrificos (▨) y controles con ingesta controlada (■). Las barras representan la media ± S.D. de 8-10 ratas. * p < 0.01 y ** p < 0.001 respecto al grupo control (test-t Student).

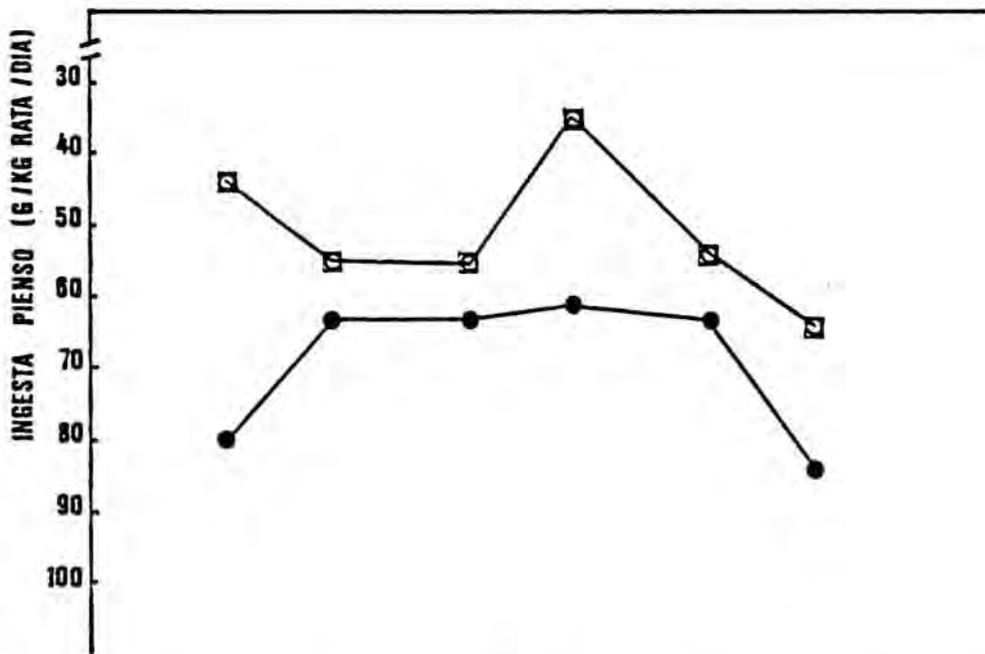
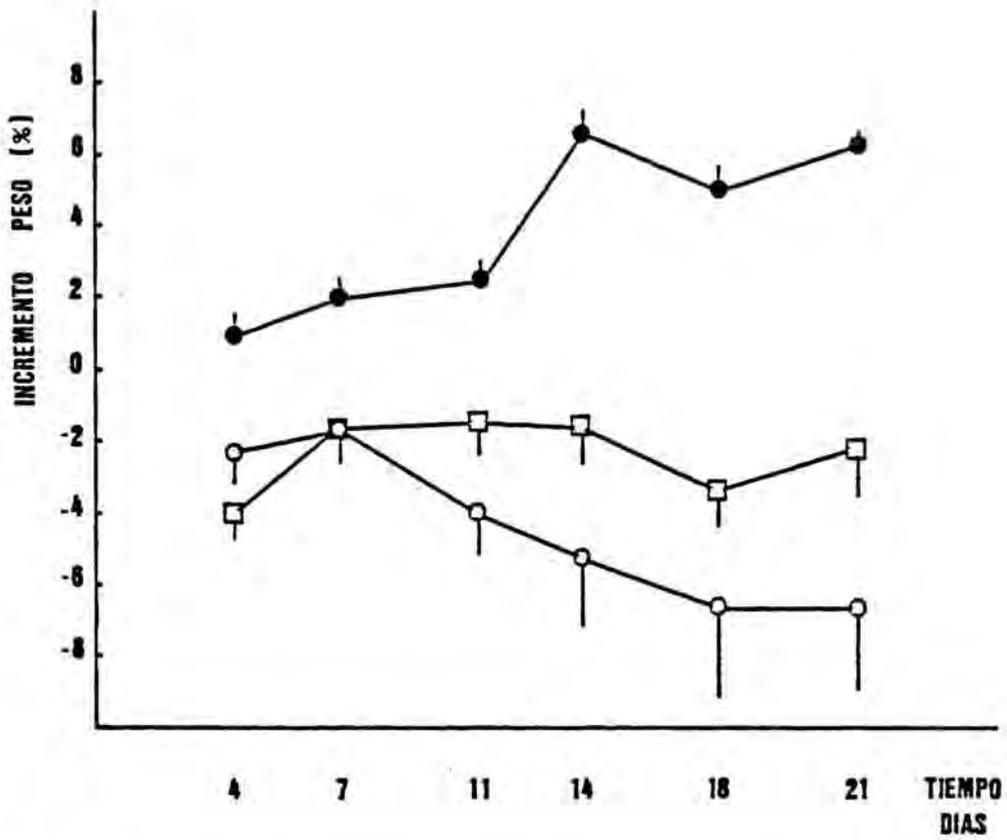


Figura 3.5. Incremento de peso e ingesta en ratas control (●), artríticas (○) y ratas control con ingesta controlada (□). Los resultados se expresan como media ± error estándar de 8 ratas. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo control (test t-Student).

sistémica (alrededor día 14) (42 %, respecto valor control).

Como se puede observar en la fig 3.5., las ratas control aumentan significativamente de peso durante el período estudiado, mientras que en las ratas artríticas y las ratas control con ingesta análoga a la de las ratas artríticas la curva ponderal posee una pendiente de crecimiento notablemente inferior a la de los animales control. La pérdida de peso de los animales artríticos es paralela al agravamiento del estado patológico, mientras que las ratas control con ingesta controlada disminuyeron de peso de forma manifiesta en la primera fase del experimento.

En la tabla 3.7. se recogen los valores del peso del hígado. Se observa que el peso del hígado de los animales artríticos es significativamente superior al de los animales control sanos y controles con ingesta reducida.

En la fig 3.6. y tabla 3.7. se expresan los valores de glutatión hepático expresados como $\mu\text{moles GSH/g hígado}$, así como las diferencias estadísticas existentes.

Tanto en los animales artríticos, como en el grupo de animales con ingesta restringida, se observa una disminución significativa de los niveles de GSH hepático.

En la fig 3.7. y tabla 3.7. se resumen los resultados obtenidos al determinarse la lipídoperoxidación hepática en ratas control, artríticas y artríticas con ingesta reducida. Los valores se expresan como $\mu\text{moles de malondialdehído/mg proteína}$. No se observaron diferencias significativas entre los diversos lotes de animales.

Los niveles de cit.P-450 y sus actividades AND y APH se

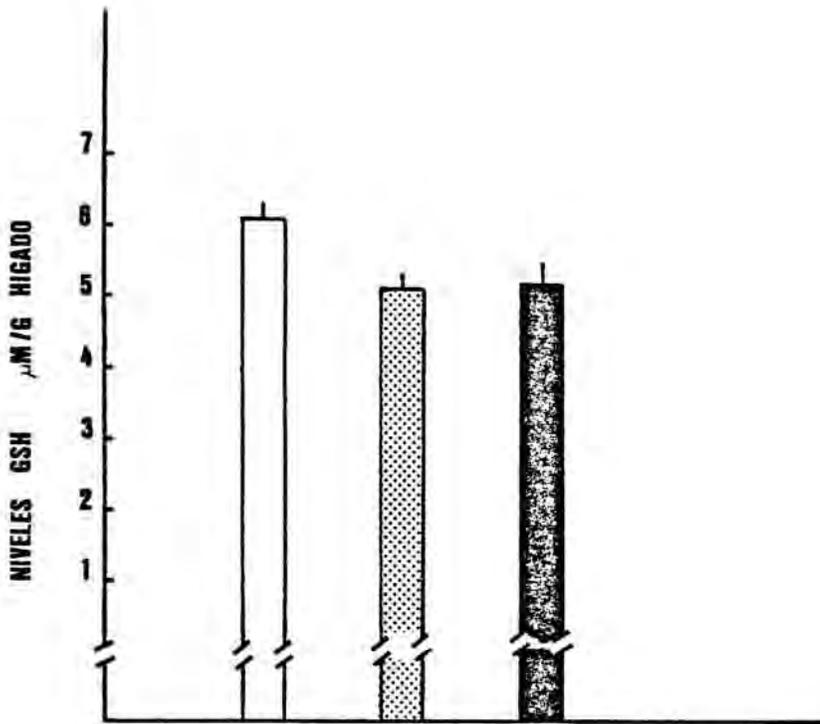


Figura 3.6. Niveles de glutatión hepático en ratas control (□), artríticas (■) y control con ingesta controlada (▣). Las barras representan la media ± error estándar de 8-12 ratas. * $p < 0.05$ respecto al grupo control (test t-Student).

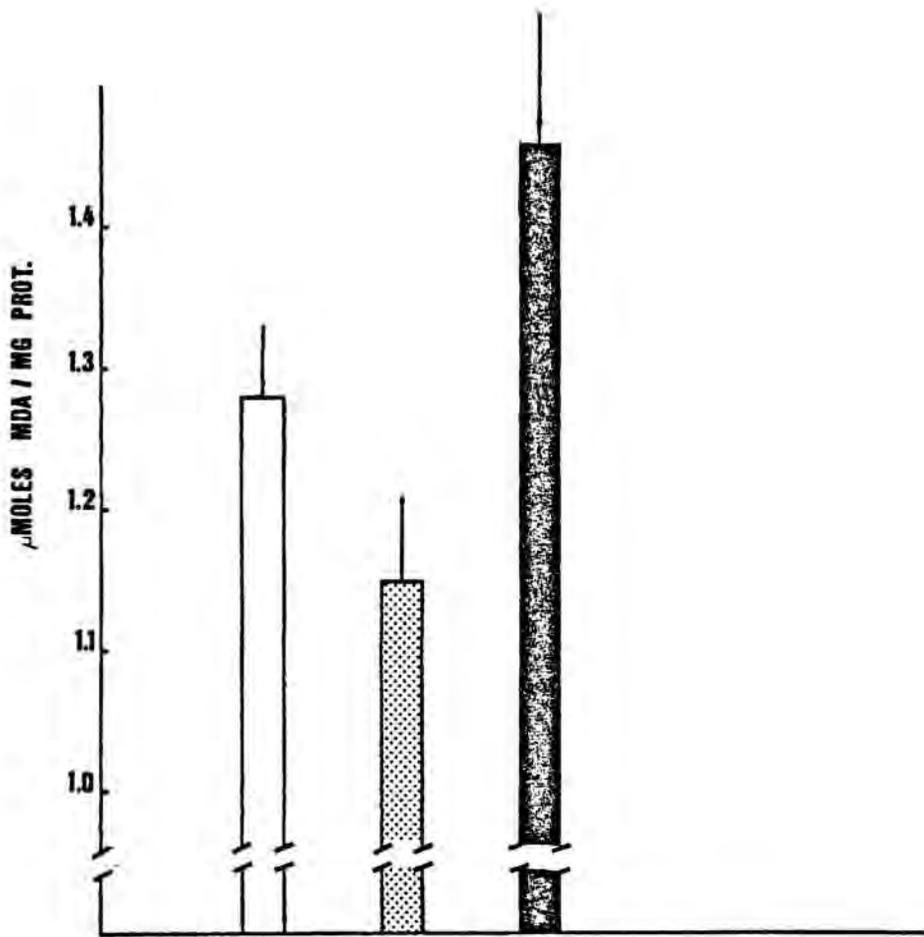


Figura 3.7. Lipidoperoxidación hepática en ratas control (□), artríticas (■) y control ingesta (▨). Las barras representan la media ± error estándar de 8-12 determinaciones.

Tabla 3.7. Peso de hígado y niveles de glutatión y lipídoperoxidación en hígado de ratas control, artríticas y control con ingesta controlada.

	Peso hígado ^a	GSH ^b	Lipidoper. ^c
Control	3.08 ± 0.09	6.05 ± 0.23	1.28 ± 0.10
Artritis	3.99 ± 0.12 ^{**} ∅	5.22 ± 0.20 [*]	1.15 ± 0.11
Control Ingesta	2.86 ± 0.05	5.12 ± 0.26	1.46 ± 0.18

a) % respecto al peso corporal.

b) µmoles GSH/g de hígado.

c) µmoles MDA/mg proteína.

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de 8-12 determinaciones. Comparación entre grupos (test t-Student) * p < 0.05 y ** p < 0.01 respecto al grupo control; ∅ p < 0.01 respecto al grupo control ingesta.

Tabla 3.8. Efectos de la artritis adyuvante sobre la actividad de los enzimas microsomales hepáticos metabolizadores de fármacos.

Grupo	Cit.P-450	AND ^a	APH ^b
Control	0.39 ± 0.03	120.47 ± 10.29	12.53 ± 0.75
Control ingesta	0.34 ± 0.07	131.96 ± 11.89	11.78 ± 0.67
Artritis	0.25 ± 0.02 ^{*φ}	22.66 ± 4.61 ^{*φ}	7.07 ± 0.51 ^{*φ}

Los resultados se expresan como media ± S.E.M. de 8-12 animales.

a) nmoles HCHO/mg proteína microsomal/30 min incubación.

b) μmoles p-aminofenol/mg proteína microsomal/30 min incubación.

Para la comparación entre grupos se utilizó el t-test de Student, * p < 0.01 respecto al grupo control y φ p < 0.01 respecto al grupo control ingesta.

recogen en la tabla 3.8. . En las ratas artríticas se observa que tanto los niveles de cit.P-450, como sus actividades disminuyen significativamente respecto al grupo control y control ingesta.

No se ha observado relación entre las alteraciones del metabolismo hepático de fármacos que tiene lugar en los animales artríticos y las modificaciones en los niveles de GSH o de la lipidoperoxidación hepática.

3.8.- VALORACION DE LOS NIVELES DE COBRE Y ZINC EN HIGADO. COMPARACION CON LOS NIVELES SERICOS DE COBRE Y ZINC.

En los animales control, se apreció una distribución gaussiana de las concentraciones de Cu y Zn en suero e hígado. Los valores basales de cobre en el suero de ratas control fueron de $1.58 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ y los valores basales de zinc de $1.08 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ (media \pm S.D.). Las concentraciones en sangre fueron de $1.13 \pm 0.10 \mu\text{g Cu/g}$ y $4.92 \pm 0.27 \mu\text{g Zn/g}$ (media \pm S.D.). En ratas control, las concentraciones en hígado de ambos metales fue de $4.81 \pm 0.41 \mu\text{g Cu/g}$ hígado fresco y $32.63 \pm 5.41 \mu\text{g Zn/g}$ hígado fresco (media \pm S.D.).

En la fig 3.8. se representa la evolución de la inflamación en las extremidades ipsi y contralateral.

Los animales artríticos sufren un incremento en la concentración sérica de cobre. Este incremento se mantuvo durante todo el período estudiado, siendo como media superior en un 80 %

a la concentración en los animales control (fig. 3.9.). Por el contrario, los animales artríticos muestran una reducción media durante todo el período estudiado en los niveles de zinc del 32 % (fig 3.10.). El día 21 de la inducción de la artritis, se escogió para evaluar los niveles de cobre y zinc en sangre, por ser el momento de máxima inflamación. Sólo los niveles de cobre sufrieron un incremento significativo.

Las concentraciones hepáticas de cobre y zinc, en los animales artríticos, aumentaron un 23 % y un 26 %, respectivamente, con respecto a los valores control (figuras 3.12. y 3.13., respectivamente). Estas alteraciones únicamente se mostraron significativas estadísticamente durante el período de máxima inflamación (del día 14 al 21 postinducción), alcanzándose los valores basales a los 28 días de la inducción.

Se observaron correlaciones entre la inflamación local y sistémica y los cambios observados en las concentraciones de ambos metales.

2.9.- EFFECTO "IN VITRO" DEL COBRE Y ZINC SOBRE LAS ACTIVIDADES AND Y APH.

El efecto del cobre y el zinc sobre las actividades AND y APH de la fracción microsomal hepática se recoge en las figuras 3.14. y 3.15. , respectivamente. El grado de inhibición de la actividad AND fué lineal a concentraciones crecientes de cobre (1-100 μM) y zinc (20-350 μM). La inhibición máxima alcanzada fué del 40-50 % . En el caso de la actividad APH, las concentraciones

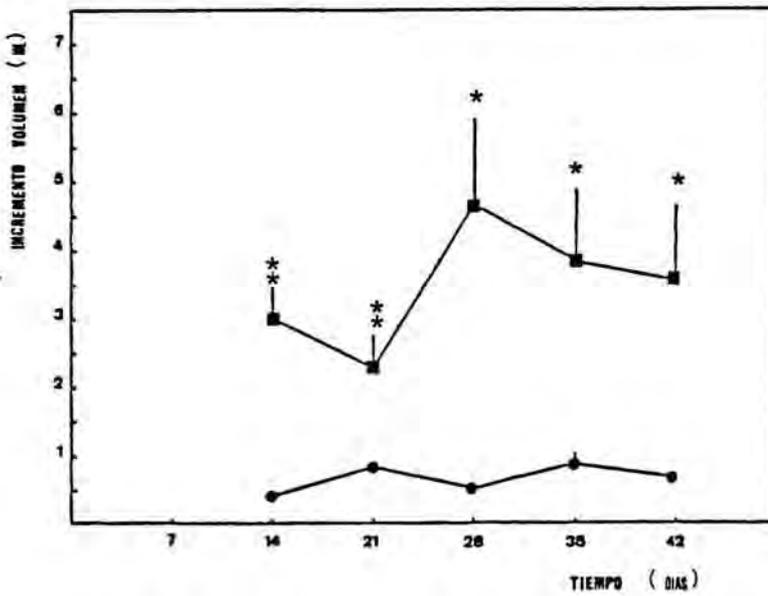
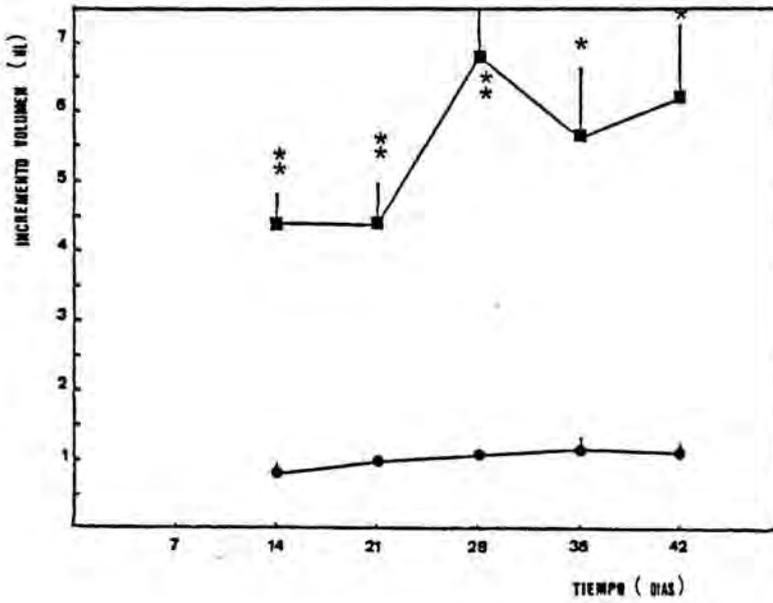


Figura 3.8. Evolución del incremento de la extremidad ipsilateral (A) y contralateral (B) en las ratas control (●) y artríticas (■). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 6-8 ratas. * $p < 0.01$ y ** $p < 0.001$ respecto al grupo control (test t-Student).

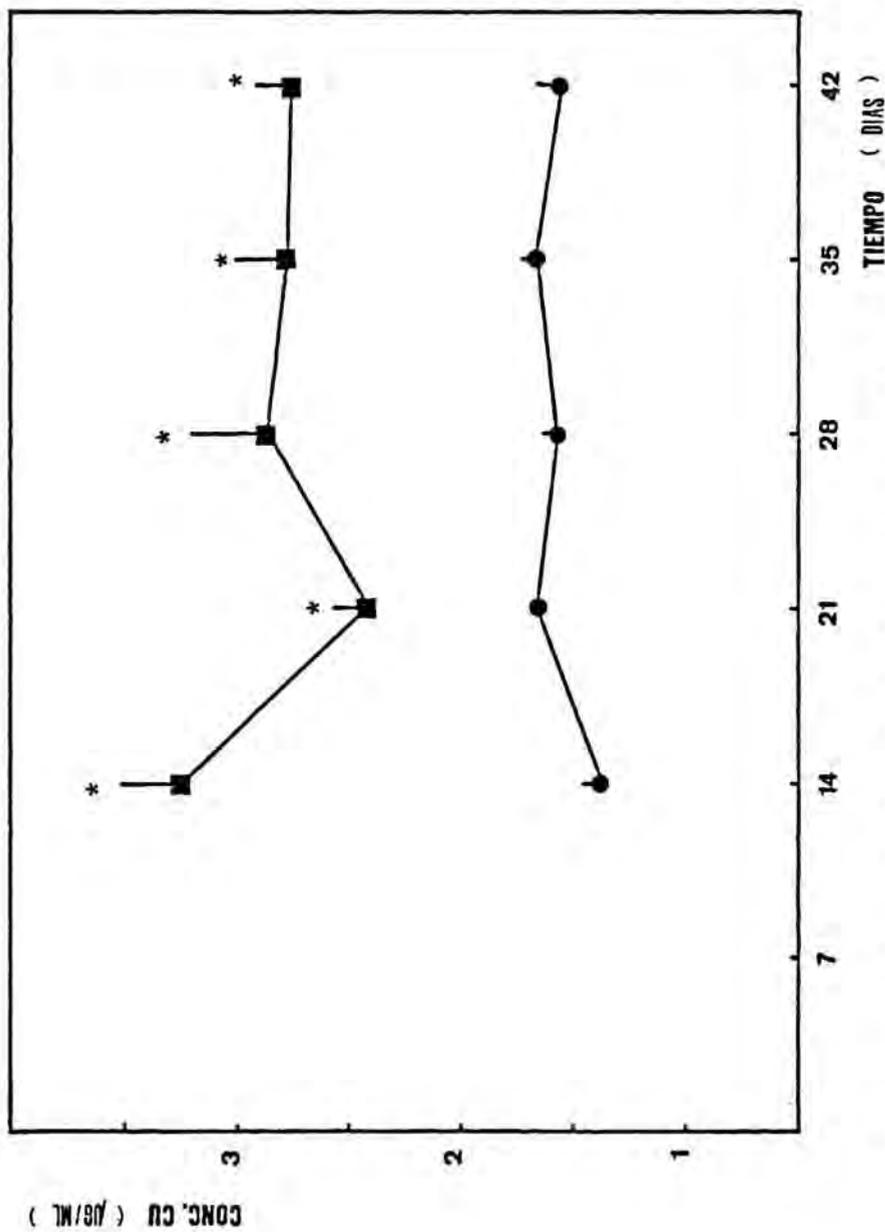


Figura 3.9. Evolución de la concentración sérica de cobre en ratas control (●) y artríticas (■). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 6-8 ratas. * $p < 0.01$ respecto al grupo control (test t-Student).

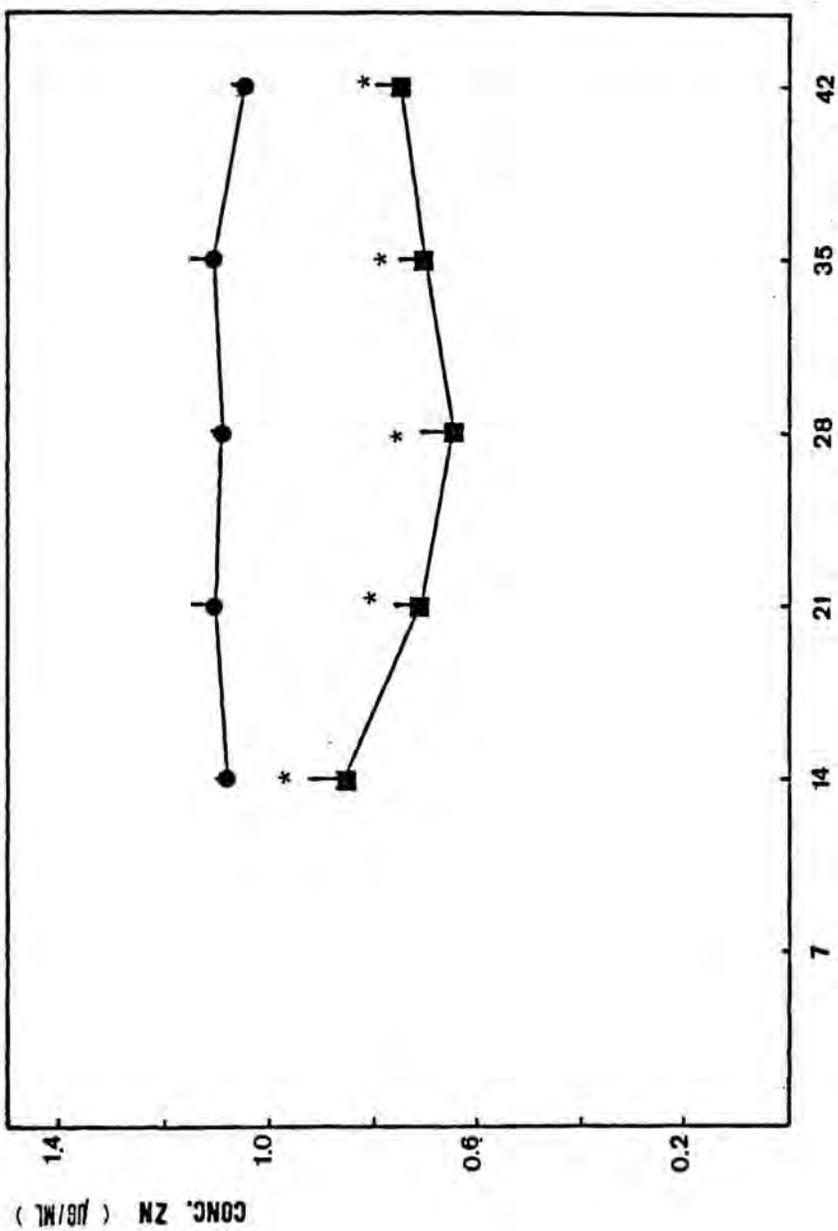


Figura 3.10. Evolución de la concentración sérica de zinc en ratas control (●) y artríticas (■). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 6-8 ratas. * $p < 0.01$ respecto al grupo control (test t-Student).

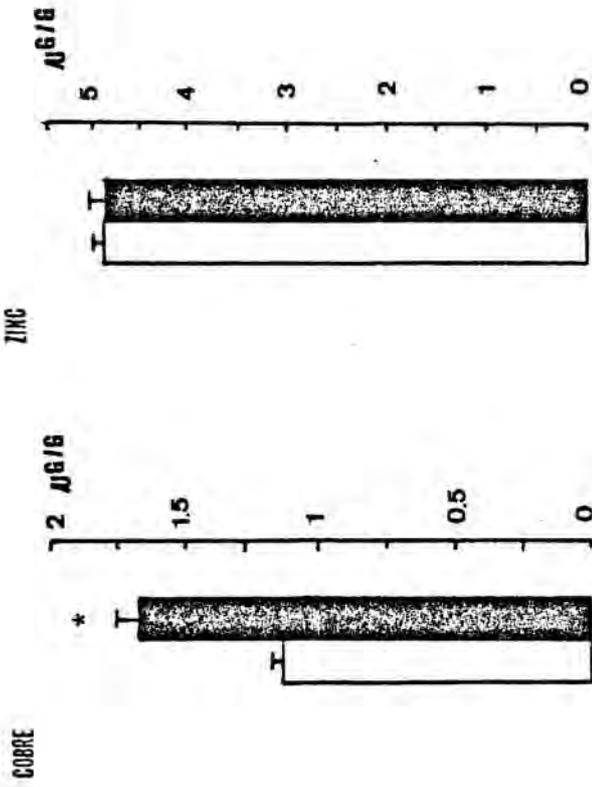


Figura 3.11. Cobre y zinc en sangre el día 21 después de la inducción de la artritis. Ratas control (□), ratas artríticas (■). Cada barra representa la media ± error estándar de 8 ratas. * p < 0.01 respecto al grupo control (test t-Student).

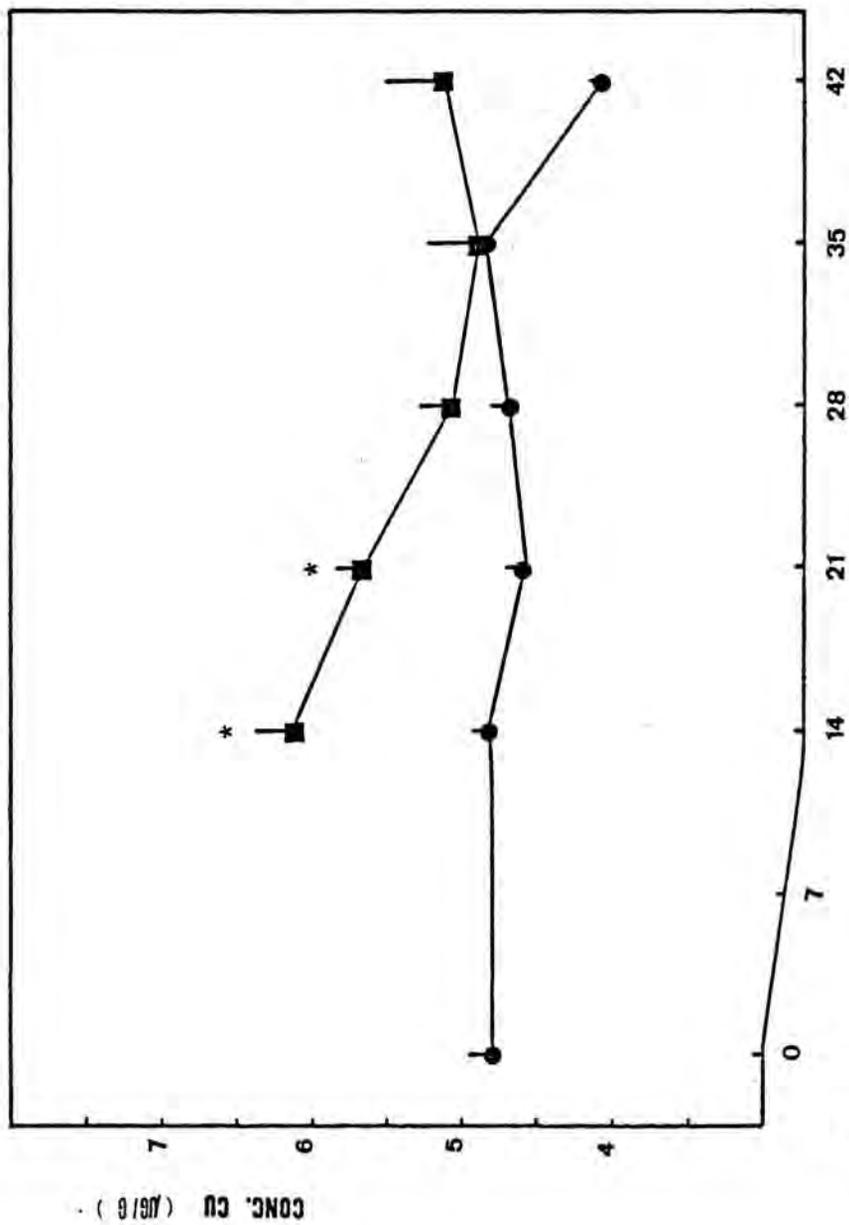


Figura 3.12. Concentración hepática de cobre en ratas control (●) y artríticas (■). Cada punto representa la media \pm error estándar de 8 animales. * $p < 0.05$ respecto al grupo control (test t-Student).

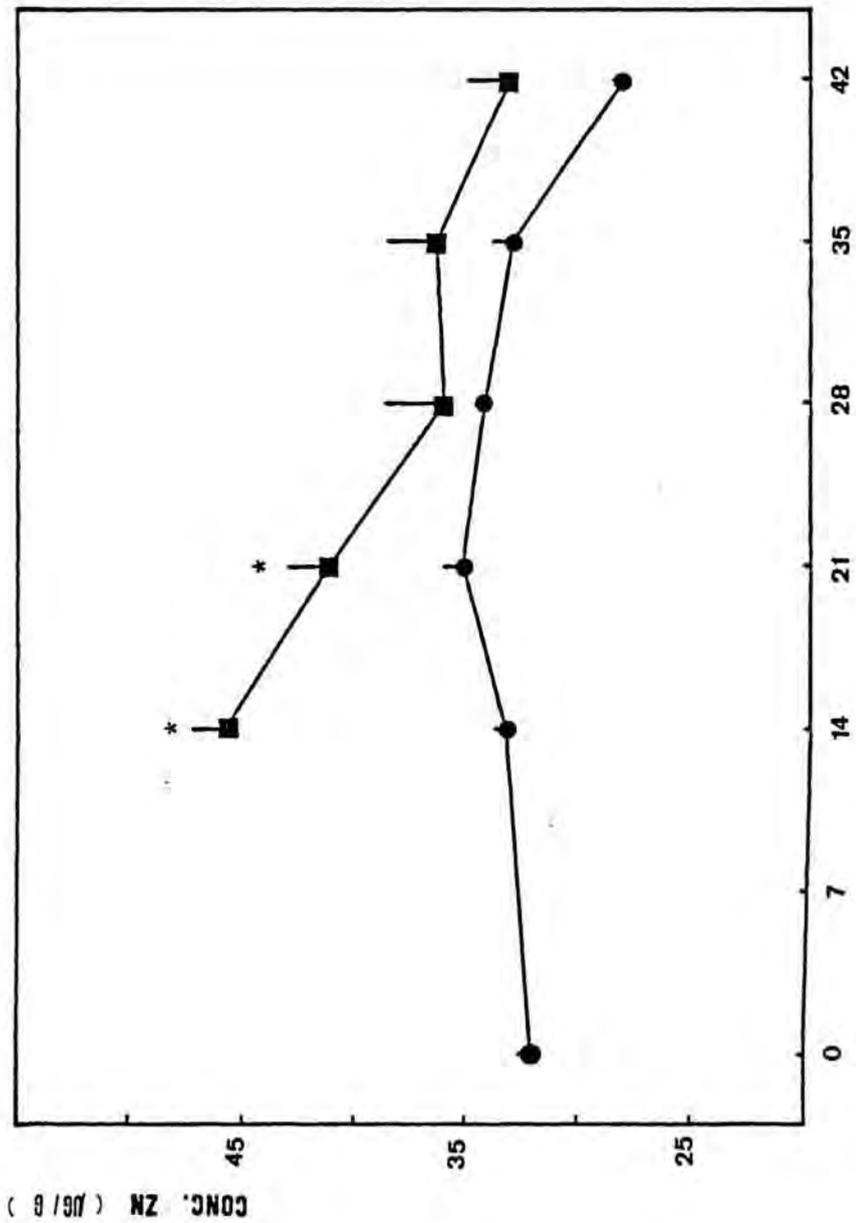


Figura 3.13. Concentración hepática de zinc en ratas control (●) y artríticas (■). Cada punto representa la media \pm error estándar de 8 ratas. * $p < 0.05$ respecto al grupo control (test t-Student).

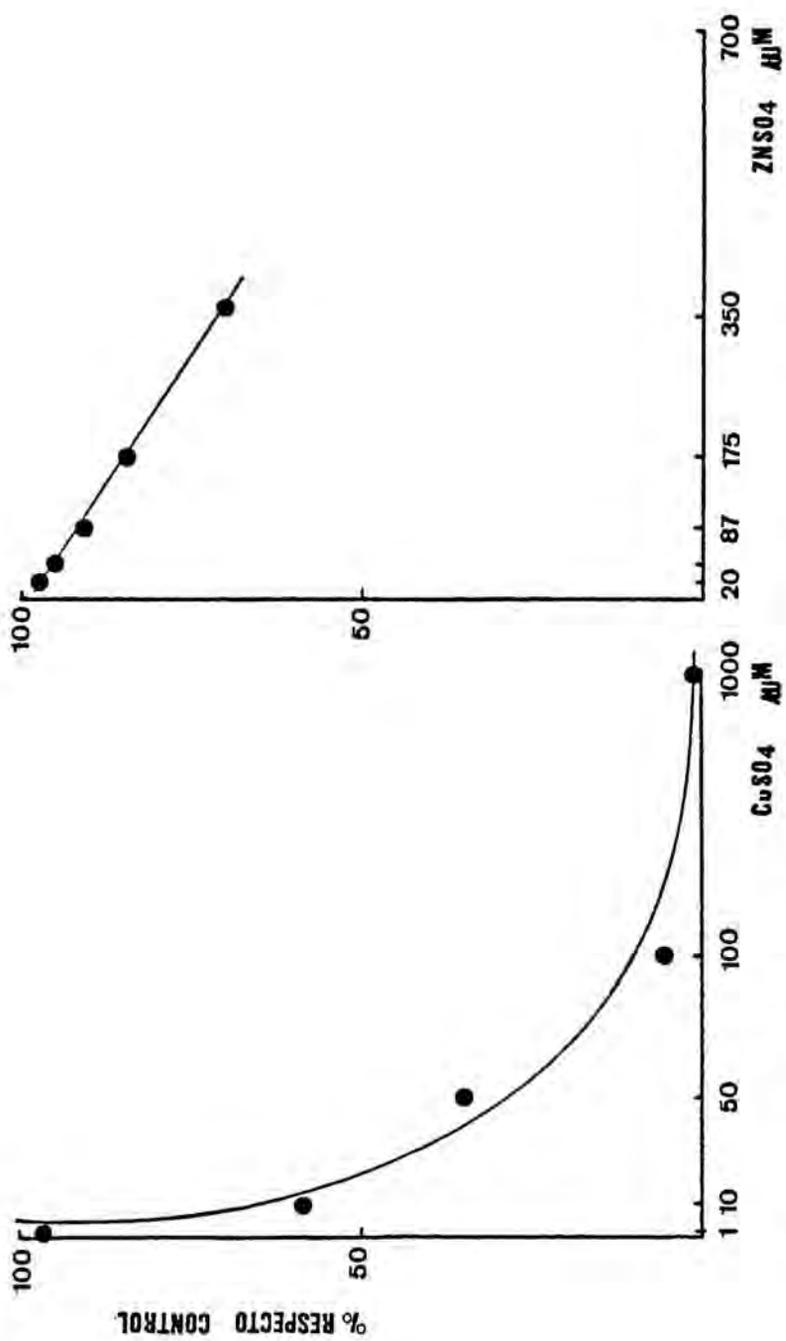


Figura 3.14. Efecto "in vitro" del cobre o zinc sobre la actividad AND de microsomas de rata. El tiempo de preincubación con ambos metales fue de 30 min. La concentración de proteínas fue de 0.7 mg/ml. Cada punto representa la media del porcentaje con respecto al valor control de 4-6 determinaciones.

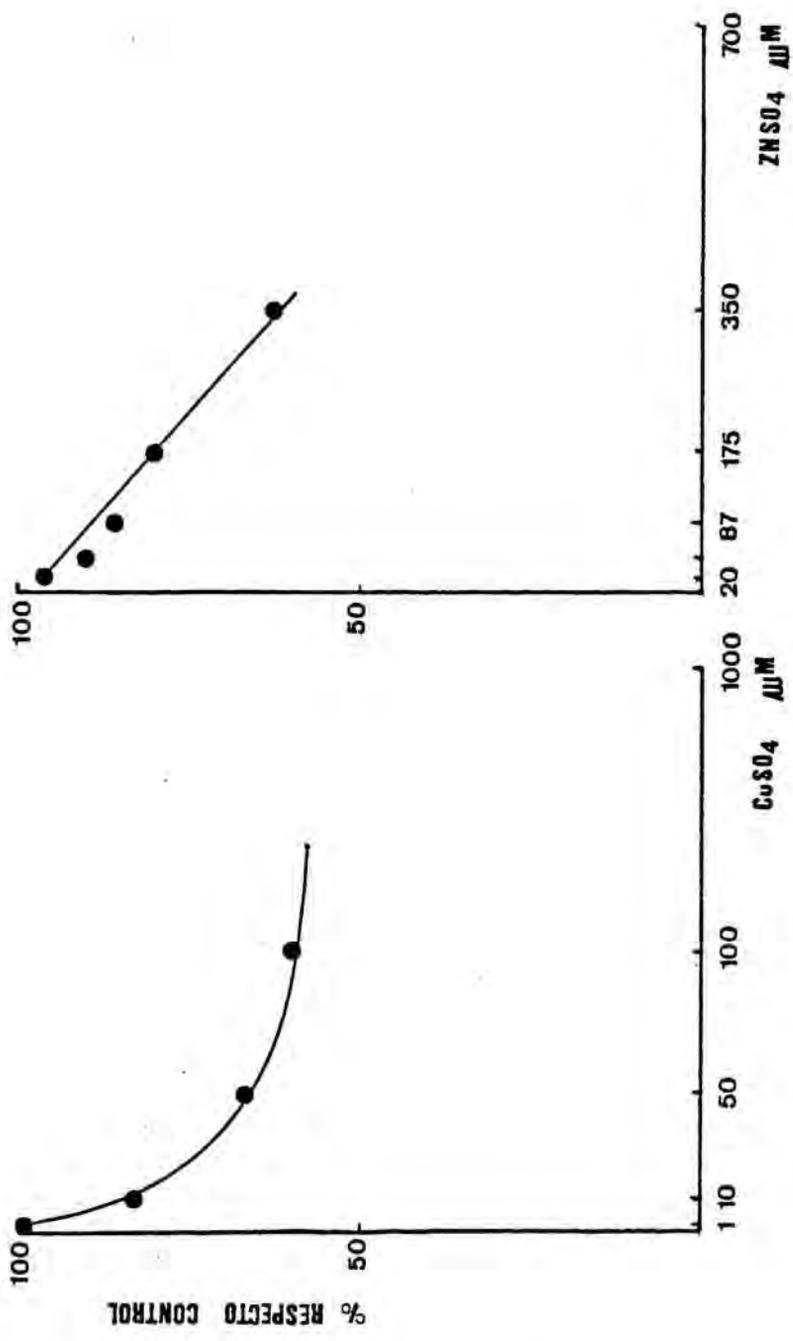


Figura 3.15. Efecto " in vitro" del cobre o zinc sobre la actividad APH de microsomas de rata. El tiempo de preincubación con ambos metales fue de 30 min. La concentración de proteínas fue de 0.7 mg/ml. Cada punto representa la media del porcentaje con respecto al valor control de 4-6 determinaciones.

TABLA 3.9. Inhibición "in vitro" de las actividades AND y APH, de la fracción microsomal hepática de ratas control, con cobre y zinc.

	Concentración de metal requerida (μM) para la inhibición de:		
	AND	APH	
	25 %	50 %	25 % 50 %
COBRE	47	117	7.5 39
ZINC	226	498	166 302

crecientes de cobre y zinc produjeron una disminución lineal de la actividad enzimática hasta llegar a la inhibición máxima del 60-70 % de la actividad basal. En la tabla 3.9. se recogen los valores de las concentraciones de cobre y zinc que producen la inhibición del 25 % y el 75 % de las actividades AND y APH.

2.10. TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS ADYUVANTE. EFEECTO SOBRE EL METABOLISMO DE FARMACOS.

Con el fin de estudiar cuál sería el efecto de un tratamiento anti-inflamatorio sobre las modificaciones del metabolismo de fármacos en la artritis adyuvante, se ha escogido a la indometacina como ejemplo de antiinflamatorio no esteroideo y a la dexametasona como fármaco antiinflamatorio esteroideo.

2.10.1.- TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS ADYUVANTE CON INDOMETACINA.

El tratamiento curativo de ratas artríticas con indometacina (1 mg/kg) durante dos semanas, reduce la respuesta inflamatoria entre el 70 y 72 % en ambas extremidades.

El tratamiento de las ratas artríticas con indometacina no restaura la pendiente de la curva ponderal, es decir, tanto las ratas artríticas no sometidas a tratamiento como las tratadas con indometacina, ganan menos peso que las ratas control durante el período estudiado (fig. 3.16.). El desarrollo de la artritis produce cambios en el porcentaje de algunas proteínas

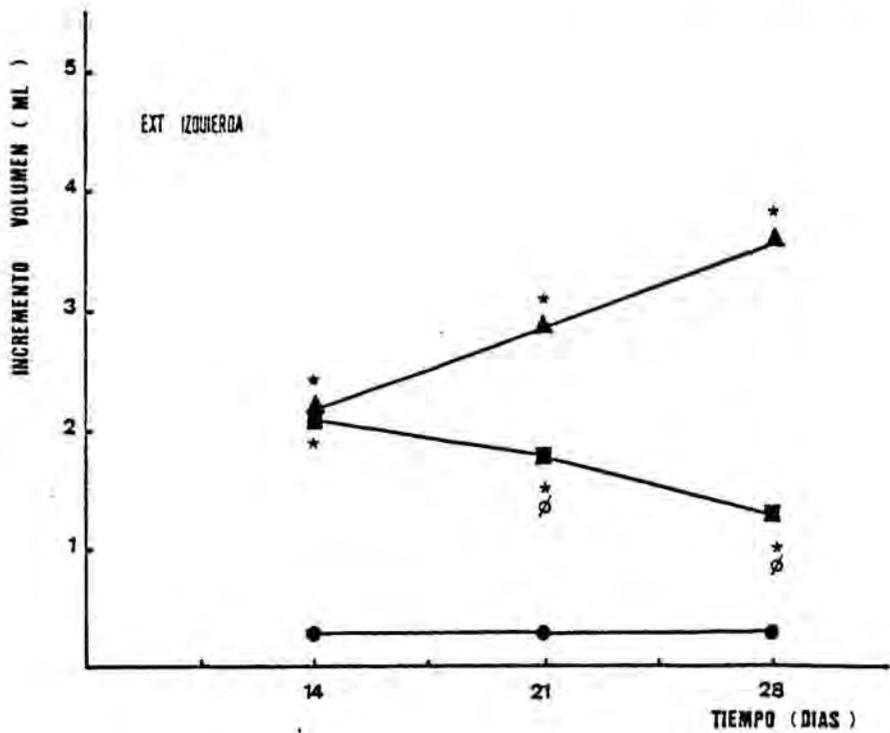
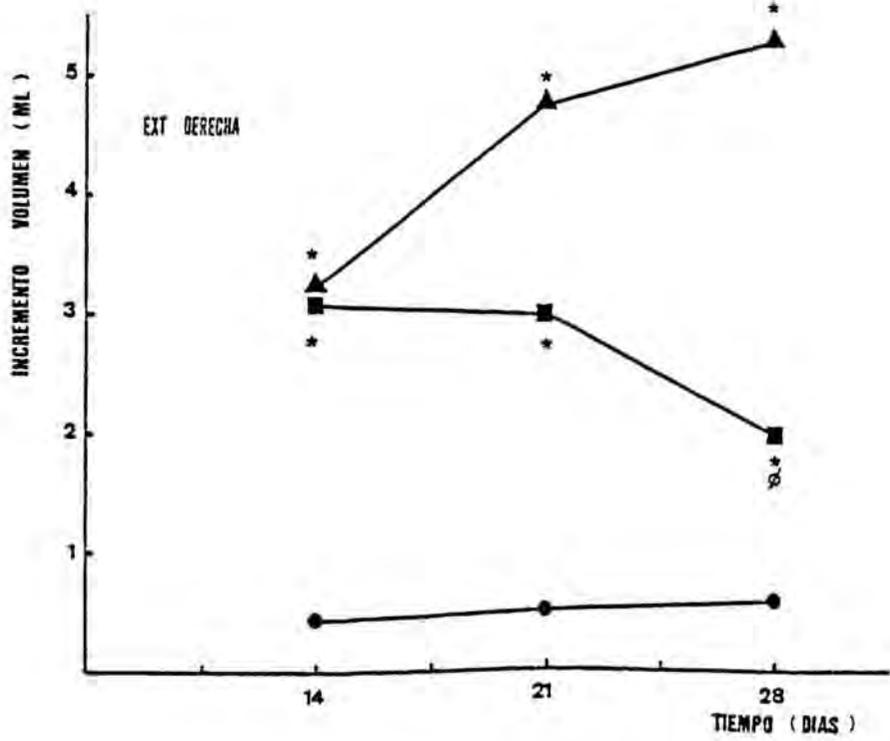


Figura 3.16. Evolución de la inflamación primaria (ext. ipsilateral) y secundaria (ext. contralateral) en ratas control (●), artríticas (▲) y artríticas tratadas con indometacina (■). Los resultados se expresan como incremento frente a los valores control del día 0. Cada valor es la media de 8-16 ratas.

TABLA 3.10. Distribución de las proteínas séricas.

	Proteínas ^a totales	Albúmina ^b	α-1-globulinas ^b	α-2-globulinas ^b	β-globulina ^b s	γ-globulinas ^b
Día 0						
Control	6.05 ± 0.16	43.77 ± 1.57	17.31 ± 0.56	7.26 ± 0.58	17.39 ± 1.07	11.82 ± 0.54
Día 14						
Control	6.37 ± 0.17	45.13 ± 1.62**	18.03 ± 0.59	7.64 ± 0.61**	17.93 ± 1.10**	12.31 ± 0.56
Artritis	5.93 ± 0.23	21.64 ± 0.67**	18.69 ± 0.65	18.15 ± 2.51	29.55 ± 0.69**	11.96 ± 0.69
Día 21						
Control	6.47 ± 0.14	46.84 ± 1.30**	15.21 ± 1.09**	7.82 ± 0.59**	17.57 ± 0.44**	13.16 ± 1.14
Artritis	6.27 ± 0.31	24.60 ± 0.88	20.32 ± 1.27	18.67 ± 1.76	25.78 ± 1.26	11.23 ± 0.61
Control-Indo.	5.94 ± 0.17	45.13 ± 1.52**	18.00 ± 0.67**	13.48 ± 1.11**	17.79 ± 1.85**	22.20 ± 3.21
Artritis-Indo.	6.79 ± 0.18	28.98 ± 3.18	19.99 ± 1.09**	14.97 ± 1.88	27.42 ± 1.34	11.49 ± 0.97
Día 28						
Control	6.48 ± 0.21	43.39 ± 1.57**	17.11 ± 0.79**	6.48 ± 0.88**	19.10 ± 0.59**	13.06 ± 1.24
Artritis	6.52 ± 0.13	23.94 ± 2.36	20.03 ± 0.35	18.53 ± 1.97	25.09 ± 0.68	11.91 ± 0.91
Control-Indo.	6.52 ± 0.16	46.84 ± 2.04	16.66 ± 0.73**	11.05 ± 1.04** ^φ	17.49 ± 1.33**	24.76 ± 2.75
Artritis-Indo.	6.43 ± 0.15	34.58 ± 2.11 ^φ	23.69 ± 1.15	8.32 ± 0.52	25.51 ± 0.89	10.02 ± 0.70

Los valores de la tabla son medias ± S.E.M. de 8-10 experimentos.

* p < 0.05 y ** p < 0.01 respecto a los controles. ^φ p < 0.01, respecto a los animales artríticos sin tratar.

a) Las proteínas totales se expresan como g/dl.

b) Las fracciones de proteínas séricas se expresan como tanto por ciento respecto a las proteínas totales.

TABLA 3.11. Efecto de la terapéutica con indometacina sobre el metabolismo de fármacos en ratas con artritis adyuvante.

Grupo	Peso de hígado ^a	AND ^b	APH ^c
Día 0			
Control	2.83 ± 0.08	50.33 ± 4.80	13.30 ± 0.95
Día 14			
Control	2.89 ± 0.08	55.93 ± 5.32	14.78 ± 1.06
Artritis	3.05 ± 0.24	22.44 ± 2.57 **	6.73 ± 0.16 **
Día 21			
Control	3.15 ± 0.64	64.85 ± 4.16	13.44 ± 0.96
Artritis	4.10 ± 0.64 **	27.73 ± 3.11 **	5.61 ± 0.13 **
Control-Indo.	2.69 ± 0.10	57.46 ± 5.63	12.09 ± 0.86
Artritis-Indo.	4.28 ± 0.73 **	25.13 ± 2.91 **	4.72 ± 0.32 **
Día 28			
Control	3.10 ± 0.15	68.50 ± 3.87	17.94 ± 1.71
Artritis	3.92 ± 0.15 **	36.71 ± 2.09 **	5.98 ± 0.35 **
Control-Indo.	3.15 ± 0.21	63.03 ± 4.71	15.25 ± 1.45
Artritis-Indo.	3.68 ± 0.21 **	41.23 ± 4.76 **	3.07 ± 0.12 **

a) Cada valor es la media ± S.E.M. de 8-10 determinaciones, y se expresa como tanto por ciento respecto al peso corporal.

b) Cada valor es la media ± S.E.M. de 6-8 determinaciones, y se expresa en nmoles de formaldehído/mg proteína microsomal/30 min incubación.

c) Cada valor es la media ± S.E.M. de 5-8 determinaciones, y se expresa en µmoles de p-aminofenol/mg proteína microsomal/30 min incubación.

* p < 0.05 y ** p < 0.01, respecto a los valores control.

plasmáticas, sin modificar el contenido total de las proteínas. Todas las fracciones globulínicas, excepto las γ globulinas, aumentan, particularmente las α -2-globulinas, mientras que la proporción de albúmina se reduce (tabla 3.10.). Se observa correlación entre los niveles de α -2-globulinas y la inflamación de la extremidad contralateral ($r=0.681$, $p<0.001$, $n=32$).

La terapéutica con indometacina inhibe la reducción de los niveles de albúmina (46.46 %) y el incremento de las α -2-globulinas (136.49 %). Estos resultados demuestran que los cambios en las fracciones de proteínas plasmáticas, producidos por la artritis, remiten al instaurar un tratamiento antiinflamatorio.

La artritis adyuvante, además de la inflamación y los cambios en las fracciones de las proteínas plasmáticas, tiene un efectos importantes sobre el sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos, (actividades AND y APH), como se observa en la tabla 3.11. . Se observa correlación entre la disminución de la actividad AND y la inflamación en la extremidad contralateral ($r=0.775$, $p<0.001$, $n=32$).

La administración del adyuvante provoca el desarrollo de la artritis a partir del 10-14 día después de la inducción, aunque la inflamación en la extremidad administrada aparece inmediatamente. Sin embargo, la modificación de la actividad APH, disminuyó de forma significativa antes de que se desarrollase la artritis adyuvante (tabla 3.12.).

El tratamiento con indometacina no consiguió atenuar, de forma significativa, las modificaciones del metabolismo de fármacos producidas por la inducción de la artritis (tabla

TABLA 3.12. Actividad anilina p-hidroxilasa durante la "fase primaria" de la artritis.

APH (μ moles p-aminofenol/mg prot. microsmal/30 min)	
	Artritis
Día 0	9.66 \pm 0.61
Día 3	9.20 \pm 0.58
Día 6	9.93 \pm 0.30
Día 9	9.42 \pm 0.16
Día 13	9.53 \pm 0.75
	Control
	5.48 \pm 0.82*
	6.20 \pm 0.55**
	6.32 \pm 0.44**
	4.86 \pm 0.60

Cada valor es la media \pm S.E.M. de 4-7 determinaciones.

* p < 0.05 y ** p < 0.01, respecto a los valores control.

3.11.).

La administración de indometacina a ratas control, a la dosis de 1 mg/kg, durante dos semanas, no afectó a los porcentajes de proteínas plasmáticas ni a las actividades enzimáticas estudiadas.

3.10.2.- TRATAMIENTO CURATIVO DE LA ARTRITIS CON DEXAMETASONA.

En el presente estudio el crecimiento corporal en los animales artríticos fué menor que el de las ratas control. El aumento de peso corporal de los animales artríticos tratados con dexametasona fué menor que el de los animales artríticos no tratados. La administración de dexametasona a ratas control retrasa el crecimiento corporal.

La administración de M. butyricum subplantar, en la pata derecha, produce una inflamación primaria inmediata. La inflamación secundaria, que ocurre entre los días 10-14 después de la inducción de la artritis, se caracteriza por una inflamación de la extremidad contralateral que se puede extender a las extremidades anteriores, hocico y cola. La fig 3.17. muestra las variaciones en la inflamación de las extremidades durante el período estudiado. El tratamiento con dexametasona, entre los días 14 y 28, reduce la inflamación en un 89.34 % y un 100 % en las extremidades ipsi y contralaterales, respectivamente.

La artritis adyuvante produce una disminución de los grupos SH séricos del 35.40 % . El tratamiento con dexametasona, durante dos semanas, restablece en un 60.0 % los niveles de grupos SH séricos (fig. 3.18.). Hay correlación entre el efecto terapéutico de la dexametasona sobre la inflamación y los grupos SH séricos ($p < 0.001$, $n = 24$).

La artritis adyuvante provoca alteraciones significativas del sistema hepático metabolizador de fármacos

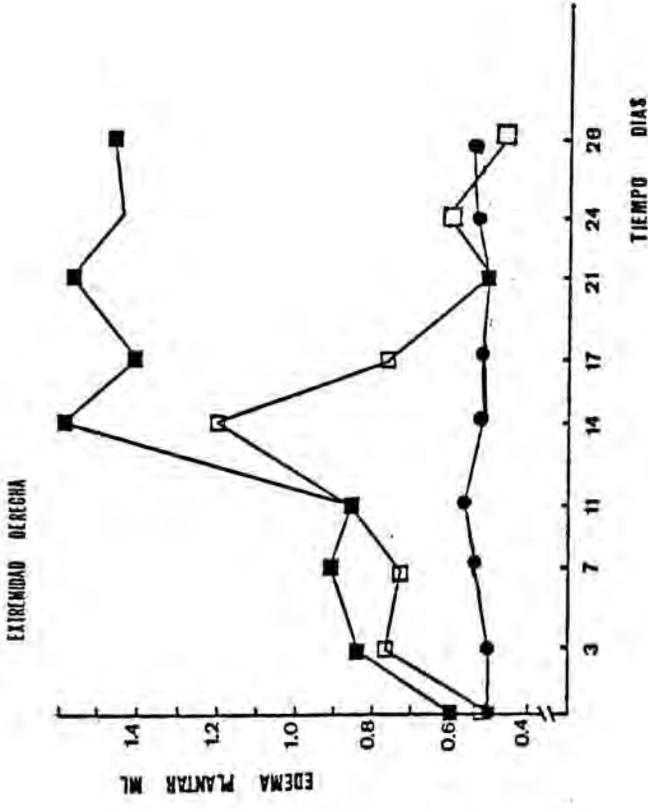
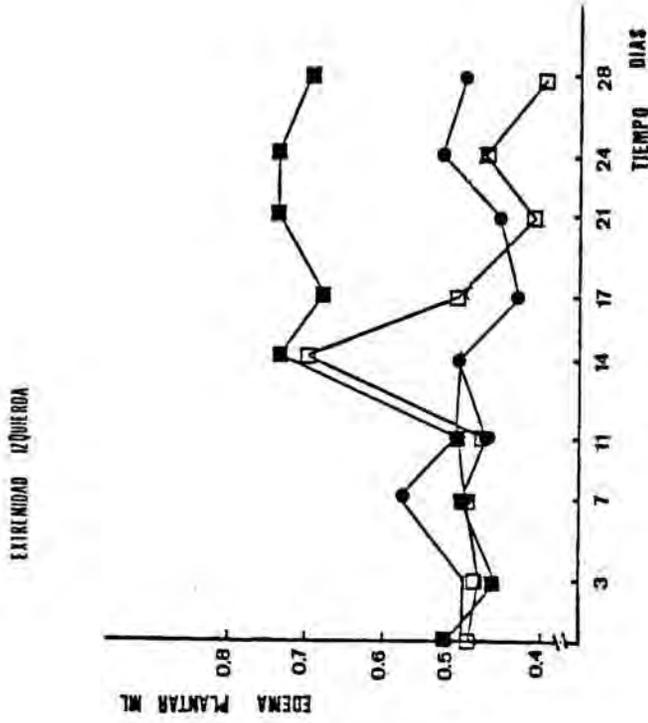


Figura 3.17. Evolución del volumen de las extremidades de ratas control (●), artríticas (■) y artríticas tratadas con dexametasona (□) (media de 7-10 ratas).

Tabla 3.13. Efecto de la dexametasona sobre las alteraciones del metabolismo de fármacos en la artritis adyuvante.

Grupo	Peso hígado ^a	cit.P-450 ^b	AND ^c	APH ^d
Control	3.25 ± 0.02	0.37 ± 0.013	127.62 ± 9.31	12.55 ± 1.51
Control + Dxt	3.61 ± 0.02	0.38 ± 0.012	135.38 ± 11.31	11.35 ± 0.49
Artritis	3.97 ± 0.17	0.26 ± 0.011**	57.90 ± 5.46**	6.60 ± 0.37**
Artritis + Dxt	4.77 ± 0.05	0.27 ± 0.005**	74.06 ± 11.73**	9.02 ± 2.21*

a) % de peso respecto al peso corporal.

b) nmoles HCHO/mg proteína microsomal/30 min incubación.

c) µmoles p-aminofenol/mg proteína microsomal/30 min incubación.

Cada valor representa la media ± S.D. de 5-8 determinaciones. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron utilizando el test t de Student: * p < 0.05 y ** p < 0.01 respecto al grupo control.

(tabla 3.13.). Así, los niveles de cit P-450 en los animales artríticos fueron un 30.13 % inferiores a los observados en los animales control ($p < 0.001$). Las actividades enzimáticas del cit.P-450 también fueron inferiores. Por efecto de la artritis adyuvante, la actividad AND fue un 54.6 % inferior, mientras que la actividad APH se redujo en un 47.41 %, con respecto a los valores control. La dexametasona no corrigió de forma significativa las alteraciones en el metabolismo de fármacos en los animales artríticos.

La administración de dexametasona a ratas control no produjo ninguna modificación significativa sobre los niveles de grupos SH séricos, o en las actividades enzimáticas metabolizadoras de fármacos del cit. P-450 .

3.11.- EFFECTO DEL M. Butyricum SOBRE EL METABOLISMO MICROSOMAL HEPATICO DE RATON. EFECTO DE LA ADMINISTRACION PROFILACTICA Y TERAPEUTICA DE INDOMETACINA Y DEXAMETASONA.

La administración de M. butyricum en ratón, por vía subcutánea o intraperitoneal, provoca un aumento del tiempo de dormición. Este efecto es máximo a los siete días de la administración por vía i.p., mientras que tras la administración s.c. del M butyricum, el efecto máximo no se obtiene hasta pasadas 4 semanas de la administración (fig 3.19.). El aumento del tiempo de dormición se podría atribuir a la inhibición del

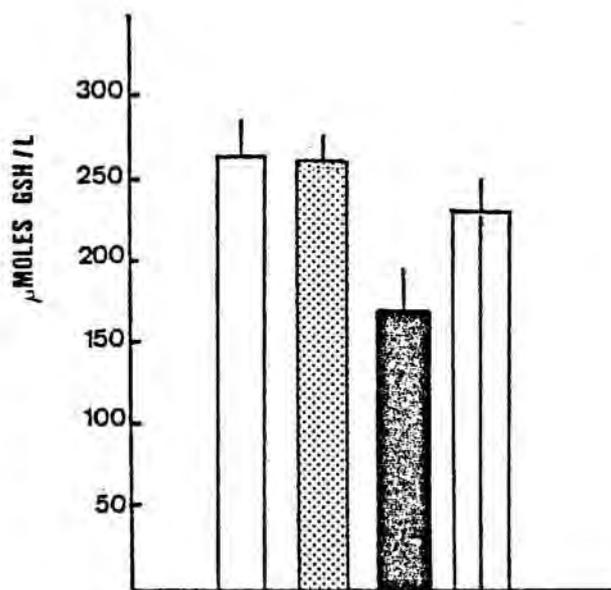


Figura 3.18. Grupos SH séricos en ratas control (□), ratas control tratadas con dexametasona (▨), artríticas (■) y artríticas tratadas con dexametasona (□). Las barras representan la media \pm desviación estándar de 5-8 determinaciones.

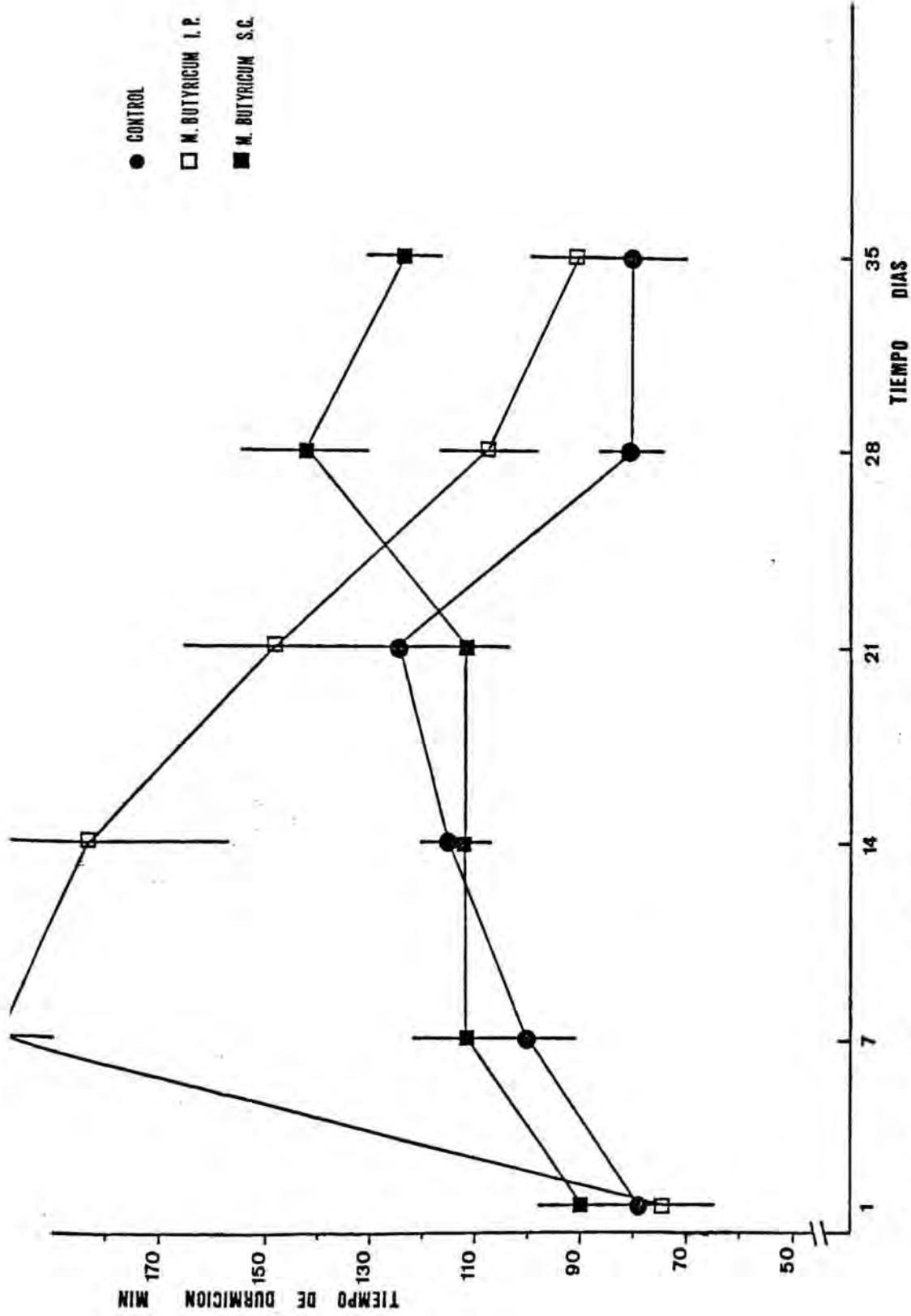


Figura 3.19. Evolución del tiempo de durmición en ratones control (●) y administrados con M. butyricum por via i.p. (□) o s.c. (■). Cada punto representa la media \pm error estándar de 8-12 determinaciones.

metabolismo microsomal hepático del pentobarbital, de forma análoga a lo que ocurre durante la artritis adyuvante, pero sin que se produzca inflamación de las extremidades.

A los 7 días de la administración i.p. del M. butyricum, se produce un aumento en el tiempo de dormición del 120 %. Paralelamente se observa una reducción del 43 % y 55 % en las actividades AND y APH, respectivamente (fig. 3.20.). Por ello se escogió esta vía de administración del M. butyricum para proseguir el trabajo.

El pretratamiento de los ratones con indometacina (1 mg/kg/día) o dexametasona (0.3 mg/kg/día) durante una semana antes de la administración del M. butyricum, evita, tanto el aumento del tiempo de dormición, como la depresión de las actividades AND y APH (fig. 3.20.y 3.21.).

Por el contrario, en los animales a los que se administró el M. butyricum y se inició su terapéutica a las 24 horas, con indometacina o dexametasona, a las mismas dosis que en el la administración profiláctica no se logra restaurar de forma significativa, ni el tiempo de dormición ni las actividades enzimáticas disminuidas.

APH

AND

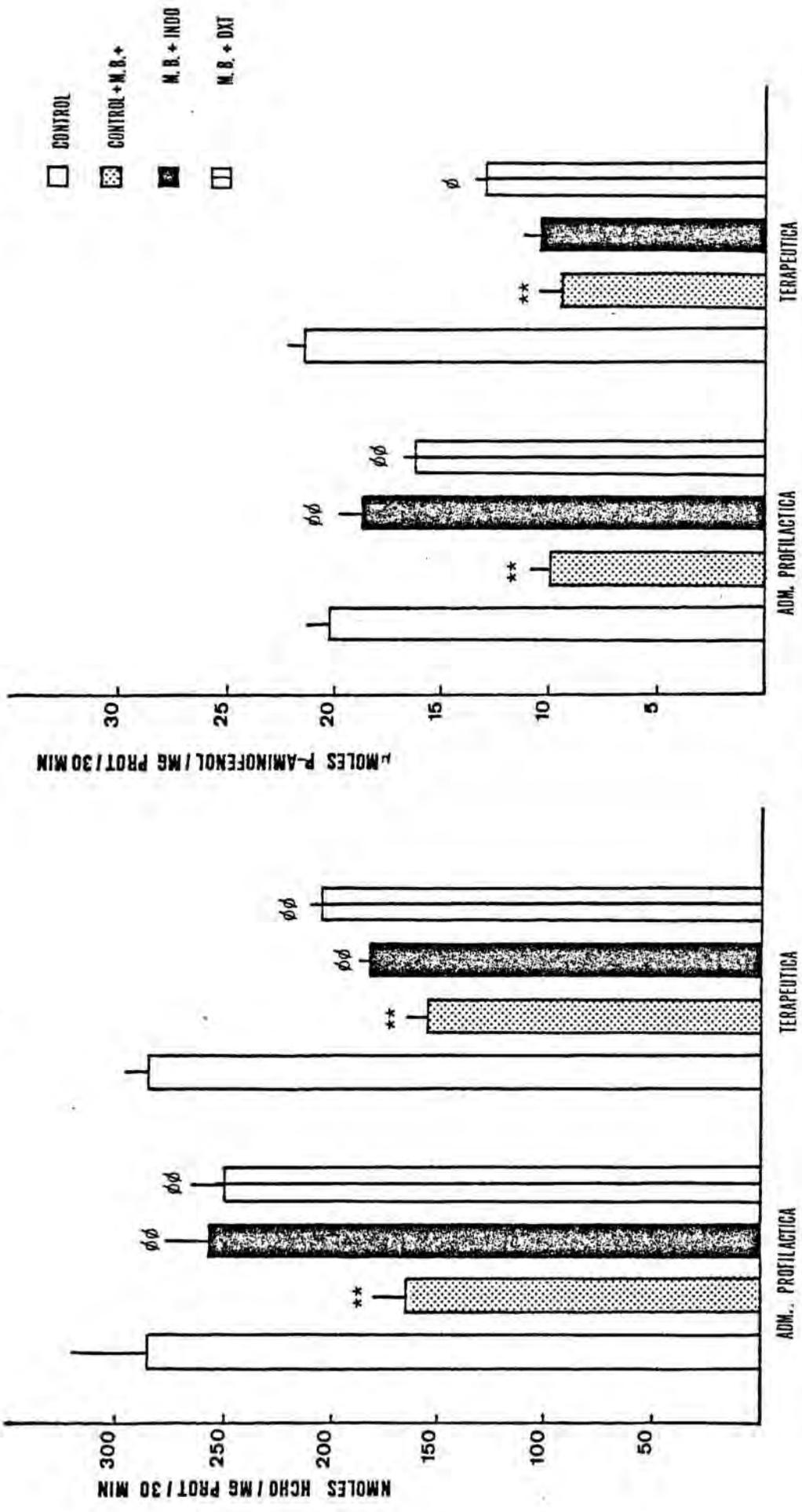


Figura 3.21.

Actividades AND y APH en la fracción microsomal hepática de ratones control (□), administrados con M. butyricum (▨) y administrados con M. butyricum y tratados con indometacina (■) o dexametasona (▤). Las barras representan a la media ± error estándar de 8-12 determinaciones. ** p < 0.01 respecto al grupo control y φ p < 0.05 y φφ p < 0.01 respecto al grupo administrado con M. butyricum. (test t-Student).

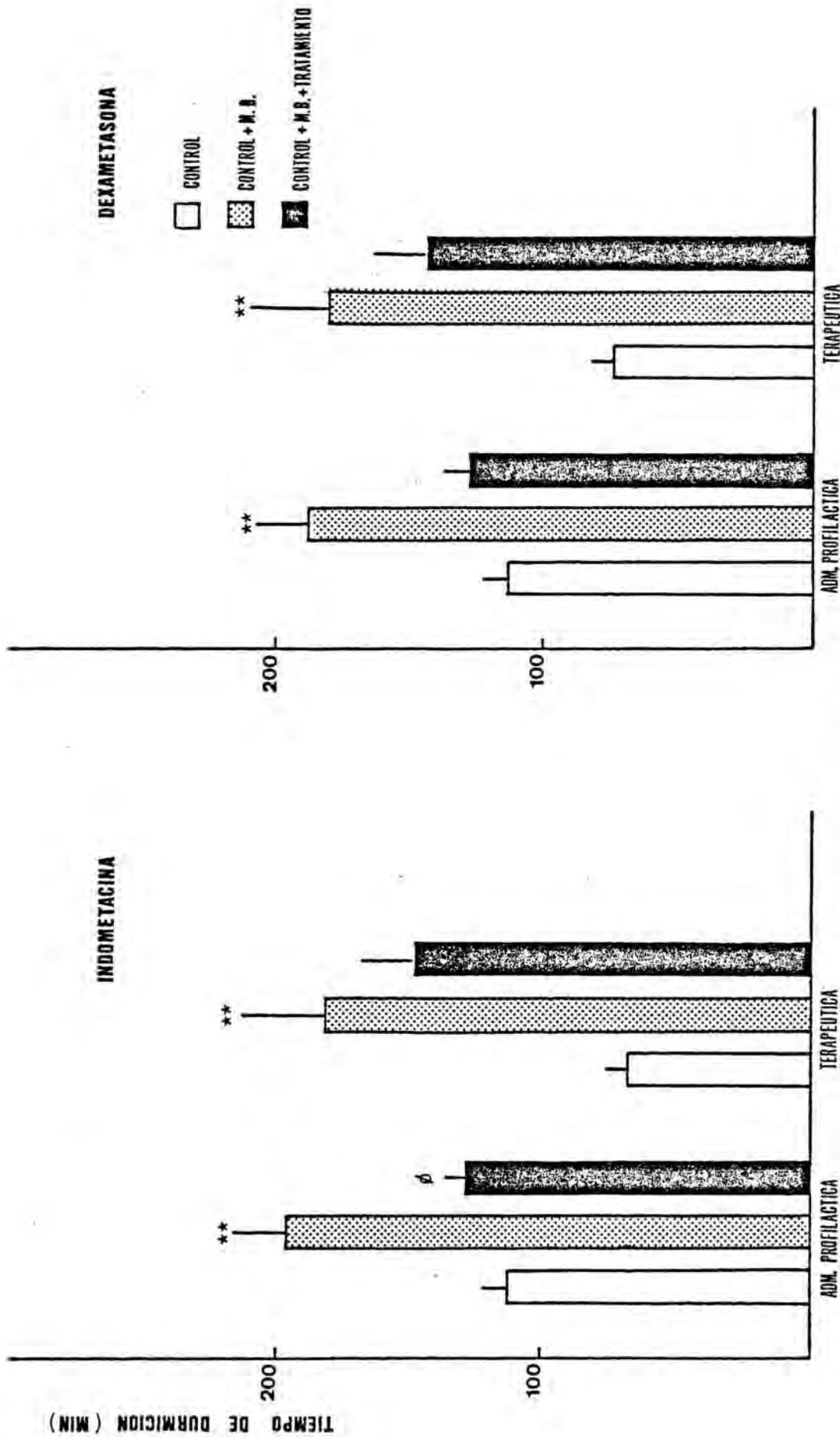


Figura 3.20. Tiempo de durmición en ratones control (□), administrados con M. butyricum (▨) y administrados con M. butyricum y tratados con Indo (▩) o Dxt. (■). Las barras representan la media \pm error estándar de 8-12 determinaciones. ** $p < 0.01$ respecto al grupo control, ϕ $p < 0.01$ respecto al grupo administrado con M. butyricum (test t-Student).

4. DISCUSSION

4. DISCUSION

Como hemos indicado anteriormente, al inicio de la Tesis, nuestro objetivo se centró en la determinación de las alteraciones hepáticas en la artritis adyuvante. Sin embargo, previamente se realizó un estudio metodológico de la separación de la fracción microsomal hepática y la mejor forma de conservar la fracción microsomal una vez aislada. Asimismo, se realizó un estudio cinético de las actividades AND y APH. También se valoraron las modificaciones de la ingesta durante la artritis adyuvante, así como las modificaciones en el metabolismo del cobre, del zinc y las variaciones que se producían en parámetros bioquímicos séricos marcadores de hepatotoxicidad, así como su relación con las alteraciones en la capacidad metabolizadora hepática de fármacos. Finalmente se observó cual era el efecto de un tratamiento antiinflamatorio sobre la inflamación articular y el metabolismo de fármacos.

Por tanto, en la primera parte del trabajo, se realizó un estudio comparativo de dos métodos de preparación de la fracción microsomal: el método de ultracentrifugación y el método de agregación con cloruro de calcio. Se valoró, asimismo, cuál era el método más idóneo para la conservación de la fracción microsomal hasta el momento de su utilización.

Kamath y col. (1971) observaron que determinadas actividades enzimáticas de la fracción microsomal hepática como la glucosa-6-fosfatasa ó la 5'nucleotidasa, no variaban si se obtenían a partir de microsomas aislados por ultracentrifugación o por agregación con CaCl_2 . En nuestras condiciones

experimentales se ha observado que, tanto en los microsomas extraídos de ratas control como de ratas tratadas con CCl_4 , se obtiene un mayor rendimiento en el aislamiento de proteínas microsomales con el método de agregación con calcio, resultados que coinciden con los obtenidos por Warchol y Rembeisa (1974) y Litterst y col. (1975). A pesar del rendimiento proteico en el aislamiento de la fracción microsomal, cuando se utiliza el método de agregación con CaCl_2 , la actividad enzimática por mg de proteína es inferior a la de la fracción microsomal obtenida por ultracentrifugación. Esta diferencia es significativa para la actividad AND, no alcanzando a serlo en el caso de la actividad APH.

Con el fin de establecer la causa que provoca la disminución de la actividad AND cuando la fracción microsomal se aísla por precipitación con CaCl_2 , se incubó la fracción microsomal aislada por ultracentrifugación en presencia de concentraciones crecientes de CaCl_2 . Conforme aumenta la concentración de CaCl_2 se produce una disminución gradual de la actividad AND, reducción que es significativa a partir de concentraciones de CaCl_2 de 26.8 mM. Este efecto podría ser explicado por la capacidad inhibitoria del calcio sobre el metabolismo de la aminopirina (Wills, 1969); el ión cloruro se ha demostrado que no ejerce efecto alguno sobre el metabolismo de la aminopirina a las concentraciones empleadas (Aniya y Matsusaki, 1983). En relación a la actividad APH, ésta no se ve afectada por el CaCl_2 .

El efecto del CaCl_2 "in vitro" sobre la actividad AND, explicaría los diferentes resultados obtenidos en los dos métodos de aislamiento microsomal descritos. La aminopirina, sustrato de la actividad AND y la anilina, sustrato de la actividad APH, se consideran ejemplos de sustratos tipo I y II, respectivamente, para el citocromo P-450 (Schenkman y col. 1967). Los sustratos tipo I, como la aminopirina, se unen al citocromo P-450 por su zona hidrofóbica, mientras que los sustratos tipo II, como la anilina, se unen al citocromo por el hierro del grupo hemo (Yoshida y Kumaoka, 1978). Cabe pensar que el CaCl_2 empleado en el aislamiento microsomal altere la zona hidrofóbica más que la región del grupo hemo; ello explicaría el comportamiento desigual de las actividades AND y APH en la fracción microsomal aislada por agregación con CaCl_2 .

Debido a que los dos métodos de aislamiento ensayados nos eran accesibles y dado que con el método de ultracentrifugación se obtenía mayor actividad AND, se escogió éste para los estudios subsiguientes.

Teniendo en cuenta la controversia sobre el efecto del tipo de conservación de la fracción microsomal sobre las actividades del citocromo P-450 (Danner-Rabousky y col. 1982, Von Bahr y col. 1982 y Ohmiya y col. 1984) y dada la imposibilidad de realizar todas las determinaciones enzimáticas inmediatamente después del sacrificio de los animales, se estudió el efecto que sobre las actividades AND y APH, producía la congelación, a -70°C durante un mes, de muestras de hígado o bien fracción microsomal aislada.

Los resultados obtenidos con ambos métodos de conservación no difieren significativamente de los obtenidos cuando la muestra se valora inmediatamente después del sacrificio, aunque se aprecia una reducción en ambas actividades, AND y APH. A la fracción microsomal precipitada se añadió una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 con un 10 % de glicerol. Esta se ha considerado la forma más idónea de almacenar las muestras, siempre que la valoración no se pueda realizar inmediatamente después del sacrificio.

Una vez establecido el método de aislamiento de la fracción microsomal así como su conservación y almacenamiento se estudiaron las modificaciones producidas por la artritis adyuvante sobre el sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos.

Inicialmente, se realizó un estudio cinético de las actividades enzimáticas AND y APH en la artritis adyuvante, hallándose una disminución de dichas actividades del citocromo P-450. Estos resultados indican una reducción en la capacidad del metabolismo oxidativo de fármacos tanto de tipo I como de tipo II. Este hecho, fué observado con anterioridad por Morton y Chatfield (1970), quienes comprobaron que en las ratas con artritis experimental se incrementaba el periodo de sueño inducido por fenobarbital.

En nuestros estudios hemos podido comprobar que la Vmax de las actividades AND y APH disminuye, significativamente, como consecuencia del proceso artrítico. Esta reducción podría ser debida a de la disminución en la cantidad del citocromo P-

450 hepático que se observa en las ratas artríticas (Perrey y col. 1976).

Strobel y col. (1970) demostraron que los fosfolípidos y especialmente la fosfatidilcolina, son componentes esenciales para el correcto metabolismo de fármacos, hidrocarburos y ácidos grasos, ya que modulan la actividad del citocromo P-450. Buchar y Janku (1985) han comprobado que durante la artritis hay una variación importante en la composición lipídica de la membrana del sistema retículo endotelial (REL) del hepatocito, apreciándose una disminución en la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Estas modificaciones podrían explicar a su vez, la disminución en la afinidad, entre la aminopirina y el citocromo P-450, que hemos hallado en el presente estudio y que viene definida por una reducción de la K_m en la actividad AND de las ratas artríticas.

Otro aspecto del trabajo ha estado constituido por el estudio de las variaciones en la ingesta alimentaria durante la artritis adyuvante y su posible influencia sobre las actividades enzimáticas metabolizadoras de fármacos. El aporte nutritivo es fuente de variaciones en el metabolismo de fármacos de los mamíferos. Así, en las ratas se ha descrito que dietas con un aporte insuficiente para mantener un ritmo óptimo de crecimiento, son también inadecuadas para mantener el funcionamiento normal de los enzimas microsomales hepáticos. Por el contrario, dietas con un contenido proteico elevado son capaces de incrementar el

metabolismo microsomal del fenobarbital, estriquina y aminopirina (Kato y col. 1968). Entre los factores dietéticos que influyen en el metabolismo de xenobiotas, el efecto de los macronutrientes, así como el de los micronutrientes ha sido muy estudiado (Hathcock y Coon, 1978), al igual que la influencia del ayuno sobre el metabolismo de fármacos (Gram y col. 1970). Sin embargo, el estudio del efecto de la restricción parcial y crónica de alimentos sobre la capacidad hepática metabolizadora de fármacos no ha sido analizado hasta más recientemente (Sachan, 1982 y Sachan y Das, 1982). Sorprendentemente, estos autores comprobaron que una restricción en la ingesta del 45 % y 50 %, durante un mes, producía un aumento en el metabolismo del hexobarbital.

Posteriormente, Sachan y Su (1986) comprobaron que una restricción dietética entre el 15 % y 30 % no modifica, significativamente, el metabolismo "in vivo" o "in vitro" de xenobiotas.

En nuestras condiciones experimentales hemos comprobado que la artritis provoca una disminución en la ingesta. La disminución media de la ingesta durante el período estudiado, fue del mismo orden en machos (27.25 %) y hembras (25.13 %). La disminución en el incremento de peso durante la artritis, a pesar de ser significativa en ambos sexos, fue mucho más manifiesta en las hembras. Este efecto más intenso puede atribuirse a que dichos animales presentan una patología articular y sistémica más acentuada. La disminución en la ingesta observada durante la artritis adyuvante, no parece influir en los cambios en los niveles de citocromo P-450 hepático, o de sus actividades

AND y APH como se ha comprobado.

En relación a las variaciones en el proteinograma y en la actividad reductora sérica, es conocido el hecho de que las reacciones inflamatorias agudas inducen un incremento en la síntesis de varias proteínas plasmáticas llamadas "proteínas de fase aguda" (Engler y col., 1988 y Kushner, 1982); simultáneamente, disminuye la síntesis de algunas proteínas como la albúmina (Schreiber y col., 1982). A pesar de que la síntesis hepática de las proteínas de fase aguda se pueden modular por efecto hormonal, la IL-1 podría hallarse implicada en la transcripción y síntesis de estas proteínas durante el proceso inflamatorio (Dinarrello, 1984).

El significado biológico de la síntesis de proteínas de fase aguda en la inflamación no ha sido totalmente establecido, aunque se halla demostrado que se trata de una respuesta de defensa del organismo tendente a neutralizar el proceso inflamatorio (Scherer y col., 1978).

En nuestras condiciones experimentales, los animales artríticos muestran una reducción significativa en sus niveles de albúmina, mientras que se incrementan, de forma significativa, los niveles de α -2-globulinas y β -globulinas en ambos sexos. En las ratas artríticas hembras se observa también un incremento de los niveles de α -1-globulinas. Todas estas modificaciones en el proteinograma se desarrollan sin que la proteinemia total se halle afectada.

Parece razonable pensar que el aumento en la síntesis y liberación de algunas proteínas de fase aguda durante la artritis adyuvante sea paralelo a una reducción en la concentración de algunas proteínas sintetizadas en el hígado. Así, Mahu y Feldmann (1984) han sugerido que puede producirse una disminución de la síntesis de algunas proteínas hepáticas como el citocromo P-450 durante los procesos inflamatorios. Sin embargo, Eiseman y col. (1982) han comprobado que la ALA sintetasa, enzima limitante en la síntesis de la hemoproteína, citocromo P-450, tiene una actividad similar en los animales control y artríticos. Estos autores comprobaron que la enzima hemooxigenasa, encargada de la degradación del citocromo P-450, es más activa en las ratas con artritis adyuvante. Esto, o bien, el hecho de que las endotoxinas, como la pared del M. butyricum, son fuertes depresoras del citocromo P-450, (Mannering y col., 1980), explicarían el que los niveles de cit.P-450 y sus actividades desciendan durante la artritis.

Con respecto a los grupos SH séricos, estos juegan un papel importante en numerosos procesos fisiológicos tales como la conformación de proteínas, la coagulación de la sangre y la división celular (Jensen, 1959), fenómenos que se encuentran modificados por los procesos inflamatorios (Oronsky y col., 1969).

Los pacientes con artritis reumatoide muestran unos niveles reducidos de grupos SH séricos que podrían ser utilizados como medida objetiva de la actividad de la artritis reumatoide (Grimaldi 1980 y Di Simplicio y col., 1983).

En nuestras condiciones experimentales las concentraciones de grupos SH séricos en los animales control fueron diferentes en ambos sexos. En las ratas hembras se observó una concentración superior, en un 12.5 %, a la de los machos, siendo esta diferencia significativa. La inducción de la artritis provoca una disminución de los niveles de grupos SH. Esta disminución fué del 25.5 % en los machos y del 39.5 % en las hembras. Asimismo, se observó que los niveles de grupos SH séricos guardan una estrecha relación con el grado de inflamación sistémica. Por esta razón, este parámetro podría utilizarse para evaluar la gravedad de la patología de forma análoga a como se hace con la cuantificación del volumen del edema de las extremidades.

Las ratas control que siguieron una dieta análoga a la de los animales artríticos no muestran variaciones en sus niveles de grupos SH séricos, por lo que podemos descartar el factor dietético, es decir, la disminución de la ingesta durante la artritis, como causa de la disminución de los grupos SH séricos.

Otro aspecto del trabajo lo ha constituido el análisis de parámetros indicadores de lesión hepática, como son las transaminasas en suero o los niveles de lipídoperoxidación o glutatión hepático y su relación con la capacidad metabolizadora de fármacos.

En la artritis experimental inducida por M. butyricum se han apreciado alteraciones funcionales a nivel del hepatocito, como la disminución en la capacidad de metabolizar fármacos. Los



cambios en la funcionalidad del hepatocito provocadas por toxicos (cirrosis) o infecciones víricas (hepatitis), suelen ir acompañados de cambios morfológicos con destrucción de estructuras celulares, lo cual se refleja en variaciones de algunos parámetros bioquímicos séricos. Por esta razón, se han valorado los niveles de las transaminasas: ALT y AST, fosfatasa alcalina, triglicéridos, colesterol y glucosa, en ratas control, artríticas y ratas control con ingesta análoga a las artríticas. Los resultados se han comparado con los obtenidos en ratas administradas con alcohol y CCl_4 , tóxicos hepáticos que se utilizaron como control positivo, ya que producen modificaciones del metabolismo de fármacos y de la estructura normal del hepatocito.

El aumento de los niveles de ALT, AST y triglicéridos en suero son signos bioquímicos característicos provocados por la intoxicación con CCl_4 . Este aumento en los niveles de transaminas se debe a la destrucción de las membranas celulares del hepatocito y a la liberación de enzimas al suero.

Owen (1980) describe el aumento en suero de AST en ratas con artritis adyuvante. En nuestros resultados no se aprecian, en el suero de las ratas artríticas, aumentos significativos de ninguna de las transaminasas. Por el contrario, en las ratas con artritis adyuvante se observa una disminución significativa en los niveles de ALT, hecho que ya observaron Morton y Chatfield (1970) en la fase inicial de la artritis adyuvante y que atribuyeron al proceso inflamatorio.

Los niveles de fosfatasa alcalina se encuentran significativamente elevados en las ratas con artritis adyuvante. Esta modificación ya la habían observado, semicuantitativamente, Morton y Chatfield (1970). Al no haber valorado cada uno de los isoenzimas de la fosfatasa alcalina, no podemos conocer con exactitud el origen de este cambio bioquímico. Sin embargo, el catabolismo del tejido muscular y óseo durante la artritis, podría ser el responsable del aumento observado de fosfatasa alcalina. En el resto de parámetros valorados: triglicéridos totales, colesterol y glucosa no se han encontrado modificaciones significativas.

El hecho de que, tanto los parámetros bioquímicos séricos marcadores de hepatotoxicidad, como la morfología del hepatocito no se modifican (Ishizuki y col. (1983), permite pensar que la disminución en la capacidad metabolizadora de fármacos no se acompaña de lesiones graves del tejido hepático.

Las membranas biológicas, debido a su elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son particularmente susceptibles a las reacciones de lipidoperoxidación. La formación de lipidoperóxidos en los microsomas hepáticos se ha comprobado que produce degradación de los fosfolípidos (May y McCay, 1968), componentes mayoritarios de las membranas microsomales. Imai y Sato (1960) demostraron que la integridad de la membrana lipídica es fundamental para la hidroxilación de la anilina, mientras que Orrenius y col. (1964) indicaron que la lipidoperoxidación afecta ligeramente a la

demetilación de la aminopirina.

El glutatión es un tripéptido que actúa como reductor intracelular. En 1983 Burk comprobó que este agente puede proteger a los microsomas hepáticos de la lipidoperoxidación.

La inflamación aguda inducida por carragenina (Sharma y col., 1972) o por caolín (Bragt y col., 1979) en rata y ratón, se asocia con un aumento en la lipidoperoxidación hepática. Este efecto, del proceso inflamatorio agudo sobre la lipidoperoxidación, se debe a la formación de sustancias prooxidantes y radicales libres por los fagocitos activados en el área de la inflamación.

El aumento de la lipidoperoxidación ha sido observado por Ishizuki y col. (1984) en hepatocitos de ratas con artritis adyuvante. Sin embargo, nuestros resultados y los de Torrielli (1981) no permiten observar ningún cambio significativo en la lipidoperoxidación hepática, durante un proceso de inflamación crónica como la artritis adyuvante.

Por el contrario, Roback (1978) observó que la lipidoperoxidación en el tejido hepático se reduce significativamente, durante la artritis adyuvante. Esta disparidad en los resultados se pueden deber al empleo de diferentes métodos para la valoración de la lipidoperoxidación o a la valoración en diferentes periodos de la artritis adyuvante. Recientemente, Yuda y col. (1987) han observado que los niveles hepáticos de lipidoperoxidación aumentan en la fase primaria de la artritis adyuvante, para descender rápidamente hacia valores normales. Nuestros resultados coinciden con los de Yuda y col., (1987) en

los que alrededor del día 21 postinducción de la artritis, ya no es significativo el incremento de la lipidoperoxidación.

En ratas con inflamación inducida por carragenina se ha observado una disminución en el contenido de glutatión y otros tioles no proteicos (Younes y Siegers, 1980). También se ha apreciado una disminución significativa de glutatión en los hepatocitos de ratas con artritis adyuvante (Ishizuki y Fujihira, 1984). Nuestros resultados muestran, asimismo, una disminución de glutatión hepático durante la artritis adyuvante, reducción similar a la que se observa en el grupo de ratas control con ingesta análoga al de las ratas artríticas. Por ello, la disminución en el glutatión hepático observado en las ratas artríticas puede depender, más de la reducción en la dieta que del propio proceso inflamatorio (Younes y Siegers 1980). Por último, Tateishi y col. (1974) han demostrado que los estados de malnutrición disminuyen los niveles de glutatión hepático, lo cual apoya nuestros resultados.

Durante la artritis adyuvante se produce una disminución de los niveles de cit.P-450 y de sus actividades. Los resultados obtenidos no permiten relacionar la disminución de los niveles de glutatión hepático y la modificación de la lipidoperoxidación, como responsables de las alteraciones del metabolismo de fármacos observado durante la artritis adyuvante.

Un aspecto importante de este trabajo ha sido la determinación de cobre y zinc en sangre, suero e hígado. Los valores normales de cobre y zinc séricos fueron de 1.58 ± 0.19 $\mu\text{g/ml}$ y 1.08 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ (media \pm desviación estándar), respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Evans y Wiederanders (1967) y Hill (1984). En sangre, los valores obtenidos de cobre y zinc fueron de 1.13 ± 0.04 $\mu\text{g/g}$ y 4.92 ± 0.10 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Con respecto a los niveles de cobre y zinc en hígado, los valores normales observados en el grupo de ratas control fueron de 4.81 ± 0.41 $\mu\text{g/g}$ y 32.63 ± 5.41 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

La artritis adyuvante produce alteraciones en los niveles de cobre, observándose un aumento significativo en sangre, suero e hígado. Este incremento se prolonga durante todo el período estudiado en suero, mientras que en el hígado, los valores tienden a normalizarse a partir del día 28 postinducción. El incremento de cobre en el suero e hígado de las ratas artríticas coincide con el observado por Kishore y col. (1984), el día 21 postinducción.

El cobre sérico se encuentra parte en forma libre y parte unido a proteínas plasmáticas, principalmente a la ceruloplasmina. Denko (1979), Sorenson (1978) y Comforti (1983) han observado que durante procesos inflamatorios crónicos, se produce un aumento en la ceruloplasmina sérica, proteína de fase aguda con actividad antioxidante y cuya síntesis se halla favorecida por la interleukina-1 (IL1) secretada por los macrófagos activados durante el proceso inflamatorio

(Rosenwasser, 1984). Es probable que la hiperceruloplasminemia sea paralela a la hipercupremia observada. La IL1 además de estimular la síntesis de ceruloplasmina, incrementa la síntesis de otras proteínas de fase aguda como la proteína C-reativa, α -2-globulina, fibrinogeno y haptoglobina, cuyos niveles en el plasma de las ratas artríticas también se encuentran incrementados (Owen, 1980).

La principal función de la ceruloplasmina consiste en neutralizar los radicales libres (Dormandi, 1980) que se producen en gran cantidad durante los procesos inflamatorios y de forma indirecta, disminuir la producción de agentes quimiotácticos (Milanino, 1979), todo lo cual tiende a impedir la cronificación del proceso inflamatorio.

Así, el incremento hepático de cobre observado en las ratas artríticas podría ser debido a un aumento de sus requerimientos para incrementar la síntesis de ceruloplasmina.

En relación al zinc, las alteraciones halladas en el suero coinciden con las obtenidas por Kishore y col. (1984). A nivel hepático, estos autores detectan una reducción de zinc, que no llega a ser significativa. En nuestras condiciones experimentales, el día 21 postinducción, se observa un aumento significativo de la cantidad de zinc en hígado. Esta diferencia se puede deber a la variabilidad en la gravedad de los procesos inflamatorios. En las ratas artríticas se ha observado una disminución del zinc en suero, mientras que la zinquemia se mantuvo en sus valores normales.

La disminución de zinc en suero en animales artríticos podría explicarse por el aumento observado en órganos como el hígado (Kishore y col., 1984) y otros fluidos biológicos como el líquido sinovial (Buneaux, 1978). En nuestras condiciones experimentales el incremento de zinc observado en hígado se correlaciona estrechamente con su disminución en suero.

La entrada de zinc a los hepatocitos se ve favorecida por la acción de la IL1 (Di Silvestro, 1984 y Klusing, 1984). El aumento de zinc en hígado se debe a su papel indispensable para la síntesis de proteínas y en el metabolismo del material genético (Prasad, 1979). Una vez dentro del hepatocito, el zinc se unirá a la metalotioneína, formándose un depósito intracelular de zinc, fácilmente accesible a las necesidades metabólicas de la célula. Otra posible función del zinc como indican Thronally y Vasak (1985), sería actuar como agente secuestrante de radicales superóxido e hidroxilo.

De los resultados obtenidos parece desprenderse que las modificaciones observadas en el metabolismo del cobre y el zinc en la artritis adyuvante, tienden a constituir un mecanismo fisiológico de defensa contra el proceso inflamatorio. Esta respuesta de defensa comportaría un aumento de la cantidad de cobre y zinc en hígado, para así, conseguir un aumento de la síntesis de ceruloplasmina y otras proteínas de fase aguda.

La administración, "in vivo", de metales puede modificar de forma significativa el metabolismo de fármacos. Así, por ejemplo, la administración de cobalto, produce una

disminución de los niveles de cit.P-450 y otros componentes del sistema microsomal metabolizador de fármacos (Sasame y Boyd, 1978). En este sentido Eaton y col. (1980), observaron que la adición de cloruro de zinc, "in vivo", no produce cambios en los niveles de cit.P-450 ó glutatión ni en la actividad de la hemooxigenasa. Sin embargo, Parkki (1980) ha observado que el zinc, "in vitro", puede inhibir la actividad epóxido hidrasa microsomal. Recientemente, Asokan y col. (1985) han comprobado que cantidades crecientes de cobre y zinc, "in vitro", son capaces de inhibir la actividad aril hidrocarbano hidroxilasa del cit.P-450 de la fracción microsomal pulmonar de rata.

Dado que como ya se ha comentado, hemos observado una alteración del metabolismo de fármacos durante la artritis adyuvante y un aumento de la cantidad de cobre y zinc en el hígado de estos animales, se consideró conveniente estudiar el efecto "in vitro" del cobre y zinc sobre las actividades AND y APH en la fracción microsomal hepática.

En nuestro trabajo, concentraciones de 1-100 μM de CuSO_4 en los medios de incubación, provocan la disminución de las actividades AND y APH, siendo el efecto mucho más acentuado sobre la actividad APH. De la misma forma, concentraciones crecientes de 20-350 μM de ZnSO_4 también disminuyen las actividades AND y APH.

De los dos metales ensayados, es el cobre el que a concentraciones más bajas, provoca disminuciones más acusadas de las actividades AND y APH del cit.P-450.

El mecanismo por el cual el cobre y el zinc modifican, "in vitro", las actividades AND y APH no se ha establecido todavía. Sin embargo, ambos metales interaccionan con las zonas hidrofóbicas o ligandos axiales del cit.P-450, pudiendo modificar la funcionalidad del enzima (Asokan y col. 1985)

La artritis adyuvante cursa con inflamación de las extremidades, hipertrofia de las adrenales, esplenomegalia, linfadenopatía y reducción del aumento de peso, tal como hemos observado. También hemos comprobado que se producen modificaciones importantes en la síntesis de proteínas plasmáticas, al mismo tiempo que hay una reducción en la capacidad de metabolizar fármacos. Todo ello parece indicar que la inflamación articular es sólo una manifestación superficial de una enfermedad sistémica grave (Whitehouse y Beck, 1973).

La actividad AND (Cawthorne y col. 1976) y la actividad APH (Tabla 3.12.) se hallan disminuidas, ya en la primera fase de la artritis adyuvante, cuando sólo ha aparecido la inflamación primaria. Esta depresión del metabolismo de fármacos se mantiene durante todo el proceso patológico estudiado.

Con el fin de diferenciar entre el propio proceso inflamatorio y las modificaciones en el metabolismo de fármacos, se llevó a cabo un estudio con fármacos con actividad antiinflamatoria reconocida.

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroideo cuyos efectos terapéuticos se explican básicamente por su efecto inhibidor de la producción de prostaglandinas (Flower y Vane,

1974). Por su parte, la dexametasona, al igual que la hidrocortisona, pueden inhibir la formación de IL-1 a dosis terapéuticas (Wahl y Wahl, 1985), al mismo tiempo que inhiben la síntesis de prostaglandinas.

Se han escogido la indometacina y la dexametasona como ejemplo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos, respectivamente. El tratamiento curativo, con ambos fármacos, disminuye de forma significativa la inflamación de las extremidades y también restablece hasta sus valores normales los niveles de proteínas plasmáticas, como la albúmina o las α -2-globulinas, o los niveles séricos de grupos SH. Contrariamente, no restauran, significativamente, la depresión del sistema microsomal encargado del metabolismo de fármacos.

El hecho de que la disminución de la inflamación no se acompañe, simultáneamente, de una normalización del metabolismo de fármacos, puede ser debido a que aunque ambas alteraciones tengan un origen común, el mecanismo por el que se producen sea diferente. Otra explicación posible a estos resultados sería que las alteraciones en el metabolismo de fármacos requiera más tiempo para normalizarse que la inflamación o que las modificaciones en la síntesis de proteínas de fase aguda.

Aunque la capacidad metabolizadora de fármacos del hígado se localiza en los hepatocitos (Cantrell y Bresnick, 1972), las células no parenquimales del retículo endotelial parece que juegan un papel importante en el mantenimiento de los niveles de cit.P-450 del hepatocito. Así, cuando los animales se

tratados con sustancias que son fagocitadas por el sistema retículo endotelial, la capacidad de metabolizar fármacos del hígado disminuye (Peterson y Renton, 1986). Este papel del sistema retículo endotelial explicaría la depresión de la actividad del cit.P-450 que se produce tras la administración de sustancias inmunoestimulantes como: BCG (Farquhar y col., 1976), Bordetella pertusis o Corynebacterium parvum (Renton, 1983). Para explicar que la depresión del metabolismo de fármacos por agentes inmunoestimulantes, pueda ser mediada por la activación del sistema retículo endotelial, se tendría que admitir la existencia de alguna forma de comunicación entre las células de Kupffer y las células parenquimales, los hepatocitos, que es donde se desarrolla mayoritariamente el metabolismo de fármacos.

La artritis adyuvante se induce tras la administración intradérmica del adyuvante completo de Freund (CFA) conteniendo Micobacterias (Pearson, 1956). De hecho, en la artritis se admite que se produce una respuesta de hipersensibilidad retardada a fragmentos de la pared de las Micobacterias (Waksman y col., 1960). Estos fragmentos, que son peptidoglicanos con efecto artritogénico, se ha comprobado que pueden inducir la formación de IL1 por los macrófagos de ratón y por células mononucleares humanas (Oppenheim y col. 1980 y Tenu y col. 1980).

No se ha descrito que la IL1 produzca, "per se", una reducción en la capacidad metabolizadora de fármacos de los hepatocitos, pero si se ha visto que conlleva la formación de prostaglandinas. Cabe pensar que las prostaglandinas pueden ser los mediadores responsables de la inhibición del metabolismo de

fármacos durante la artritis adyuvante. Así, Ishizuki y col. (1986) comprobaron que la administración de PGE₁, PGE₂ y PGF_{2α} mediante perfusión del hígado, provoca disminución en la capacidad de metabolizar fármacos.

Durante la artritis adyuvante inducida con M. butyricum, al mismo tiempo que se inicia el proceso inflamatorio, se estimula el sistema retículo endotelial. Por ello, es muy difícil discernir a través de cuál de los dos procesos se llega a la disminución del metabolismo de fármacos.

Dado que en el ratón la administración de M. butyricum no causa lesiones articulares, se escogió esta especie para producir la reducción del metabolismo de fármacos por acción del M. butyricum.

La administración intraperitoneal de M. butyricum en ratón produce una disminución de la capacidad metabolizadora de fármacos, sin afectación articular. Dicha reducción es mayor que la producida por la administración intradérmica, de forma análoga a lo que ocurre en rata (Cawthorne y col., 1978). Por esta razón se ha escogido esta especie y vía de administración del M. butyricum en el estudio del posible papel de las prostaglandinas en la génesis del daño hepático.

La disminución en la capacidad metabolizadora de fármacos se pone de manifiesto por un aumento del tiempo de dormición tras la administración de pentobarbital y en la reducción de las actividades AND y APH del citocromo P-450. La depresión del metabolismo de fármacos sólo se puede explicar en

este caso, a través de la activación del sistema retículo endotelial.

El pretratamiento de los ratones con un inhibidor de la síntesis de PGs o PGs y LTs impide que la administración de M. butyricum cause una reducción en la actividad enzimática del cit. P-450. Si el tratamiento se efectúa cuando la depresión de las actividades enzimáticas del cit. P-450 ya se han manifestado, sólo hay una recuperación parcial de dichas actividades enzimáticas. Ello puede indicar que mientras las PGs son un factor etiológico en la génesis de la afectación de los hepatocitos, cuando la lesión ya se ha producido intervienen además otros mediadores. Dichos mediadores podrían ser monoquinas, linfoquinas o citoquinas generadas durante el proceso patológico.

En resumen, en la artritis experimental inducida en rata por M. butyricum se ha comprobado que:

Existe una marcada depresión en la actividad del sistema microsomal hepático metabolizador de fármacos sin alteración de las pruebas habituales de disfunción hepática. Esta depresión se manifiesta antes de la afectación articular sistémica. Asimismo, se ha comprobado que los niveles de cobre y zinc en hígado están aumentados en los animales con artritis y se ha observado, "in vitro", que ambos cationes son capaces de reducir la actividad del cit. P-450. En cambio, no se han encontrado modificaciones en los niveles de glutatión o en la lipídoperoxidación que puedan ser atribuidas al proceso artrítico o que puedan explicar su patogenia.

Se ha puesto de manifiesto que el daño articular puede revertirse mediante el tratamientos, con fármacos antiinflamatorios, a diferencia de lo que sucede con la afectación hepática. A nivel hepático es posible que, durante la fagocitosis por las células de Kupffer de las partículas de M. butyricum, se generen PGs que actuando sobre el hepatocito, inician el proceso patológico responsable de la afectación del cit. P-450. Sin embargo es posible que otros mediadores como las monoquinas intervengan en la perpetuación del daño hepático.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En ratas con artritis experimental existe una marcada depresión de las actividades enzimáticas ligadas al citocromo P-450. Así, hay una disminución en la V_{max} de las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa y una reducción en la K_m de la actividad aminopirina N-demetilasa. Los niveles de cit P-450 también están reducidos. Estas modificaciones aparecen antes de que se desarrolle la inflamación articular en la extremidad contralateral (inflamación sistémica) y se producen sin modificaciones en las transaminasas (aspartato amino transferasa y alanina amino transferasa) séricas y tan sólo hay un ligero aumento de la fosfatasa alcalina.

La inflamación sistémica se manifiesta a los 12-14 días de la inducción. Cursa con hipoalbuminemia, aumento de alfa y beta globulinas. No se modifican las gamma-globulinas. Existe correlación entre la reducción en los niveles de albúmina, el aumento en alfa-globulinas y la inflamación articular. Como consecuencia de la artritis también se produce una marcada disminución de la actividad reductora sérica.

Los animales artríticos reducen su ingesta con la consiguiente disminución en la pendiente de su curva ponderal. Se ha comprobado que este trastorno no influye en los niveles de cit P-450 hepáticos o en sus actividades enzimáticas.

Los animales artríticos presentan unos niveles de cobre y zinc en hígado elevados. A nivel sérico se aprecia un aumento en los niveles de cobre y una reducción en los de zinc. Se ha comprobado, "in vitro", que el cobre y el zinc pueden deprimir las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa.

En el período de máxima inflamación articular y lesión hepática no se aprecia un aumento en la lipidoperoxidación hepática. En consecuencia, la reducción observada en los niveles de glutatión hepático es atribuible, más a la ingesta reducida, que a los efectos del proceso artrítico.

La terapéutica de las ratas artríticas con indometacina (1 mg/kg/día) y dexametasona (0.3 mg/kg/día) disminuye el edema plantar en un 50 y 100 %, respectivamente. Sin embargo, ninguno de los fármacos indicados es capaz de revertir, significativamente, la disminución de las actividades enzimáticas ligadas al cit P-450.

La administración intraperitoneal de M. butyricum en ratones, produce una reducción de la capacidad metabolizadora de fármacos que se pone de manifiesto por un aumento en el tiempo de dormición con pentobarbital. Asimismo, las actividades

aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa están disminuídas. Estos cambios se producen sin que aparezca inflamación articular.

Por último, una vez establecida la lesión hepática en ratón, el tratamiento con indometacina o dexametasona, a las dosis indicadas, revierte parcialmente el daño hepático. Sólo la administración profiláctica con ambos fármacos antes de la administración del M. butyricum, es capaz de prevenir la aparición de daño a nivel del sistema microsomal hepático.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, N.G., LEVERE, R.D. Y FREEDMAN, M.L. (1985) Effect of age on rat liver heme and drug metabolism. *Exp. Gerontol.* 20, 277-284.
- ADELMAN, R.C. (1971) Age-dependent effects in enzyme induction. A biochemical expression of aging. *Exp. Gerontol.* 6, 75-87 .
- ADLERCRENTZ, H., TIKKANEN, M.J. (1973) Defect in hepatic uptake and transport and biliary excretion of estrogens. *Med. Chir. Dig.* 2, 59-65.
- ALI, M., NICHOLLS, P.J., YOOSUF, A. (1976) The influence of old age and of renal failure on hepatic glucuronidation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 66, 4988-4998.
- AL-TURK, W.A., STOHS, S.J. (1981) Hepatic glutathione content and aryl hydrocarbon hydroxylase activity of acetaminophen-treated mice as a function of age. *Drug Chem. Toxicol.* 4, 37-48.
- ALVAN, G., VON BAHR, C., SEIDEMAN, P., SJOQUIST, F. (1982) High plasma concentration of β -receptor blocking drugs and deficient debrisoquine hydroxylation. *Lancet* 1, 333.
- ALVAN, G., GRIND, M., GRAFFNER, C., SJOQUIST, F. (1984) Relation of N-demethylation of amiflamine and its metabolite to debrisoquine hydroxylation polymorphism. *Clin. Pharmacol. Therp.* 36, 515-519.
- ANIYA, Y. y MATSUSAKI, K (1983) Effects of neutral salts on hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system in rats. *Japan J. Pharmacol.* 33, 647-657.
- AOKI, T., TELLER, M.N., ROBITALLIE, A. (1965) Aging and cancerogenesis. II Effect of age on phagocytic activity of the reticuloendothelial system and on tumor growth. *J. Natl. Cancer Inst.* 34, 255-264.
- ARIAS, I.M., GARTNER, L.M., COHEN, M., BEN EZZER, J. Y LEVI, A.J. (1969) Chronic non-hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. *Am. J. Med.* 47, 395-409.
- ARMBRACHT, H.J., BIRNBAUM, L.S., ZENSER, T.V. Y DAVIS, B.B. (1982) Changes in hepatic microsomal membrane fluidity with age. *Exp. Gerontol.* 17, 41-48.
- ASOKAN, P., DAS, M., DIXIT, R. y MUKHTAR, H. (1985) Interaction of certain metal ions with aryl hydrocarbon hydroxylase of rat lung microsomes. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 57, 72-77.

AUCLAIR, C., HAKIM, J., BOIVIN, P., TROUBE, H. Y BOUCHEROT, J. (1976) Bilirubin and paranitrophenol glucuronyl transferase activities of the liver in patients with Gilbert's syndrome. *Enzyme* 21, 97-107.

BAIRD, M., SAMIS, A. Y MASSIE, H. (1971) Recovery from zoxazolamine paralysis and metabolism in vitro of zoxazolamine in aging mice. *Nature (London)* 233, 565-567.

BAIRD, M.D., NICOLosi, R.J., MASSIE, H.R. Y SAMIS, H.V. (1975) Microsomal mixed-function oxidase activity and senescence. I. hexobarbital sleep time and induction of componets of the hepatic microsomal enzyme system in rats of different ages. *Exp. Gerontol.* 10, 89-99.

BAXTER, J.D. Y TOMKINS, G.M. (1970) The relationship between glucocorticoid binding and tyrosine aminotransferase induction in hepatoma tissue culture cells. *Procc. Nat. Acad. Sci. USA* 65, 709-715.

BAXTER, J.D. Y TOMKINS, G.M. (1971) Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Procc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 932-937.

BECKING, G.C. Y MORRISON, A.B. (1970) Role of dietary magnesium in the metabolism of drugs by NADPH-dependent rat liver microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol.* 19, 2639-2644.

BECKING, G.C. Y MORRISON, A.B. (1970) Hepatic drug metabolism in zinc deficient rats. *Biochem Pharmacol.* 19, 895-902.

BECKING, G.C. (1972) Influence of diet on hepatic drug metabolism in vivo and in vitro in rat. *Biochem. Pharmacol.* 21, 1585-1593.

BERTILSON, L. Y ABERG-WISTEDT, A. (1983) The debrisoquine hydroxylation test predict steady-state plasma levels of desipramine. *Br. J. Pharmacol.* 15, 388-390.

BILDER, G.E. (1975) Studies on inmune competence in the rat: changes with age, sex and strain. *J. Gerontol.* 30, 641-646.

BIRNBAUM, L. Y BAIRD, M. (1978a) Induction of hepatic mixed function oxidases in senescent rodents. *Exp. Gerontol.* 13, 299-303.

BIRNBAUM, L.S. Y BAIRD, M.B. (1978b) Induction of hepatic mixed function oxidases in senescent rodents. *Exp. Gerontol.* 13, 469-477.

BIRNBAUM, L.S. Y BAIRD, M.B. (1979) Senescent changes in rodent hepatic epoxide metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 26, 254-256.

BIRNBAUM, L.S. (1980) Altered hepatic drug metabolism in senescent mice. *Exp. Gerontol.* 15, 259-267.

BLACKWELL, G.J., CARNUCCIO, R., DI ROSA, M., FLOWER, R.J., PARENTE, L. Y PERSICO, P. (1980) Macro cortin: A polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature* 287, 147-149.

BLACKWELL, G.J., CARNUCCIO, R., DI ROSA, M., FLOWER, R.J., LANGHAM, C.S.J., PERSICO, P., RUSSELSMITH, N.C. Y STONE, D. (1982) Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 76, 185-194.

BLANCK, A., ASTROM, A., HANSSON, T., DE PIERRE, J.W. Y GUSTAFSSON, J.A. (1986) Pituitary regulation of cytochrome P-450 mediated metabolism of steroids and xenobiotics in rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 7, 575-582 .

BOCK, K.W., BURCHELL, B., BUTTON, G., HANNINEN, O., MULDER, G.J., OWENS, I.S., SIEST, G. Y TEPHLY, T.R. (1983) UDP-glucuronyltransferase activities: guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem Pharmacol.* 32, 953-955.

BOCK, K.W., LILIENBLUM, M., Y VON BAHR, C. (1984) Studies of UDP-glucuronyltransferase activities in human liver microsomes. *Drug Metab. Disposition* 12, 93-97.

BONDY, P.K., Y BODEL, P. (1971) Mechanisms of pyrogenic and antipyretic steroids. In: *Pyrogens and fever*, Wolstenholme GEW, Birch J. eds. Churchill Livingstone (Edinburgh) pp. 101-113.

BOUTIN, J.A., JACQUIER, A., BATT, A.M., MARLIERE, D. Y SIEST, G. (1983) udp-glucuronyltransferase activities in human liver microsomes and in some laboratory animal species. *Biochem Pharmacol.* 30, 2507-2510.

BRAGT, P.C., SCHENKELAARS, E.P.M. y BONTA, I.L. (1979) Acute inflammation process induced by kaolin. *Prostaglandin Med.* 2, 51-61.

BROUWER, A. Y KNOOK, D.L. (1983) The reticuloendothelial system and aging *Mech. Ageing Dev.* 21, 205-228.

BRUNK, S.F., COMBS, S.P., MILLER, J.D., DELLE, M. Y WILSON, W.R. (1969) Dipyrone metabolism in myxedema, hyperthyroidism and triiodothyronine-induced hypermetabolism. *Fed. Proc.* 28, 676.

BUCHAR, E. y JANKU I. (1985) The effect of adjuvant-induced arthritis on rat liver microsomal phospholipid metabolism. *Meth. Find. Explt. Clin. Pharmacol.* 7, 469-472.

BURK, R.F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 757, 21-28.

CANTRELL, E. y BRESNICK, E. (1972) Benzpyrene hydroxylase activity in isolated parenchymal and nonparenchymal cells of rat liver. *J. Cell. Biol.* 52, 316-321.

CARPENTER, M.P. (1972) Vitamin E and microsomal drug hydroxylations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 203, 81-92.

CATZ, C.S., JUCHAU, M.R. y YAFFE, S.J. (1970) Effects of iron, riboplavin, and iodide deficiencies on hepatic drug-metabolizing enzyme systems. *J. Pharmacol. Exp. Therp.* 174, 197-205.

CHILDS, B., SIDBURY, J.B., y MIGEON, C.J. (1959) Glucuronic acid conjugation by patients with familial non-hemolytic jaundice and their relatives. *Pediatrics* 23, 903-913.

CLOIX, J.F., GLARD, O., ROTHHUT, B. y RUSSO-MARIE, F. (1983) Characterization and partial purification of "renocortins": two polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase like action of glucocorticoids. *Br. J. Pharmacol* 79, 313-321.

COLBY, H.D., GASKIN, J.H. y KITAY, J.I. (1973) Requirement of the pituitary gland for gonadal hormone effects on hepatic corticosteroid metabolism in rats and hamsters. *Endocrinology* 92, 769-774.

COLBY, H.D., KRAMER, R.E., GREINER, J.W., ROBINSON, D.A., KRAUSSE, R.F. y CANADY, W.J. (1975) Hepatic drug metabolism in retinol-deficient rats. *Biochem Pharmacol.* 24, 1644-1652.
Clinical pharmacology and therapeutics (1980) Conney, A.H. y Turner, P. eds., MacMillan (London), pp 51-62 .

COOK, D.E. y PAST, M.R. (1979) Drug metabolism in diabetic isolated perfused rat liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 24, 389-392.

CROOKS, J., HEADLY, J.A., McNEE, C., STEVENSON, I.H. (1973) Changes in drug metabolizing ability in thyroid disease. *Br. J. Pharmacol.* 49, 156P.

CRIVELLO, J.F. y GILL, G.N. (1983) *Mol. Cell. Endon.* 30, 97-107.

Drugs and the elderly (1979) Crooks, J. y Stevenson, I.H. eds., MacMillan Press (London)

DANON, A. y ASSOULINE, G. (1978) Inhibition of prostaglandin biosynthesis by corticosteroids requires RNA and protein synthesis. *Nature* 273, 552-554.

DANNER-RABOUSKY, J. y GROSEDOSE, R.D. (1982) Stability of rat lung and liver microsomal cytochrome P-450 enzyme activities to storage: purified microsomal fraction, postmitochondrial fraction and whole tissue. *J. Toxicol. Environ. Health* 10, 601-611.

DAS, K.M., EASTWOOD, M.A., McMANUS, J.P.A. Y SIRCUS, W. (1973) Adverse reactions during salicylazo-sulfapyridine therapy and the relation with drug metabolism and acetylator phenotype. *New Engl. J. Med.* 289, 491-495.

DAYER, P., BALANT, L., LOURVOISIER, F., KUPFER, A., KUBLI, A., GIORGIA, A. Y FABRED, J. (1982) The genetic control of bufuralol metabolism in man. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics* 7, 73-77.

DE LEEUW-ISRAEL, F.R. (1971) Aging changes in the rat liver (Thesis, Leiden).

DE MOOR, P. Y DENEFF, C. (1968) The puberty of the rat liver. Feminine patterns of cortisol metabolism in male rats castrated at birth. *Endocrinology* 8, 480-492.

DENEFF, C. (1974) Effect of hypophysectomy and pituitary implants at puberty on the sexual differentiation of testosterone metabolism in rat liver. *Endocrinology* 94, 1577-1582.

DEVADATTA, S. (1960) Peripheral neuritis due to isoniazid. *Bull. WHO* 23, 587.

DINARELLO, C.A. (1984) Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6, 51-95.

DINGELL, J.V., JOINER, P.D. Y HURWITZ, L. (1966) Impairment of hepatic drug metabolism in calcium deficiency. *Biochem. Pharmacol.* 15, 971-976.

DIPLOCK, A.T., BAUM, H. Y LUCY, J.A. (1971) The effect of vitamin E on the oxidation state of selenium in rat liver. *Biochem. J.* 123, 721-729.

DIPLOCK, A.T., CAYGILL, C.P., JEFFREY, E.H. Y THOMAS, C. (1973) The nature of the acid-volatile selenium in the liver of the male rat. *Biochem. J.* 134, 283-293.

DIPLOCK, A.T. Y LUCY, J.A. (1973) The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: A hypothesis. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 29, 205-210.

DI SIMPLICIO, P. (1983) An improved method of determination of SH group concentration and reactivity in plasma of patients with various clinical disorders and in rats after administration of indomethacin or carbon tetrachloride. *Pharmacol. Res. Commun.* 15, 805-814.

DIXON, R.L., HART, L.G. Y FOUTS, J.R. (1961) The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 133, 7-11.

DOUGLAS, A.P., SAVAGE, R.L. Y RAWLINS, M.D. (1978) Paracetamol kinetics in patients with Gilbert's syndrome. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 13, 209-212.

DUBOIS, R.N., SIMPSON, E.R., KRAMER, R.E. y WATERMAN, M.R. (1981) Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 by adenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 256, 7000-7005.

EATON, D.L., STACEY, N.H., WONG, K.L. y KLAASSEN, C.D. (1980) Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 393-402.

EBEL, R.E. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 559.

EDEN, S. (1979) Age and sex related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105, 555-560.

EDWARDS, A.M. Y ELLIOTT, W.A. (1975) Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in isolated rat liver cells by steroids. *J. Biol. Chem.* 250, 2750-2755.

EICHELBAUM, M., BODEM, G., GUGLER, R. SCHNEIDER-DETERS, C. Y DENGLER, H.J. (1974) Influence of thyroid status on plasma half-life of antipyrine in man. *New Engl. J. Med.* 290, 1040.

EICHELBAUM, M., BERTILSON, L., SAWE, J. Y ZERORN, C. (1982) Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 31, 184-186.

EINARSSON, K., GUSTAFSSON, J.A. Y STENBERG, A. (1973) Neonatal imprinting of liver microsomal hydroxylation and reduction of steroids. *J. Biol. Chem.* 248, 4987-4997.

EISEMAN, J.L., VON BREDOW, J. y ALVARES A.P. (1982) Effect of honeybee venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1139-1146.

ENEROTH, P., GUSTAFSSON, J.A., SKETT, P. Y STENBERG, A. (1977) The effects on hepatic steroid metabolism of an ectopic pituitary graft: a time study. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7, 167-175.

ENGLER, R., PONTET, M. y PAYANO, M. (1980) *Expos. Annu. Biochim. Med.* 34, 27-44.

EL DEFRAWY, S., COHEN, G.M. Y MANNERING, G.J. (1974) Sex-dependent differences in drug metabolism in the rat. Qualitative changes produced by castration and the administration of steroid hormones and phenobarbital. *Drug Metab. Disposition* 2, 279-284.

PRICE EVANTS, D.A., MANLEY, F.E. Y MCKUSICK, V.A. (1960) Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med. J.* 2, 485.

FAHIM, M.S., BENNETT, R. Y HALL, D.G. (1970) Effect of DDT on the nursing neonate. *Nature (London)* 228, 1222-1223.

FARGUKAR, D., LOO, T.L., GUTTERMAN, J.U., HERSH, E.M. y LUNA, M.A. (1976) Inhibition of drug-metabolizing enzymes in the rat after bacillus calmette-guerin treatment. *Biochem. Pharmacol.* 25, 1529-1535.

FONDA, M.L., EGGERS, D.K. Y MEHTA, R. (1980) Vitamin B₆ metabolism in the livers of young, adult and senescent mice. *Exp. Gerontol.* 15, 457-463.

FENER, G. (1979) Action of pregnancy and various progesterones on hepatic microsomal activities. *Drug Metab. Rev.* 9, 147-172.

FLOWER, R.J. Y BLACKWELL, G.J. (1976) The importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* 25, 285-291.

FLOWER, R.J. (1978) Prostaglanins and related compounds. In: *Inflammation*. Vane J.R. y Ferreira, S.H. (eds). *Handb. Exp. Pharm* 50/I. Springer Verlag, Berlin.

FUJITA, S., UESUGI, T., KITAGAWA, H., SUZUKI, T. Y KITANI, K. (1982) Hepatic microsomal monooxygenase and azoreductase activities in aging Fisher-344 rats. Importance of sex difference for aging studies. In: *Liver and Aging, liver and drugs*, Kitari, K. ed., Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, pp 55-72.

GEHRING, V. Y TOMKINS, G.M. (1974) A new mechanism for steroid unresponsiveness: loss of nuclear binding activity of a steroid hormone receptor. *Cell* 3, 301-306.

GEENBLATT, D.J., DIVOLL, A.M., LOCNISKAR, A., HARMATZ, J.S. Y SHADER, R.I. (1979) Lorazepam kinetics in the elderly. *Clin. Pharmacol. Ther.* 26, 103.

GILLETTE, J.R. Y GRAM, T.E. (1969) Cytochrome P-450 in liver microsomes and its relationship to drug metabolism. In: *Microsomes and drug oxidations*, Gillette, J.R., Conney, A.H., Cismides, G.J., Estabrook, R.W., Fouts, J.R. y Mannering, G.J., Academic Press, (New York) pp. 133-149.

GOBLE, F.C. (1975) Sex as a factor in metabolism, toxicity and efficacy of pharmacodynamic and chemotherapeutic agents. *Ad. Pharmacol. Chemother.* 13, 173.

GOLD, G. Y WIDNELL, C.C. (1974) Reversal of age-related changes in microsomal enzyme activities following the administration of triamcinolone, triiodothyronine and phenobarbital. *Biochim. Biophysc. Acta* 384, 75-85.

GRANICK, S. (1966) The induction "in vitro" of the synthesis of δ -aminolevulanic acid synthetase in chemical porphyria: A response to certain drugs, sex hormones, and foreign compounds. *J. Biol. Chem.* 241, 1359-1375.

GRANT, D.M., TANG, B.K. Y KALOW, W. (1984) A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 17, 459-464.

GRASSO, R.J., KLEIN, T.W. Y BENJAMIN, W.R. (1981) Inhibition of yeast phagocytosis and cell spreading by glucocorticoids in cultures of resident murine peritoneal macrophages. *J. Immunopharmacol.* 3, 171-192.

GRASSO, R.J., WEST, L.A., GUAG, R.C. Y KLEIN, T.W. (1982) Inhibition of yeast phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: Reversibility of the effect and enhanced suppression in cultures of stimulated macrophages. *J. Immunopharmacol.* 4, 265-278.

GRIMALDI, M.G. (1980) Serum sulphhydryl concentrations and antirheumatic drugs in rheumatoid patients. *J. Pharm. Pharmacol.* 32, 876.

GRINNA, L.S. (1977) Age-related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of the rat liver and kidney. *Mech. Ageing Dev.* 6, 197-205.

GROSSE, W. Y WADE, A.E. (1971) The effect of thiamine consumption on liver microsomal drug metabolizing pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 758-765.

GUPTA, C., KATSUMATA, M., GOLDMAN, A.S. Y HAROLD, R. (1984) Glucocorticoid-induced phospholipase a_2 inhibitory proteins mediate glucocorticoid teratogenicity in vitro. *Proc. Natn. Sci. USA* 81,1140-1143.

GUSTAFSSON, J.A. Y STENBERG, A. (1974) Neonatal programming of androgen responsiveness of liver of adult rats. *J. Biol. Chem.* 249, 719-723.

GUSTAFSSON, J.A. Y STENBERG, A. (1974) Masculinization of rat liver enzyme activities following hypophysectomy. *Endocrinology* 95, 891-896.

GUSTAFSSON, J.A., EDEN, S., ENEROTH, P., HOKFELT, T., ISAKSSON, O., JANSSON, J.O., MODE, A. Y NORSTEDT, G. (1983) Regulation of sexually dimorphic hepatic steroid metabolism by the somatostatin growth hormone axis. *J. Steroid Biochem.* 19, 691-698.

HARA, T. Y TANIGUCHI, M. (1982) Abnormal NADPH cytochrome P-450 reductase in the liver microsomes of riboplavin-deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 394-401.

HATHCOCK, J.N. y COON, J. (1978) Nutrition and drug interactions. Academic Press, New York. pp. 303-532.

HAWCROFT, D.M. Y MARTIN, P.A. (1974) Studies on age-related changes in the lipids of mouse liver microsomes. *Mech. Ageing Dev.* 3, 121-130.

HEGNER, D. Y PLATT, D. (1975) Effect of essential phospholipids on the properties of ATPases of isolated rat liver plasma membranes of young and old animals. *Mech. Ageing Dev.* 4, 191-200.

HELD, H. Y PRZEAWA, M. (1976) Effect of female sexual cycle on the activity of δ -aminolevulinic acid synthetase in rat liver. *Eur. J. Clin. Invest.* 6, 411-414.

HILDEBRAND, D., FAHIM, M.S., HALL, D.G. Y PICKETT, E. (1972) Trace substrate in environmental health. Vol. 5, Hemphill, D.D. ed., University of Missouri, Columbia, pp. 235-246.

HIRATA, F., SCHIFFMAN, E., VENKATASUBRAMANIAN, K., SALOMON, D. Y AXELROD, J. (1980) A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 77, 2533-2536.

HORBACH, G.J.M.J., YAP, S.H. Y VAN BEZOOIJEN, C.F.A. (1983) Age-related changes in albumin elimination in female WAG/Rij rats. *Biochem J.* 216, 309-315.

HORN, L.R., MACHLIN, L.J., BARKER, M.O. Y BRIN, M. (1976) Drug metabolism and hepatic heme proteins in the vitamin E deficient rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 270-277.

IDLE, J.R., RITCHIE, J.C. Y SMITH, R.L. (1979) Oxidation phenotype and metiamide metabolism. *Br. J. Pharmacol.* 66, 432P (abstract).

IMAI, Y. y SATO, R. (1960) Solubilization of aromatic hydroxylase system of liver microsomes and requirement of lipid-like factor. *Biochim. Biophys. Acta* 42, 164.

ISHIZUKI, S., FURUHATA, K., KANETA, S. y FUJIHIRA, E. (1983) Reduced drug metabolism in isolated hepatocytes from adjuvant arthritis rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 32, 261-276.

ISHIZUKI, S. y FUJIHIRA, E. (1984) Peroxidative status of isolated hepatocytes from adjuvant arthritis rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 3, 431-443.

ISHIZUKI, S., KANDA, N. y FUJIHIRA, E. (1986) Prostaglandins: A possible mediators to inhibit hepatic drug metabolism in adjuvant arthritic rats. *Biochem. Medicine & Metabolic biology* 35, 40-49.

JENNE, J.W. (1965) Partial purification and properties of the isonizid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation of p-aminosalicylic acid. *J. Clin. Invest.* 44, 1992-2002.

JAESCHKE, H. Y WENDEL, A. (1985) Diurnal fluctuation and pharmacological alteration of mouse organ glutathione content. *Biochem. Pharmacol.* 34, 1029-1033.

JAROSLOW, B.N. Y LARRICK, J.W. (1973) Clearance of foreign red cells from the blood of aging mice. *Mech. Ageing Dev.* 2, 23-32.

JONES, T.C. (1979) Pathology of the liver of rats and mice. In: Pathology of laboratory rats and mice. Cotchin, E. y Roe, F.J.C. eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1-23 .

JONES, T.W.J. Y HAWNOFT, D.M. (1982) Some interactions of hepatic microsomal phospholipid metabolism and monooxygenase activity in advancing age. In: Liver and Aging. Liver and drugs. Kitani, K. ed., Elsevier Bichemical Press, pp. 39-51.

JULICHER, R.H.M., STERREBERG, L., HAENEN, G.R.M.M., BAST, A. Y NOORDHOEK, J. (1984) Sex differences in the cellular defense system against free radicals from oxygen or drug metabolites in rat. *Arch. Toxicol.* 56, 83-86.

KAHN, G.C., BOODIS, A.R., MURRAY, S., BRODIE, M.J. Y DAVIES, D.S. (1982) Assay and characterization of debrisoquine 4-hydroxylase activity of microsomal fractions of human liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 13, 637-645.

KAMATAKI, T., MAEDA, K., YAMAZOE, Y., NAGARI, T. y KATO, R. (1983) Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantification of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Archs. Biochem. Biophys.* 225, 758-770.

KAMATH, S.A., KUMMEROW, F.A. y NARAYAN, K.A. (1971) A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *FEBS Lett.* 17, 90-92.

KAO, J. Y HUDSON, P. (1980) Induction of the hepatic cytochrome P-450 dependent monooxygenase system in young and geriatric rats. *Biochem Pharmacol.* 29, 1191-1194.

KARLSSON, E. Y MOLIN, L. (1975) Polymorphic acetylation of procaine amide in healthy subjects. *Acta Medica Scand.* 197, 299.

KATO, R. Y GILLETTE, J.R. (1965) Sex differences in the effects of abnormal physiological status on the metabolism of the drug by rat liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150, 285-291.

KATO, R. Y TAKANABA, A. (1968) Effect of phenobarbital on electron transport system, oxidation and reduction of drugs in liver microsomes of rats of different age. *J. Biochem.* 63, 406-408.

KATO, R. Y TAKANAKA, A. (1968b) Metabolism of drugs in old rats.II. Metabolism in vivo and effect of drugs in old rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 18, 389-396.

KATO, R. Y TAKANAKA, A. (1968c) Metabolism of drugs in old rats (I) Activities of NADPH-linked electron transport and drug-metabolizing enzyme systems in liver microsomes of old rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 18, 381-388.

KATO, R. Y TAKABASKI, A. (1968) Thyroid hormone and activities of drug metabolizing enzymes and electron transport system of rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 4, 109-120.

KATO, R., OSHIMA, T. y TOMIZAWA, S. (1968) Toxicity and metabolism of drug in relation to dietary proteins. *Japan J. Pharmacol.* 18, 356-361.

KATO, R. (1974) Sex-related differences in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* 3, 1-32.

KATO, R. (1977) Drug metabolism and pathological and abnormal physiological states in animals and man. *Xenobiotica* 7, 25-92.

KATO, R. Y KAMATAKI, T. (1982) Cytochrome P-450 as a determinet of sex difference in drug metabolism in the rat. *Xenobiotica* 12, 787-800.

KITAHARA, A., EBINA, T., ISHIKAWA, T., SOMA, Y., SATO, K. Y KANAI, S. (1982) Changes in activities and molecular forms of rat hepatic drug metabolizing enzymes during aging. In: *Liver and aging. Liver and drugs.* Kitani, K. ed., Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, pp. 135-142.

KITANI, K., KANAI, S., MIURA, R., MORITA, Y. Y MASAHARA, M. (1978) The effect of ageing on the biliary excretion of ouabain in the rat. *Exp. Gerontol.* 13, 9-17.

KITANI, K., ZURCHER, C., VAN BEZOOIJEN, C.F.A. (1981) The effect of aging on the hepatic metabolism of sulfobromophthalein in BN/Bi female and WAG/Rij male and female rats. *Mech. Ageing Dev.* 17, 381-393.

KITANI, K., SATO, Y. Y VAN BEZOOIJEN, C.F.A. (1982) The effect of age on the biliary excretion of digitoxin and its metabolites in female BN/Bi rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1, 43-54.

KITANI, K., SATO, Y., KANAI, S. Y NOKUBO, M. (1982) Biliary elimination of cardiac glycosides in aging rats. Sex and strain differences. In: *Liver and ageing. Liver and drugs.* Kitani, K. ed., Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, pp. 179-191.

KITCHEN, I., TREMBLAY, J., ANDRE, J., DRING, J.G., IDLE, J.R., SMITH, R.L. Y WILLIAMS, R.T. (1979) Interindividual and interspecies variation in the metabolism of the hallucinogen 4-methoxyamphetamine. *Xenobiotica* 9, 397-404.

KLEIBLOESEM, C.H., VAN BRUMMELEN, P., FABER, H., DAUHOF, M., VERMEULEN, N.P.E. Y BREIMER, D.D. (1984) Variability in nifedipine pharmacokinetics and dynamics: a new oxidation polymorphism in man. *Biochem Pharmacol.* 33, 3721-3724.

KLOTZ, U., AVANT, G.R., HOYUMDA, A., SCHENKER, S. Y WILKINSON, G.R. (1975) The effect of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J. Clin. Invest.* 55, 347-352.

KNODELL, R.G., STEELE, N.M., CERRA, F.B., GROSS, J.B. Y SOLOMON, T.E. (1984) Effect of parenteral and enteral hyperalimentation on hepatic drug metabolism in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229, 589-597.

KNOOK, D.L., PRAANING, D.P., Y BROUWER, A. (1982) The clearance of kupffer and endothelial liver cells in relation with drugs and aging. In: *Liver and aging. Liver and drugs.* Kitani, K. ed., Elsevier Biochemical Elsevier, Amsterdam, pp. 269-282.

KREEK, M.J. Y SLEISENGER, M.H. (1968) Reduction of serum unconjugated bilirubin with phenobarbitone in adult congenital non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemia. *Lancet* 2, 73-78.

KUENZING, W., TKACZEUSKI, V., KAMM, J.J., CONNEY, A.H. Y BURNS, J.J. (1977) The effect of ascorbic acid deficiency on extrahepatic microsomal metabolism of drugs and carcinogens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201, 527-533.

KUPFER, A. Y PREESING, R. (1984) Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 753-759.

KUPFER, A., SMITH, B., PREISING, P. Y PFAFF, G. (1984) Dextromethorphan as a safe probe for debrisoquine hydroxylation polymorphism. *Lancet* 2, 517-518.

KUSHNER, I. (1982) C-reactive protein and the plasma proteins response to tissue injury. Kushner, I., Volanakis, J.E. y Gewurz, H. eds., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 389, 39-48.

KUTZ, K., SCHULTE, A., JENSEN, C. Y GUGLER, R. (1977) Impaired drug conjugation in subjects with Gilbert's syndrome. *Gastroenterology* 73, 1229(abstract).

LAL, S. Y SOURKES, T.L. (1970) The effect of chronic administration of carbon tetrachloride and α -naphthylisocyanate on tissue copper levels in the rat. *Biochem. Med.* 4, 260.

LAMPE, J. Y BUTSCHAK, C. (1978) The role of cytochrome P-450 in the toxicity of xenobiotics. *Pharmazie* 33, 407-413.

LARREY, D. Y BRANCH, R.A. (1983) Clearance by the liver: current concepts in understanding the hepatic disposition of drugs. *Semin. Liv. Dis.* 3, 285-297.

LARREY, D., DISTLERATH, L.M., DANNAN, G.A., WILKINSON, G.R. Y GUENGERICH, F.P. (1984) Purification and characterization of the rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the 4-hydroxylation of debrisoquine, a prototype for genetic variation in oxidative drug metabolism. *Biochemistry* 23, 2787-2795.

LENNARD, M.S., JACKSON, P.R., FREESTONE, S., TUCKER, G.T., RAMSAY, L.E. Y WOODS, H.F. (1984) The relationship between debrisoquine oxidation phenotype and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 17, 679-685.

LENNARD, M.S., SILAS, J.H., FREESTONE, S., RAMSAY, L.E., TUCKER, G.T. Y WOODS, H.F. (1982) Oxidation phenotype, a major determinant of metoprolol metabolism and response. *New Engl. J. Med.* 307, 1558-1560.

LEVY, H.A. Y DI PALMA, J.R. (1953) The effect of nutritional deficiency on response to thiopental. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 109, 377-386.

LIKE, A.A. Y ROSSINI, A.A. (1976) Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415-417.

LUNDE, P.K.M., FRISLID, K. Y HANSTEEN, V. (1977) Disease and acetylation polymorphism. *Clin. Pharmacokinet.* 2, 182-197.

MACKLON, A.F., SAVAGE, R.L. Y RAWLINS, M.D. (1979) Gilbert's syndrome and drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.* 4, 223-232.

MAHU, J.L., FELDMAN, G. y ENGLER, R. (1984) Effect of an acute inflammatory reaction on the haptoglobin, albumin, cytochrome P-450 contents and glucose-6-phosphatase activity in hepatic microsomal fractions in the rat. In : *Marker proteins in inflammation.* Arnaud, P., Bienvenu, J. y Laurent, P. (eds.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 581-584.

MAINES, M.D. Y KUTTY, R.K. (1983) Differential response of testicular and ovarian heme oxygenase activity to metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 134-144.

MALASKA, T. Y PAYNE, A.H. (1984) Luteinizing hormone and cyclic AMP mediated induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured mouse leydig cells. *J. Biol. Chem.* 259, 11654-11657.

MANNERING, G.J., RENTON, K.W., EL AZHARY, A. y DELORIA, L.B. (1980) *Ann. NY Acad. Sci.* 350, 314.

MAY, H.E. y Mc CAY, P.B. (1968) Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 243, 2288.

Mc CARTY, J., KRAMER, R.E., FUNKENSTEIN, B., SIMPSON, E.R. Y WATERMAN, M.R. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 222, 590-598.

McMARTIN, D.N., O'CONNOR, J.A., FASCO, M.J. Y KAMINSKY, L.S. (1980) Influence of aging and induction of rat liver and kidney microsomal mixed function oxidase systems. Toxicol. Appl. Pharmacol. 54, 411-419.

MEIER, P.J., MUELLER, H.K., DICK, B. Y MEYER, U.A. (1983) Hepatic monooxygenase activities in subjects with a genetic defect in drug oxidation. Gastroenterology 85, 682-692.

MELLSTROM, B., BERTILSON, L., LOU, Y.C., SAWE, J. Y SJOQUIST, F. (1983) Amitriptyline metabolism: relationship to polymorphic debrisoquine hydroxylation. Clin. Pharmacol. Ther. 34, 516-520.

MELLSTROM, B., BERTILSON, L., SAWE, J., SCHULZ, H.V. Y SJOQUIST, F. (1981) E- and z-10-hydroxylation of nortriptyline relationship to polymorphic debrisoquine hydroxylation. Clin. Pharmacol. Ther. 30, 189-193.

MERKUS, F.W.H.M. (1980) The serum concentration of drugs. Excerpta Medica, Amsterdam.

MILLER, M.E., GARLAND, W.A., MIN, B.H., LUDWICK, B.T., BALLARD, R.H. Y LEVY, R.H. (1981) Clonazepam acetylation in fast and low acetylators. Clin. Pharmacol. Ther. 30, 343-347.

MIRANDA, C.L., MUKHTAR, H., BEND, J.R. Y CHHABRA, R.S. (1979) Effects of vitamin A deficiency on hepatic and extrahepatic mixed function oxidase and epoxide metabolizing enzymes in guinea pig and rabbits. Biochem. Pharmacol. 28, 2713-2716.

MIRANDA, C.L. Y CHHABRA, R.S. (1981) Effect of high dietary vitamin A on drug metabolizing enzyme activities in guinea pig and rabbit. Drug-Nutr. Interact. 1, 55-61.

MITCHELL, J.R. (1976) Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis. Ann. Intern. Med. 84, 181.

MODE, A., ENEROTH, P., GUSTAFSSON, J.A., HOKFET, T. Y SKETT, P. (1980) Effect of hypothalamic deaffectation at different levels on metabolism of hepatic steroid in rat. J. Endocrinol. 86, 69-77.

MODE, A., NORSTEDT, G., SIMIC, B., ENEROTH, P. Y GUSTAFSSON, J.A. (1981) Continuous infusion of growth hormone feminizes hepatic steroid metabolism in the rat. Endocrinology 108, 2103-2108.

MODE, A., GUSTAFSSON, J.A., JANSSON, J.D., EDEN, S. Y ISAKSSON, O. (1982) Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. Endocrinology 111, 1692-1697.

- MOFFITT, A.E., DIXON, J.R., PHIPPS, F.C. Y STOKINGER, H.E. (1972) The effect of benzpyrene phenobarbital and carbon tetrachloride on subcellular metal distribution and microsomal enzyme. *Cancer Res.* 32, 1148-1153.
- MOFFITT, A.E., MURPHY, S.D. (1973) Effect of excess and deficient copper intake on rat liver microsomal enzyme activity. *Biochem. Pharmacol.* 22, 1463-1476.
- MORSELLI, P.J. (1976) Clinical pharmacy and clinical pharmacology. Gouveia, W.A., Tognoni, G., Van der Kleijn, E. eds., Elsevier North Holland Bichemical Press, Amsterdam, pp. 277-289.
- MORTON, D.M. y CHATFIELD, D.H. (1970) The effects of adjuvant induced arthritis on the liver metabolism of drugs in rats. *Biochem. Pharmacol.* 19, 473-481.
- MURRAY, M. y FARRELL, G.C. (1984) Different effects of carbon tetrachloride toxicity and cirrhosis on substrate binding to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 33, 687-689.
- NIJKAMP, F.P., FLOWER, R.J., MONCADA, S. Y VANE, J.R. (1976) Partial purification of rabbit aorta contacting substance-releasing factor and inhibition of its activity by anti-inflammatory steroids. *Nature* 263, 479-482.
- NOTTER, D. (1973) Place des N-acetyltransferases dans de metabolisme de medicaments et de la serotonine influence de la fhenelzine. Tesis Doctoral (Nancy).
- OATES, N.S., SHAH, R.R., IDLE, J.R. Y SMITH, R.L. (1982) Genetic polymorphism of phenformin 4-hydroxylation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32, 81-89.
- OATES, N.S., SHAH, R.R., DRURY, P.L., IDLE, J.R. Y SMITH, R.L. (1982) Captopril-induced agranulocytosis associated with an impairment of debrisoquine hydroxylation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 14, 601P(abstract).
- OHMIYA, Y. y MEHENDALE, M. (1984) Effect of storage on chlorpromazine and imipramine N-oxidizing activity of rat lung microsomes. *Japan J. Pharmacol.* 36, 256-257.
- OMAYE, S.T. Y TURNBULL, J.D. (1980) Minireview: effect of ascorbic acid on heme metabolism in hepatic microsomes. *Life Science* 27, 441-449.
- OMAYE, S.T., GREEN, M.D. Y DONG, M.H. (1981) Influence of dietary thiamine on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the mouse. *J. Toxicol. Environ. Health* 7: 317-326.

OPPENHEIM, J.J., TOGAWA, A., CHEDID, L. y MIZEL, S. (1980) Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor. *Cell. Immunol.* 50, 71-81.

O'SHAUGHNESSY, P.J. y PAYNE, A.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11593-11599.

OWEN, R.T. (1980) Adjuvant induced polyarthritis. An overview. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* 2, 199-204.

PANTUCK, E.J., PANTUCK, C.B., WEISSMAN, C., GIL, K.M. y ASKANAZI, J. (1985) Stimulation of oxidative drug metabolism by parenteral refeeding of nutritionally depleted patients. *Gastroenterology* 89, 241-245.

PARDON, I.S., JONES, T.W.G. y HAWCROFT, D.M. (1977) The apparent absence of an age-dependent lag period for hepatic enzyme induction in mice under chronic phenobarbitone treatment. In: *Liver and ageing*, Platt, D. ed., FK Schattner Verlag, Stuttgart, pp. 183-193.

PARK, B.K. (1982) Assessment of the drug metabolism capacity of the liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 14, 631-651.

PARKKI, M.G. (1980) Inhibition of rat hepatic microsomal styrene oxide hydration by mercury and zinc in vitro. *Xenobiotica* 10, 307-310.

PAST, M.R. y COOK, D.E. (1983) Catalytic activities of cytochrome P-450 from female rat liver: correlation with sex differences in drug metabolism in diabetic liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 40, 379-388.

PAYNE, A.H., WONG, K.L. y VEGA, M.M. (1980) Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 255, 7118-7122.

PERREY, K., JONEN, H.G., KAHL, G.F. y JAHNCHEN, E. (1976) Elimination and distribution of phenyl-butazone in rats during the course of adjuvant-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 470-477.

PETERS, M.A. y FOUTS, J.R. (1970) The influence of magnesium and some other divalent cations on hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *Biochem Pharmacol.* 19, 533-544.

PETERS, M.A. y FOUTS, J.R. (1970) A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 173, 233-241.

PETERSON, R.E. Y SCHIMD, 7(1957) A clinical syndrome associated with a defect in steroid glucuronide formation. J. Clin. Endocrinol. 17, 1485-1488.

PETERSON, T.C. y RENTON, K.W. (1986) Kupffer cell factor mediated depression of hepatic parenchymal cell cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. 35, 1491-1497.

PHILIP, A.P., ROBERTS, M.S., Y ROGERS, H.J. A rapide method for determination of acetylation phenotype using dapsone. Br. J. Clin. Pharmacol. 17, 465-469.

PIERI, C., NAGY, I.Z., MAZZUFFERI, G. Y GIULI, C. (1975) The aging of rat liver as reveales by electron microscopic morphometry. I. Basis parameters. Exp. Gerontol. 10, 291-304.

PLATT, D. (1977) Age dependent morphological and biochemical studies of the normal and injured rat liver. In: Liver and aging, FK Schattauer Verlag, Stuttgart, pp. 75-83.

PLAYER, T., MILLS, D. Y HORTON, A. (1977) Age-related dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH-dependent lipid peroxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1397-1402.

PYYKKO, K. (1983) Acta Pharmacol. Toxicol. 53, 401.

REINKE, L.A., STOHS, S.J. Y ROSENBERG, H. (1978) Altered activity of hepatic mixed-function monooxygenase enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. Xenobiotica 8, 611-619.

RICHNEY, D. Y BENDER, A. (1977) Pharmacokinetics consequences of aging. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17, 49-65.

RIKANS, L.E. Y NOTTEY, B.A. (1982) Age-related in hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 574-578.

RIKANS, L.E. Y NOTTEY, B.A. (1982) Differential effects of aging on hepatic microsomal monooxygenase induction by phenobarbital and β -naphthoflavone. Biochem. Pharmacol. 31, 2339-2343.

RICKENS, A., MARKS, V. (1981) Therapeutic drug monitoring. Churchill Livingstone, Edinburgh.

RIULIN, R.S. Y LONGDON, R.G. (1966) Regulation of hepatic FAD levels by thyroid hormone. In: Advances in enzyme regulation, vol 4, Weber, G. ed., Pergamon Press, New York, pp. 45-58.

ROBACK, K.J. (1978) Adjuvant-induced and carrageenin-induced inflammation and lipid peroxidation in rat liver, spleen and lungs. Biochem. Pharmacol. 27, 531-533.

ROBERTS, R.K., DESMOND, P.V., WILKINSON, G.R. Y SCHENKER, S. (1979) Disposition of chlordiazepoxide: sex differences and effects of oral contraceptives. Clin. Pharmacol. Ther. 25, 826.

ROELS, C.O.A., ANDERSON, O.R., LUI, N.S.T., SHAN, D.O. Y TROUT, M.E. (1969) Vitamin A and membranes. *Am. J. Clin. Nutr.* 22, 1020-1032.

ROSSINI, A.A., LIKE, A.A., CHICK, W.L., APPEL, M.C. Y CAHILL, G.F. (1977) Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2485-2489.

ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D. Y TOMKINS, G.M. (1972) Glucocorticoid receptors: relations between steroid binding and biological effects. *J. Molec. Biol.* 67, 99-115.

RUCHIRAWAT, M., ARAMPHONGPHAN, A., TANPHAICHITR, V. Y BANDITTANUKOOL, W. (1981) The effect of thiamine deficiency on the metabolism of acetaminophen. *Biochem. Pharmacol.* 30, 1904-1906.

RUMBAUGH, R.C., McCOY, Z. Y LUCIER, G.W. (1984) Correlation of hepatic cytosolic androgen binding proteins with androgen induction of hepatic microsomal ethylmorphine N-demethylase in the rat. *J. Steroid Biochem.* 21, 243-252.

SACHAN, D.S. (1982) Modulation of drug metabolism by food restriction in male rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 984-989.

SACHAN, D.S. y DAS, S.K. (1982) Alterations of NADPH-generating enzymes and drug metabolizing enzymes in male rats. *J. Nutr.* 112, 2301-2306.

SACHAN, D.S. y SU, P.K. (1986) Effects of levels of feed restriction on in vivo and in vitro alterations in drug metabolism and associated enzymes. *Drug-Nutrient Int.* 4, 363-370.

SADEE, W. Y BEELEN, G.C.M. (1980) Drug level monitoring. Analytical techniques, metabolism and pharmacokinetics. John Wiley & Sons, New York.

SASAME, H.A. y BOYD, M.R. (1978) Paradoxical effects of cobaltous chloride and salts of other divalent metals on tissue levels of reduced glutathione and microsomal mixed-function oxidase components. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 718-724.

SCHENKMAN, S.B., REMMER, H. y ESTABROOK, R.W. (1967) Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochromes. *Mol. Pharmacol.* 3, 113-123.

SCHERER, R. y RUHENSTROTH-BANER, G. (1978) Hemmung des Carrageenan-induzierten entzündlichen Rattenpfotenodemus durch systemische Applikation von Rattenfibrinogen und fibrinopeptiden. *Blut* 36, 327-330.

SCHMUCKER, D.L., MOONEY, J.S. Y JONES, A.L. (1977) Age-related changes in the hepatic endoplasmic reticulum: A quantitative

analysis. *Science* 197, 1005-1007.

SCHMUCKER, D.L. (1979) Age-related changes in drug disposition. *Pharmacol. Rev.* 30, 445-456.

SCHMUCKER, D.L. Y WANG, R.K. (1980) Age-related changes in liver drug metabolism: Structure us function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165, 178-187.

SCHMUCKER, D.L. Y WANG, R.K. (1980b) Age-related changes in liver drug metabolizing enzymes. *Exp. Gerontol.* 15, 321-329.

SCHMUCKER, D.L. Y WANG, R.K. (1981) Effect of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug metabolizing system. *Mech. Ageing Develop.* 15, 180-202.

SCHMUCKER, D.L., WANG, R.K. Y KWONG, P. (1982) Age-dependent alterations in rat liver microsomal NADPH cytochrome c reductase. In: *Liver and aging. Liver and drugs.* Kitani, K. ed., Elsevier Bichemical Press, Amsterdam, pp. 75-96.

SCHMUCKER, D.L. (1983) Aging and drug disposition. *Rev. Biol. Res. Aging* 1, 381-403.

SCHMUCKER, D.L. (1986) Subcellular and molecular mechanisms underlying the age-related decline in liver drug metabolism. In: *The aging Process: Therapeutic Implications,* Butler, R.N. y Bearn, A.G. eds., Raven Press, New York, pp-117-136.

SCOTT, J. Y POFFENBARGER, P.L. (1979) Pharmacogenetics of tolbutamide metabolism in humans. *Diabetes* 28, 41-51.

SHAFFER TANNENBAUM, G. Y LING, N. (1984) The interrelationship of growth hormone (GH) releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115, 1952-1957.

SHAH, R.R., OATES, N.S., IDLE, J.R., SMITH, R.L. Y LOCKHART, J.D.F. (1982) Impaired oxidation of debrisoquine in patients with perhexidine neuropathy. *Br. Med. J.* 284, 295-299.

SHARMA, S.C., MUKHTAR, H., SHARMA, S.K. y KRISHNA MURT, C.R. (1972) Lipid peroxide formation in experimental inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 21, 1210-1214.

SIKIC, B.I., MIMNAUGH, E.G., LITTERST, C.L. Y GRAM, T.E. (1977) The effect of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 901-914 .

SINGH, G., RENTON, K.W. y STEBBING, N. (1982) Homogeneous interferon from *E. coli* depresses hepatic cytochrome P-450 and drug biotransformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 1256-1261.

SJOQUIST, F., BORGA, O. Y ORME, M.L.E. (1980) Drug Treatment. Avery, G.S. ed., Adis Press, Sidney, pp. 1-61.

SKETT, P., MODE, A., RAFTER, J., SAHLIN, L. Y GUSTAFSSON, J.A. (1980) The effects of gonadectomy and hypophysectomy on the metabolism of imipramine and lidocaine by the liver of male and female rats. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2759.

SKETT, P., COCHRANE, R.A. Y JOELS, L.A. (1984) The role of androgens in the effect of diabetes mellitus on hepatic drug metabolism in the male rat. *Acta Endocrinologica* 107, 506-512.

SLADEK, N.E. Y MANNERING, G.J. (1969) Induction of drug metabolism. II. Qualitative differences in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 5, 186-199).

SLANINA, P. Y STALHANDSKE, T. (1977) In vitro metabolism of nicotine in liver of ageing mice. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 226, 258-262.

SLOAN, T.P., MAHGOUB, T.P., LANCASTER, R., IDLE, J.R. Y SMITH, R.L. (1978) Polymorphism of carbon oxidation of drugs and clinical implications. *Br. Med. J.* 2, 655-657.

SONAWANE, B.R., ERIKSSON, M., CATZ, C. Y YAFFE, S.J. (1983) Effect of protein depletion and intrauterine growth retardation on rat hepatic drug metabolism. *Dev. Pharmacol. Ther.* 6, 239-247.

SONAWANE, B.R., COATES, P.M., YAFFE, S.J. Y KOLDOVSKY, O. (1983b) Influence of perinatal nutrition on hepatic drug metabolism in the adult rat. *Dev. Pharmacol. Ther.* 6, 323-332.

STEVENSON, I.H., SALEM, S.A.M. Y SHEPHARD, A.M.M. (1976) Drugs and the elderly. Crooks, J. y Stevenson, I.H. eds., Mac Millan Press, London, pp. 51-63.

STOHS, S.J., AL TURK, W.A. Y HASSING, J.M. (1980) Altered drug metabolism in hepatic and extrahepatic tissues in mice as a function of age. *Age* 3, 88-92.

STOHS, S.J., HASSING, J.M., AL TURK, W.A. Y MASOUD, A.N. (1980) Glutathione levels in hepatic and extrahepatic tissues of mice as a function of age. *Age* 3, 11-14.

STIER, A., FINCH, S.A.E., GREINERT, R., HOHME, M. Y MULLER, R. (1982) Membrane structure and function of the hepatic microsomal cytochrome P-450 system. In: *Liver and aging. Liver and drugs.* Kitani. K ed., Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, pp. 3-14.

STROBEL, M.W., LU, A.Y., HEIDEMA, J. Y COON, M.J. (1970) Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 245, 4851-4854.

SU, L.C., AYAZ, K.L. Y CSALLANY, A.S. (1979) Glutathione peroxidase in mouse tissues: effect of age and dietary vitamin E. *Nutr. Rep. Int.* 20, 461-467.

SUTTON, J.L., BASU, T.K. Y DICKERSON, J.W.T. (1982) Effect of large doses of ascorbic acid on the mixed function oxidase system in guinea pig liver. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1591-1594.

SUKUKI, M., LAMI, K., ITO, A., OMURA, T. Y SATO, R. (1967) Effects of thyroidectomy and triiodothyronine administration on oxidative enzymes in rat liver microsomes. *J. Biochem. (tokyo)* 62, 447-455.

TANNENBAUM, G.S. (1981) Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence for role of endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology*, 108, 76-82.

TATEISHI, N., HIGASHI, T., SHINYA, S., NARUSE, A. y SAKAMOTO, Y. (1974) Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem.* 75, 93-103.

TENU, J.P., LEDERER, E. y PETIT, J.F. (1980) Stimulation of thymocytes mitogenic protein secretion and of cytotoxic activity of mouse peritoneal macrophages by tetralose dimycolate and muramyl dipeptide. *Eur. J. Immunol.* 10, 647-653.

THOMPSON, T.H. (1976) The cellular actions of glucocorticoids in relation to human neoplasms. *Current Topics Molec. Endocrinol.* 4, 114-132.

THORNALLY, P.J. y VASAK, M. (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reactions with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827, 36-44.

TORRIELLI, M.V. (1981) Lipid peroxidation in inflammatory processes. In: *Recent advances in lipid peroxidation and tissue injury*. Brunel Univ. Printing Serv., Uxbridge, pp.267-296.

UCHIDA, K., MATSUBARA, T., ISHIKAWA, Y. Y ITOH, N. (1982) Age-related changes in cholesterol bile acid metabolism and hepatic mixed function oxidase activities in rats. In: *Liver and ageing, Liver and drugs*. Kitani, K. ed., Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, pp. 195-210.

VAN BEZOOIJEN, C.F.A. Y KNOOK, D.L. (1978) A comparison of age-related changes in bromsulphophthalein metabolism of the liver and isolated hepatocytes. In: *Liver and ageing*. Kitani, K. ed., Elsevier North Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 131-141.

VAN BENZOOIJEN, C.F.A. (1984) Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism. A review. *Mechanisms of ageing and Development* 25, 1-22.

VARGA, F. Y FISCHER, E. (1978) Age dependent changes in blood supply of the liver and in the biliary excretion of eosine in rats. In: Liver and aging, Kitani, K. ed., Elsevier North Holland biochemical Press, Amsterdam, pp. 327-339.

VASKO, M.R., BELL, R.D., DALY, D.D. Y PIPPENGER, C.E. (1980) Inheritance of phenitoin hypometabolism: a kinetic study of one family. Clin. Pharmacol. Ther. 27, 96-103.

VESELL, E.S., SHAPIRO, J.R., PASSANTI, G.T., JORGENSEN, H. Y SHIVELY, C.A. (1975) Altered plasma half-lives of antipyrine, propylthiouracil and methimazole in thyroid dysfunction. Clin. Pharmacol. Ther. 17, 48.

VESELL, E.S. (1979) The antipyrine test in clinical pharmacology: conceptions and misconceptions. Clin. Pharmacol. Ther. 26, 275-286.

VESELL, E.S. (1980) In: Clinical pharmacology and therapeutics. Turner, P. ed., McMillan, London, pp. 63-79.

VOGEL, F. (1959) Moderne probleme der Humangenetik. Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd. 12, 52-125.

VON BAHR, C., GLAUMANN, H. y MELLSTROM, R. (1982) In vitro assessment of hepatic drug metabolism in man: A clinical pharmacological perspective. TIPS 12, 487-490.

VORBECK, M.L., MARTIN, A.P., LONG, J.W., SMITH, J.M. Y ORR, R.R. (1982) Age dependent modifications of lipid composition and lipid structural order parameter of hepatic mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 217, 351-361.

VREE, T.B., HEKSTER, Y.A., DAMSMA, J.E., VAN DER KLEIJN, E. Y O'REILLY, W.J. (1979) Pharmacokinetics of N₁-acetyl- and N₄-actylsulphamethoxazole in man. Clin. Pharmacokin. 4, 310.

WADE, A.E., WU, B.C., HOLBROOK, C.M. Y CASTER, W.O. (1973) Effects of thiamine antagonist on drug hydroxylation and properties of cytochrome P-450 in the rat. Biochem. Pharmacol. 22, 1573-1580.

WADE, A.E., EVANS, J.L. Y SEITZ, A. (1976) Influence of the oral contraceptive mestranol on drug metabolizing enzymes of female rats in thiamin-supplemented and deficiency states. Pharmacology 14, 104-114.

WAHL, S.M. Y WAHL, L.M. (1985) Regulation of macrophage collagenase, prostaglandin and fibroblast activating factor production by anti-inflammatory agents: different regulatory mechanisms for tissue injury and repair. Cell Immunol. 92, 302-312.

WAKSMAN, B.H., PEARSON, C.M. y SHARP, J.T. (1960) Studies of arthritis and other lesions induced by the injection of mycobacterial adjuvant. Evidence that the disease is a disseminated immunologic response to exogenous antigen. *J. Immunol.* 85, 403.

WANG, T., RODEN, D.M., WOLFENDEN, H.T., WOOSLEY, R.L., WOOD, Y. A.I.J., WILKINSON, G.R. (1984) Influence of genetic polymorphism on the metabolism and disposition of encainide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 605-611.

WARCHOL, A. y REMBEISA, R. (1974) Isolation of cytochrome P-450 by ultracentrifugation and calcium aggregation in testis, ovary and adrenals. *Steroid lipid Res.* 5, 113-117.

WARING, R.H., MITCHELL, S.C., SHAH, R.R., IDLE, J.R. Y SMITH, R.L. (1982) Polymorphic sulphoxidation of S-carboxymethyl l-cysteine in man. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3151-3154.

WARREN, D.L., PAK, R., FINLAYSON, M., GONTOVNICK, L., SUNAHARA, G. Y BELLWARD, G.D. (1983) Differential effects of diabetes on microsomal metabolism of various substrates: comparison of streptozotocin and spontaneously diabetic Wistar rats. *Biochem. Pharmacol.* 32, 327-335.

WEIGAND, W., HANNAPPEL, E. BRAND, K. (1980) Effect of starvation and refeeding a high-protein or high carbohydrate diet on lipid composition and glycogen content of rat liver in relation to age. *J. Nutr.* 110, 669-674.

WILKINSON, G.R. (1977) The effects of liver disease and aging on the disposition of diazepam, chlordiazepoxide, oxazepam and lorazepam in man. *Acta Psychiatr. Scand (Suppl)* 274, 56.

WILLS, E.D. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes III. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem. J.* 113, 333.

WILLS, E.D. (1972) Effects of iron overload on lipid peroxide formation and oxidative demethylation by the liver endoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 21, 239-247.

YANG, C.S. (1974) Alterations of the aryl hydrocarbon hydroxylase system during riboflavin depletion and repletion. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 623-630.

YANG, C.S. (1977) Interactions between solubilized cytochrome P-450 and hepatic microsomes. Characterization of the binding and the enhanced catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 252, 293-298.

YOSHIDA, Y. y KUMAOKA, H. (1978) Studies on the substrate-induced spectral change of cytochrome P-450 in liver microsomes. *J. Biochem (tokyo)* 78, 455-468.

YOUNES, M., y SIEGERS C.P., (1980) Hepatic GSH concentrations and lipid peroxidation in acute inflammation induced by carrageenin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 27, 119-128.

YUDA, Y., HIRANO, F. y TANAKA, J. (1987) Formation of lipid peroxides in adjuvant arthritis. Yakugaku Zasshi 4, 287-293.

ZANNONI, V.G., FLYNN, E.J. Y LYNCH, M. (1977) Ascorbic acid and drug metabolism. Biochem. Pharmacol. 21, 1377-1392.