

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS
INSTITUTO DE FISIOLOGIA EXPERIMENTAL
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS

**ALTERACIONES DE ISOENZIMAS DE CITOCROMO P450
DURANTE LA REGENERACION HEPATICA.
PARTICIPACION DE PUTRESCINA**

CRISTIAN FAVRE

DIRECTORA: Dra. MARIA CRISTINA CARRILLO

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR

AÑO 1999

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron publicados en revistas y presentados en reuniones científicas que se enumeran a continuación.

PUBLICACIONES

- Favre, C., Monti, J. A., Scapini, C., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1998). Putrescine decreases cytochrome P450 3A4 levels during liver regeneration in the rat. *J. Hepatol.* 28, 700-708.
- Favre, C., Carnovale, C. E., Monti, J. A., Carrillo, M. C. (1999). Inhibition by IFN α -2b of rat liver regeneration: Effect on ornithine decarboxylase and total protein synthesis. *Biohem. Biophys. Res. Commun.* (en revisión)

REUNIONES CIENTIFICAS

NACIONALES

- Favre, C., Scapini, C., Carnovale, C. E., Monti, J. A., Carrillo, M. C. (1995). Monooxigenasas microsomales en la regeneración hepática. **XL Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica**. Mar del Plata, Noviembre 1995. Resumen publicado en **MEDICINA (Buenos Aires) 1995, 55(5):546**
- Favre, C., Scapini, C., Monti, J. A., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1995). Efecto del proceso de regeneración hepática sobre isoenzimas del Citocromo P450. **XV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**. Rosario, Noviembre 1995.
- Favre, C., Monti, J.A., Scapini, C., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1996). Putrescina disminuye CYP3A4 durante la regeneración hepática en ratas. **XLI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Paraná, Noviembre 1996 y II Congreso Rosarino y XVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**. Paraná y Rosario, Noviembre 1996. Resumen publicado en **MEDICINA (Buenos Aires) 1996, 56(5):589**
- Favre, C., Scapini, C., Monti, J. A., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1997). Enzimas metabolizadoras de carcinógenos durante la regeneración hepática en ratas. Efecto de inductores. **XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica**.

Mar del Plata, Noviembre 1997. Resumen publicado en **MEDICINA (Buenos Aires) 1997, 57(4)13**

- Favre, C., Monti, J. A., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1998). Efecto inhibitor del IFN α -2b sobre la regeneración hepática: Ornitina decarboxilasa (ODC) y síntesis proteica. **XLIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica**. Mar del Plata, Noviembre 1998. Resumen publicado en **MEDICINA (Buenos Aires) 1998, 58(4):601**

INTERNACIONALES

- Carnovale, C. Monti, J. A., Pisani, G., Favre, C., Carrillo, M. C. (1994). Intestinal GST activity: GABA inhibition of liver regeneration. **International Association for the Study of the Liver**. Cancun, Méjico, Febrero 1994. Resumen publicado en **Hepatology Rapid Lit Rev. 1994, 19 (4):501**
- Favre, C., Monti, J. A., Scapini, C., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1996). Involvement of putrescine in the decrease of CYP3A4 during liver regeneration in rats. **American Association for the Study of Liver Diseases**. Chicago, USA. Noviembre 1996. Resumen publicado en **Hepatology 1996, 24(4)**
- Favre, C., Monti, J. A., Scapini, C., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1997). Putrescina disminuye CYP 3A4 durante la regeneración hepática en ratas. **XXII Congreso Nacional de la Asociación Española para el**

Estudio del Hígado. Madrid, España, Febrero de 1997. Resumen publicado en **Gastroenterología y Hepatología 1997, 20 (Sup 1)**

- Favre, C., Monti, J. A., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1998). Effects of Interferon alfa-2b (IFN α -2b) on rat liver regeneration: IFN receptor, ornithine decarboxylase protein expression and total protein synthesis. **American Association for the Study of Liver Diseases y International Association for the Study of the Liver.** Chicago, USA, Noviembre 1998. Resumen publicado en **Hepatology. 1998, 28(4):179A**
- Favre, C., Monti, J. A., Carnovale, C. E., Carrillo, M. C. (1999). Diminution by IFN α -2b of ornithine decarboxylase (ODC) protein expression and total protein synthesis in rat regenerating liver. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology.** San Francisco, USA, Mayo 1999. Resumen publicado en **FASEB J 1999, 13(7):A1402**

ABREVIATURAS

ANOVA análisis de variancias

AP1 Proteína Activadora-1

BROD benciloxiresorufina o-dealquilasa

CYP citocromo P450

DNA ácido desoxiribonucleico

EGF Factor de Crecimiento Epidérmico

EROD etoxiresorufina o-dealquilasa

GABA ácido gama aminobutírico

HGF Factor de Crecimiento Hepatocitario

HP hepatectomía parcial

HPLC cromatografía líquida de alta presión

IFN Interferon

IL Interleuquina

IRF Factor Regulador asociado a Interferon

mRNA ácido ribonucleico mensajero

NAD(H) nicotinamida-adenina dinucleótido (forma reducida)

NADP(H) nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

NF- κ B Factor Nuclear *kappa* B

NO nifedipina oxidasa

ODC ornitina decarboxilasa

PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS buffer fosfato en solución salina

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfunilo

PROD pentoxiresorufina o-dealquilasa

PT putrescina

SDS dodecil sulfato de sodio

SH sham

STAT Factor Transductor de Señales y Activador de la Transcripción

TCA ácido tricloroacético

TGF Factor de Crecimiento Transformante

TNF Factor de Necrosis Tumoral

INDICE GENERAL 13

1. INTRODUCCION 12

1.0 REGENERACION HEPATICA Y MITOLOGIA GRIEGA

- 1.0.1 *El fuego de los dioses* 1
- 1.0.2 *El suplicio eterno* 1
- 1.0.3 *Mito y pensamiento científico* 2

1.1 REGENERACION HEPATICA

- 1.1.1 *Consideraciones generales. Modelo de hepatectomía parcial.*
 - Dinámica del proceso regenerativo* 2-4
- 1.1.2 *El hepatocito como célula diferenciada con capacidad de proliferación* 4-5
- 1.1.3 *Eventos tempranos en la regeneración* 5-6
- 1.1.4 *Factores de crecimiento* 6-9
- 1.1.5 *Comitógenos: norepinefrina e insulina* 9-11
- 1.1.6 *Poliaminas en los procesos proliferativos* 12-13
- 1.1.7 *Inhibición y finalización del proceso de regeneración* 14-15
- 1.1.8 *Citoquinas en el hígado regenerante. Interferon alfa* 15-18

1.2 FAMILIA DE ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P450

- 1.2.1 *Generalidades* 18-21
- 1.2.2 *Multifamilia P450. Nomenclatura* 21-22
- 1.2.3 *Localización subcelular* 22-23
- 1.2.4 *Reacciones de detoxificación* 23
- 1.2.5 *Regulación de la actividad y la expresión* 23-24
- 1.2.6 *Citocromo P450 3A4 (CYP3A4)* 25-26
- 1.2.7 *Citocromos P450 1A1, 1A2 y 2B1/2 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1/2)* 26-28

1.2.8	<i>Antecedentes e importancia del estudio de CYP en la regeneración</i>	28-29
1.2.9	<i>Acción de aminas sobre monooxigenasas microsomales</i>	29-30

2. OBJETIVOS

2.1	<i>Primera Parte: Contribución de las isoenzimas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 en la disminución de CYP total en el hígado regenerante. Hipótesis sobre las causas de esta inhibición</i>	31-32
2.2	<i>Segunda Parte: Efectos inhibitorios del IFNα en la regeneración hepática. Convalidación de la hipótesis</i>	33-34

3. METODOS

3.1 ANIMALES Y TRATAMIENTOS

3.1.1	<i>ANIMALES</i>	35
3.1.2	<i>ANIMALES REGENERANTES Y ANIMALES CONTROLES</i>	35-36
3.1.3	<i>TRATAMIENTO CON PUTRESCINA</i>	36-37
3.1.4	<i>TRATAMIENTO CON GABA</i>	38-39
3.1.5	<i>TRATAMIENTO CON IFNα-2b</i>	39-40
3.1.6	<i>OBTENCIÓN DE LOS HÍGADOS Y LOS REMANENTES DE HÍGADO A DISTINTOS TIEMPOS LUEGO DE LA CIRUGÍA</i>	40
3.2	PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	
3.2.1	<i>SÍNTESIS DE DNA</i>	40
3.2.1.1	<i>Incorporación de [3H] timidina al DNA</i>	40
3.2.1.1	<i>Concentración de DNA</i>	41
3.2.2	<i>OBTENCIÓN DE MICROSOMAS</i>	42
3.2.3	<i>CITOCROMO P450 TOTAL DURANTE LA REGENERACIÓN Y TRAS EL TRATAMIENTO CON PUTRESCINA EXÓGENA</i>	42-43
3.2.4	<i>ISOENZIMAS DE P450: CYP1A1, CYP2B1/2 Y CYP3A4</i>	

**DURANTE LA REGENERACIÓN Y TRAS EL TRATAMIENTO
CON PUTRESCINA EXÓGENA**

3.2.4.1 (i) Actividades o-dealquilasas	43-44
3.2.4.1 (ii) Inducción de o-dealquilasas: Tratamientos con 3-metilcolantreno y fenobarbital	44-45
3.2.4.2 Actividad nifedipina oxidasa	45
3.2.5 WESTERN BLOTTING DE ISOENZIMAS CYP1A1, CYP2B1/2 y CYP3A4	45-46
3.2.6 NIVELES DE PUTRESCINA HEPÁTICA	46-47
3.2.7 IFNα-2b Y VELOCIDAD DE SÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA	
3.2.7.1 Síntesis de proteínas totales	48-49
3.2.7.2 Síntesis proteica en la fracción microsomal	49
3.2.8 ACTIVIDAD NIFEDIPINA OXIDASA (NO) EN MICROSOMAS DE ANIMALES REGENERANTES TRATADOS CON IFNα-2b	50
3.2.9 IFNα-2b Y ORNITINA DECARBOXILASA (ODC)	
3.2.9.1 Detección de ODC en lisado hepático	50-51
3.2.9.2 Síntesis de ODC en hepatocitos aislados	51-53
3.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	53
 4. RESULTADOS	
4.1 Velocidad de síntesis de DNA	54
4.2 Disminución del contenido de CYP total	55
4.3 Isoenzimas en la regeneración y en el tratamiento con putrescina	56-58
4.4 Niveles de las proteínas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2	59-60
4.5 Seguimiento en el tiempo de NO y putrescina hepática	61-62
4.6 Síntesis de DNA en el tratamiento con IFNα-2b	63
4.7 Disminución de la síntesis de proteínas totales por IFN	63-64
4.8 Concentración de putrescina y proteína ODC total en lisado hepático	64-65

RB

4.9	<i>Disminución de la síntesis de ODC por IFN</i>	65-66
4.10	<i>Efecto del IFN sobre la síntesis de proteínas microsomales y la actividad nifedipina oxidasa microsomal durante la regeneración</i>	67-68
4.11	<i>Análisis comparativo entre niveles hepáticos de putrescina y actividad NO en todos los grupos experimentales a las 24 hs</i>	68-69
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES		
5.1	<i>CYP3A4, CYP1A1 Y CYP2B1/2 EN EL PROCESO REGENERATIVO</i>	
5.1.1	<i>Resumen de los hallazgos</i>	70
5.1.2	<i>Disminución de P450 durante la regeneración. Efecto de putrescina</i>	71-72
5.1.3	<i>Cambios selectivos en la isoforma CYP3A4</i>	72-74
5.1.4	<i>Implicancias de los hallazgos</i>	74-75
5.2	<i>EFFECTO INHIBIDOR DEL INTERFERON ALFA-2b EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA</i>	
5.2.1	<i>Resumen de los hallazgos</i>	76-77
5.2.2	<i>Disminución de putrescina y de la velocidad de síntesis de proteínas</i>	77-78
5.2.3	<i>Síntesis de proteínas microsomales</i>	78-79
5.2.4	<i>Nifedipina oxidasa e IFNα-2b</i>	79-81
5.2.5	<i>Efecto de IFNα-2b sobre ODC</i>	81
5.3	<i>CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS</i>	82-83
6. RESUMEN		84-88
BIBLIOGRAFIA		89-113
AGRADECIMIENTOS		114

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

*...Para mí nada es ni puede ser positivo.
Todas las cosas oscilan en torno a mí, y yo con ellas,
incierto de mí mismo. Todo es para mí incoherencia y
mutación. Todo es misterio, todo está preñado de significados.
Todas las cosas son desconocidas: símbolos de lo Desconocido...*
Fernando Pessoa

1.0 REGENERACION HEPATICA Y MITOLOGIA GRIEGA

Es en la mitología griega, sin duda, donde se da cuenta por primera vez de la capacidad regenerativa del hígado.

1.0.1 El Fuego de los Dioses

El titán *Prometeo* es encomendado para crear al hombre. Tentado por atribuirle el don más valioso entre los animales de la Tierra, se dirige a los Cielos y enciende una antorcha con un rayo de Sol, convencido de que con su robo dotaría a los hombres con el atributo más precioso, el Fuego.

1.0.2 El suplicio eterno

El Dios de los Cielos, *Zeus*, enfurecido por el acto de *Prometeo*, lo condena por el resto de los tiempos a vivir encadenado a una roca en el *Olimpo*. Un águila comerá todos los días el hígado de *Prometeo*, que durante la noche tendrá tiempo de recuperarse proveyendo al ave una y otra vez de alimento, eternamente.

1.0.3 Mito y pensamiento científico

Desde la Filosofía, se ha analizado extensamente la oposición Mito-Razón.

De alguna manera, para muchos, no hay tal antagonismo sino que más bien la narración mitológica está incorporada en el discurso racional.

Según el epistemólogo Ernst Cassirer, la narración mítica objetiviza una emoción atribuyéndole un carácter absoluto. Tal forma de "pensamiento mítico" es actualmente en Occidente desarrollada en la cultura científica y tecnológica.

1.1 REGENERACION HEPATICA

1.1.1 Consideraciones generales. Modelo de hepatectomía parcial. Dinámica del proceso regenerativo.

La regeneración hepática luego de la pérdida de tejido es una muestra de la respuesta del hígado ante la injuria. Se entiende ahora por este fenómeno a la respuesta orquestada inducida por estímulos externos que involucra cambios secuenciales tanto en la expresión génica y producción de factores de crecimiento como en la morfología.

El mejor modelo para estudiar el proceso de regeneración del hígado es el de la hepatectomía parcial en rata (1), consistente en la remoción quirúrgica de las 2/3 partes de la masa hepática de manera que los lóbulos remanentes aumentan su tamaño hasta restaurar la masa inicial en un proceso que se completa en 5-7 días. Comparado con otros estímulos de regeneración como el tratamiento con CCl_4 , la hepatectomía parcial no se asocia con la injuria e inflamación y el comienzo del proceso se puede definir

de manera exacta (es el momento en que se resectan los lóbulos correspondientes). Por otra parte se ha establecido que la respuesta regenerativa es proporcional a la masa removida.

En contraste con la regeneración en otros tejidos como piel y médula ósea, la regeneración del hígado no se produce a partir de un grupo de células progenitoras (2,3). La regeneración hepática se debe a la proliferación de toda la población existente de células maduras que incluye hepatocitos, células del epitelio biliar, células endoteliales, células de Kupffer y células de Ito. Todas estas células proliferan para reconstruir la masa perdida, siendo los hepatocitos los primeros en proliferar. Existe un intervalo de tiempo variable entre la hepatectomía y el comienzo de la duplicación del DNA que normalmente en la rata es de 10 a 12 h. Esta cinética varía también según la especie estudiada, pero en roedores ocurre un primer pico en la síntesis de DNA de los hepatocitos a las 24 h y un segundo pico mucho menor entre las 36 y las 48 h. Dado que se remueven las 2/3 partes del hígado, para restaurar el número de hepatocitos se requiere, en teoría, que los hepatocitos remanentes lleven a cabo 1.66 ciclos. En una rata joven el 95 % de los hepatocitos de los lóbulos remanentes lleva a cabo uno o dos eventos proliferativos (4).

La proliferación hepatocitaria comienza en las áreas periportales del lóbulo y prosigue hacia las zonas pericentrales hacia las 36 h (5). Las otras células del hígado comienzan su proliferación desfasadas 24 h de los hepatocitos y esta cinética sugiere que los hepatocitos proveen los estímulos mitogénicos que conducen a la proliferación de las demás células (6). Luego de 3-4 días tras la hepatectomía parcial, la histología hepática se caracteriza por acúmulos de pequeños hepatocitos rodeando capilares. Las células de Ito o estrelladas producen procesos que penetran en estos acúmulos de hepatocitos y comienzan a sintetizar laminina. Los acúmulos se

reestructuran formando las hileras características de la arquitectura del hígado maduro y los capilares centrales al acúmulo con su membrana basal se transforman en los sinusoides hepáticos rodeados de escasa matriz y constituidos por células endoteliales fenestradas intercaladas con células de Kupffer. La composición de la matriz también cambia perdiendo laminina hasta constituirse en la matriz escasa del hígado normal (fibronectina, colágenos I y IV y otros glicosaminoglicanos en baja cantidad). A la semana, la histología consiste en lóbulos que aumentaron su tamaño con los hepatocitos dispuestos en capas de dos hileras a diferencia de las capas de una sola hilera características del hígado normal.

1.1.2 El hepatocito como célula diferenciada con capacidad de proliferación

La capacidad clonogénica de los hepatocitos parece ser ilimitada. Se han desarrollado dos modelos en ratón donde los hígados tienen defectos inducidos que los hacen incompatibles con la vida. En el primero se producen cantidades elevadas de uroquinasa a través de un transgen con el promotor de la albúmina; en el otro se reproduce la tirosinemia hereditaria causada por un defecto de la fumarilacetoacetato hidrolasa (7). Si se inyecta un número determinado de hepatocitos normales en estos hígados, comienza un crecimiento clonogénico creando nódulos que restauran la masa hepática y la arquitectura del hígado (8). Un hepatocito maduro podría, entonces, expandirse en 34 divisiones celulares hasta $1.7 \cdot 10^{10}$ células y dado que un hígado de rata posee sólo $3 \cdot 10^8$ hepatocitos, el cálculo indica que un hepatocito tiene la capacidad clonogénica de generar 50 hígados. Estudios con cultivos celulares también revelan que los hepatocitos en presencia del Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF) o del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) se desdiferencian, proliferan y se expanden

de manera clonal y luego se rediferencian para originar hepatocitos maduros (9). Todo esto demuestra que los hepatocitos maduros son células que no están diferenciadas definitivamente sino que pueden proliferar casi sin límites. Este hecho es paradójico debido a la alta ploidía y complejidad de las funciones del hepatocito maduro.

Quizás lo más paradójico es que el hepatocito puede manifestar esta capacidad proliferativa desarrollando paralelamente todas las funciones necesarias para su homeostasis (regulación de la glicemia, síntesis de proteínas, secreción de bilis, detoxificación). Esta capacidad se debe a un complejo arreglo de eventos que involucran la regulación de la matriz, la disolución y resíntesis de dominios de la membrana especializados y alineamiento y disposición apropiada de más de 150 cromosomas (la mayoría de los hepatocitos en la rata y en el hombre son tetraploides) (10,11).

1.1.3 Eventos tempranos en la regeneración

Dentro de los eventos más tempranos que suceden en los primeros minutos luego de la hepatectomía parcial está la expresión del receptor de uroquinasa en la membrana del hepatocito (12). A los 30 min también se hiperpolariza la membrana (13). Por otro lado, dentro de las primeras horas se inducen una serie de genes denominados "genes inmediatos tempranos" que incluyen activadores transcripcionales, como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*, receptores de factores de crecimiento, proteínas fijadoras, tirosin fosfatasas, proteínas de la coagulación, etc (14). La activación transcripcional de estos genes no depende de la síntesis de proteínas, lo que indica que los factores transactivadores necesarios para la actividad promotora preexisten en la célula al momento de la hepatectomía. Existen algunos cambios previos a la activación de estos genes, como el aumento de IGFBP1, una proteína de

membrana que se une a los factores "insulin-like"; la activación de STAT3 (Factor Transductor de Señales y Activador de la Transcripción-3) y la activación del factor nuclear NF- κ B, complejo de las proteínas p50 y p65, que aumenta minutos después de la hepatectomía y se transloca rápidamente al núcleo al igual que STAT3 (15,16).

Se describió que muchos de los "genes inmediatos tempranos" contienen en sus secuencias promotoras sitios para NF- κ B y para STAT3. También aumenta rápidamente la actividad de la proteína activadora AP1 por el aumento previo de la expresión de c-Fos y c-Jun (17).

Hasta ahora, la activación de estos tres factores AP1, NF- κ B y STAT3 parece representar la cascada de señales intracelulares que conduce a la síntesis de DNA. En la expansión clonal de hepatocitos en cultivo son registrados cambios similares en los factores de transcripción.

En el hígado regenerante también se expresan genes fetales como el de la alfafetoproteína, hexoquinasa y otras variantes fetales de muchas enzimas (18). Otras proteínas asociadas al ciclo celular sufren cambios como en cualquier tipo de tejido en proliferación (timidina quinasa, histonas, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, etc) (19). Todos estos parámetros retornan a la normalidad de 5 a 7 días después de la hepatectomía parcial junto con el final de la proliferación y la restauración de la arquitectura del hígado.

1.1.4 Factores de crecimiento

El HGF fue identificado como un mitógeno circulante con actividad mitogénica en hepatocitos en cultivo. HGF y su receptor c-Met son claves para el crecimiento y funcionamiento hepático (20). Su delección se asocia a letalidad del embrión por detención del desarrollo del hígado (21). HGF aumenta en plasma de humanos cuando disminuye la masa hepática (22) y

RP

en rata 1 h después de la hepatectomía parcial la concentración de HGF en plasma aumenta 20 veces (23). Esto avala la hipótesis de que el aumento de este factor es el estímulo primario que conduce a los hepatocitos a la síntesis de DNA. De hecho, HGF induce la expresión de algunos "genes inmediatos tempranos" como LRF-1 y IGFBP1 y es un mitógeno potente en cultivo (24). Las causas del aumento plasmático de HGF no están completamente aclaradas. Si bien el hígado lo depura, la disminución de su clearance luego de la hepatectomía no es suficiente para explicar su gran aumento y por otro lado su expresión en tejido hepático (células de Ito) es bastante tardía como para explicar el aumento de 20 veces antes de 1 hora. El mRNA de HGF también aumenta durante la regeneración en tejidos extrahepáticos como el bazo y los pulmones (25) y en la inducción parecen estar involucradas las interleuquinas 1 (IL1) y 6 (IL6) (26). Si HGF fuera el estímulo principal para la proliferación de los hepatocitos, su administración exógena en ratas normales debería causar aumento de la síntesis de DNA lo que sólo ocurre en muy bajo número de hepatocitos periportales. Lo mismo sucede ante la administración de EGF y del Factor de Crecimiento Transformante- α , TGF α . Esto sugiere que los hepatocitos requieren un conjunto de eventos iniciadores para responder a estímulos mitogénicos ulteriores (27). Cuando la inyección de HGF es precedida por una de colagenasa, el efecto mitogénico es dramáticamente amplificado y la síntesis de DNA es inducida en más del 60% de las células, mientras que la colagenasa sola no tiene ningún efecto (28).

Existen evidencias *in vivo* e *in vitro* que indican que existe degradación de la matriz rápidamente luego de la hepatectomía parcial. La cascada proteolítica que involucra la conversión del plasminógeno en plasmina es comenzada por la uroquinasa. La actividad de esta última aumenta a los 5 min de la hepatectomía como resultado de la translocación del receptor de

uroquinasa a la membrana del hepatocito (29). La conversión del plasminógeno en plasmina y la proteólisis de componentes de la matriz como laminina, fibronectina y entactina se observa rápidamente. Las evidencias indican que existe HGF en grandes cantidades en la matriz principalmente alrededor de los espacios portaes y que la degradación de la matriz lo libera explicando el rápido aumento de HGF en plasma (30). Además se describió que la uroquinasa convierte la cadena de HGF simple, inactiva y unida a la matriz, en una doble cadena, libre de la matriz, activa y con capacidad de unirse a su receptor (31). La fosforilación de restos tirosina de c-Met se observa unas cuantas horas antes de la iniciación de la síntesis de DNA, lo que sugiere que HGF está involucrado en la señal mitogénica (32).

Tanto el Factor de Necrosis Tumoral- α , TNF α , como IL6 son importantes componentes en las vías de señalización tempranas que conducen a la iniciación de la regeneración. Algunos estudios muestran que la administración de anticuerpos contra TNF α luego de la hepatectomía parcial, disminuye la velocidad de síntesis de DNA e impide los aumentos de c-jun, su quinasa y la actividad nuclear de AP1 (33). Estos y otros resultados sugieren la participación de TNF α en la señalización temprana durante la regeneración. En ratones con deficiencias de su receptor disminuye la síntesis de DNA luego de la hepatectomía y no tienen lugar los aumentos esperados de NF- κ B y de STAT3. Estos defectos se corrigen con la administración de IL6, lo que sugiere que el rol de TNF α es regular la secreción de IL6 (34). IL6 es secretada por las células de Kupffer y esta secreción es estimulada por TNF α . El pico de IL6 tiene lugar 24 h luego de la hepatectomía parcial (35). Sus efectos sobre el hepatocito son contradictorios, se la describió como mitógeno (36) y como antimitógeno (37). En el hígado regenerante, la supresión del gen de IL6, suprime la

síntesis de DNA, disminuye la activación de STAT3, AP1, Myc y ciclina D1. Estos cambios se corrigen con la administración de IL6 (38). Si EGF, que también activa a STAT3, compensara la deficiencia frente a la falta de IL6, la regeneración podría cursar normalmente. Contrariamente, los resultados indican que IL6 es irremplazable por otras citoquinas. Estos resultados indican que existe un requerimiento de IL6 y $TNF\alpha$ en el proceso regenerativo pero no aclaran si el rol es facultativo. Es decir, si se requiere la presencia de la citoquina para que tenga lugar la regeneración, o si posee un rol iniciador que comienza nuevas señales que conducen a la mitogénesis.

EGF y $TGF\alpha$ son mitógenos primarios del hepatocito en cultivo que comparten el mismo receptor. En ratas donde se extirparon las glándulas salivales que producen EGF, se reduce notoriamente la respuesta regenerativa (39). EGF es también continuamente suministrado al hígado regenerante por las glándulas de Brunner duodenales. Tras la hepatectomía tiene lugar la rápida fosforilación de la tirosina y la regulación negativa de su receptor lo que sugiere que EGF tiene un rol mitogénico temprano (40).

$TGF\alpha$ parece actuar todavía más tempranamente. Su mRNA aumenta en hepatocitos 2-3 h luego de la hepatectomía alcanzando un pico de expresión entre las 12 y las 24 h y permaneciendo elevado más allá de las 48 h. Sin embargo, en ratones con delección del gen de $TGF\alpha$, la regeneración procede normalmente (41). Esto se debe a un efecto compensatorio de otros ligandos del receptor de EGF. A pesar del aumento marcado en el mRNA, la proteína $TGF\alpha$ sólo aumenta dos veces en el hígado regenerante (42).

1.1.5 Comitógenos: norepinefrina e insulina

En hepatocitos en cultivo la norepinefrina amplifica las señales mitogénicas de EGF y de HGF por acción sobre el receptor adrenérgico $\alpha 1$ (43). Por otro lado, si se bloquean los receptores adrenérgicos disminuye la

síntesis de DNA 24 h luego de la hepatectomía. Se reportó que la norepinefrina aumenta en el plasma en la primera hora luego de la hepatectomía parcial e induce la secreción de EGF por las glándulas de Brunner duodenales (44). También impide el efecto inhibitor de TGF β 1 en cultivo de hepatocitos aislados de animales regenerantes (45).

La insulina, por su parte, tiene efectos tróficos sobre el hígado normal aunque no tiene efectos mitogénicos sobre hepatocitos (46). En cultivo, los hepatocitos en presencia de otros factores de crecimiento aumentan su proliferación con el agregado de insulina en el medio, aunque la insulina no es un mitógeno primario para los hepatocitos. Al igual que IL6, la vía de señalización iniciada por la insulina y su receptor parece ser necesaria para que la señal mitogénica proceda normalmente.

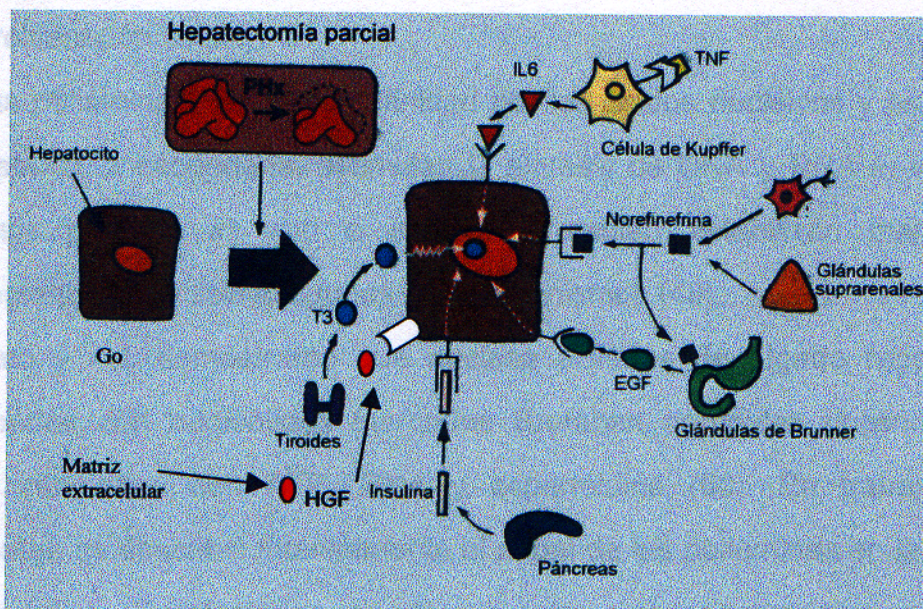
Hasta aquí, se planteó el escenario de factores involucrados en la regeneración hepática. Hay mucha evidencia que sugiere que todos ellos contribuyen de alguna manera a la transición de los hepatocitos de G₀ a G₁ y S en el ciclo celular. En este sentido, HGF es el único capaz de generar una señal mitogénica completa en hepatocitos en cultivo en ausencia de otras citoquinas.

El aumento de HGF en plasma de animales regenerantes hace también razonable la hipótesis de que sea el principal disparador del proceso regenerativo, aunque existe una redundancia de las señales iniciadoras tempranas.

El cambio inicial más importante inducido por la hepatectomía parcial es el aumento del flujo sanguíneo por unidad de masa hepática. En este sentido, la activación de los factores transcripcionales como NF- κ B se debería a cambios conformacionales originados por oxidación. Luego de la hepatectomía existiría un rápido aumento de radicales libres por alteraciones

en los flujos iónicos, exceso de nutrientes y desequilibrios rédox que tienen lugar como consecuencia de los cambios hemodinámicos y metabólicos tras la cirugía (14). De cualquier manera, no está claro como estos cambios eventualmente disparan eventos tan rápidos como el aumento en la actividad uroquinasa a los 5 min o la activación de factores de transcripción dentro de los primeros 30 min y la inducción de "genes inmediatos tempranos".

Figura 1.1.1. Factores de crecimiento y comitógenos en la iniciación de la regeneración hepática



B

1.1.6 Poliaminas en los procesos proliferativos

Trabajos preliminares de los años 70', demostraron el aumento de la actividad DNA polimerasa purificada de hígado normal y de hígado regenerante *in vitro* por el agregado de espermidina en el medio de reacción (47). Otros estudios mostraron el efecto de las poliaminas en la transcripción al estimular las actividades de las RNA polimerasas I y II (48).

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, son cationes alifáticos ubicuos. Su concentración y las actividades de las enzimas que las sintetizan aumentan en tejidos en crecimiento y este aumento precede o es simultáneo al aumento de los niveles de ácidos nucleicos y proteínas en ese tejido. La ornitina decarboxilasa (ODC) es la primera enzima en la biosíntesis de las poliaminas y la limitante en la cinética. Tiene un recambio elevado y sus niveles aumentan rápidamente luego de una gran variedad de estímulos de proliferación celular.

Las poliaminas tienen alta afinidad por los ácidos nucleicos y estabilizan su estructura secundaria, estimulan la síntesis de DNA y RNA *in vitro* y la síntesis proteica *in vivo* e *in vitro*. También estabilizan membranas protegiendo de la lisis a algunos microorganismos (49).

Sato y col. demostraron que núcleos aislados de hígado regenerante incubados con nucleótidos marcados liberaban partículas ribosomales si eran incubados con ATP, RNA y espermidina (50). En trabajos más recientes se describió intensamente el papel de las poliaminas en la síntesis de proteínas. En efecto, se reportó que putrescina y espermidina estabilizan extractos crudos de tRNA metil transferasas (51) y activan proteinquinasas implicadas en la regulación de RNA polimerasas (52). En cultivo de células de hepatoma se observó que al inhibir la síntesis de poliaminas disminuye concomitantemente el número de ribosomas en los poliribosomas y se perturba la síntesis proteica antes que la síntesis de DNA (53). Algo similar

ocurre en la iniciación de la síntesis proteica en cultivo de linfocitos expuestos a mitógenos (54).

Es un hecho conocido que tras una hepatectomía parcial, el tratamiento de los animales con inhibidores de la síntesis de poliaminas inhibe la síntesis de DNA (55,56). También, se registra un aumento de poliaminas en humanos con resección hepática entre las dos y las cuatro semanas de la resección (57).

Por su parte, en estudios en cultivo primario de hepatocitos se corroboró la correlación existente entre la actividad ornitina decarboxilasa y la iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (58). Trabajos posteriores ratificaron la participación esencial de las poliaminas en la síntesis de macromoléculas durante el proceso regenerativo, describiéndose un máximo de los niveles de putrescina en tejido hepático hacia las 18-22 h de la hepatectomía que garantiza los aumentos en las velocidades de síntesis de DNA y proteínas a las 24 h (59-61).

Recientemente, se han explorado más intensamente algunos de los mecanismos moleculares que explican el papel de las poliaminas en la regulación del crecimiento. La depleción de poliaminas en células intestinales aumenta la actividad de la proteína activadora AP1 (62). Otra proteína reguladora del ciclo celular como c-Myc transactiva el gen *odc* (63). En células de epitelio intestinal la depleción de poliaminas se asocia al aumento de la expresión del gen *p53*, lo que conduce a un arresto de las células en la fase G1 (64). Asimismo, se reportó la participación de estos cationes biológicos en la regulación de la apoptosis en células CHO y en células del sistema inmune (65,66).

1.1.7 Inhibición y finalización del proceso de regeneración

La síntesis de DNA prácticamente se completa en 72 h luego de la hepatectomía parcial, los cambios histológicos, en cambio, continúan por varios días. El Factor de Crecimiento Transformante- β 1 (TGF β 1) es un muy estudiado inhibidor de la proliferación de hepatocitos en cultivo (67). Es el más abundante de las tres isoformas de TGF β que a su vez poseen homología con otros péptidos inhibidores denominados activinas, por lo que se cree que en realidad todos ellos conforman una gran familia de mito-inhibidores. TGF β 1 es normalmente sintetizado por las células de Ito y está también asociado con la síntesis de la matriz del hígado. Va desapareciendo desde la región periportal a la perivenosa y esta pérdida gradual es seguida por una ola de hepatocitos en mitosis, lo que sugiere que la pérdida de TGF β 1 del medio es requerida para que se complete el ciclo celular. Aumenta muy rápidamente tras la hepatectomía con la misma cinética que HGF (68). Esto también podría deberse a la liberación de TGF β 1 de la matriz. En hígado, su mRNA aumenta a las 3-4 h luego de la hepatectomía alcanzando un máximo a las 48-72 h (69). La finalización de la síntesis de DNA en este período, es atribuible al efecto mito-inhibitorio de TGF β 1. La infusión de TGF β 1 en animales regenerantes suprime el pico de síntesis de DNA a las 24 h. Por otro lado, los hepatocitos aislados de animales regenerantes entre las 12 y las 48 h luego de la hepatectomía son resistentes a los efectos mito-inhibitorios del TGF β 1 en cultivo (70). Los receptores a esta citoquina también disminuyen durante ese intervalo de tiempo (71). La sensibilidad a TGF β 1 recién retorna después de las 96 h, sin embargo la proliferación finaliza entre las 48 y las 72 horas, período en el cual los hepatocitos todavía son algo resistentes al TGF β 1. La Norepinefrina disminuye la sensibilidad a TGF β 1 entre las 12 y las 48 h (72). Los hepatocitos prosiguen con la proliferación aún cuando TGF β 1 esté en

aumento. Por otro lado, en ratones transgénicos con sobreexpresión de TGF β 1, la regeneración hepática luego de una hepatectomía parcial cursa hasta su totalidad (73). Esto hace pensar que TGF β 1 por sí solo no es suficiente para actuar como señal de terminación de este proceso. Otras señales de metabolitos, factores de crecimiento, citoquinas o la restauración de la propia matriz, pueden conducir, en conjunto, hacia la terminación de la regeneración. TGF β 1 además de su efecto mito-inhibitorio es mitógeno y moto-estimulador en hepatocitos normales (74). También está involucrado en la regulación de la síntesis de la nueva matriz en el hígado regenerante. Por todo esto, su papel en la regeneración parece ser más amplio y no se ha aclarado en forma definitiva.

1.1.8 Citoquinas en el hígado regenerante. Interferon alfa

Muchas citoquinas tienen efecto sobre distintas actividades del metabolismo hepático. Por ejemplo, IL1, IL6 y TNF α poseen acciones similares sobre la síntesis de macromoléculas, concretamente en lo que se refiere a la expresión de las denominadas proteínas de fase aguda en las respuestas inflamatorias. En otro aspecto, también se ha descrito la disminución de los sistemas de detoxificación hepática de fase I por IL1, IL6, TNF α , TGF α/β e IFN $\gamma/\alpha/\beta$ (75).

En lo que se refiere a la regulación de la regeneración hepática y las citoquinas no parenquimáticas, es decir no producidas por el hepatocito durante este proceso, el análisis de la participación de algunas de ellas es siempre tema de investigación. De hecho, y como hemos visto, el rol de TNF α en la iniciación de la regeneración, así como el efecto inhibitorio de TGF β y de la familia de las activinas en la terminación de este proceso, continúan sin una aclaración definitiva (14,76).

Nuestro interés se centró en el estudio de algunos efectos inhibitorios que se esperaban para los interferones alfa ($\text{IFN}\alpha$) sobre el proceso de regeneración que sigue a una hepatectomía parcial.

Los interferones alfa pertenecen a la familia de interferones de tipo I, que incluye más de veinte glicoproteínas identificadas hasta el momento y que son producidas principalmente por linfocitos y monocitos. Los $\text{IFN}\alpha$ son reconocidos y utilizados terapéuticamente por sus propiedades antivirales e inmunomoduladoras, pero también se conoce su capacidad antiproliferativa (77).

Muchas de estas acciones del $\text{IFN}\alpha$, si no todas, son mediadas por la interacción con su receptor de membrana ($\text{IFN}\alpha\text{-R}$) y las tirosina-quinazas asociadas a éste, con las proteínas STAT. Éstas últimas, una vez activadas, se complejan formando multímeros que se translocan al núcleo donde ejercen su acción como transactivadores de genes específicos, uniéndose a regiones regulatorias de genes inducibles por citoquinas (78,79). Se sabe que en el hígado regenerante existe una compleja superposición de muchos de los blancos de esta cascada entre citoquinas proinflamatorias y mitógenos del hepatocito como el mismo EGF (76).

Se han descrito una serie de efectos inhibitorios del $\text{IFN}\alpha$ en la regeneración del hígado que no han sido completamente aclarados. En un trabajo preliminar con IFN de tipo I (alfa + beta), Nishiguchi y col. demostraron que el tratamiento de ratones parcialmente hepatectomizados con esta mezcla de interferones disminuía la actividad hepática de la ornitina decarboxilasa (ODC) (80). Como se mencionó antes, la ODC es la enzima que limita la síntesis de poliaminas durante la regeneración hepática. Otros estudios posteriores en roedores con distintas subclases de $\text{IFN}\alpha$, también reportan la inhibición de ODC (81,82).

AP

Como se comentara anteriormente, durante el proceso de regeneración hepática que sigue a una hepatectomía parcial del 65% en la rata, los hepatocitos ingresan rápidamente en la fase G1 del ciclo celular luego de la inducción de una serie de genes específicos para progresar hacia la fase S del ciclo hacia las 24 h (83). En este sentido, el gen *odc* es un gen activado tempranamente (84) que junto con otros como *c-fos* y *c-myc* permite la progresión hacia la fase de duplicación. La expresión de la enzima ODC es regulada a diferentes niveles (85-87) y su velocidad de síntesis, entonces, resulta de un balance entre la actividad transcripcional del gen *odc*, la estabilidad de su mRNA, así como la eficiencia de su traducción. Por esto, el estudio de la posible modificación de la expresión de ODC por el tratamiento con IFN α durante la regeneración resulta necesario para explicar los efectos descritos acerca de la disminución de su actividad.

Previamente, se mencionó que la putrescina tiene un rol esencial en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en el proceso de regeneración hepática (59,60). Se ha descrito que IFN α reduce la síntesis de DNA luego de una hepatectomía parcial por medio de la disminución de los niveles de putrescina (80,81,88). Se sugirió que tal disminución depende de la dosis y del subtipo de interferon alfa (81).

Además de la disminución de los niveles de putrescina por IFN α durante la regeneración hepática, hecho que podría afectar la velocidad de síntesis proteica, se conocen otros efectos de los IFN en general que afectan la síntesis de macromoléculas. Por ejemplo, está bien documentada la inhibición por IFN de la iniciación de la síntesis de proteínas (89).

Finalmente, otro efecto inhibitorio en el hígado descrito para los IFN α , es la supresión de algunas actividades de isoenzimas inducibles de citocromo P450 (90,91). CYP3A4, la principal isoforma de la familia de P450 en hígado adulto humano, metabolizadora de una gran variedad de

fármacos, como será desarrollado en otra parte de este capítulo, no ha sido estudiada a este respecto.

1.2 FAMILIA DE ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P450.

1.2.1 Generalidades

El sistema enzimático P450 fue descubierto a fines de los años 40' al estudiarse un tipo inusual de reacciones de oxidación que involucraban un átomo de O (monoxigenación). En esta reacción un O se combina con dos H donados por dos moléculas de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) para formar H₂O y el segundo átomo de O de la molécula de O₂ se incorpora al sustrato.



Esta reacción de "oxidación de función mixta", parecía ser importante en el metabolismo de una gran variedad de químicos de diversas estructuras y funciones. Las mismas tenían lugar en preparaciones hepáticas y de algunos otros tejidos. En el caso del hígado, el sistema está muy desarrollado, lo que indica que el hepatocito juega un rol crucial en el metabolismo de sustancias endógenas y exógenas (92).

El primer paso en la identificación de los componentes microsomales que participaban en estas reacciones llegó con el descubrimiento de una proteína inusual portadora del grupo *hemo* que cuando se fijaba a una molécula de CO producía un espectro de absorbancia con un pico característico a 450nm. Este pigmento se identificó como un componente terminal de una cadena de transporte de electrones que catalizaba la oxidación de distintos sustratos (93).

Al estudiar esta cadena de transporte de electrones en la *Pseudomona putida*, bacteria capaz de desarrollarse con canfor como única fuente de carbono, se observó que la misma comienza con la forma reducida de la nicotinamida-adenina dinucleótido, sigue con una flavoproteína seguida de la putidaredoxina y finalmente el citocromo P450. En contraste, la cadena en mamíferos, estudiada por primera vez en microsomas de conejo, mostró la existencia de un flujo de electrones desde NADPH a una flavoproteína y luego al P450.

Cada especie posee un gran número de formas enzimáticas de P450 distintas, por lo que existen formas especie-específicas y aún tejido-específicas. Cada forma oxida preferencialmente ciertos sustratos y esta especificidad contribuye a la destoxicación o bioactivación de drogas por diferentes isoformas. La reacción catalítica involucra básicamente la pérdida de electrones o átomos de H del sustrato en cuestión seguida de la unión de O (Figura 1.2.1) (94). Así, la diversidad de reacciones oxidativas catalizadas por el citocromo P450 pueden clasificarse según Guengerich y col. (94) en:

- a) hidroxilación de un átomo de C
- b) liberación de un heteroátomo (dealquilación)
- c) oxigenación de un heteroátomo
- d) epoxidación
- e) migración de grupo oxidativo
- f) inactivación suicida por olefinas

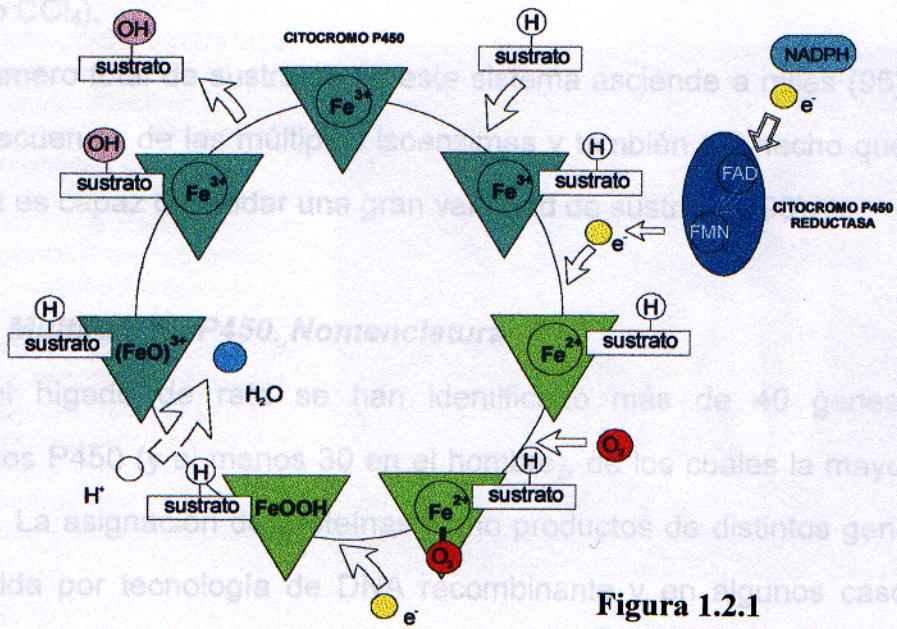
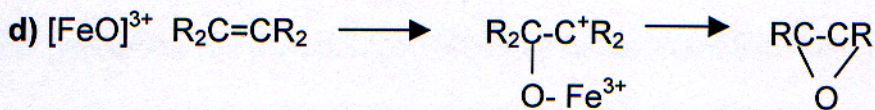
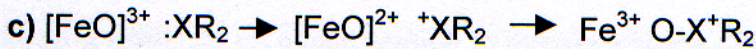
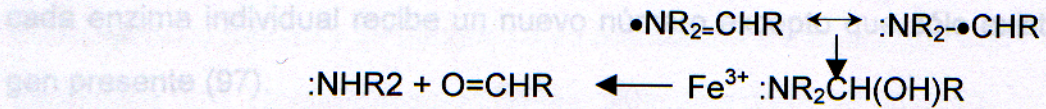
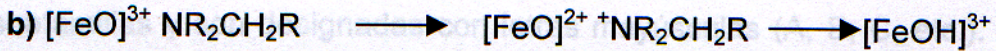
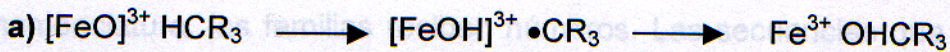


Figura 1.2.1
Reacción general de oxidación.



CP

También, aunque poco frecuentemente, puede reducirse al sustrato (ejemplo CCl_4).

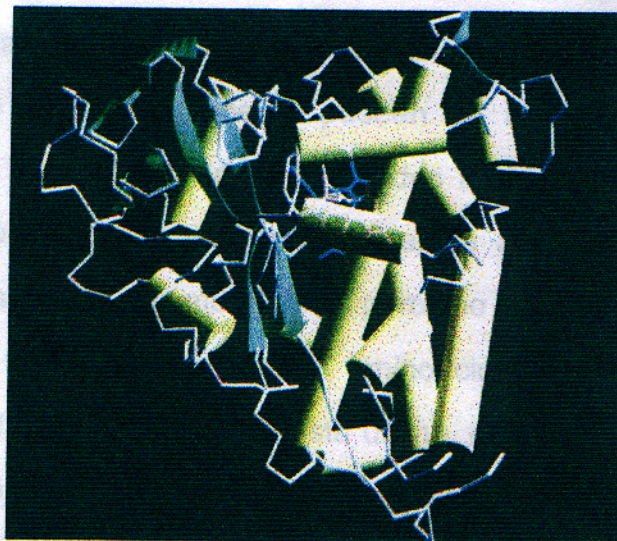
El número total de sustratos de este sistema asciende a miles (95). Esto es consecuencia de las múltiples isoenzimas y también del hecho que cada isoforma es capaz de oxidar una gran variedad de sustratos (96).

1.2.2 Multifamilia P450. Nomenclatura

En el hígado de rata se han identificado más de 40 genes para citocromos P450 (y al menos 30 en el hombre), de los cuales la mayoría se expresa. La asignación de proteínas como productos de distintos genes fue establecida por tecnología de DNA recombinante y en algunos casos por secuenciación de las proteínas directamente. Por construcción de sondas de DNA complementarias a partir de los mRNAs estos genes, se los agrupa en familias que poseen al menos un 40% de identidad. De acuerdo a esta nomenclatura, las familias reciben números. Las secuencias que dentro de cada familia muestran al menos un 60% de homología constituyen las subfamilias y son designadas con letras mayúsculas (A, B, C, etc.). Luego, cada enzima individual recibe un nuevo número excepto que sólo exista un gen presente (97).

Figura 1.2.2 Estructura tridimensional de un citocromo P450 bacteriano.

En la figura se esquematiza la estructura tridimensional de una isoforma bacteriana de citocromo P450 denominada CYP 101 o CYPcam purificado de *Pseudomonas putida*. En ella se pueden observar los componentes que le permiten oxidar al sustrato: dos sitios de unión, uno a una molécula de O₂ en el grupo hemo y el otro, por encima del hemo, para unir al sustrato (en anillos azules y rosados). La estructura secundaria muestra la existencia de 12 hélices alfa (cilindros amarillos) y 10 láminas plegadas beta (cintas verdes).



1.2.3 Localización subcelular

En las células de mamíferos hay dos clases de citocromo P450, microsomal y mitocondrial. Ambos están estrechamente asociados a las membranas. Esta unión parece ser esencial para su función. Las isoformas de P450 son sintetizadas por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso y se integran a su membrana a medida que son traducidas (98). La conformación de las moléculas de P450 unidas a membrana, esencial para la inserción correcta del grupo prostético *hemo*, se logra a partir de su integración y la misma parece depender de la porción amino terminal de unión a la membrana. Al comparar la estructura primaria de porciones N-t de distintos P450s se hallaron motivos altamente conservados: un aminoácido cargado negativamente en el N-t, una serie de aminoácidos hidrofóbicos, luego varios aminoácidos cargados positivamente y finalmente una región rica en prolina. La región hidrofóbica es reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal y funciona como una señal de destinación de los péptidos de P450 a la membrana. El aminoácido cargado

negativamente es importante en la determinación de la función de la secuencia de la señal de anclaje. Mientras que la secuencia señal de las proteínas secretorias (S) y la secuencia de la señal de anclaje de las proteínas de membrana tipo II que usualmente poseen un aminoácido positivo en el N-t, inducen la translocación de los péptidos a través de la membrana del retículo endoplásmico, la secuencia señal de anclaje tipo P450 se inserta por sí misma en la membrana pero no permite la translocación del péptido. El reemplazo del aminoácido cargado negativamente por otro cargado positivamente en esta última, convierte a la secuencia de la señal de anclaje en una del tipo de las proteínas secretorias (S) (99).

1.2.4 Reacciones de detoxificación

Las oxidaciones catalizadas por P450 pueden resultar en la detoxificación de un tóxico potencial o en su bioactivación. En general las reducciones siempre aumentan la reactividad de los productos. Las oxidaciones por parte de otras enzimas microsomales (flavin-monooxigenasas, como la alcohol y la aldehído deshidrogenasas) también pueden generar productos más activos o menos tóxicos. En general, las reacciones de oxido-reducción en el metabolismo clásico de drogas constituyen lo que se denomina **fase I** y las reacciones de conjugación, que usualmente suceden a las de oxido-reducción, constituyen la **fase II**. La mayoría de estas últimas conducen a la detoxificación de químicos (100).

1.2.5 Regulación de la actividad y la expresión

La actividad catalítica de las isoenzimas de la familia P450 puede ser influida a distintos niveles. El aporte del cofactor puede ser importante. Los niveles de NADPH pueden alterarse por ayuno y por gradientes de O₂ en el

hígado. El *hemo* es necesario como grupo prostético y su déficit disminuye la actividad, sin embargo no es muy claro su papel en la regulación de los genes de P450 (101,102). Finalmente, la NADPH-citocromo P450 reductasa, que está presente en un orden de magnitud por debajo del mismo P450, también se requiere para la actividad. La composición lipídica no parece influir en la actividad de las distintas isoformas (103) excepto para la subfamilia 3A (104,105). Sin embargo, la evidencia experimental indica que la forma más común de modular las actividades específicas de estas isoenzimas es a través de cambios en las cantidades individuales de ellas (106,107). Estos cambios involucran la síntesis *de novo*, en general por aumento de la velocidad de transcripción. La lista de inductores es así casi tan larga como la de sustratos y generalmente la inducción es de varias isoformas a la vez. En muchos casos también se da que algunas son disminuidas mientras otras se inducen (108,109). Muchas de las isoformas en roedores están reguladas por hormonas esteroideas (110,111).

En general, la vida media de las distintas isoenzimas es similar y cercana a las 24 horas, sin embargo, se sabe que algunos inductores, muchos de los cuales interaccionan con receptores intracelulares, también modulan la estabilidad de los mRNAs.

Otro aspecto de la regulación es el polimorfismo. Casi todas las actividades catalíticas de los CYPs son afectadas por algún factor ambiental, en cambio, el polimorfismo genético es muy poco afectado por otros factores. Su origen puede ser la modificación en genes estructurales o en las proteínas que regulan su expresión. En el hombre, esto se ha identificado sobre todo en el metabolismo de ciertas drogas y en algunos casos se puede establecer correlación entre el fenotipo expresado y la susceptibilidad a algunos carcinógenos (112).

1.2.6 Citocromo P450 3A4 (CYP3A4)

La subfamilia 3A de este sistema está constituida principalmente por la isoenzima 4 (113). CYP3A4 es la isoforma más abundante, representando casi un 50% del citocromo P450 hepático total en el hombre (114). Además de su importancia en el metabolismo de esteroides endógenos, existe una gran lista de fármacos metabolizados por CYP3A4 dentro de los que se incluyen corticoesteroides, antibióticos macrólidos, cimetidina, nifedipina, warfarina, acetaminofeno e inmunosupresores como la ciclosporina y el FK-506 (115-118).

En el feto estas actividades están concentradas en otra isoforma de la subfamilia 3A, CYP3A7, que es la más abundante en el hígado fetal. Al nacimiento, ésta comienza a decrecer mientras aumenta progresivamente la expresión de CYP3A4. A pesar de que CYP3A4 y CYP3A7 están estructuralmente relacionadas, difieren en su capacidad de realizar las reacciones de mono-oxigenación (119).

Se ha descrito la inducción de CYP3A4 por rifampicina y barbituratos (120,121). Es conocida también la inducción de la actividad CYP3A4 causada por dexametasona en hepatocitos (122).

En cuanto a su disminución, se ha descrito la inhibición de CYP3A4 por flavonoides presentes en las frutas (123). Con respecto a la regulación negativa por hormonas y citoquinas, ha sido reportada la disminución del metabolismo de drogas dependiente de CYP3A4 y los niveles de su mRNA en hepatocitos humanos tratados con triiodotironina (T3) (124), interleuquina 6 (IL6) y otras citoquinas que se fijan al receptor de IL6 como oncostatina, así como interferon gama (125). Así mismo, se describió que el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) disminuye la actividad CYP3A4 y reduce su inducción por rifampicina (126).

Algunos resultados en cultivo de hepatocitos en distintos estadios muestran que en ausencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) disminuye la acumulación de los mRNAs de CYP3A4 y CYP1A2 en respuesta a sus respectivos inductores (rifampicina y dioxina) en cultivos subconfluentes respecto a confluentes. La presencia de EGF (proliferación) sólo disminuye levemente la acumulación de ambos citocromos en cultivos confluentes y subconfluentes. En cambio, el citocromo fetal CYP3A7, no se expresa ni en cultivo confluyente ni en subconfluyente independientemente de la presencia de EGF, lo que indica que no se produce un cambio hacia el fenotipo fetal durante la proliferación (127).

Estudios preliminares a nivel del mRNA de CYP3A4 en hepatocitos humanos revelan la existencia de una segunda señal de poliadenilación lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación de la expresión pre-traducciona (128).

1.2.7 Citocromos P450 1A1, 1A2 y 2B1/2 (CYP1A1, CYP1A2 Y CYP2B1/2)

La mayoría de las isoformas de P450 involucradas en el metabolismo de xenobióticos son inducibles. En muchos casos los inductores son sustratos. Por lo tanto las actividades de estas isoenzimas permanecen elevadas cuando es necesario. En general, la inducción aumenta la capacidad de detoxificación y en la mayoría de los casos es un mecanismo de protección. Entre los inductores están los hidrocarburos aromáticos policíclicos, barbitúricos, bifenilos policlorinados, etc. Sin embargo, muchas sustancias son modificadas por la actividad P450 volviéndose más electrofílicas, lo que permite, en algunos casos, que puedan interaccionar covalentemente con el DNA para producir mutaciones. CYP1A2, por ejemplo, está involucrada en la acción carcinogénica de las comidas asadas y el humo del cigarrillo. Algunas

aminas heterocíclicas producidas con la combustión no son carcinógenas *per se* pero son bioactivadas por esta isoenzima (129).

Los efectos de la dieta en la actividad de algunas isoenzimas de P450 fueron descritos por primera vez hace casi 30 años al demostrarse la inducción de la actividad benzopireno hidroxilasa (130). Posteriormente, esto se aclaró al comprobarse que los indoles de la dieta aumentaban las actividades benzopireno hidroxilasa y etoxiresorufina *o*-dealquilasa debido a la inducción de CYP1A1 intestinal y CYP1A1 y CYP1A2 hepáticas (131).

En los 80', se purificaron dos formas de citocromo P450 a partir de microsomas de animales tratados con fenobarbital ó 3-metilcolantreno lo que dividía a las formas inducibles de P450 en dos grandes grupos (132).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el metilcolantreno y el benzopireno son inductores prototípicos de CYP1A1 y CYP1A2 y en menor medida de CYP1B1. A esta familia de inductores también pertenece el contaminante ambiental tetraclorodibenzo *p*-dioxina (TCDD), el inductor más poderoso de CYP1A1. Poland y col. mostraron que en hígado de ratón existía una proteína que se unía a TCDD en forma saturable y con alta afinidad con las características de un receptor. Esta proteína fue designada como receptor Ah, AhR, por unirse a los hidrocarburos aromáticos (133). Para que el AhR adquiera capacidad de unión al DNA debe heterodimerizar con la proteína Arnt (traslocador nuclear del receptor AhR). Esta proteína no se une a TCDD ni a DNA en ausencia de AhR. Se comprobó la existencia de secuencias activadoras y secuencias promotoras transcripcionales arriba del gen de CYP1A1, dependientes de la unión del heterodímero AhR/Arnt. La secuencia reconocida por el heterodímero es denominada "elemento de respuesta a xenobióticos" (134). Estudios en células intactas revelaron que el "enhancer" es inaccesible a las proteínas de unión *in vivo* (la cromatina en

esta región adquiriría la conformación de un nucleosoma), pero la presencia de TCDD conduce a la ocupación de múltiples sitios para AhR/Arnt (135).

El fenobarbital, por su parte, induce varias formas de citocromo P450. En la rata, el tratamiento con este barbitúrico aumenta rápidamente la velocidad de transcripción de los genes CYP2B1/2 por una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (136). En bacterias se halló una región regulatoria arriba del gen de un citocromo inducible por barbituratos que contenía un elemento que se denominó Barbie Box. Estas secuencias también se identificaron en CYP2B1/2 de rata (137,138). También se identificó una región sensible a fenobarbital por encima de los genes CYP2B1 y CYP2B2 en hepatocitos humanos (139). Esta respuesta a fenobarbital era también influida por glucocorticoides, sugiriendo que el fenobarbital podía actuar indirectamente causando una acumulación de un esteroide endógeno (139).

1.2.8 Antecedentes e importancia del estudio de CYP en la regeneración

Como ya hemos desarrollado en la primer parte de este capítulo, la hepatectomía parcial es ampliamente usada en la investigación básica como un modelo de regeneración hepática. A este respecto, se ha mencionado la notoria capacidad del hígado para regenerar en respuesta a daños de distintas naturaleza (infección, injuria tóxica ó trauma). Luego de la hepatectomía parcial, la regeneración tiene lugar en ausencia de muerte celular, inflamación o fibrosis, aunque clínicamente la regeneración se da en falla hepática aguda y en enfermedades crónicas del hígado en condiciones que producen alteraciones importantes del tejido (83). El estudio del proceso de regeneración cobró también interés con la difusión del trasplante de

hígado, ya que existe regeneración tanto en el receptor como en el donante vivo (140,141).

Resulta muy interesante analizar las variaciones y los mecanismos de regulación de las isoenzimas de CYP durante la regeneración del hígado en virtud de establecer estrategias farmacológicas para pacientes que cursan regeneración y son medicados, como en el caso del manejo terapéutico en el post-transplante, cirrosis, resección de hepatocarcinoma, etc.

El primer indicio de la disminución de enzimas de la Fase I durante la regeneración fue descrito en 1960, demostrándose la disminución de P450 total tras la hepatectomía parcial en ratas (142). Luego hubo distintos estudios que se encargaron de aclarar que tras la hepatectomía existía una reducción del 50 % del CYP total atribuida a la disminución selectiva de algunas isoformas, sin establecer hasta el momento las causas de estos cambios y sugiriéndose la participación de factores de crecimiento u otros mediadores del proceso regenerativo (143-145).

1.2.9 Acción de aminas sobre monooxigenasas microsomales

Desde hace más de una década se conocen los efectos inhibitorios de la histamina (146) y de análogos estructurales como los antihistamínicos sobre monooxigenasas microsomales, específicamente sobre isoenzimas constitutivas como las de la familia 3A (147,148).

Más recientemente, se han sumado a las aminas con efecto inhibitorio sobre CYP, los antidepresivos tricíclicos (149,150).

Existen evidencias del efecto inhibitorio de aminas citotóxicas como la cisplastina sobre el P450 testicular, que inhibe la expresión de isoenzimas esteroideogénicas (151).

Por otra parte, se han asociado algunos efectos moduladores del crecimiento que posee la histamina con su capacidad de unión a sitios

intracelulares en retículo endoplasmático y núcleo de distintos tejidos. En tal sentido, se comprobó que tanto la histamina como las poliaminas se unen a isoformas de P450 microsomal con distinta afinidad, lo que puede representar una manera indirecta de regular la función génica modulando isoenzimas de P450 que controlan los niveles de lípidos oxigenados (152).

La disminución del contenido de CYP durante el proceso regenerativo hepático es un evento paralelo al aumento de los niveles tisulares de poliaminas (59,60). Una hipótesis que surge considerando estos antecedentes, es la posibilidad que el aumento de putrescina (y/o de las otras poliaminas superiores) esté involucrado en la disminución de los niveles de P450 durante la regeneración hepática.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Se requiere tanto la conciencia del deseo como el deseo de la conciencia.
Guy Debord

2.1 Primera Parte: Contribución de las isoenzimas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 en la disminución de CYP total en el hígado regenerante. Hipótesis sobre las causas de esta inhibición

En una primera etapa del estudio centramos nuestra atención en tres isoenzimas del sistema P450, CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 durante el proceso de regeneración hepática.

La primera, CYP3A4, representa cerca de un 50 % del total de P450 y se expresa constitutivamente; es fundamental en la depuración de drogas, metabolizando una enorme variedad que incluye, nifedipina, warfarina, acetaminofeno, ciclosporina y FK-506 (115,153). Hasta el presente, no se conocían datos definitivos de su comportamiento durante la regeneración hepática.

Por su parte, CYP1A1 y CYP2B1/2 son inducibles por xenobióticos y pueden generar productos carcinogénicos. CYP1A1 metaboliza hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), como el benzopireno y el 3-metilcolantreno, este último, potente inductor de esta familia. CYP2B1/2 también metabolizan PAH pero son inducibles por fenobarbital (115,154).

El objetivo general de esta primera parte del trabajo de tesis fue analizar la posible participación de putrescina como mediador de la disminución de CYP durante la regeneración hepática. La hipótesis establecida fue que esta poliamina, esencial para el aumento de la síntesis de macromoléculas en el proceso regenerativo, podía resultar inhibitoria sobre algunas isoenzimas de

P450, como se describía para otras aminas biógenas y exógenas (ver capítulo anterior 1.2.9).

Se estudió para ello el efecto de una inyección exógena de putrescina sobre CYP total y sobre las actividades asociadas a las isoenzimas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 así como la cantidad de estas proteínas.

También se modificaron los niveles de putrescina en el hígado regenerante mediante la administración de un inhibidor de la ornitina decarboxilasa, el ácido gama amino butírico (GABA), y se analizaron los cambios de estas isoformas en animales regenerantes a distintos tiempos luego de una hepatectomía parcial.

Los objetivos específicos que se plantearon para la primera etapa de este estudio fueron:

- a. Analizar la contribución de las isoenzimas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 en la disminución de CYP total durante la regeneración hepática.
- b. Estudiar el efecto de putrescina exógena sobre CYP total y sobre la isoformas mencionadas, CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2.
- c. Analizar los posibles cambios de CYP total y de CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 frente a la modificación de los niveles de putrescina en la regeneración hepática por inhibición de la enzima que la produce, ornitina decarboxilasa, con ácido gama aminobutírico (GABA).

2.2 Segunda Parte: Efectos inhibitorios del IFN α en la regeneración hepática. Convalidación de la hipótesis

En esta etapa se propuso trabajar en el mismo modelo de regeneración hepática atenuando la producción de poliaminas del hígado regenerante con una citoquina antiproliferativa como el interferon alfa (IFN α), utilizado terapéuticamente en el tratamiento de hepatitis crónicas (155).

Son conocidas las propiedades antiproliferativas del IFN α en diversas células y tejidos, aún en el tejido hepático. Al respecto, como describimos anteriormente (ver 1.1.8), se demostró su efecto inhibitor sobre la actividad ornitina decarboxilasa y, por ende, la reducción de los niveles de putrescina, en cultivos celulares (156) y en hígado regenerante (80), aunque no se conoce claramente el mecanismo de disminución de esta actividad.

En virtud de todo esto, se halló interesante caracterizar los posibles efectos del IFN α sobre la velocidad de síntesis de macromoléculas, particularmente sobre la síntesis de proteínas totales y microsomales durante la regeneración, no estudiadas hasta el momento. Asimismo, se pretendió analizar las consecuencias que podía tener la disminución de putrescina en el hígado regenerante sobre los niveles de la isoenzima de P450 más abundante, CYP3A4, para corroborar la hipótesis enunciada en la primera parte de este estudio, que el aumento de esta poliamina durante el proceso regenerativo podría resultar inhibitorio sobre la actividad de algunas isoenzimas de P450.

Los objetivos específicos de esta segunda etapa fueron los siguientes:

d. Analizar el efecto del tratamiento con dosis farmacológica del IFN α más utilizado en el tratamiento de la hepatitis crónica C, IFN α -2b, en el hígado regenerante en cuanto a:

Síntesis de DNA

Síntesis de proteínas totales

Síntesis de proteínas microsomales

Expresión de la proteína ODC y niveles de putrescina

e. Analizar el efecto de IFN α -2b sobre la actividad nifedipina oxidasa microsomal (CYP3A4) en hígado normal y comprobar si en hígado regenerante la disminución de los niveles de putrescina provocada por esta citoquina modificaba de alguna manera el grado de inhibición de esta isoenzima.

22

CAPITULO 3

METODOS

3. METODOS

*El trabajo es, ante todo, un acto que tiene lugar
entre el hombre y la naturaleza.
Karl Marx*

3.1 ANIMALES Y TRATAMIENTOS

3.1.1 ANIMALES

Para la realización de estos estudios se trabajó con ratas Wistar machos adultas (340-390 g) de nuestro bioterio (Instituto de Fisiología Experimental, CONICET).

Los animales fueron mantenidos en las condiciones habituales de luz, temperatura y alimentación de acuerdo a normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio ("Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" National Institutes of Health, publication no. 86-23, revised 1985).

3.1.2 ANIMALES REGENERANTES Y ANIMALES CONTROLES

A lo largo de todo el estudio se trabajó con hígados regenerantes y con sus respectivos controles. Como modelo experimental de hígado regenerante se recurrió al de hepatectomía quirúrgica.

Para esto, un grupo de ratas fue sometido a una hepatectomía parcial (HP), esto es una resección del 65% de la masa hepática (remoción de los

R

lóbulos medio o central y lateral izquierdo) según describen Higgins y Anderson (1).

Brevemente, se detalla a continuación el procedimiento quirúrgico:

Se realizó una incisión transversal de 2 cm en el abdomen, 1 cm por debajo del apófisis xifoides. Se exteriorizaron los dos lóbulos anteriores (medio y lateral izquierdo). Luego de ligar el pedículo vascular de cada lóbulo con hilo quirúrgico, cada uno de ellos fue escindido realizando un corte 1-2 mm distal a la ligadura (*Fig. 3.1*). Finalmente, se absorbió cuidadosamente la sangre coagulada en la cavidad abdominal utilizando gasas y se suturaron las capas musculares y la piel.

Otro grupo de animales fue utilizado como control. Para esto se le practicó una cirugía simulada (SH, *sham*) consistente en la escisión del abdomen con exteriorización y cuidadosa manipulación de los lóbulos hepáticos durante el tiempo de duración de una hepatectomía parcial.

En todos los casos, durante la cirugía y después de la misma, los animales fueron mantenidos en un ambiente con temperatura cálida utilizando lámparas de calentamiento hasta la recuperación de la conciencia.

3.1.3 TRATAMIENTO CON PUTRESCINA

Para estudiar la acción de putrescina exógena sobre CYP total y sobre las isoformas en cuestión, se administró a un grupo de ratas controles SH, 18.5 $\mu\text{mol}/100$ g peso corporal, i.v. de putrescina (PT) (Sigma Chemicals Co.) en el momento de la cirugía simulada.

La dosis fue establecida en base a su capacidad de producir niveles comparables a los alcanzados tras una hepatectomía parcial (59).

Las concentraciones hepáticas de putrescina determinadas por HPLC (ver más adelante, 3.2.6) tras una inyección única de la dosis elegida de $18.5 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$ peso corporal, i.v., resultaron ser las que se ilustran en la tabla 3.1.

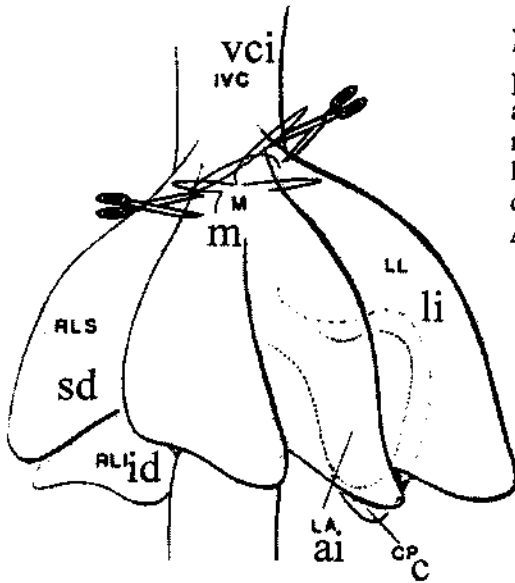


Figura 3.1. Hepatectomía

parcial. El esquema muestra una vista anterior del hígado de rata donde están representados los lóbulos medio y lateral izquierdo removidos de acuerdo con la técnica quirúrgica de Higgins y Anderson (1).

vci, vena cava inferior
m, lóbulo medio
li, lóbulo lateral izquierdo
sd, lóbulo superior derecho
id, lóbulo inferior derecho
ai, lóbulo anterior izquierdo
c, lóbulo caudado

TABLA 3.1. Concentración hepática de putrescina luego de su administración

Tiempo después de la inyección ($18.5 \mu\text{mol}/100 \text{ g}$)	Putrescina hepática nmol/g hígado
0 h	n. d.
1 h	20 ± 11
6 h	81 ± 6
24 h	29 ± 3
48 h	10 ± 1
96 h	8 ± 1

n. d., no detectable

3.1.4 TRATAMIENTO CON GABA

Con el fin de atenuar los niveles de putrescina en el hígado regenerante, se ensayó un tratamiento con ácido gama amino butírico (GABA), un inhibidor fisiológico de la enzima que cataliza la síntesis de putrescina, ornitina decarboxilasa (157) (Fig.3.2).

De esta manera, subgrupos de animales SH y HP fueron tratados con vehículo (solución fisiológica) o con GABA (Sigma Chemicals Co.), intraperitonealmente, en dos dosis diarias de 500 µg/g peso corporal comenzando 16 h antes de la cirugía y continuando hasta la tarde anterior al sacrificio (Fig. 3.3), de acuerdo a trabajos de otros autores (84).

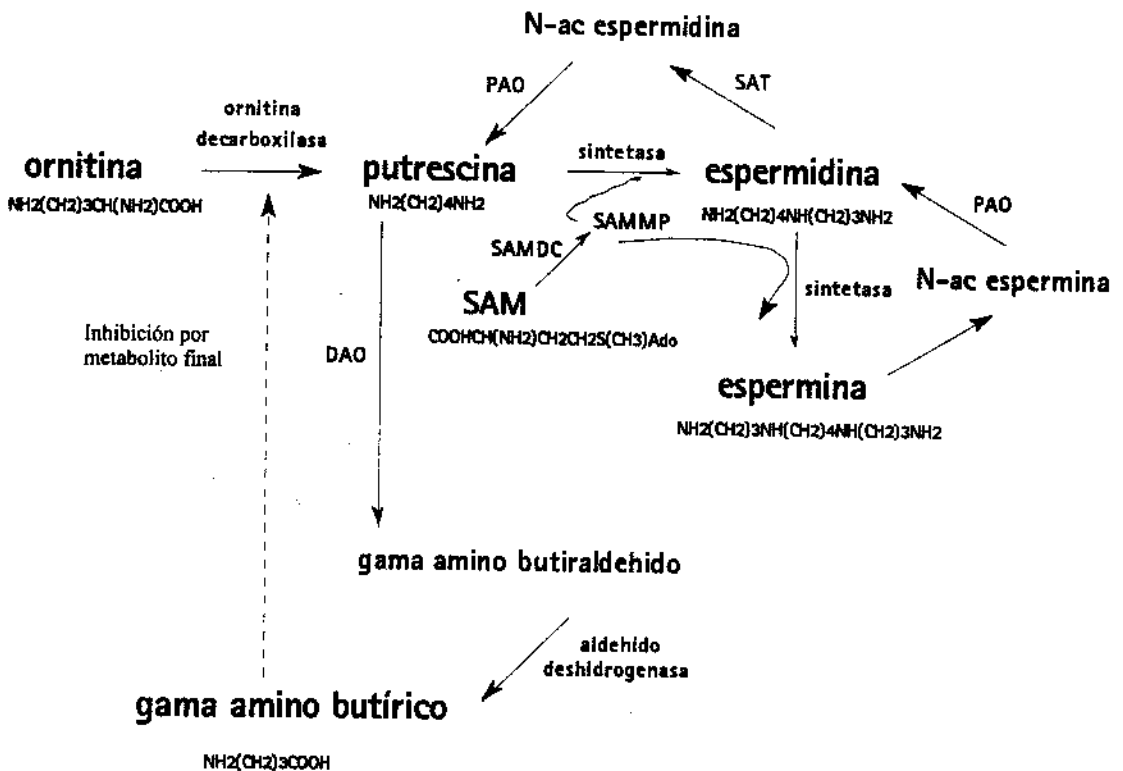
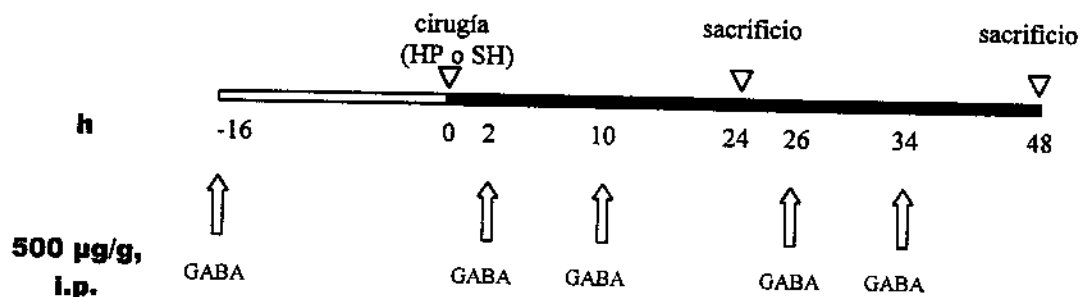


Figura 3.2. Ruta de las poliaminas.

SAM, S-adenosilmetionina; DAO, diaminaoxidasa; SAMDC, S-adenosilmetionina decarboxilasa; SAMMP, S-adenosil 3 metil mercaptopropilamina; SAT, espermidina N-acetiltransferasa; PAO, poliaminaoxidasa.

Figura 3.3. Tratamiento con GABA. El esquema ilustra el tratamiento con este inhibidor. Se eligió representar un tratamiento hasta las 24 ó 48 h de evolución luego de la cirugía (hepatectomía o sham). En el caso de los grupos de 96 h se continuó la administración con la misma regularidad.



3.1.5 TRATAMIENTO CON $IFN\alpha-2b$

En otra parte del estudio, se pretendió analizar los efectos del $IFN\alpha$, también descrito como inhibidor de la actividad ornitina decarboxilasa. En esta etapa de la investigación, un subgrupo de animales SH y HP se trataron con vehículo o $IFN\alpha-2b$ recombinante (BioSidus, Buenos Aires, Argentina).

El tratamiento con $IFN\alpha-2b$ consistió en la administración de dos dosis, 16 h antes y en el momento de la cirugía, de $6.5 \cdot 10^5$ U/Kg peso corporal, i.p.

Tal dosis de $IFN\alpha-2b$ resulta comparable a la utilizada terapéuticamente en humanos adultos en el tratamiento de hepatitis C crónica (81,155).

3.1.6 OBTENCIÓN DE LOS HÍGADOS Y LOS REMANENTES DE HÍGADO A DISTINTOS TIEMPOS LUEGO DE LA CIRUGÍA

En todos los casos, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/Kg peso corporal, i.p.) y se sacrificaron por exsanguinación mediante punción cardíaca a las 0, 24, 48, y 96 h (estudio de las isoenzimas

de P450 en la regeneración y tras la inyección de putrescina) ó a las 12 y 24 h (estudio con interferon alfa) luego de la operación.

Los hígados enteros o sus remanentes, según el caso, fueron removidos y lavados *ex situ* con solución fisiológica helada.

Se pesaron y fraccionaron en las alícuotas requeridas manteniéndose durante todos los procedimientos a 0 °C.

Las operaciones se realizaron entre las 9 y las 11 a.m. para minimizar los efectos de las variaciones circadianas.

3.2 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.2.1 SÍNTESIS DE DNA

La actividad regenerativa del hígado se refleja, en gran medida, en la velocidad de síntesis de DNA, describiéndose un primer pico alrededor de las 24 h de la hepatectomía parcial y un segundo pico mucho menor hacia las 48 h (83). Dado que en estos estudios se utilizaron tratamientos con drogas inhibitoras de la síntesis de poliaminas y del proceso regenerativo hepático, se evaluó en todos los grupos experimentales la incorporación de [³H] timidina al DNA como índice de la velocidad de síntesis del mismo.

3.2.1.1 Incorporación de [³H] timidina al DNA

Se administró a los animales [³H] timidina (Sigma Chemicals Co.) (10 µCi/200 g peso corporal, i.p.) 1 h antes del sacrificio. Una muestra de 1 g de hígado se homogeneizó en 5 volúmenes de H₂O destilada y se precipitaron

los ácidos nucleicos con TCA 10% (p/v) para determinar la radiactividad en la fracción TCA-insoluble por centelleo líquido (Rack Beta, Pharmacia), como se reporta en trabajos previos (158).

3.2.1.1 Concentración de DNA

La velocidad de síntesis de DNA fue expresada en dpm/mg DNA determinando para ello la concentración de DNA en los especímenes de hígado según Wannemacher y col.(159). Para ello, una alícuota de tejido fue homogeneizada al 20% en H₂O destilada y sometida a precipitación con TCA 10% (p/v). El precipitado resultante (centrifugación 2000 rpm, 4 °C) fue lavado con etanol saturado con acetato de potasio para extraer el TCA y algunos lípidos. Luego se realizó una nueva extracción lipídica con etanol:éter etílico (3:1) y éter anhidro. El éter remanente del precipitado fue evaporado. Se resuspendió el precipitado en KOH 0.3 N y se sometió a hidrólisis durante 60 min a 37 °C. Para separar DNA y RNA se agregó a la solución resultante HClO₄ 60% (p/v) helado. Tras centrifugación a 2000 rpm, a 4 °C, durante 5 min, el precipitado conteniendo el DNA fue lavado exhaustivamente con HClO₄ 5%. El DNA fue hidrolizado en HClO₄ 0.5 N a 96 °C durante 45 min. Luego de centrifugar, el sobrenadante fue recogido y se lavó el precipitado con HClO₄ 0.5 N volviendo a recoger el sobrenadante. La concentración de DNA fue determinada en una alícuota del sobrenadante por lectura de la diferencia de absorbancia a 265 nm y 290 nm comparándola con soluciones estándares de DNA de timo de ternero (Sigma Chemicals. Co.) en HClO₄ 0.2 N.

3.2.2 OBTENCIÓN DE MICROSOMAS

Alícuotas de los hígados fueron homogeneizadas al 25% (p/v) en una solución tamponada conteniendo sacarosa 0.25 M, EDTA 1mM (pH 7.4) y se obtuvo la fracción microsomal por ultracentrifugación. Para esto, primero se realizó una centrifugación preparativa a 20000 g durante 15 min, a 4 °C descartando el pellet (membranas, núcleos y mitocondrias) para una centrifugación ulterior de los sobrenadantes a 105000 g durante 1 h, a 4 °C (160). Los pellets de microsomas se resuspendieron en buffer Tris 10 mM, EDTA 1mM y glicerol 20% (pH 7.4) y se congelaron a -70 °C hasta su utilización.

En estas muestras las proteínas microsomales se determinaron según Lowry y col. (161), utilizando albúmina bovina como estándar y fueron ajustadas a los valores requeridos.

3.2.3 CITOCROMO P450 TOTAL

En las muestras provenientes de los grupos HP y SH tratados con vehículo o con GABA, así como en las provenientes de las ratas tratadas con putrescina se analizaron los posibles efectos sobre el contenido total de citocromo P450 (CYP). El contenido hepático de CYP se midió de acuerdo al método de Omura y Sato (93), utilizando las propiedades del espectro del citocromo reducido (Fe[II]) cuando se burbujea monóxido de carbono en una suspensión de microsomas en presencia de ditionito de sodio.

Brevemente, aproximadamente 3 mg de proteína microsomal se colocaron en sendas microcubetas en un espectrofotómetro de doble haz (UV/Vis Spectrometer Lambda 2S, Perkin Elmer) y se obtuvieron lecturas a 450 y 490 nm. A continuación se agregaron 15 mg de ditionito de sodio en cada

cubeta y luego de homogeneizar por inversión, una de las cubetas fue burbujeada con un fino rosario de monóxido de carbono durante 30 seg. Se obtuvo de esta manera el siguiente valor de diferencia de absorbancias:

$$\Delta A = (A_{450} - A_{490})_2 - (A_{450} - A_{490})_1$$

Donde 1 y 2 representan los estados antes y después del burbujeo, respectivamente.

El contenido de P450 fue calculado utilizando este ΔA y adoptando como coeficiente de extinción de este pigmento el valor de $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, establecido por otros autores (162). El resultado se expresó en nmol P450/mg proteína microsomal.

3.2.4 ISOENZIMAS DE P450: CYP1A1, CYP2B1/2 Y CYP3A4

Luego de analizar los cambios en el contenido total de CYP, se estudiaron en los mismos grupos experimentales las actividades específicas asociadas a isoformas representativas de familias distintas dentro de este sistema, como mencionamos anteriormente (ver 1.2.6 y 1.2.7). Por un lado la familia 3A de expresión constitutiva y muy abundante y por otro lado las familias 1A y 2B inducibles e importantes en el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

3.2.4.1 (i) Actividades o-dealquilasas

Las actividades *etoxiresorufina o-dealquilasa* (EROD), *pentoxiresorufina o-dealquilasa* (PROD) y *benziloxiresorufina o-dealquilasa* (BROD), que se

asocian a las isoformas CYP1A1 y CYP2B1/2, respectivamente, fueron determinadas por detección de resorufina (HPLC acoplado a espectrofluorómetro) usando sustratos específicos (etoxiresorufina, pentoxiresorufina y benziloxiresorufina, respectivamente) (Sigma Chemicals Co.) y NADPH como co-sustrato, de acuerdo a trabajos de otros autores (163), con algunos cambios.

Se incubaron durante 5 min a 37 °C suspensiones de microsomas equivalentes a 10 µg de proteína en una mezcla de reacción conteniendo el sustrato en concentración 1.5 mM y NADPH 10 mM en buffer Tris 0.1 M (pH 7.8). La reacción se detuvo por el agregado de ZnSO₄ 15%, TCA 20% y éter. Se centrifugó durante 5 min a 3500 g tras lo cual la fase orgánica se extrajo y se llevó a sequedad en atmósfera de N₂. El sedimento fue resuspendido en 300 µl de la fase móvil.

La detección de la resorufina producida se realizó eluyendo la muestra (columna Waters, µBondapak C18, 10 µm, 3.9x300 mm) con una mezcla isocrática de buffer fosfato (pH 7)-metanol (58%-42% v/v), velocidad de flujo: 0.8 ml/min (Waters 600 Pump), detección: excitación 530, emisión 580 nm (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector). Se utilizaron soluciones estándares de resorufina (Sigma Chemicals Co.) en Tris-HCl (pH 7.8).

3.2.4.1 (ii) Inducción de o-dealquilasas: Tratamientos con 3-metilcolantreno y fenobarbital

Un subgrupo de animales SH y HP fue tratado durante 72 h tras la cirugía con los inductores clásicos de estas isoenzimas para comparar las actividades de las mismas en condiciones de sobre-expresión.

Se utilizó un tratamiento con 3-metilcolantreno (MC, 20 mg/kg de peso corporal/día, i.p.) para la inducción de CYP1A1 y un tratamiento con

fenobarbital (PB, 100 mg/kg de peso corporal/día, i.p.) para la inducción de CYP2B1/2.

A las 72 h de la cirugía, se ensayaron en estos grupos las actividades EROD y BROD, respectivamente de la manera en que se indicaba en el ítem anterior.

3.2.4.2 Actividad nifedipina oxidasa

La actividad *nifedipina oxidasa* asociada a la isoforma CYP3A4, fue medida por método cromatográfico según Guengerich y col. (164) con algunas modificaciones.

Una cantidad equivalente a 0.6 mg de proteína microsomal fue incubada 20 min a 37 °C con nifedipina 0.2 mM y NADPH 0.5 mM. La reacción fue detenida por el agregado de cloroformo seguido de centrifugación durante 10 min a 3000 g. Una alícuota de la fase clorofórmica fue reducida a sequedad bajo atmósfera de N₂ y se resuspendió el sedimento en 50 µl de metanol.

El análisis por HPLC de estas muestras fue realizado usando una columna C18 (Waters, µBondapak C18, 10 µm, 3.9x300 mm), eluída con una mezcla isocrática metanol-agua (64%-36% v/v), velocidad de flujo: 1.5 ml/min (Waters 600 Pump), detección: 254 nm (Waters 486 Tunable Absorbance Detector).

3.2.4.3 Western blotting de isoenzimas CYP1A1, CYP2B1/2 y CYP3A4

A los efectos de analizar si los cambios hallados en las actividades se debían a modificaciones en la cantidad de las proteínas, las mismas muestras de microsomas fueron ensayadas por inmunoblotting para la detección de cada isoenzima estudiada.

Cantidades iguales de proteínas microsomales (50 ó 100 µg) se sembraron en mini-geles de acrilamida (10% (p/v)) para SDS-PAGE (165) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (166).

Para la identificación de las proteínas detectadas, algunos mini-geles fueron también cargados con albúmina bovina y ovoalbúmina como marcadores de pesos moleculares y fueron fijados y teñidos con Azul de Coomasie.

Los mini-geles se prepararon y corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-Protean II Cell, BIO RAD) y la transferencia se realizó en otra cuba del mismo fabricante (Mini-Trans Blot Cell, BIO RAD).

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon una noche en una solución bloqueante conteniendo 3% (p/v) de leche en polvo. Luego se probaron con anticuerpos específicos contra CYP3A4, CYP1A1/2 y CYP2B1/2 (Oxford Biomedical Research Inc.), incubándolas con diluciones apropiadas de los mismos (1:100 a 1:200 de los stocks originales) durante 2 h. Las membranas fueron luego probadas con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (o ratón, según el caso), conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemicals Co.) y se revelaron utilizando en la reacción de color 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y Azul de Nitrotetrazolium (NBT).

Las bandas fueron cuantificadas por densitometría (Shimadzu CS 9000).

3.2.6 NIVELES DE PUTRESCINA HEPÁTICA

Se analizó la concentración de putrescina en muestras de tejido hepático de todos los grupos experimentales. Para esto se cuantificó mediante HPLC el derivado dansilado de putrescina en extractos de tejido de acuerdo a trabajos de otros autores (167), con algunas modificaciones.

CP

Se homogeneizaron alícuotas de hígado en 10 volúmenes de HClO_4 0.2 M frío. Tras 20 min de centrifugación a 5000 *g* a 4 °C, se lavó el pellet en igual volumen de HClO_4 y se recogieron ambos sobrenadantes que se mantuvieron a 0 °C durante 10 h, luego de lo cual se volvió a centrifugar. Se utilizó una alícuota de este nuevo sobrenadante para derivatizar el compuesto en cuestión. Para esto, se neutralizó una alícuota del extracto con NaOH y se llevó a sequedad al vacío. El sedimento se resuspendió en 50 μl de NaHCO_3 0.2 M (pH 10) y 50 μl de cloruro de dansilo 5 mg/ml en acetona. Esta mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y se evaporó a sequedad al vacío. El sedimento se resuspendió en 200 μl de acetonitrilo.

El dansil-derivado de putrescina se separó por HPLC en una columna C18 (Phenomenex, Phenosphere C18, 5 μm) utilizando como mezcla eluyente acetonitrilo-buffer A, según el siguiente esquema: 70% de acetonitrilo durante 1.5 min, gradiente hasta 100% de acetonitrilo durante los siguientes 2.5 min, 100% acetonitrilo durante 3 min y retorno a las condiciones iniciales en 1 min. Velocidad de flujo: 2 ml/min (Waters 600 Pump). Detección: excitación 333, emisión 522 nm (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector). El buffer A consistió en una solución de heptanosulfonato de sodio 5mM, ácido acético 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM y NaHSO_4 2 mM (pH 3.5).

Se utilizaron soluciones estándares de putrescina (Sigma Chemicals Co.) en H_2O destilada en las que esta amina fue derivatizada siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras.

3.2.7 IFN α -2b Y VELOCIDAD DE SÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Se estudió el efecto del tratamiento con IFN α -2b sobre la velocidad de síntesis de DNA y de proteínas a las 24 h de la cirugía. En el primer caso se procedió según se describió en el ítem 3.2.1.

A continuación, se describe la técnica empleada para evaluar la síntesis proteica.

3.2.7.1 Síntesis de proteínas totales

La velocidad de síntesis proteica *in vivo* se determinó de acuerdo al método reportado por Garlick y col. (168) con algunas modificaciones.

Para esto, se administró [3 H] fenilalanina (Sigma Chemicals Co.) en mezcla con el mismo aminoácido frío (50 μ Ci/100 g peso corporal, 150 μ mol/100 g peso corporal), por vía endovenosa 10 minutos antes del sacrificio, a ratas SH y HP tratadas con vehículo o con IFN α -2b. Alícuotas de los hígados removidos se homogeneizaron con HClO $_4$ 2% y se centrifugaron a 3000 g 15 min. El sobrenadante se utilizó para la medida de la marca libre. El pellet fue lavado y solubilizado 1 h a 37° con NaOH 0.3 M. Esta solución se precipitó con HClO $_4$ 70% y se centrifugó a 3000 g, 15 min. El precipitado se lavó con HClO $_4$ 2% y se resuspendió en HCl 6M para su hidrólisis durante 24 h a 110 °C. El hidrolisado se disolvió en ácido cítrico 0.3 M y fue usado para la medición de la marca unida a proteínas.

Para descontar la [3 H] tirosina producida a partir de la [3 H] fenilalanina, la fenilalanina de los sobrenadantes y de los hidrolisados fue convertida en β -fenetilamina por acción enzimática (0.7 unidades de L-tirosina decarboxilasa, 0.5 mg de piridoxal fosfato por ml) durante 6 h a 50 °C. La β -fenetilamina

producida fue extraída por agregado de 8 ml de heptano y 2 ml de H₂SO₄ 0.01 M. La fase acuosa fue utilizada para la detección de radiactividad en contador de centelleo líquido (Rack Beta, Pharmacia). La velocidad fraccional de síntesis proteica fue calculada según la siguiente fórmula:

$$k_s = \frac{S_B \times 100}{S_A \times t}$$

Donde S_A es radiactividad libre (dpm en el sobrenadante/g hígado); S_B es radiactividad unida a proteína (dpm en el hidrolisado/g hígado) y t es 10 min.

3.2.7.2 Síntesis proteica en la fracción microsomal

Con el fin de analizar el efecto del tratamiento con IFN α -2b sobre la síntesis de proteínas microsomales, se midió la incorporación de un aminoácido radiactivo a las proteínas de esta fracción en animales controles y regenerantes tratados con vehículo o con IFN α -2b.

Se precipitaron con TCA 10% (p/v) las proteínas de las preparaciones microsomales de los animales a los que se les había administrado [³H] fenilalanina intravenosa 10 min antes de su sacrificio para la determinación de la velocidad fraccional de síntesis de proteínas totales (ver arriba: 3.2.7.1). Los precipitados fueron lavados exhaustivamente y neutralizados con NaOH 6M para la medida de la radiactividad por centelleo líquido (Rack Beta, Pharmacia). Los resultados se expresaron en dpm/mg de proteína microsomal.

3.2.8 ACTIVIDAD NIFEDIPINA OXIDASA (NO) EN MICROSOMAS DE ANIMALES REGENERANTES TRATADOS CON IFN α -2b

Se estudió también el efecto de esta citoquina sobre la actividad nifedipina oxidasa microsomal (CYP3A4), procediendo como se describió en el ítem 3.2.4.2 en muestras microsomales de hígado de animales SH y HP tratados con vehículo o IFN α -2b.

3.2.9 IFN α -2b Y ORNITINA DECARBOXILASA (ODC)

Luego de analizar los cambios en los niveles de putrescina tras el tratamiento inhibitor con IFN α -2b medidos según se describió anteriormente (3.2.6), se estudió su efecto sobre la expresión de la proteína ornitina decarboxilasa (ODC).

Para esto, en una primera instancia, se evaluó la cantidad de proteína ODC en lisado total hepático en los grupos controles y regenerantes tratados con vehículo o con la citoquina.

A continuación, y para determinar efectivamente si el tratamiento con IFN α -2b modificaba en alguna etapa la síntesis de esta proteína, se analizó la capacidad de síntesis de ODC en hepatocitos aislados provenientes de los distintos grupos experimentales estudiados.

3.2.9.1 Detección de ODC en lisado hepático

Se homogeneizaron muestras de 1 g de tejido en 3 ml de buffer de lisis (PBS, Triton 1% (v/v), deoxicolato sódico 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v)) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, leupeptin 10 μ g/ml y aprotinin 1 μ g/ml). Luego de 30 min de incubación a 0 °C y tres ciclos de congelado-descongelado, se determinó la concentración de proteínas (161). Cantidades iguales de proteínas (aproximadamente 150 μ g) fueron

sometidas a inmunoprecipitación usando anticuerpo específico (monoclonal de ratón anti-ODC de rata, Sigma Chemicals Co.) mediante incubación a temperatura ambiente durante 1.5 h. Luego se incubó durante 1 h a 4 °C agregando 4 mg/ml de Proteína A-Sepharose, tras lo cual se centrifugó 5 min a 5000 rpm. El precipitado fue lavado y resuspendido en buffer de muestra para SDS-PAGE y hervido durante 3 min. Las muestras resultantes se sembraron en mini-geles de acrilamida 10% (p/v) y se sometieron a electroforesis (165) (Mini-Protean II Cell, BIO RAD). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (166) utilizando un equipo comercial (Mini-Trans Blot Cell, BIO RAD). Luego de ser bloqueadas durante una noche, las membranas fueron incubadas durante 2 h con diluciones apropiadas de anti-ODC.

La proteína inmovilizada fue detectada por quimioluminiscencia (169) utilizando un kit comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (ECL-Western Blotting, Amersham Pharmacia Biotech). Para ello, las membranas se expusieron a films radiográficos (Kodak X-Omat) y las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría (Shimadzu CS 9000).

3.2.9.2 Síntesis de ODC en hepatocitos aislados

A las 12 y 24 h tras la cirugía, se obtuvieron hepatocitos aislados por digestión enzimática con colagenasa de cortes de hígado, de acuerdo a la técnica descrita por Fry y col. (170), con algunas modificaciones.

Para esto, los especímenes de hígado fueron lavados con buffer Hanks libre de calcio, conteniendo EGTA 0.5 mM (pH 7.6), tras lo cual fueron rápidamente cortados sobre una superficie de vidrio a 0 °C en secciones de aproximadamente medio milímetro. Los cortes se incubaron con agitación a 37 °C durante 7 min en recipientes plásticos con 50 ml del mismo buffer

Hanks burbujeado con mezcla de gas carbógeno. Luego de esta incubación, se trasvasaron a un nuevo recipiente plástico burbujeado con carbógeno conteniendo buffer Hanks sin EGTA con CaCl_2 1mM y colagenasa 0.08 % (p/v) y se incubaron 25 min a 37 °C. El sobrenadante resultante se filtró en una malla de tela de 75 μm de poro y se centrifugó a 1000 rpm durante 8 min a 4 °C. El pellet de células se lavó dos veces con buffer Hanks libre de calcio y finalmente fue resuspendido para obtener su índice de viabilidad en base a la capacidad de exclusión del colorante Azul de Tripan (171), siendo en todos los casos superior al 85%.

Se realizaron pooles de las suspensiones de hepatocitos de tres animales para cada grupo experimental. Los hepatocitos se recolectaron por centrifugación (500 g, 4°, 5 min), se resuspendieron en viales plásticos en medio Dulbecco (DMEM) libre de metionina y así se preincubaron durante 30 min a 37 °C en atmósfera de carbógeno. Tras este período, se agregó en los viales 100 μCi de [^{35}S] metionina (NEN Life Sciences) a $2 \cdot 10^7$ células y se incubó durante 30 min a la misma temperatura.

Los siguientes procedimientos se realizaron según descripciones de otros autores (172), con algunas modificaciones. Brevemente, se interrumpió la actividad sintética por el agregado de metionina fría 5mM y se recolectaron las células por centrifugación (500 g, 4°, 5 min). Los hepatocitos se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis conteniendo PBS, Triton 1% (v/v), deoxicolato sódico 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v), PMSF 1mM, leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luego de 30 min de incubación a 0 °C y tres ciclos de congelado-descongelado, los lisados se centrifugaron (30000 g, 4 °C, 20 min), y se determinaron las proteínas en el sobrenadante (161).

Igual cantidad de proteínas totales se inmunoprecipitaron con anti-ODC 1.5 h a temperatura ambiente, tras lo cual se agregó 4 mg/ml de Proteína A-Sepharose y se reincubó durante 1 h a 4° con agitación suave. Luego de centrifugación (5 min, 5000 rpm) y lavado exhaustivo, los inmunoprecipitados se resuspendieron en buffer apropiado para SDS-PAGE y se hirvieron durante 3 min. Las muestras resultantes se cargaron en mini-geles de acrilamida 10% (p/v) y se sometieron a electroforesis (165) (Mini-Protean II Cell, BIO RAD). Se utilizó un kit de estándares de pesos moleculares marcados radiactivamente con [¹⁴C] (Amersham Pharmacia Biotech) para la identificación de la proteína precipitada.

Los geles corridos se fijaron apropiadamente en una solución de metanol 40 % (v/v), TCA 10 % (p/v) (173) y se impregnaron en una solución de salicilato de sodio 1M y glicerol 1% (v/v) durante 30 min para intensificar las bandas (174). Luego fueron secados sobre papeles cromatográficos (Whatman 3MM) y expuestos a films radiográficos (Kodak X-Omat) a -70 °C durante 20-30 días.

Las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría (Shimadzu CS 9000).

3.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se expresaron como media ± error estándar.

Para el análisis de los datos correspondientes al contenido de citocromo P450 total en hígado de todos los grupos estudiados, se realizó ANOVA seguido del Test de Newman-Keuls. Todos los otros datos fueron analizados realizando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

La significancia fue seteada en un nivel de $p < 0.05$.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Cuando la ilusión desaparece, es decir, cuando vemos el ser o el hecho tal como existe, fuera de nosotros, experimentamos un raro sentimiento complicado. Mitad pesar por la desaparición del fantasma. Mitad agradable sorpresa ante la novedad, ante la realidad.
Charles Baudelaire

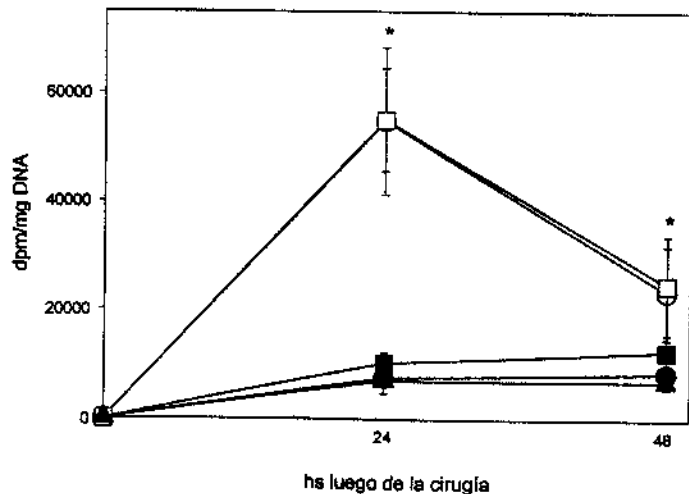
4.1 Velocidad de síntesis de DNA

La incorporación de [³H] timidina al DNA hepático durante la regeneración es mostrada en la *figura 4.1*. La velocidad de síntesis de DNA en el hígado regenerante mostró un pico característico a las 24 h (54746±13600 vs. 7500±2783 dpm/mg DNA en HP y SH, respectivamente) decreciendo hacia las 48 h aunque conservando la diferencia significativa respecto al grupo *sham* (23338±8526 vs. 8500±2778 dpm/mg DNA).

El tratamiento con GABA no previno el aumento en la síntesis de DNA observado en el grupo regenerante (55028±4500 dpm/mg DNA). El tratamiento con putrescina exógena, por su parte, no produjo cambios significativos en estos valores respecto al grupo SH (10250±1970 dpm/mg DNA).

Figura 4.1. Síntesis de DNA.

Círculos rellenos, SH; círculos blancos, HP; cuadrados rellenos, SH+GABA; cuadrados blancos, HP+GABA; triángulos rellenos, putrescina. * Diferencia significativa vs SH. $p < .01$



4.2 Disminución del contenido de CYP total

La cantidad de citocromo total en hígado a las 48 h en animales controles y hepatectomizados tratados y no tratados con GABA, así como en animales tratados con putrescina exógena, se presentan en la *figura 4.2*. La hepatectomía parcial produjo una disminución cercana a un 50% ($p < 0.01$) en este contenido y el tratamiento con putrescina también disminuyó este valor un 30% ($p < 0.01$) con respecto al grupo *sham* (0.31 ± 0.02 ; 0.38 ± 0.02 y 0.59 ± 0.03 nmol/g hígado en HP, PT y SH, respectivamente). Por otro lado, las ratas HP tratadas con GABA mostraron niveles de CYP total que no difirieron significativamente de los niveles del grupo *sham* (0.52 ± 0.05 y 0.51 ± 0.06 nmol/g hígado en HP y SH tratadas con GABA, respectivamente).

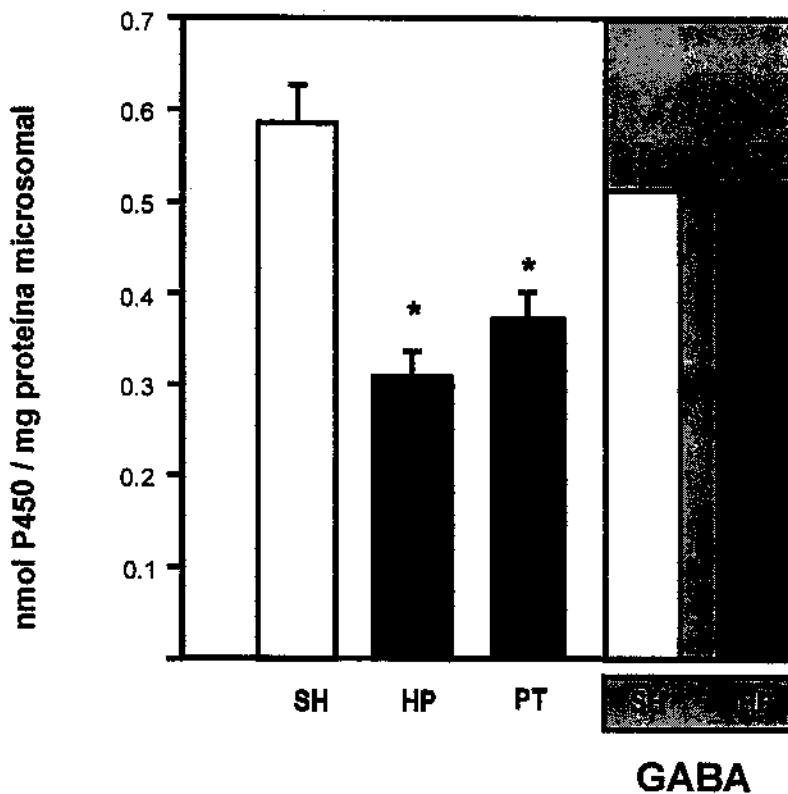


Figura 4.2. Citocromo P450 total a las 48 h de la cirugía. * Diferencia significativa vs. SH. $p < .01$.

4.3 Isoenzimas en la regeneración y en el tratamiento con putrescina

Las actividades asociadas a las isoenzimas inducibles por xenobióticos, CYP1A1 y CYP2B1/2, se analizaron midiendo sus actividades *o*-dealquilasas: etoxiresorufina *o*-dealquilasa (EROD), pentoxiresorufina *o*-dealquilasa (PROD) y benciloxiresorufina *o*-dealquilasa (BROD). En la *figura 4.3* se observan estas actividades específicas a las 48 h luego de la cirugía. No hubo diferencias significativas entre los grupos.

Lo mismo sucedió al comparar las actividades entre grupos SH y HP tratados durante tres días con los inductores 3-metilcolantreno (MC) y fenobarbital (PB). EROD: SH-MC: 66 ± 4 ; HP-MC: 75 ± 6 pmol/min/mg proteína ($p > 0.05$). BROD: SH-PB: 0.47 ± 0.08 ; HP-PB: 0.25 ± 0.15 pmol/min/mg proteína ($p > 0.05$) (*Fig. 4.4*).

La actividad nifedipina oxidasa (NO) asociada a CYP3A4 se analizó mediante la detección del producto de oxidación de la nifedipina por medio de cromatografía líquida de alta presión. La técnica utilizada se adaptó para registrar valores bajos. Como se observa en los cromatogramas típicos de la *figura 4.5*, el producto de la reacción disminuyó considerablemente en las ratas HP a las 48 h.

En la *figura 4.6* se representan estas actividades a las 48 h para todos los grupos experimentales. La actividad NO se halló significativamente reducida en el grupo HP (43% respecto al grupo sham), disminución que fue prevenida por el tratamiento con GABA en los animales HP y tratados con este inhibidor de la síntesis de putrescina. La NO en ratas tratadas con putrescina disminuyó a un 60% del grupo control (SH), siendo este valor de 3.25 ± 0.43 nmol/min mg de proteína.

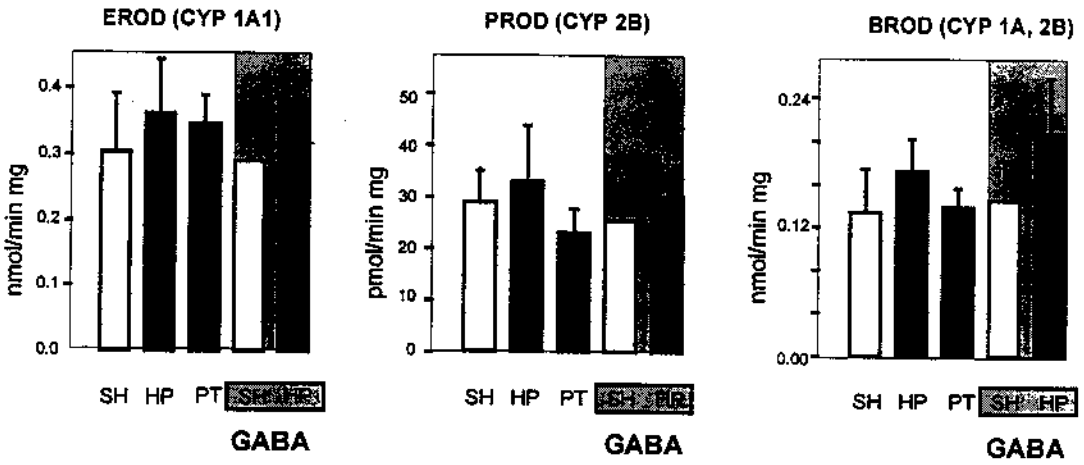


Figura 4.3. Actividades *o*-dealquilasas a las 48 h de la cirugía.

EROD, etoxiresorufina *o*-dealquilasa; PROD, pentoxiresorufina *o*-dealquilasa; BROD, benziloxiresorufina *o*-dealquilasa. Las medias para los grupos SH en las tres actividades analizadas fueron 297 ± 98 ; 29 ± 6 y 135 ± 42 pmol de producto/min mg proteína, respectivamente.

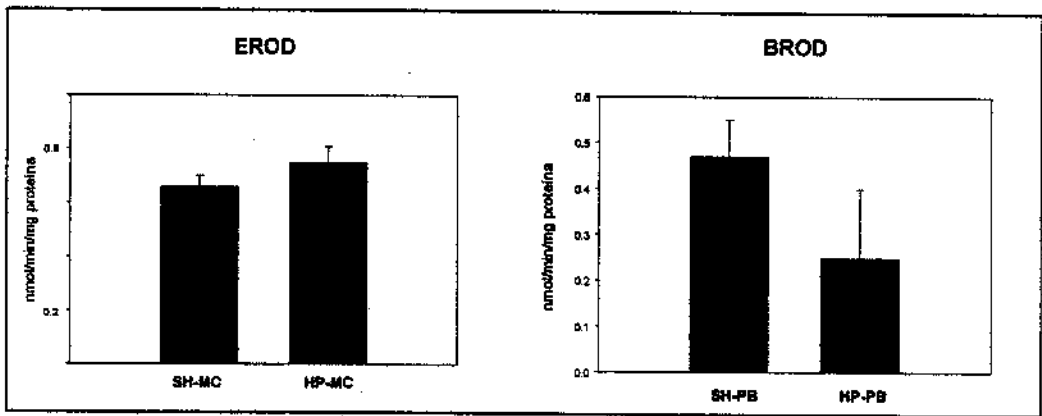


Figura 4.4. Actividades *o*-dealquilasas tras el tratamiento con inductores.

Etoxi-resorufina *o*-dealquilasa (EROD) fue analizada en animales SH y HP tratados durante 72 h con 3-metilcolantreno (MC) (Panel de la izquierda). Benziloxiresorufina *o*-dealquilasa (BROD) fue analizada en SH y HP tratados con fenobarbital (PB) (Panel de la derecha).

Figura 4.5. Detección del producto de oxidación de nifedipina por HPLC.

Panel A: muestra proveniente de ensayo enzimático con microsomas de rata control.

Panel B: muestra proveniente de ensayo enzimático con microsomas de rata parcialmente hepatectomizada. La flecha indica el producto de la reacción.

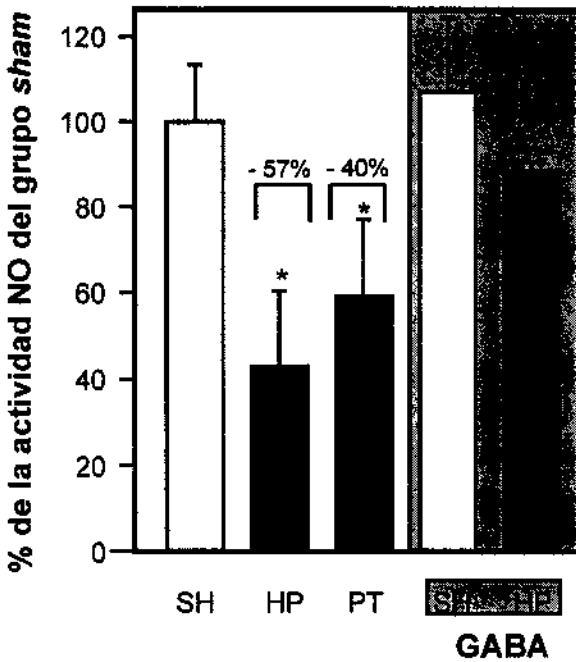
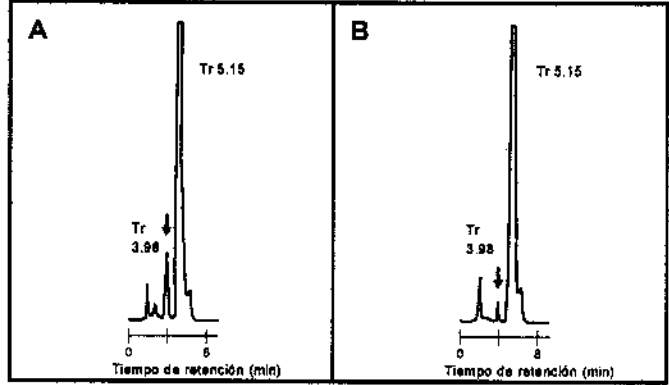


Figura 4.6. Actividad nifedipina oxidasa a las 48 h de la cirugía. * Diferencia significativa vs. SH. $p < .05$

4.4 Niveles de las proteínas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2

Los ensayos de inmunoblotting demostraron cambios similares a las disminuciones observadas en la actividad NO. La proteína inmunodetectable para CYP3A4 mostró un descenso relativo notorio en los grupos HP y tratado con putrescina (hasta de un 63 y un 48% respectivamente). Los niveles de CYP1A1/2 y CYP2B1/2, en cambio, permanecieron sin modificaciones con los tratamientos y prácticamente indetectables (*Fig. 4.6*).

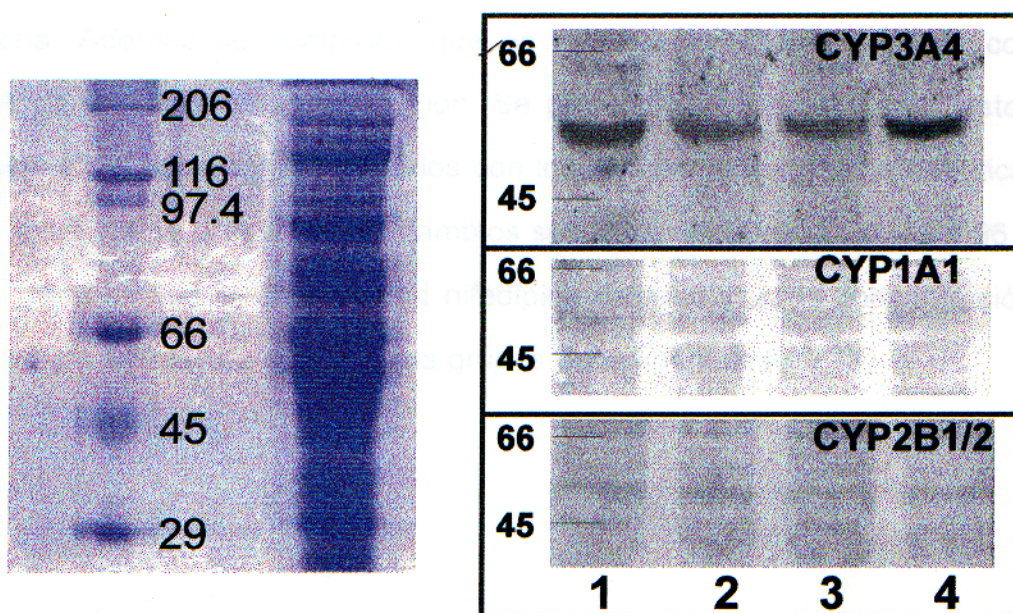


Figura 4.7. Inmunoblotting típicos para la detección de las isoformas CYP3A4, CYP1A1 y CYP2B1/2 en microsomas hepáticos a las 48 h de la cirugía.

Panel izquierdo: Se sembraron cantidades equivalentes a 100 ug de proteína microsomal en geles de poliacrilamida 10% junto a estándares de pesos moleculares. Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y fijados apropiadamente.

Panel derecho: Se sembraron 50-100 ug de proteína microsomal en geles de poliacrilamida 10% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos contra cada isoforma y se probaron con anti IgG conjugada con fosfatasa alcalina. El revelado se realizó utilizando en la reacción de color NBT y BCIP según se describe en el capítulo anterior (3.2.4.3) y las bandas se cuantificaron densitométricamente. Calle 1, SH; calle 2, HP; calle 3, PT; calle 4, HP+GABA. Densidades de banda para CYP3A4 en unidades arbitrarias: 4900, 2700, 2800, 5200, respectivamente.

4.5 Seguimiento en el tiempo de NO y putrescina hepática

Hasta aquí, se observó la disminución de la isoforma principal de la familia, CYP3A4, y de la actividad nifedipina oxidasa asociada, a las 48 h de la hepatectomía parcial así como luego del tratamiento con putrescina exógena. Además se comprobó que en ratas regenerantes tratadas con GABA se prevenía esta disminución. Se pretendió, entonces, seguir estos cambios en el tiempo y relacionarlos con los niveles de putrescina hepática. En la *tabla 4.1* se presentan los cambios secuenciales a las 0, 24, 48 y 96 h luego de la cirugía en la actividad nifedipina oxidasa y en la concentración hepática de putrescina en todos los grupos experimentales.

2

TABLA 4.1. Cambios secuenciales en nifedipina oxidada y putrescina en hígado.

	SH	HP	PT	SH + Gb	HP + Gb
0 h	3.20±0.30	3.20±0.30	3.20±0.30	3.20±0.30	3.20±0.30
Nifedipina					
24 h	2.97±0.41	1.64±0.17*	1.62±0.07*	3.02±0.24	2.60±0.23
oxidasa					
48 h	3.30±0.17	1.21±0.13*	1.22±0.08*	3.00±0.12	2.51±0.26
96 h	3.13±0.08	1.31±0.15*	1.33±0.06*	3.10±0.40	2.82±0.12
0 h	nd	nd	nd	nd	nd
Putrescina					
24 h	4±2	101±2**	29±3**	3±1	49±1**
48 h	3±1	78±3**	10±1**	3±1	40±7**
96 h	3±1	26±2**	8±1**	3±1	14±4**

* Diferencia significativa vs. SH. p<.05.

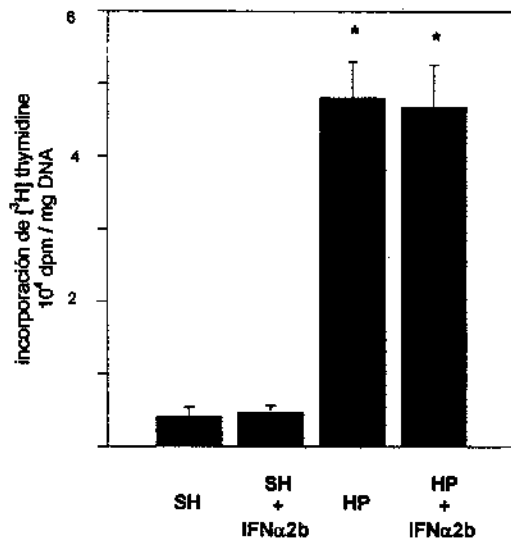
** Diferencia significativa vs. SH. p<.01.
nd, no detectable.

4.6 Síntesis de DNA en el tratamiento con $IFN\alpha-2b$

Los resultados de la incorporación de [3H] timidina al DNA en hígado a las 24 h en los grupos experimentales tratados con $IFN\alpha-2b$ se muestran en la *figura 4.8*. Se observó que esta velocidad era significativamente mayor en los grupos hepatectomizados respecto a los *sham* y que el tratamiento con esta citoquina no afectó significativamente la magnitud de este aumento (46782 ± 5843 ; 48062 ± 4934 y 4114 ± 1314 dpm/mg DNA en HP- $IFN\alpha-2b$; HP-vehículo y SH-vehículo, respectivamente).

Figura 4.8. Velocidad de síntesis de DNA a las 24 h de la cirugía en el tratamiento con IFN.

* Diferencia significativa vs. SH. $p < .01$.



4.7 Disminución de la síntesis de proteínas totales por $IFN\alpha-2b$

La *figura 4.9* resume las velocidades fraccionales de síntesis proteica a las 24 h. Esta síntesis mostró un aumento significativo en las ratas hepatectomizadas respecto a las controles (12.1 ± 1.7 y 6.2 ± 1.3 % . min^{-1} en HP-vehículo vs. SH-vehículo, respectivamente). Por su parte, $IFN\alpha-2b$ impidió completamente este aumento siendo la velocidad de esta síntesis en el grupo HP tratado con $IFN\alpha-2b$ de 7.0 ± 2.0 % . min^{-1} .

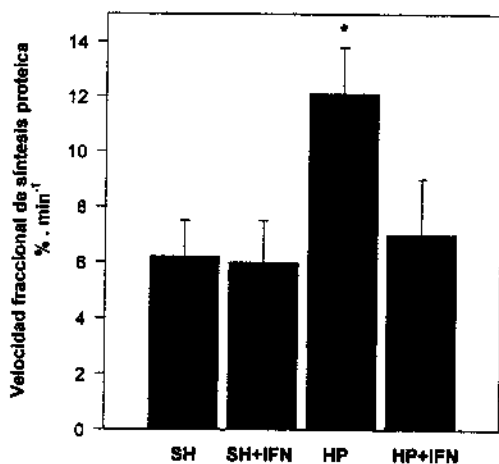


Figura 4.9. Efecto del IFN α -2b sobre la velocidad fraccional de síntesis proteica a las 24 h de la cirugía. * Diferencia significativa vs. SH. $p < .01$.

4.8 Concentración de putrescina y proteína ODC total en lisado hepático

El contenido hepático de putrescina (Fig. 4.10) fue reducido significativamente en las ratas parcialmente hepatectomizadas tratadas con IFN α (63 ± 25 vs. 101 ± 15 nmol/g hígado en HP tratadas con IFN α -2b y con vehículo, respectivamente).

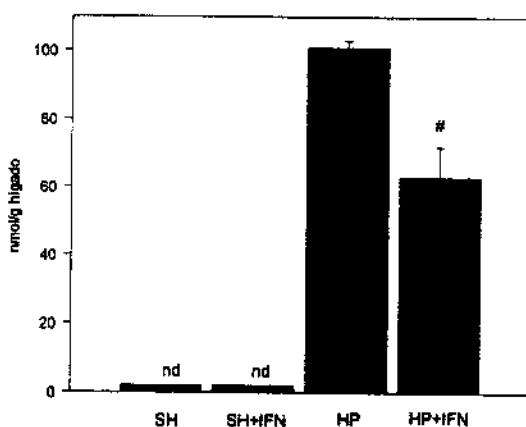
La proteína ODC detectada por inmunoprecipitación seguida de ECL-Western blotting mostró su inducción en el grupo regenerante no tratado con respecto al *sham*. Sin embargo, las densidades de las bandas permanecieron sin modificación significativa en los animales HP tratados con IFN α -2b con respecto al grupo SH.

La figura 4.11 muestra un inmunoblotting típico para esta proteína. Los promedios de las densidades de banda en unidades arbitrarias fueron 401 ± 17 y 192 ± 24 en HP-vehículo y en HP-IFN, respectivamente ($p < .01$).

Figura 4.10. Efecto del IFN α -2b sobre los niveles de putrescina hepática a las 24 h de la cirugía.

Diferencia significativa vs. HP. $p < .01$.

nd, no detectable.



4.9 Disminución de la síntesis de ODC por IFN α -2b

La síntesis de novo de ODC en hepatocitos aislados resultó significativamente disminuída en los hepatocitos provenientes de los animales hepatectomizados tratados con IFN a las 12 h de la cirugía. El promedio de este porcentaje de disminución fue 79 % (Fig. 4.12). A las 24 h la síntesis de ODC no fue detectable en ningún grupo y tampoco lo fue en los hepatocitos de los animales SH en ninguno de los dos tiempos estudiados.

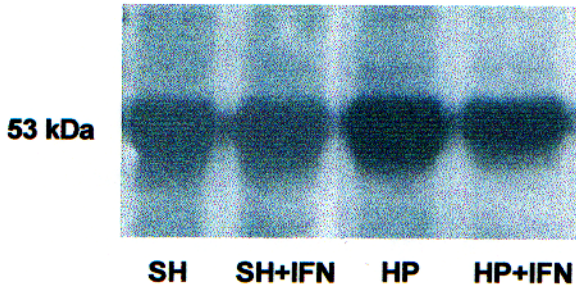


Figura 4.11. Detección de la proteína ODC en lisado hepático a las 24 h de la cirugía. La figura muestra un western blot típico para la detección de ODC. La proteína presente en 150 μg de proteína total en lisado de hígado, fue inmunoprecipitada e inmunodetectada con anticuerpo monoclonal específico y luego revelada por quimioluminiscencia como se describe en el capítulo anterior (3.2.9.1). Las bandas se cuantificaron densitométricamente.

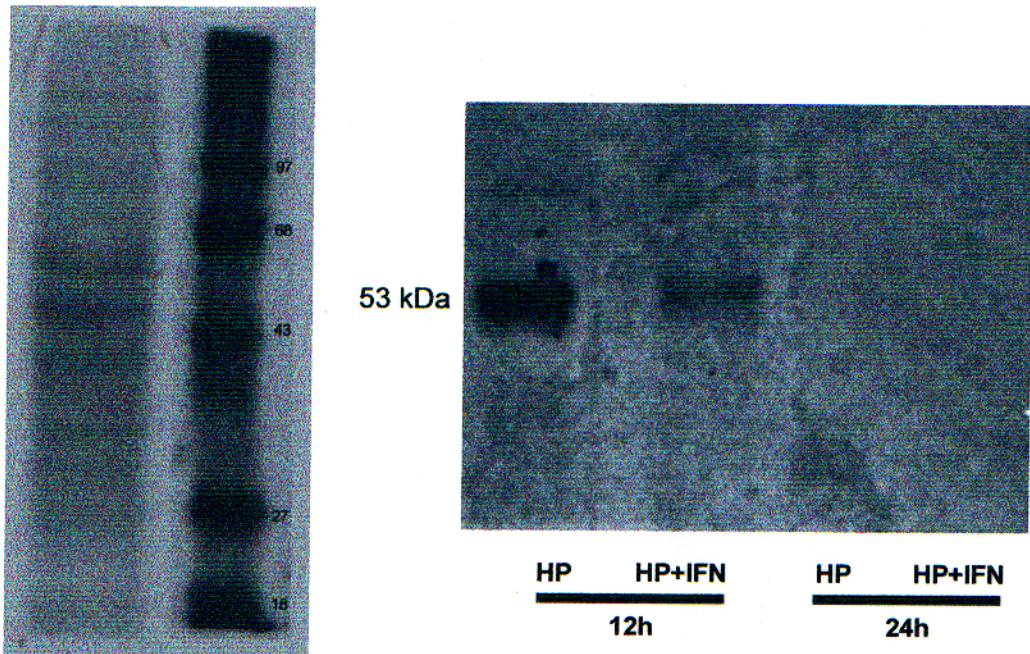


Figura 4.12. Síntesis de ODC en hepatocitos aislados a las 12 y a las 24 h de la cirugía.

Panel de la izquierda: Se sembraron en geles de poliacrilamida 10%, lisados provenientes de 20×10^6 hepatocitos incubados con un pulso de [^{35}S] metionina durante 30 min. En calles aledañas se sembraron estándares de peso molecular marcados con [^{14}C]. Los geles secados se expusieron con films radiográficos como se indica en el capítulo anterior (3.2.9.2). **Panel de la derecha:** 20×10^6 hepatocitos provenientes de pooles de suspensiones de hepatocitos de tres animales de cada grupo, se incubaron en medio DMEM con [^{35}S] metionina. ODC fue inmunoprecipitada en los lisados celulares y se detectó la [^{35}S] ODC por autorradiografía de los geles luego de SDS-PAGE desnaturizante de los inmunocomplejos. En los hepatocitos obtenidos 24 h luego de la cirugía la ODC sintetizada resultó indetectable, al igual que en los grupos SH que se omiten en la fotografía.

GP

4.10 Efecto del $IFN\alpha-2b$ sobre la síntesis de proteínas microsomales y la actividad nifedipina oxidasa microsomal durante la regeneración

La figura 4.13 muestra los cambios en la incorporación de fenilalanina tritiada en las proteínas de la fracción microsomal. Se halló una disminución significativa en los animales HP tratados con vehículo respecto a los controles tratados con vehículo ($67\pm 15\%$ del grupo *sham*). En ratas hepatectomizadas tratadas con $IFN\alpha-2b$ esta diferencia se invirtió, la incorporación de marca en las proteínas microsomales aumentó significativamente respecto al valor en el grupo SH, siendo este aumento, en promedio, de un 70%.

La figura 4.14 ilustra la actividad nifedipina oxidasa asociada a la isoforma de P450 CYP3A4 24 h luego de la cirugía. Se registró una disminución significativa de la misma en las ratas HP-vehículo (1.60 ± 0.17 y 3.20 ± 0.03 nmol/min mg en HP-vehículo y en SH-vehículo, respectivamente). Por su parte, el tratamiento con $IFN\alpha-2b$ borró este efecto inhibitor en la regeneración (2.72 ± 0.24 en HP-IFN vs. 3.10 ± 0.17 nmol/min mg en SH-IFN, $p>0.05$).

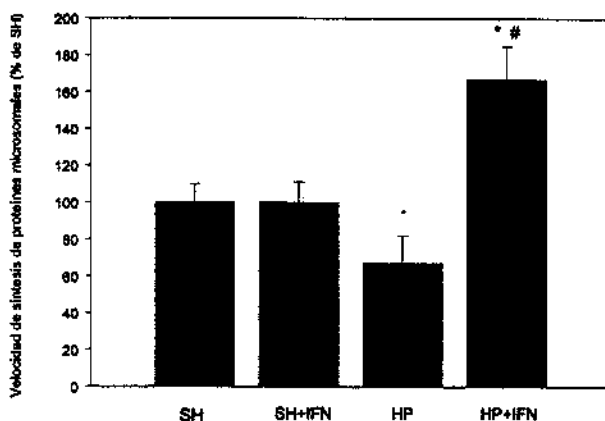


Figura 4.13. Efecto del IFN sobre la síntesis de proteínas microsomales.

* Diferencia significativa vs. SH. $p < .01$.

Diferencia significativa vs. HP. $p < .01$.

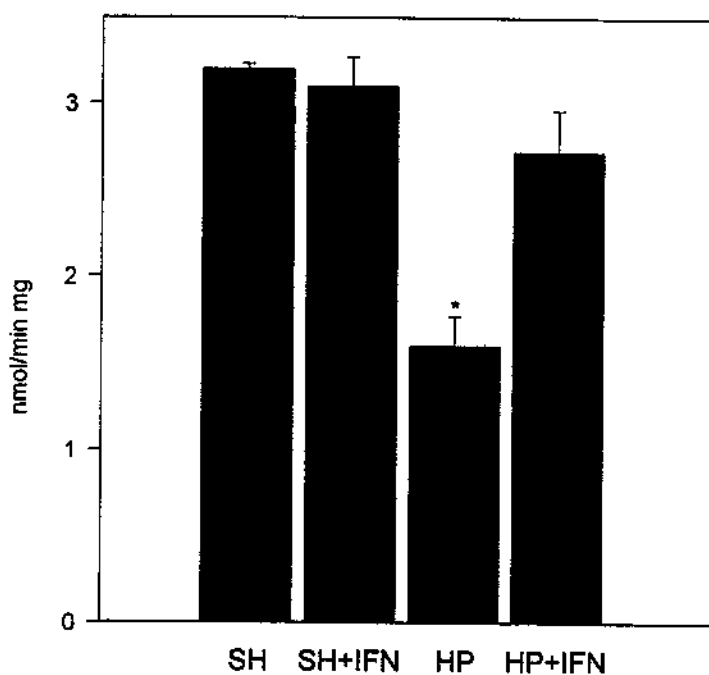


Figura 4.14. Actividad nifedipina oxidasa microsomal (CYP3A4).
* $p < .01$ vs. SH

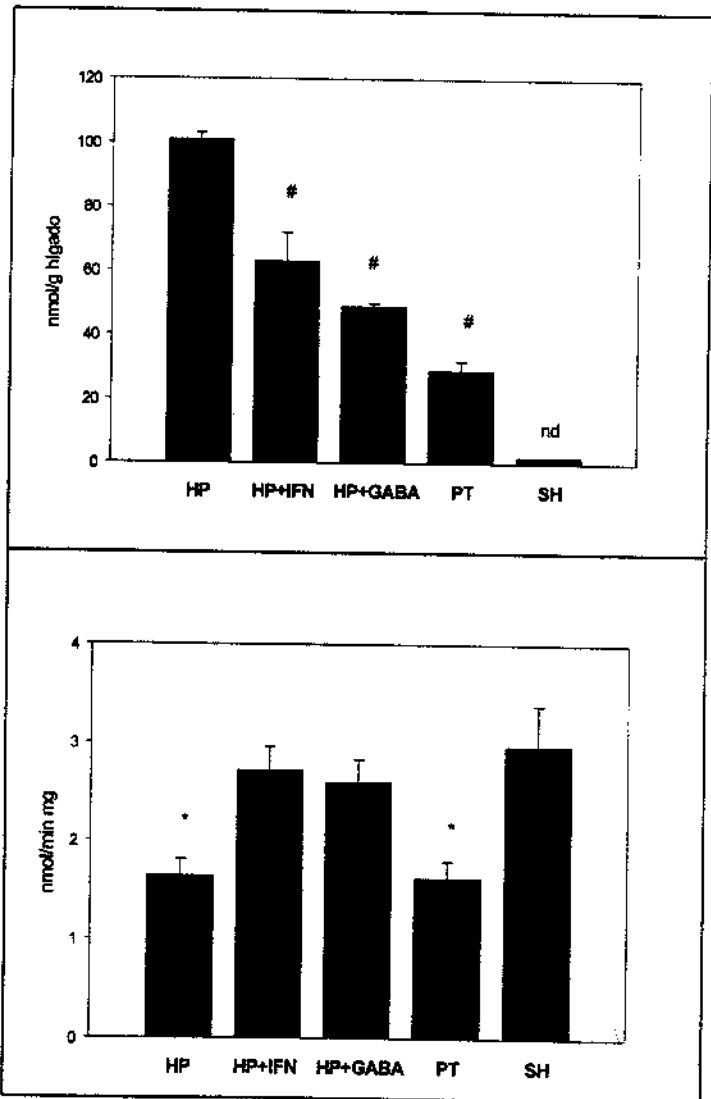
4.11 Análisis comparativo entre niveles hepáticos de putrescina y actividad NO en todos los grupos experimentales a las 24 h

A fin de hacer más claro el análisis de los efectos producidos sobre NO a lo largo de todo este estudio, y para asociar estas variaciones con los

cambios en la concentración de putrescina hepática, los resultados de estos parámetros a las 24 h de la cirugía en todos los grupos se integraron en la figura 4.15. En la misma, se ilustran las acciones inhibitoras de los tratamientos con GABA e IFN α -2b en la producción de putrescina en el hígado regenerante. Asimismo, se contrastan los valores de la actividad nifedipina oxidasa que se encontró significativamente disminuída durante la regeneración hepática, efecto que fue impedido por los tratamientos con los inhibidores.

Figura 4.15.
Putrescina y NO
hepática a las 24 h
de la cirugía.

Panel superior:
concentración de
putrescina hepática.
Panel inferior: actividad
nifedipina oxidasa (NO).
En ambos casos, se
omiten los grupos SH
tratados con GABA y
con IFN α -2b que no
difieren de los
respectivos SH-vehículo.
* Diferencia significativa
vs. SH. $p < .05$.
Diferencia significativa
vs. HP. $p < .05$.
nd, no detectable.



CAPITULO 5

**DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y
CONCLUSIONES**

AS

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

*El proceso del pensamiento viene a sustituir
un esfuerzo de la imaginación para una
examinación real de los objetos.
Jean Luc Godard*

5.1 CYP3A4, CYP1A1 Y CYP2B1/2 EN EL PROCESO REGENERATIVO

5.1.1 Resumen de los hallazgos

En la primera etapa de este trabajo de tesis se planteó el estudio de la posible mediación del aumento de putrescina en la disminución del contenido de citocromo P450 durante el proceso regenerativo del hígado.

También se analizó la contribución en la disminución de CYP total de isoenzimas particulares como CYP3A4, mayoritaria y fundamental en el metabolismo de fármacos y de CYP1A1 y CYP2B1/2 inducibles e importantes en el metabolismo de carcinógenos.

- Los hallazgos más notorios resultaron ser:
- a. Reducción de la actividad nifedipina oxidasa asociada a CYP3A4 y de la proteína inmunodetectable en el hígado regenerante subsecuente al incremento de los niveles de putrescina.
 - b. Reproducción de esta disminución en ratas tratadas con putrescina exógena.
 - c. Prevención de la disminución de CYP total y de CYP3A4 durante la regeneración con la atenuación del aumento de putrescina producida por el inhibidor de la enzima ornitina decarboxilasa, GABA.

5.1.2. Disminución de P450 durante la regeneración. Efecto de putrescina

Se sabe bastante poco de los factores que pueden regular los niveles de citocromo P450 durante la regeneración tras la hepatectomía parcial. Algunos autores han demostrado que existe un efecto temprano e inespecífico asociado al estrés quirúrgico durante las primeras horas y efectos específicos y selectivos sobre algunas isoenzimas que se extienden hacia las 48 h (143,144).

Ronis y col. (144) descartaron la posibilidad de que las alteraciones en CYP durante la regeneración se puedan deber a cambios en los niveles de la hormona de crecimiento o de estradiol y sugieren la posible participación de factores de crecimiento u otros mediadores del proceso regenerativo que podrían modificar selectivamente la expresión de algunas isoformas del sistema. Por otro lado, la disminución descrita en estos trabajos de las isoenzimas que metabolizan esteroides sexuales (principalmente la isoforma macho-específica CYP2C11) no puede dar cuenta por sí sola de la disminución en el citocromo total (143,144).

Considerando todos estos hechos, surgía la necesidad de abordar un estudio tratando de indagar otras causas que explicasen estas disminuciones más allá de las alteraciones endócrinas propuestas por otros grupos hasta el momento.

En este trabajo postulamos que la putrescina producida en el hígado regenerante podía inhibir algunas isoenzimas de P450 como se ha descrito para otras aminas que disminuyen selectivamente algunas isoformas de este sistema multienzimático (147-152).

En este estudio se utilizó GABA para reducir el aumento de putrescina en el hígado regenerante de los animales parcialmente hepatectomizados. Este derivado de las poliaminas es un inhibidor de la ornitina decarboxilasa

(ODC), la enzima que cataliza la síntesis de putrescina (ver *figura 3.2*). El tratamiento con este inhibidor produjo disminuciones cercanas al 50 % en los niveles de putrescina hepática a las 24 y 48 h luego de la hepatectomía en concordancia con resultados previos de otros autores (84). En los experimentos desarrollados en esta tesis no se observó un efecto significativo de GABA sobre la velocidad de síntesis de DNA en el hígado regenerante (*Fig. 4.1*), hecho que también concuerda con trabajos previos de otros autores (175,176). Este resultado no invalida el hecho que GABA pueda inhibir el proceso de regeneración disminuyendo la velocidad de síntesis proteica como se reporta (157). De hecho, otros inhibidores de la regeneración como el interferon no afectan la actividad timidina quinasa pero disminuyen la expresión de proteínas que actúan como reguladoras del ciclo celular como P53 y ErbB-2 (88).

Se mostró que GABA previno completamente los cambios en CYP total en el hígado regenerante (*Fig. 4.2*). Esto indicaba que las poliaminas estaban involucradas en la disminución de CYP observada durante el proceso regenerativo. Este hecho se confirmó con los resultados obtenidos en el grupo tratado con putrescina exógena. En efecto, cuando esta poliamina se administró i.v. en una dosis capaz de producir niveles comparables en magnitud a los alcanzados tras una hepatectomía parcial (59,84,177), produjo una disminución significativa de CYP total (*Fig. 4.2*).

El aumento de putrescina durante la regeneración podría ser la causa, al menos en parte, de la reducción del citocromo P450.

5.1.3 Cambios selectivos en la isoforma CYP3A4

Al analizar el comportamiento de las isoformas estudiadas se demostró que las isoenzimas inducibles no seguían el comportamiento de CYP total en

la regeneración y tampoco tras el tratamiento con putrescina. CYP1A1 y CYP2B1/2 permanecieron preservadas durante el proceso de regeneración hepática (*Fig. 4.3* y *Fig. 4.7*) lo que concuerda con algunos resultados de otros autores (143,144). Tampoco el tratamiento con inductores de estas isoformas puso de manifiesto ningún efecto subyacente de la regeneración sobre las actividades de estas isoenzimas, como se puede observar en la *figura 4.4*. El mantenimiento de estas isoformas puede resultar clave para el control del riesgo carcinogénico en el hígado regenerante.

Contrariamente, al analizar CYP3A4, de expresión constitutiva y cuantitativamente mayoritaria, se halló una disminución en el grupo HP y una reducción comparable en el grupo tratado con putrescina exógena (*tabla 4.1* y *figura 4.6*). Por otra parte, el análisis por inmunoblotting de la cantidad de la proteína CYP3A4 (*Fig. 4.7*) corroboró los hallazgos en la actividad. La disminución de la actividad NO en el hígado regenerante y en el tratamiento con putrescina exógena se debería entonces a una disminución en la cantidad de la proteína CYP3A4.

En otros trabajos se describe una disminución en las actividades de otras isoenzimas de P450 que se hace máxima entre las 48 y las 72 h tras la hepatectomía (143,145,178). En los resultados expuestos en esta tesis se mostró un comportamiento similar en la actividad NO (CYP3A4) que se mantiene disminuída hasta las 96 h (*tabla 1*) retornando completamente a valores basales hacia los diez días luego de la cirugía (datos no presentados).

Dado que CYP3A4 representa una importante proporción del CYP total, su disminución puede dar cuenta de la reducción descrita en el contenido de citocromo P450 en el hígado regenerante.

El rol que puede tener la disminución de CYP3A4 en la regeneración, si es que lo tiene, queda por dilucidarse. De cualquier manera, es indudable lo

que esto puede implicar en el metabolismo de drogas. CYP3A4 es la isoenzima principal en la depuración de inmunosupresores como ciclosporina y FK-506 que son usados en la terapia post-transplante hepático y son potencialmente tóxicos (153). La evaluación de los niveles de esta isoforma a través del ensayo por HPLC de la actividad nifedipina oxidasa en microsomas hepáticos demostró ser de gran sensibilidad para detectar las disminuciones registradas.

5.1.4 Implicancias de los hallazgos

El aumento de las poliaminas precede los aumentos en las velocidades de síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas durante la regeneración. Putrescina, la primera poliamina de la vía, parece ser esencial en el proceso (59).

Algunos efectos producidos por putrescina exógena en el hígado regenerante de rata están bastante documentados. Se describe el mejoramiento de la regeneración en injuria inducida por etanol o galactosamina (179,180). También se reportó el aumento de la sobrevivencia con disminución de los niveles séricos de transaminasas luego del transplante hepático con el tratamiento con esta poliamina (181). Se ha descrito la restauración de la velocidad de síntesis de DNA tras el tratamiento con putrescina en animales hepatectomizados en los que se produce inhibición de esta síntesis con interferon alfa-2a (81).

Con respecto a la regulación de P450, se sabe que existe un patrón de isoenzimas distinto en hígado adulto y en hígado fetal lo que sugiere la existencia de control genético de la expresión durante el desarrollo (182). Además, existen numerosos trabajos que describen el efecto de hormonas (183-185), citoquinas y factores de crecimiento como IL2, IL6, IL1, IFN γ ,

IFN β , TNF α y Liver Growth Factor (186-190). En este sentido, el estudio desarrollado en esta tesis doctoral agrega una posibilidad más de regulación de algunas isoformas de CYP por putrescina, un mediador intracelular de la proliferación. Queda por establecer a qué nivel estaría afectada la expresión de CYP3A4.

5.2 EFECTO INHIBIDOR DEL INTERFERON ALFA-2b EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

5.2.1 Resumen de los hallazgos

Hemos mencionado en capítulos anteriores la importancia de los niveles de poliaminas en la síntesis de macromoléculas durante el proceso de regeneración hepática. Los resultados expuestos hasta aquí indican que el aumento de putrescina en el hígado regenerante resultaría inhibitorio para algunas actividades asociadas a isoformas de citocromo P450 como CYP3A4. Continuando con el estudio y en virtud de antecedentes en la literatura acerca de la inhibición por $\text{IFN}\alpha$ de la actividad ODC y, por ende, de la síntesis de putrescina en cultivos celulares (156,191-194) y en hígado regenerante (80-82), se pretendió analizar el efecto del $\text{IFN}\alpha$ -2b en el hígado regenerante luego de una hepatectomía parcial. Se estudió la expresión de la proteína ODC que cataliza la producción de putrescina, y la concentración hepática de esta poliamina en animales regenerantes tratados con dosis farmacológica de $\text{IFN}\alpha$ -2b. Además, se estudió la velocidad de síntesis de DNA y la velocidad de síntesis de proteínas totales y de proteínas microsomales pretendiendo establecer las posibles consecuencias de la disminución de los niveles de putrescina en la actividad sintética. Por último, en base a los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis, se evaluó el posible efecto de este tratamiento sobre la actividad nifedipina oxidasa microsomal asociada a la isoforma principal de la familia P450, CYP3A4.

Los hallazgos más remarcables fueron:

a. Reducción importante de putrescina, de la proteína ODC total y de su síntesis *de novo* por hepatocitos aislados en el grupo regenerante tratado con $\text{IFN}\alpha$ -2b.

b. Disminución del 40% en la velocidad de síntesis de proteínas totales en el grupo regenerante tratado con esta citoquina sin cambios significativos en la velocidad de síntesis de DNA.

c. Prevención de la disminución de la actividad nifedipina oxidasa microsomal en el grupo regenerante (HP) tratado con la citoquina, sin modificaciones significativas en el grupo control (SH) tratado con IFN α -2b respecto al grupo SH-vehículo.

5.2.2 Disminución de putrescina y de la velocidad de síntesis de proteínas

Trabajos previos demostraron la inhibición de la síntesis de DNA por IFN α luego de la hepatectomía parcial en roedores (80-82) o en cultivo de células de hepatoma humano (156). En estos estudios la disminución de la síntesis de DNA se asociaba a la disminución de los niveles de putrescina.

Los picos en la velocidad de síntesis de DNA y proteínas tras la hepatectomía parcial en rata se registran, como explicamos en el primer capítulo, a las 24 h de la cirugía (83). En nuestros estudios utilizamos una dosis de IFN α -2b que no modificó la síntesis de DNA (*Fig. 4.8*) pero sí disminuyó la síntesis de proteínas totales a las 24 h (*Fig. 4.9*). Aunque estos resultados no permitirían descartar un efecto directo del IFN α -2b disminuyendo la elongación en la síntesis de proteínas mediante la activación de PKR que inhibe el factor de iniciación eIF-2, como se conoce (89), la disminución observada en la concentración de putrescina por el tratamiento con IFN α -2b podría dar cuenta de la reducción de la velocidad de síntesis de proteínas. En efecto, la disminución de putrescina fue de un 40 % en el grupo regenerante tratado con esta citoquina.

En este sentido, se ha reportado una correlación entre los niveles de esta poliamina en el hígado regenerante y la velocidad de síntesis proteica (176). Además, también se ha descrito que los cambios en la cantidad de putrescina por inhibición de su síntesis modifican la síntesis proteica en células en cultivo mucho antes de que se afecte la síntesis de DNA (53). Como mencionáramos en el primer capítulo (ver 1.1.6) las poliaminas participan en distintos niveles de la maquinaria de transcripción y traducción de proteínas para lo que sus niveles parecen resultar aún más críticos que para la duplicación del DNA. En concordancia con estos resultados, en este estudio, IFN α -2b produjo, a la dosis estudiada, una reducción tal de la síntesis de putrescina en el hígado regenerante que se disoció el efecto inhibitorio sobre la velocidad de síntesis de macromoléculas afectándose sólo la velocidad de síntesis proteica.

5.2.3 Síntesis de proteínas microsomales

Hemos visto que contrariamente a lo que sucede con la velocidad de síntesis de proteínas totales, la velocidad de síntesis de proteínas microsomales parece ser menor durante la regeneración hepática (Fig. 4.13). La síntesis de proteínas estimada de esta manera depende tanto de la síntesis de proteínas del retículo endoplasmático *per se* como la de proteínas secretorias y pertenecientes a otras organelas. Es sabido que durante el proceso regenerativo hepático disminuye la cantidad de enzimas microsomales, entre ellas algunas isoenzimas de P450 (143,178) -y aún de la isoforma mayoritaria CYP3A4, como demostramos en este mismo estudio- y de las UDP-glucuronosiltransferasas (194). Por el contrario, proteínas secretorias como la albúmina aumentan (195,196). La disminución de la

incorporación de un aminoácido marcado a las proteínas microsomales en los animales HP puede reflejar los cambios en las proteínas del primer tipo.

Por su parte, el IFN α -2b produjo un efecto opuesto al observado en la síntesis de proteínas totales. La velocidad de síntesis proteica en microsomas aumentó un 70% en el grupo HP tratado con IFN α -2b respecto al grupo control lo que representó casi una duplicación respecto al grupo HP tratado con vehículo (*Fig. 4.13*).

Este resultado paradójico podría explicarse por un cambio producido por esta citoquina durante la regeneración a nivel del tráfico de proteínas que podría conducir a una acumulación de proteínas marcadas en el compartimiento microsomal. Evidentemente, resultan necesarios otros estudios para aclarar esta hipótesis.

5.2.4 Nifedipina oxidasa e IFN α -2b

Durante la regeneración hepática existen cambios selectivos en las isoenzimas del citocromo P450 como describimos anteriormente (143,178). Resultados desarrollados también en esta tesis, muestran que la isoforma CYP3A4 que representa el 50% del citocromo P450, disminuye en el hígado regenerante paralelamente al aumento de putrescina en el hígado. En esta parte del estudio se trató de comprobar si IFN α -2b, al modificar los niveles de putrescina en el hígado regenerante, podía conducir también a cambios de la actividad nifedipina oxidasa (NO) microsomal asociada a la isoforma CYP3A4.

La actividad NO no se vio modificada por el tratamiento con IFN α en los animales controles (3.2 ± 0.03 y 3.1 ± 0.17 nmol/min mg en SH-vehículo y SH-IFN α -2b, respectivamente) y en ratas HP-vehículo siguió el mismo patrón de disminución que la síntesis de proteínas microsomales. La dosis de IFN α -2b

empleada produjo una abolición de la disminución de la actividad NO en animales regenerantes (2.52 ± 0.12 y 1.6 ± 0.17 nmol/min mg proteína tratado vs. vehículo) (*figura 14*).

La disminución de los niveles hepáticos de putrescina por el tratamiento con IFN α -2b explica estos resultados al evitar el efecto inhibitorio de esta poliamina sobre CYP3A4. En la *figura 15* se contrasta la concentración de putrescina en los distintos grupos experimentales con la actividad nifedepina oxidasa microsomal a las 24 h. Los efectos de GABA e IFN α -2b son similares en cuanto a que borran la disminución de NO observada en la regeneración al reducir de manera semejante el aumento de putrescina.

En cuanto al efecto observado por el tratamiento con putrescina exógena, si bien se registra una disminución en la actividad NO, la concentración hepática de esta poliamina a las 24 h es significativamente más baja que la del grupo HP (*figura 15, panel superior*). La putrescina administrada es rápidamente depurada por el hígado. Luego de 1 h de su inyección es detectable el nivel alcanzado en tejido (20 ± 11 nmol/g hígado), a las 6 h aumenta a una concentración de 81 ± 6 nmol/g y a las 24 h ya ha disminuído a 29 ± 3 nmol/g (*tabla 3.1*). Es posible, entonces, que el efecto máximo de esta inyección exógena de putrescina sobre NO se registre mucho antes de las 24 h y que a este tiempo, en realidad, se observe en los animales controles tratados con putrescina la acción inhibitoria sobre NO que persiste desfasada del pico de esta poliamina en el tejido hepático.

Hay varios estudios que reportan cambios de isoenzimas de P450 por IFN γ en hígado normal (197-199), pero no se disponía hasta el momento de datos acerca del efecto de IFN α -2b sobre isoenzimas individuales de la familia P450 como CYP3A4. Con el tratamiento utilizado no parece existir un efecto deletereo directo sobre CYP3A4 como podría suponerse por la acción inhibitoria atribuída a los interferones, sino, contrariamente, una

consecuencia beneficiosa producida por la disminución de los niveles de putrescina que permite que se mantenga la actividad nifedipina oxidasa en el hígado regenerante.

5.2.5 Efecto de $IFN\alpha$ -2b sobre ODC

Distintos trabajos describen la disminución de los niveles de putrescina por $IFN\alpha$ en hígado regenerante y en cultivos celulares de distinto origen (80-82,156,191-193). Este efecto es explicado por la disminución de la actividad ODC.

En el presente estudio, se ha medido el status de la proteína ODC en animales hepatectomizados y tratados con $IFN\alpha$ y la síntesis de esta proteína en hepatocitos aislados de estos animales.

Demostramos que existe una dramática disminución de la síntesis *de novo* de ODC en hepatocitos provenientes de ratas hepatectomizadas tratadas con $IFN\alpha$ -2b a las 12 h de la cirugía (*Fig. 4.12*). A este respecto, Nishiguchi y col. mostraron que la inhibición de la actividad ODC causada por $IFN\alpha+\beta$ en el hígado regenerante de ratón estaba mediada por AMPc (80). Sin embargo, la posible regulación de la síntesis de ODC por esta citoquina no ha sido indagada hasta el momento.

Los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis de que la reducción de la actividad ODC se debería a una disminución de su síntesis. Los estudios que midieron mRNA de ODC en cultivo de células tratadas con $IFN\alpha$ aportan resultados dispares. En fibroblastos 3T3 no se modifica la cantidad de mensajero (192), en células de hepatoma aumenta (156) y en células linfoblásticas de Daudi disminuye (193). Se requieren nuevos estudios, sobre todo a nivel post-transcripcional, para explicar a qué nivel el $IFN\alpha$ afecta la síntesis de ODC durante la regeneración.

5.3 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo de tesis se mostraron resultados sobre los niveles de CYP3A4, una isoenzima clave en el metabolismo de drogas, durante el proceso de regeneración hepática. Se describió la disminución de esta isoforma asociada al aumento de putrescina en el hígado regenerante. La reducción de CYP3A4 (50 % de todo el sistema P450) explica la disminución observada en CYP total y descrita desde 1960.

Es interesante considerar estos efectos si se propone el uso terapéutico de la putrescina como mejoradora de la actividad regenerativa del hígado (181) y, por otro lado, en la evaluación del manejo de fármacos en pacientes con hepatocarcinoma donde existen niveles tisulares de poliaminas elevados (200). Al respecto, se ha descrito la disminución de algunas actividades asociadas a isoenzimas de P450 en tejido tumoral de carcinoma hepatocelular (201) que podrían ser explicadas por los resultados expuestos en este trabajo de tesis.

Se requieren estudios que profundicen en el mecanismo molecular de esta disminución, sobre todo dirigidos al estudio del nivel donde estaría afectada la expresión de CYP3A4 (análisis de la cantidad y estabilidad de su mRNA en el hígado regenerante).

En otra etapa del trabajo se utilizó IFN α como inhibidor de la ornitina decarboxilasa (ODC) durante el proceso regenerativo hepático. Al analizar el efecto inhibitorio de IFN α -2b sobre la síntesis de putrescina en el hígado regenerante y sus consecuencias en la velocidad de síntesis de macromoléculas, se halló una importante disminución de la expresión de la proteína ODC y una reducción paralela de la síntesis de proteínas totales. Este efecto podría deberse a la disminución de putrescina a niveles que no logren mantener el aumento de la síntesis proteica en el hígado regenerante.

IFN α -2b es ampliamente usado en pacientes que potencialmente pueden cursar con regeneración hepática como ocurre luego del trasplante en pacientes con hepatitis C crónica. Existen controversias entre trabajos que reportan en pacientes HCV trasplantados y tratados con IFN α -2b un mejoramiento (202) o un aumento del riesgo de rechazo del trasplante (203).

También es materia de discusión el efecto de la terapia con IFN α sobre la mortalidad y la posibilidad de descompensación en el tratamiento de la cirrosis asociada a HCV (204,205).

Los resultados expuestos postulan un mecanismo básico por el cual IFN α -2b en dosis farmacológica puede inhibir el proceso regenerativo hepático.

Son necesarios más estudios en este sentido para dilucidar completamente los mecanismos moleculares que expliquen las acciones del IFN α en el hígado regenerante. Algunos puntos a desentrañar son la cascada intracelular implicada, la posibilidad de que estén participando factores nucleares como los IRF (factores regulatorios asociados a interferon) involucrados en los efectos antiproliferativos de los interferones tipo 1, inhibiendo directamente la expresión de ODC; etc.

CAPITULO 6

RESUMEN

6. RESUMEN

El hígado es un órgano con una notable capacidad de regeneración que se manifiesta ante cualquier agresión sea ésta de origen tóxico, infeccioso o quirúrgico.

La hepatectomía parcial en roedores es un incuestionable modelo para abordar el estudio del proceso regenerativo del hígado.

La regeneración comienza con una serie de eventos que conducen al hepatocito a ingresar en la fase G1 del ciclo celular. Estos cambios iniciales incluyen la activación temprana de una serie de genes como *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* y el gen *odc*. Los productos de estos genes son requeridos para la progresión del ciclo celular. *odc* codifica la enzima ornitina decarboxilasa, la primera de las enzimas de la vía sintética de las poliaminas y la limitante de esta ruta. Las poliaminas aumentan sus niveles durante cualquier proceso proliferativo en cualquier tipo de tejido. Poseen afinidad por moléculas nucleofílicas y posibilitan que aumente la velocidad de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. En la regeneración tras una hepatectomía parcial, la primer poliamina de la vía, putrescina, alcanza un máximo alrededor de las 20 h. Este aumento es indispensable para que se alcancen velocidades máximas en la síntesis de DNA y proteínas a las 24 h de la hepatectomía.

En la literatura se describe la disminución del citocromo P450 (CYP) durante la regeneración hepática sin estar aclarados los mediadores involucrados en la misma. El sistema de monooxigenasas microsomales que constituyen la Fase I de detoxificación es, en realidad una multifamilia de isoenzimas. En el hígado adulto la isoforma más abundante es CYP3A4, que

representa alrededor del 50 % del total y metaboliza una gran variedad de fármacos.

Resulta muy interesante establecer las causas de la disminución de P450 en el hígado regenerante así como conocer la contribución de isoenzimas claves de este sistema en tal disminución. Se ha descrito que algunas aminas como la histamina, análogos estructurales como los antihistamínicos, o aminas citotóxicas como la cisplatina, inhiben selectivamente isoenzimas de la familia P450. Una hipótesis que surge para explicar la disminución de P450 durante la regeneración es que las altas concentraciones de poliaminas del hígado regenerante podrían resultar inhibitorias para la actividad de algunas isoformas de P450.

En una primera parte de esta tesis el objetivo propuesto fue estudiar la posibilidad que el aumento de putrescina en el hígado regenerante estuviera involucrado en la reducción de CYP. Asimismo se pretendió analizar la contribución de la isoenzima constitutiva CYP3A4, y de las isoenzimas inducibles CYP1A1 y CYP2B1/2 en la reducción del citocromo P450 total.

Para esta parte del trabajo se evaluó el efecto de un tratamiento con putrescina exógena en animales controles en lo que respecta a los niveles de P450 total y de las isoenzimas en cuestión.

CYP3A4 se analizó mediante la medición de la actividad nifedipina oxidasa microsomal. Para CYP1A1 y CYP2B1/2 se ensayaron las actividades etoxi, pentoxi y benciloxiresorufina *o*-dealquilasas (EROD, PROD y BROD). Los estudios se realizaron a distintos tiempos luego de la cirugía.

También se redujo la producción de putrescina en el hígado regenerante tratando a un grupo de animales hepatectomizados con ácido gama amino butírico (GABA), inhibidor fisiológico de la ornitina decarboxilasa. En este grupo experimental también se midió el contenido total de CYP y las

isoenzimas particulares estudiadas y se cotejaron estos valores con los de los grupos control, hepatectomizado y tratado con la poliamina.

Los resultados mostraron una reducción comparable de CYP total y de la actividad nifedipina oxidasa (CYP3A4) en los animales hepatectomizados y en los tratados con putrescina exógena, con respecto a los controles. Esta reducción fue de un 50% en el grupo regenerante y de un 40% en los animales tratados con putrescina exógena. Por su parte, la inhibición de la síntesis de putrescina conseguida con GABA en las ratas parcialmente hepatectomizadas borró completamente las disminuciones de CYP total y de CYP3A4 en los hígados regenerantes.

Las isoenzimas EROD, PROD y BROD asociadas a CYP1A1 y a CYP2B1/2 no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

Para comprobar si los cambios en la actividad nifedipina oxidasa se debían a modificaciones en la cantidad de la proteína CYP3A4, se analizaron por inmunoblotting las preparaciones microsomales de todos los hígados. Estos ensayos corroboraron las disminuciones observadas en la actividad indicando que existía una reducción de la proteína inmunodetectable en el hígado regenerante y luego del tratamiento con putrescina.

En todos los animales se midió la concentración de putrescina en hígado.

Las conclusiones de esta primera parte del estudio se pueden resumir de la siguiente manera:

- CYP3A4, principal isoforma de P450, disminuye durante la regeneración hepática dando cuenta de la disminución hallada en el contenido total de P450.
- La reproducción de la disminución con la administración de putrescina exógena y la prevención de la misma por la atenuación de los niveles de putrescina en el hígado regenerante por inhibición de la ornitina

decarboxilasa con GABA, confirman que el aumento de putrescina durante la regeneración puede ser causa, al menos en parte, de la disminución observada.

Posteriormente, se pretendió trabajar con otros inhibidores de la síntesis de poliaminas durante la regeneración. Se halló interesante emplear una citoquina como el interferon alfa ($\text{IFN}\alpha$) con efectos inhibitorios establecidos aunque no completamente dilucidados. En el hígado regenerante existe una compleja superposición de cascadas intracelulares entre citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento. Se ha descrito la acción antiproliferativa del $\text{IFN}\alpha$ en cultivo de células de hepatoma y, por otra parte, se ha reportado que en animales hepatectomizados los IFN tipo 1 disminuyen la velocidad de síntesis de DNA y la actividad ornitina decarboxilasa.

Los interferones α son una familia de casi 20 proteínas pertenecientes a los interferones tipo 1 producidos por linfocitos y monocitos, algunos de ellos utilizados desde hace más de diez años en el tratamiento de las hepatitis crónicas por sus propiedades antivirales. Comparten receptor y vía de señalización intracelular que involucra a las proteínas STAT.

Con estos antecedentes, en una segunda etapa de este trabajo de tesis se focalizó el estudio en el efecto del $\text{IFN}\alpha$ -2b en el hígado regenerante en cuanto a síntesis de DNA, síntesis de proteínas totales y microsomales, expresión de la proteína ornitina decarboxilasa y niveles de putrescina. Asimismo, continuando con la hipótesis de la primera parte, se pretendió conocer el estado de la principal isoforma del sistema P450, CYP3A4, en animales regenerantes tratados con esta citoquina, considerando la posibilidad de que su efecto inhibitor sobre la síntesis de putrescina modulara esta isoenzima de P450 que se había hallado disminuída durante la regeneración según estudios anteriores en este mismo trabajo de tesis.

CP

La dosis utilizada de IFN α -2b (comparable a la usada terapéuticamente en adultos tratados por HCV crónica) no modificó la velocidad de síntesis de DNA pero disminuyó significativamente la velocidad de síntesis proteica en el hígado regenerante (aproximadamente en un 40%). En igual magnitud se vieron reducidos los niveles de putrescina. En cuanto a la enzima que la produce, ornitina decarboxilasa, se halló una disminución en la cantidad de proteína (inmunoprecipitación e inmunoblotting) así como en su síntesis en hepatocitos aislados (detección de [³⁵S] ODC tras pulso de [³⁵S] metionina).

Las proteínas microsomales en el hígado regenerante resultaron disminuidas en su síntesis y paradójicamente se incrementaron tras el tratamiento con interferon. Particularmente, la actividad nifedipina oxidasa asociada a CYP3A4 fue reestablecida en el grupo hepatectomizado y tratado con IFN α -2b respecto a la disminución producida durante la regeneración en el grupo hepatectomizado y tratado con vehículo.

Las conclusiones de esta etapa del estudio se resumen a continuación:

- La disminución observada en la velocidad de síntesis proteica se asociaría a la reducción de los niveles de putrescina en los animales regenerantes tratados. La concentración de esta poliamina disminuiría a valores que no logran mantener la actividad sintética de proteínas durante el proceso regenerativo.
- IFN α -2b afecta la expresión de la proteína ODC durante la regeneración hepática.
- La atenuación de los niveles de putrescina en las ratas tratadas con esta citoquina también pareció abolir la inhibición producida en la actividad nifedipina oxidasa (CYP3A4). Este hecho corrobora la hipótesis que la inhibición selectiva de esta isoenzima mayoritaria del sistema P450 está asociada al aumento de putrescina durante la regeneración hepática.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Higgins, G. M., Anderson, R. M. (1931). Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12, 186-202
2. Fausto, N., Lemire, J. M., Shiojiri, N. (1993). Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204, 237-241
3. Thorgeirsson, S. S. Hepatic stem cells in liver regeneration. (1996). *FASEB J.* 10, 1249-1256
4. Stocker E., Heine, W. D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions *Beitr. Pathol.* 144, 400-408
5. Rabes, H. M., Wirsching, R., Tuckzek, H. V., Iseler, G. (1976). Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell. Tissue Kinet.* 9, 517-532
6. Michalopoulos, G. K., DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science* 4, 60-66
7. Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 263, 1149-1152
8. Overturf, K. (1996). Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat. Genet.* 12, 266-273
9. Block, G. D. (1996). Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by

- HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell. Biol.* 132, 1133-1149
10. Nadal, C., Zajdela, F. (1966). Somatic polyploid cells in rat liver. I. The role of binuclear cells in the formation of the polyploid cells. *Exp. Cell. Res.* 42, 99-116
 11. Sargent, L. M., Sanders, N. D., Thorgeirsson, S. S. (1996). Ploidy and karyotypic alterations associated with early events in the development of hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring c-myc and transforming growth factor alpha transgenes. *Cancer Res.* 56, 2137-2142
 12. Mars, W. M., Kim, T. H., Stolz, D. B., Liu, M. L., Michalopoulos, G. K. (1996). Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. *Cancer Res.* 56, 2837-2843
 13. de Hemptinne, B., Lorge, F., Kestens, P. J., Lambotte, L. (1985). Hepatocellular hyperpolarizing factors and regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Acta Gastroenterol. Belg.* 48, 424-431
 14. Fausto, N., Laird, A. D., Webber, E. M. (1995). Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9, 1527-1536
 15. Cressman, D. E., Diamond, R. H., Taub, R. (1995). Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 21, 1443-1449
 16. Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., Haber, B. A., Taub, R. (1994). Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 269, 30429-30435

17. Taub, R. (1996). Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J.* 10, 413-427
18. Bonney, R. J., Hopkins, H. A., Walker, P. R., Potter, R. (1973). Glycolytic isoenzymes and glycogen metabolism in regenerating liver from rats on controlled feeding schedules. *Biochem. J.* 136, 115-124
19. Loyer, P., Glaise D., Cariou, S., Baffet, G., Meijer, L., Guguen-Guillouzo, C. (1994). Expression and activation of cdk2 (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration *J. Biol. Chem.* 269, 2491-2500
20. Michalopoulos, G., Houck, K. A., Dolan, N. C., Luetkeke, N. C. (1984) Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.* 44, 4414-4419
21. Schmidt, C. Blatt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702
22. Tomiya, T., Tani, M., Yamada, S., Hayashi, S., Umeda, N., Fujiwara, K. (1992) Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and nonhepatectomized surgical patients. *Gastroenterology* 103, 1621-1624
23. Lindroos, P. M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K. (1991). Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 13, 743-750
24. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443
25. Yanagita, K., Nagaïke, M., Ishibashi, H., Niho, Y., Matsumoto, K., Nakamuro, T. (1992). Lung may have an endocrine function producing

- hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 802-809
26. Moghul, A., Lin, L., Beedle, A., Kanbour-Shakir, A., DeFrances, M. C., Liu, Y., Zarnegar, R. (1994). Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 9, 2045-2052
 27. Webber, E. M., Godowski, P. J., Fausto, N. (1994). In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 19, 489-497
 28. Liu, M. L., Mars, W. M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K. (1994). Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- α in adult rat liver. *Hepatology* 19, 1521-1527
 29. Mars, W. M., Liu M. L., Kitson, R. P., Goldfarb R. H., Gabauer, M. K., Michalopoulos, G. K. (1995). Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 21, 1695-1701
 30. Matsumoto, A., Fujiwara, Y. (1991). Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 361-365
 31. Naldini, L., Vigna, E., Bardelli, A., Follenci, A., Galimi, F., Comoglio, P. M. (1995). Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J. Biol. Chem.* 270, 603-611
 32. Horimoto, M., Hayashi, N., Sasaki, Y., Ito, T., Ito, Y., Wada, S., Tanaka, Y., Kaneko, A., Fusamoto, H., Tohyama, M. et al. (1995). Expression

CP

- and phosphorylation of rat c-met/hepatocyte growth factor receptor during rat liver regeneration. *J. Hepatol.* 23, 174-183
33. Diehl, A. M., Yin, M., Fleckenstein, J., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Brenner, D. A., Westwick, J., Bagby, G., Nelson, S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.* 267, G552-G561
 34. Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J. J., Fausto, N. (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1441-1446
 35. Kawarasaki, H., Makuuchi, M., Ishisone, S., Iwanaka, T., Hashizume, K., Kawasaki, S., Matsunami, H. (1992). Partial liver transplantation from living related donors. *Transplant. Proc.* 24, 1470-1472
 36. Kordula, T., Rokita, H., Koj, A., Fiers, W., Gauldie, J., Baumamm, H. (1991). Effects of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor on the acute phase response and DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 10, 23-26
 37. Kuma, S., Inaba, M., Ogata, H., Inaba, K., Okumura, T., Saito, K., Yamamoto, M., Ikehara, S. (1990). Effect of human recombinant interleukin-6 on the proliferation of mouse hepatocytes in the primary culture. *Immunobiology* 180, 235-242
 38. Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383
 39. Jones, D. E. Jr., Tran-Patterson, R., Cui, D. M., Davin, D., Estell, K. P. Miller, D. M. (1995). Epidermal growth factor secreted from the salivary

- gland is necessary for liver regeneration *Am. J. Physiol.* 268, G872-G878
40. Rubin, R. A., O'Keefe, E. J., Earp, H. S. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 776-780
 41. Russell, W. E., Kaufmann, W. K., Sitaric, S., Luetkeke, N. C., Lee, D. C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog.* 15, 183-189
 42. Russell, W. E., Dempsey, P. J., Sitaric, S., Peck, A. J., Coffey, R. J. (1993). Transforming growth factor-alpha (TGF alpha) concentrations increase in regenerating rat liver: evidence for a delayed accumulation of mature TGF alpha. *Endocrinology* 133, 1731-1738
 43. Cruise, J. L., Houck, K. A., Michalopoulos, G. K. (1985). Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science* 227, 749-751
 44. Skov Olsen, P., Kirkegaard, P., Poulsen, S. S., Nexø, E. (1985). Adrenergic effects on renal secretion of epidermal growth factor in the rat. *Regul. Pept.* 11, 17-25
 45. Houck, K. A., Michalopoulos, G. K. (1989). Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell. Physiol.* 141, 503-509
 46. Starzl, T. E., Francavilla, A., Halgrimson, C. G., Francavilla F. R., Porter, K. A., Brown, T. H., Putnam, C. W. (1973). The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg. Gynecol. Obstet.* 137, 179-199
 47. Lynch, W. E., Surrey, S., Lieberman, I. (1975). Nuclear deoxyribonucleic acid polymerases of liver. *J. Biol. Chem.* 250, 8179-8183

48. Janne, O. Bardin C. W., Jacob, S. T. (1975). DNA-dependent RNA polymerases I and II from kidney. Effect of polyamines on the in vitro transcription of DNA and chromatin. *Biochemistry* 14, 3589-3597
49. Tabor, C. W., Tabor, H. (1976). 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 285-306
50. Sato, T., Ishikawa, K., Ogata, K. (1977). Factors causing release of ribosomal subunits from isolated nuclei of regenerating rat liver in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 474, 549-561
51. Mach, M. Kersten, H., Kersten, W. (1982). Regulation of tRNA methyltransferase activities by spermidine and putrescine. Inhibition of polyamine synthesis and tRNA methylation by alpha-methylornithine or 1,3-diaminopropan-2-ol in Dictyostelium. *Biochem. J.* 15, 153-162
52. Cochet, C., Chambaz, E. M. (1983). Polyamine-mediated protein phosphorylations: a possible target for intracellular polyamine action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 30, 247-266
53. Rudkin, B. B., Mamont, P. S., Seiler, N. (1984). Decreased protein-synthetic activity is an early consequence of spermidine depletion in rat hepatoma tissue-culture cells. *Biochem. J.* 217, 731-741
54. Holttä, E., Hovi, T. (1985). Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 152, 229-237
55. Pösö, H., Janne, J. (1976). Inhibition of polyamine accumulation and deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rat liver. *Biochem. J.* 158, 485-488
56. Wiegand, L., Pegg A. E. (1978). Effects of inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase and ornithine decarboxylase on

24

- DNA synthesis in rat liver after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta* 517, 169-180
57. Marchesini, G., Checchia, G. A., Stefanelli, C., Bianchi, G., Fabbri, A., Zoli, M., Caldera, C. M., Pisi, E. (1992). Polyamine plasma levels and liver regeneration following partial hepatic resection in man. *J. Hepatol.* 16, 159-164
58. Demetriou, A. A., Seifter, E., Levenson, S. M. (1983). Ornithine decarboxylase as an early indicator of in vitro hepatocyte DNA synthesis. *J. Surg. Res.* 35, 163-167
59. Pösö, H., Pegg, A. E. (1982). Effect of alpha-difluoromethylornithine on polyamine and DNA synthesis in regenerating rat liver: reversal of inhibition of DNA synthesis by putrescine. *Biochim. Biophys. Acta* 696, 179-186
60. Luk, G. D. (1986). Essential role of polyamine metabolism in hepatic regeneration. Inhibition of deoxyribonucleic acid and protein synthesis and tissue regeneration by difluoromethylornithine in the rat. *Gastroenterology* 90, 1261-1267
61. Minuk, G. Y., Gauthier, T., Benarroch, A. (1990). Changes in serum and hepatic polyamine concentrations after 30%, 70% and 90% partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 12, 542-546
62. Patel, A. R., Wang, J. Y. (1999). Polyamine depletion is associated with an increase in JunD/AP-1 activity in small intestinal crypt cells. *Am. J. Physiol.* 276, G441-G450
63. Tobias, K. E., Shor, J., Kahana, C. (1995). c-Myc and Max transregulate the mouse ornithine decarboxylase promoter through interaction with two downstream CACGTG motifs. *Oncogene* 11, 1721-1727

64. Li, L., Li, J., Rao, J. N., Li, M., Bass, B. L., Wang, J. Y. (1999). Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am. J. Physiol.* 276, C946-C954
65. Hu, R. H., Pegg, A. E. (1997). Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *Biochem. J.* 15, 307-316
66. Brooks, W. H. (1995). Polyamine involvement in the cell cycle, apoptosis, and autoimmunity. *Med. Hypotheses* 44, 331-338
67. Carr, B. I., Hayashi, E. L., Moses, H. L. (1986). Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res.* 46, 2330-2334
68. Michalopoulos, G. K. (1995). In: Liver regeneration and carcinogenesis, Jirtle R., Ed. Academic Press San Diego, pp.27-50
69. Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I., Fausto, N. (1988) Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1539-1543
70. Houck, K. A., Cruise, J. L., Michalopoulos, G. K. (1988). Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures. *J. Cell. Physiol.* 135, 551-555
71. Chari, R. S., Price, D. T., Sue, S. R., Meyers, W. S., Jirtle, R. L. (1995). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am. J. Surg.* 169, 126-131
72. Houck, K. A., Michalopoulos, G. K. (1989). Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell. Physiol.* 141, 503-509
73. Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaijah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Thorgeirsson, S. S. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic

- mice results in multiple tissue lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2572-2576
74. Stolz, D. B., Michalopoulos, G. K. (1997). Synergistic enhancement of EGF, but not HGF, stimulated hepatocyte motility by TGF-beta 1 in vitro. *J. Cell. Physiol.* 170, 57-68
 75. Andus, T., Bauer, J. Gerok, W. (1991). Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 13, 364-375
 76. Diehl, A. M., Rai R. M. (1996). Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 10, 215-227
 77. Gutterman, J. U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1198-1205
 78. Darnell, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421
 79. Sadowski, H. B., Shuai, K., Darnell, J. E., Gillman, M. Z. (1993). A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 261, 1739-1744
 80. Nishiguchi, S., Otani, S., Matsui Yuasa, I. (1988). Inhibition of ornithine decarboxylase induction of interferon (alpha + beta) and its reversal by dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate. *Eur. J. Biochem.* 172, 282-292
 81. Wong, S., Gauthier, T., Kaita, K. D. E., Minuk, G. Y. (1995). The differential effects of three forms of interferon alfa on hepatic regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 22, 883-886
 82. Theocharis, S. E., Margeli, A. P., Skaltsas, S. D., Skopelitou, A. S., Mykoniatis, M. G., Kittas, C. N. (1997). Effect of interferon-alpha2b

CP

- administration on rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Dig. Dis. Sci.* 42, 1981-1986
83. Fausto, N. (1994). In: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Third Edition. Arias, I. M., Ed. Raven Press, New York, pp.1059-1084.
 84. Minuk, G. Y., Gauthier, T., Gaharie, A., Murphy, L. J. (1991) The effect of GABA on serum and hepatic polyamine concentrations after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 14, 685-689
 85. Halmekytö, M., Hyttinen, J.M., Sinervirta, R., Leppänen, P., Jänne, J., Alhonen, L. (1993). Regulation of the expression of human ornithine decarboxylase gene and ornithine decarboxylase promoter-driven reporter gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 292, 927-932
 86. Morris, D. R. (1991). A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J. Cell. Biochem.* 46, 102-105
 87. Hayashi, S., Murakami, Y. (1995). Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 306, 1-10
 88. Theocharis SE, Margeli AP, Tsokos MG. (1995). Alpha 2b-interferon inhibits rat liver regeneration after partial hepatectomy without affecting thymidine kinase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 125, 588-596
 89. Hovanessian, A. G. (1993). The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology* 4, 237-245
 90. Moochhala, S., Renton, K. W., Stebbing, N. (1989). Induction and depression of cytochrome P-450-dependent mixed-function oxidase by a cloned consensus alpha-interferon (IFN-alpha CON1) in the hamster. *Biochem. Pharmacol.* 38, 439-447
 91. Goerz, G., Tsambaos, D., Schuppe, H. C., Bolsen, K., Georgiou, S., Reinauer, S., Zografakis, C. (1995). Effects of human recombinant

- interferon-alpha 2b on P450-dependent isozymes in rat liver and skin. *Skin. Pharmacol.* 8, 162-166
92. Guengerich, F. P. (1991). Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* 266, 10019-10022
 93. Omura, T., Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2381
 94. Guengerich, F. O., MacDonald, T. L. (1984). Chemical mechanisms of catalysis by cytochrome P450: a unified view. *Acc. Chem. Res.* 17, 9-14
 95. Wislocki, P. G., Miwa, G. T., Lu, A. Y. H. (1980). In: Enzymatic basis of detoxification. Jakoby, W. B., Ed. pp. 135-182
 96. Guengerich, F. P. (1987). In: Progress in drug metabolism. Bridges, J. W., Ed. pp. 1-54
 97. Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Fujii-Kuriyama, Y., González, F. J. et al (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 10, 1-14
 98. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R. (1984). Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3361-3364
 99. Szczesna-Skorupa, E., Kemper, B. (1989). NH₂-terminal substitutions of basic amino acids induce translocation across the microsomal membrane and glycosylation of rabbit cytochrome P450IIC₂. *J. Cell. Biol.* 108, 1237-1243
 100. Guengerich, F. P. (1994). In: Principles and Methods of Toxicology. Wallace Hayes, A., Ed. Raven Press, pp 1259

101. Bhat, J. G., Padmanaban, G. (1988). Heme is a positive regulator of cytochrome P-450 gene transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 584-590
102. Rangarajan, P. N., Padmanaban, G. (1989). Regulation of cytochrome P-450b/e gene expression by a heme- and phenobarbitone-modulated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3963-3967
103. Müller-Enoch, D., Churchill, P., Fleisher, S., Guengerich, F. P. (1984). Interaction of liver microsomal cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in the presence and absence of lipid. *J. Biol. Chem.* 259, 8174-8182
104. Halvorson, M., Greenway, D., Eberhart, D., Fitzgerald, K., Parkinson, J. (1990). Reconstitution of testosterone oxidation by purified rat cytochrome P450p (III A1). *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 166-180
105. Imaoka, S., Imai, Y., Shimada, T., Funae, Y. (1992). Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P450 3A forms and mechanism of their activation of catalytic activity. *Biochemistry* 31, 6063-6069
106. Guengerich, F. P. (1987). In: Progress in drug metabolism. Bridges, J. W., pp. 1-54
107. Guengerich, F. P. (1987). In: Mammalian Cytochromes P450. CRC Press, Boca Raton, FL.
108. Dannan, G. A., Guengerich, F. P., Kaminsky, L. S., Aust, S. D. (1983). Regulation of cytochrome P-450. Immunochemical quantitation of eight isozymes in liver microsomes of rats treated with polybrominated biphenyl congeners. *J. Biol. Chem.* 258, 1282-1288
109. Guengerich, F. P., Dannan, G., Wright, S. T., Martin, M. V., Kaminsky, L. S. (1982). Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and

- immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry* 21, 6019-6025
110. Dannan, G. A., Guengerich, F. P., Waxman, D. J. (1986). Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes. Role of gonadal steroids in programming, maintenance, and suppression of delta 4-steroid 5 alpha-reductase, flavin-containing monooxygenase, and sex-specific cytochromes P-450. *J. Biol. Chem.* 261, 10728-10735
111. Waxman, D. J., Dannan, G. A., Guengerich, F. P. (1985). Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* 24, 4409-4417
112. Distlerath, L. M., Reilly, P. E. B., Martin, M. V., Davis, G. G., Wilkinson, G. R., Guengerich, F. P. (1985). Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 260, 9057-9067
113. González, F. J. (1988). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40, 243-288
114. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Beaune, P., Kremmers, P., Wolff, T., Waxman, D. J. (1986). Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 261, 5051-5060
115. Guengerich, F. P. (1994). Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* 70, 133-138

116. Daujat, M., Pichard, L., Fabre, I., Pineau, T., Fabre, G., Bonfils C., Maurel, P. (1991). Induction protocols for cytochromes P450III_A in vivo and in primary cultures of animal and human hepatocytes. *Methods Enzymol.* 206, 345-353
117. Bertrault-Pères, P., Bonfils, C., Fabre, G., Just, S., Cano, J. P., Maurel, P. (1987). Metabolism of cyclosporin A. II. Implication of the macrolide antibiotic inducible cytochrome P-450 3c from rabbit liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 15 391-398
118. Vincent, S. H., Karanam, B. V., Painter, S. K, Chiu, S. H. L. (1992). In vitro metabolism of FK-506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as the major enzymes responsible for its metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 454-460
119. Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G., Cresteil, T. (1997). Expression of CYP3A in the human liver—evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur. J. Biochem.* 247, 625-634
120. Bolt, H. M., Bolt, M., Kappus, H. (1977). Interaction of rifampicin treatment with pharmacokinetics and metabolism of ethinyloestradiol in man. *Acta Endocrinol.* 85, 189-197
121. Guengerich, F. P. (1990). Metabolism of 17 alpha-ethynylestradiol in humans. *Life Sci.* 47, 1981-1988
122. Seree, E., Villard, P. H., Hever, A., Guigal, N., Puyou, F., Charvet, B., Point-Somma, H., Lechevalier, E., Lacarelle, B., Barra, Y. (1998). Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: evidence for an inverse regulation in adrenals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 392-395

123. Guengerich, F. P., Kim, D. H. (1990). In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 11, 2275-2281
124. Liddle, C., Goodwin, B. J., George, J., Tapner, M., Farrell, G. C. (1998). Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2411-2416
125. Guillen, M. I., Donato, M. T., Jover, R., Castell, J. V., Fabra, R., Trullenque, R., Gomez-Lechon, M. J. (1998). Oncostatin M down-regulates basal and induced cytochromes P450 in human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 127-1134
126. Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., Jover, R., Nakamura, T., Castell, J. V. (1998). Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 760-767
127. Greuet, J., Pichard, L., Ourlin, J. C., Bonfils, C., Domergue, J., Le Treut, P., Maurel, P. (1997). Effect of cell density and epidermal growth factor on the inducible expression of CYP3A and CYP1A genes in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 25, 1166-1175
128. Bork, R. W., Muto, T., Beaune, P. H., Srivastava, P. K., Lloyd, R. S., Guengerich, F. P. (1989). Characterization of mRNA species related to human liver cytochrome P-450 nifedipine oxidase and the regulation of catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 264, 910-919
129. Guengerich, F. P. (1992). Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 6, 745-748

130. Wattenberg, L. W. (1971). Studies of polycyclic hydrocarbon hydroxylases of the intestine possibly related to cancer. Effect of diet on benzpyrene hydroxylase activity. *Cancer (Phila)* 28, 99-102
131. Vang, O., Jensen, M. B., Autrup, H. (1990). Induction of cytochrome P450IA1 in rat colon and liver by indole-3-carbinol and 5,6-benzoflavone. *Carcinogenesis* 11, 1259-1263
132. Harada, N., Omura, T. (1981). Selective induction of two different molecular species of cytochrome P-450 by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *J. Biochem.* 89, 237-248
133. Poland, A., Knutson, J. C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517-554
134. Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307-340
135. Yang, C. S., Yoo, J. S. H. (1988). Dietary effects on drug metabolism by the mixed-function oxidase system. *Pharmacol. Ther.* 38, 53-72
136. Birt, D., Hruza, D. S., Baker, P. Y. (1983). Effects of dietary protein level on hepatic microsomal mixed-function oxidase systems during aging in two generations of Syrian hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 68, 77-86
137. Yoo, J. S. H., Hong, J. Y, Ning, S. M., Yang, C. S. (1990). Roles of dietary corn oil in the regulation of cytochromes P450 and glutathione S-transferases in rat liver. *J. Nutr.* 120, 1718-1726
138. Miller, K. W., Yang, C. S. (1984). Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone, and ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 483-491

139. Giger, U., Meyer, U. A. (1981). Induction of delta-aminolevulinat synthase and cytochrome P-450 hemoproteins in hepatocyte culture. Effect of glucose and hormones. *J. Biol. Chem.* 256, 11182-11190
140. Blanc, P., Maurel, P., Larrey, D., Michel, H. (1993). Hepatocyte regeneration. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 17, 376-385
141. Fausto, N. (1992). In: Liver regeneration. Bernuau, D., Fedlman, G., Ed.: John Libbey Eurotext, Paris pp:1-6
142. Von der Decken, A., Hutiin, T. (1960). *Exp. Cell. Res.* 19, 591-604
143. Liddle, C., Murray, M., Farrell, G. C. (1989). Effect of liver regeneration on hepatic cytochrome P450 isozymes and serum sex steroids in the male rat. *Gastroenterology* 96, 864-872
144. Ronis, M. J. J., Lumpkin, C. K., Thomas, P. E., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T. M. (1992). The microsomal monooxygenase system of regenerating liver. An examination of the role of estradiol in the demasculinization of drug metabolism produced by 2/3 partial hepatectomy. *Biochem. Pharmacol.* 43, 567-573
145. Babany, G., Descatoire, V., Corbic, M., Gendre, S., Degott, C., Larrey, D., Letteron, P., et al. (1985). Regulation of renal cytochrome P-450. Effects of two-thirds hepatectomy, cholestasis, biliary cirrhosis and post-necrotic cirrhosis on hepatic and renal microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 34, 311-320
146. Lennard MS, Crewe HK, Tucker GT, Woods HF (1986). Histamine: an inhibitor of cytochrome P-450-catalysed drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2459-2460
147. Rendic, S., Alebic-Kolbah, T., Kajfez, F., Ruf, H. H. (1982). Interaction of ranitidine with liver microsomes. *Xenobiotica* 12, 9-17
148. Speeg, K. V. Jr., Patwardham, R. V., Avant, G. R., Mitchell, M. C., Shenker, S. (1982). Inhibition of microsomal drug metabolism by

- histamine H₂-receptor antagonists studied in vivo and in vitro in rodents. *Gastroenterology* 82, 89-96
149. Vella, J. P., Sayegh, M. H. (1998). Interactions between cyclosporine and newer antidepressant medications. *Am. J. Kidney Dis.* 31, 320-323
150. Roos, P. H. (1999). Common multiple interactions of tricyclic antidepressants and orphenadrine with liver microsomal cytochrome P450 enzymes of the rat. *Xenobiotica* 29, 629-640
151. Sergejew, T. F., Hartmann, R. W., J. (1996). Effect of a diphenylethylenediamine platinum complex on steroidogenesis in rats. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 58, 243-248
152. Brandes, L. J., Queen, G. M., La Bella, F. S. (1998). Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cytochrome P450, nuclei, and chromatin from rat hepatocytes. *J. Cell. Biochem.* 69, 233-243
153. Lemoine, A., Azoulay, D., Denninson, A., Kiffel, L., Pichard, L., Furlan, V., Biennu, T., et al. (1994). FK 506 renal toxicity and lack of detectable cytochrome P-450 3A in the liver graft of a patient undergoing liver transplantation. *Hepatology* 20, 1472-1477
154. Denison, M. S., Whitlock, J. P. (1995). Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* 270, 18175-18178
155. Araya, V., Rakela J., Wright, T. (1997). Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 112, 575-582
156. Takeda, T., Nishiguchi, S., Kuroki, T., Kobayashi, K., Hasuma, T., Matsui-Yasa I., Otani, S. (1991). Reduction by interferon-alpha of levels of c-myc protein and DNA synthesis in a human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 378-384
157. Minuk, G. Y. (1993). Gamma-aminobutyric acid and the liver. *Dig. Dis.* 11, 45-54

Q

158. Carrillo, M. C., Carnovale, C. E., Favre, C., Monti, J. A., Scapini, C. (1996). Hepatic protein synthesis and serum aminoacids levels during liver regeneration in young and old malnourished rats. *Mech. Ageing and Development* 91, 55-64
159. Wannemacher, R. W., Banks, W. L. Wunner, W. H. (1964). Use of a single tissue extract to determine cellular protein and nucleic acid concentrations and rate of aminoacid incorporation. *Anal. Biochem.* 11, 320-326
160. Siekevitz, P. (1962). Preparation of microsomes and submicrosomal fractions. *Meth. Enzymol.* 5, 61-68
161. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193,265-275
162. Haugen, D. A., Coon, M. J. (1976). Properties of electroforetically homogeneous phenobarbital-inducible and β -naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 251, 7929-7939
163. Leclercq, I., Desager, J. P., Vandenplas, C., Horsmans, Y. (1996). Fast determination of low-level cytochrome P-450 1A1 activity by high-performance liquid chromatography with fluorescence or visible absorbance detection. *J. Chromatogr.* 681, 227-232
164. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Beaunne, P., Kremers, P., Wolf, T., Waxman, D. J. (1986). Characterization of rat and human liver microsomal Cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorfism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 261, 5051-5060
165. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Cf

166. Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
167. Bontemps, J., Laschet, J., Dandrifosse, G., Van Custem, J. L., Forget, P. P. (1984). Analysis of dansyl derivatives of di- and polyamines in mouse brain, human serum and duodenal biopsy specimens by high-performance liquid chromatography on standard reversed-phase column. *J. Chromatogr.* 311, 59-67
168. Garlick, P. J., McNurlan, M. A., Preedy, V. R. (1980). A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H]phenylalanine. *Biochem. J.* 192, 719-723
169. Bollag, D. M., Edelstein, S. J. (1993). In: *Protein Methods*. Wiley, J., Ed.
170. Fry, J. R., Jones, C. A., Wiebkin, P., Bellemann, P., Bridges, J. W. (1976) Mono-oxygenase activity in hepatic microsomes isolated by isoelectric precipitation. *Anal. Biochem.* 71, 341-350
171. Cummings, H. (1970). In: *Virology Tissue Culture*. 1st edition. Butleworth & Co., Ed, London, pp. 26
172. Svensson, F., Persson, L. (1996). Regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in a polyamine auxotrophic cell line. *Mol. Cell. Biochem.* 162, 113-119
173. *Meth. Enzymol.* Volume 182. (1990). Deutscher, M. P., Ed. Academic Press, Inc.
174. Laposata, E. A., Laboda, H. M., Glick, J. M., Strauss, J. F. (1987). Hepatic lipase. Synthesis, processing, and secretion by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 5333-5338
175. Minuk, G. Y., Gauthier, T. (1989). The effect of GABA on hepatic regeneration in rats (abstract). *Hepatology* 10, 607

176. Minuk, G. Y., Gauthier, T. (1993). The effect of gamma-aminobutyric acid on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 104, 217-221
177. MacIntosh, E., Gauthier, T., Pettigrew, N., Minuk, G. (1992). Liver regeneration and the effect of exogenous putrescine on regenerative activity after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatology* 16, 1428-1433
178. Jean Marie, I., Dalet, C., Blanchard, J. M., Astre, C., Szawlowski, A., Saint Aubert, B., Joyeux, H., Maurel, P. (1988). Inhibition of cytochrome P-450p (P450III_{A1}) gene expression during liver regeneration from two-thirds hepatectomy in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 37, 3515-3521
179. Diehl, A. M., Abdo, S., Braun, N. (1990). Supplemental putrescine reverses ethanol-associated inhibition of liver regeneration. *Hepatology* 12, 633-637
180. Nishiguchi, S., Kuroki, T., Takeda, T., Nakajima, S., Shiami, S., Seki, S., Matsui-Yuasa, I., et al. (1990). Effects of putrescine on D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Hepatology* 12, 348-353
181. Terakura, M., Higaki, I., Matsui-Yuasa, I., Kinoshita, H., Otani, S. (1995). Polyamine metabolism in the rat liver after orthotopic liver transplantation. *Biochim. Biophys. Acta* 1245, 207-214
182. Hakkola, J., Pasanen, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Pelkonen, O., Mäenpää, J., Rane, A., et al. (1994). Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem. Pharmacol.* 48, 59-64
183. Oinonen, T., Lindros, K. O. (1995). Hormonal regulation of the zonated expression of cytochrome P-450 3A in rat liver. *Biochem. J.* 309, 55-61

cf

184. Liao, D., Porsch-Hällström, Gustaffson, J. A., Blanck, A. (1996). Persistent sex differences in growth control of early rat liver lesions are programmed during promotion in the resistant hepatocyte model. *Hepatology* 23, 835-839
185. Pereira, T. M., Lechner, M. C. (1995). Differential regulation of the cytochrome P450 3A1 gene transcription by dexamethasone in immature and adult rat liver. *Eur. J. Biochem.* 229, 171-177
186. Tinel, M., Robin, M. A., Doostzadeh, J., Maratrat, M., Ballet, F., Fardel, N., et al. (1995). The interleukin-2 receptor down-regulates the expression of cytochrome P450 in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* 109, 1589-1599
187. Clark, M. A., Bing, B. A., Gottschall, P. E., Williams, J. F. (1995). Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 97-104
188. Monshouwer, M., Witkamp, R. F., Nijmeijer, S. M., Van Amsterdam, J. G., Van Miert, A. S. (1996). Suppression of cytochrome P450- and UDP glucuronosyl transferase-dependent enzyme activities by proinflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 137, 237-244
189. Nadin, L., Butler, A. M., Farrel, G. C., Murray, M. (1995). Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* 109, 198-205
190. García-Cañero, R., Pérez de Diego, J., Trilla, C., de Foronda, M., Díaz-Gil, J. J., Cereceda, R. M., Guijarro, M. (1996). Changes in rat liver

- microsomal enzyme activities induced by injection of rat liver growth factor into male rats. *Int. Hepatol. Commun.* 6, 92-98
191. Kelly, J. M., Gilbert, C. S., Stark, G. R., Kerr, I. M. (1985). Differential regulation of interferon-induced mRNAs and c-myc mRNA by alpha- and gamma-interferons. *Eur. J. Biochem.* 153, 367-371
192. Levine, R. A., Seshadri, T., Hann, S. R., Campisi, J. (1990). Posttranscriptional changes in growth factor-inducible gene regulation caused by antiproliferative interferons. *Cell. Regul.* 1, 215-226
193. Yonish-Rouach, E., Kimchi, A., Rubinstein, M. (1991). The antiproliferative effect of cyclosporine on hematopoietic and lymphoblastoid cell lines--common mechanistic elements with interferon-alpha. *Transplantation* 51, 1276-1282
194. Iversen, P. L., Franklin, M. R. (1985). Selective changes in cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyltransferase subpopulations following partial hepatectomy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 78, 10-18
195. Scornik, O. A., Botbol, V. (1976). Role of changes in protein degradation in the growth of regenerating livers. *J Biol Chem* 251, 2891-2897
196. Iwai, M., Kashiwadani, M., Harada, Y., Tada, K., Ishii, Y., Kitagawa, Y. et al. (1996). Synthesis of secretory protein in regenerating liver of rat after partial hepatectomy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1137-1142
197. Mochhala, S. M., Renton, K. W. (1991). The effect of IFN-alpha-Con1 on hepatic cytochrome P-450 and protein synthesis and degradation in hepatic microsomes. *Int. J. Immunopharmacol.* 13, 903-912
198. Gorce, P., Wade, A. E. (1984). Inhibition of polyribonucleic:polyribocytidylic acid-induced depression of mouse hepatic mixed function oxidases by actinomycin D or cycloheximide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 237-242

199. Cribb, A. E., Renton, K. W. (1993). Dissociation of xanthine oxidase induction and cytochrome P450 depression during interferon induction in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 46, 2114-2147
200. Kubo, S., Tamori, A., Nishiguchi, S., Omura, T., Kinoshita, H., Hirohashi, K., Kuroki, T., Otani, S. (1998). Relationship of polyamine metabolism to degree of malignancy of human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 5, 1385-8
201. Chen, T. L., Hou, W. Y., Sun, W. Z., Wu, G. J., Wang, K. C., Peng, W. L., Lin, C. J. (1997). Metabolic characteristics and enflurane defluorination of cytochrome P450-dependent monooxygenases in human hepatocellular carcinoma. *Acta Anaesthesiol. Sin.* 35, 7-14
202. Wright, T. L., Combs, C., Kim, M., Ferrell, L., Bacchetti, P., Ascher, N. et al. (1994). Interferon-alpha therapy for hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 20, 773-779
203. Feray, C., Samuel, D., Gigou, M., Paradis, V., David, M. F., Lamonnier, C. et al. (1995). An open trial of interferon alfa recombinant for hepatitis C after liver transplantation: antiviral effects and risk of rejection. *Hepatology*, 22, 1084-1089
204. Schalm, S., Fattovich, G., Brouwer, J. T. (1997). Therapy of hepatitis C: Patients with cirrhosis. *Hepatology* 26, 128S-132S
205. Valla, D. C., Chevallier, M., Marcellin, P., Payen, J. L., Trepo, C., Fonck, M., Bourliere, M., Boucher, E. et al. (1999). Treatment of Hepatitis C Virus-related cirrhosis: A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology* 29, 1870-1875

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cristina Carrillo por dirigirme con criterio en el desarrollo de este trabajo de tesis y por transmitirme su confianza y tranquilidad para ver las cosas.

Al Dr. Emilio Rodríguez Garay por permitirme desarrollar este trabajo como Becario en el Instituto de Fisiología Experimental - CONICET.

A Juan y a Cristina por su ayuda siempre generosa.

A mis amigos del Instituto de Fisiología Experimental por su afecto..., que ya es una entrañable costumbre.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad Nacional de Rosario por concederme las Becas que posibilitaron el desarrollo de estas investigaciones.