

Cambios en el sistema de defensa antioxidante inducido por Ciclosporina A

Changes in the antioxidant defence system induced by Cyclosporin A

► Carmen Rosa Araujo^{1*}, Sara Emilia Posleman^{2*},
Lilia Cristina de la Cruz Rodríguez^{3*}

-
1. Bioquímica. Profesora Adjunta Bioquímica Clínica III.
 2. Bioquímica y Farmacéutica. Profesora Asociada Bioquímica Clínica III.
 3. Doctora en Bioquímica. Profesora Titular Bioquímica Clínica III.

* Instituto de Bioquímica Aplicada. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Balcarce 747. 4000 SAN MIGUEL DE TUCUMÁN. Argentina. Teléfono: 54-0381-4310994.

Resumen

La Ciclosporina A (CyA) es un inmunosupresor que presenta efectos adversos como la hepatotoxicidad. Se estudió el efecto de CyA sobre el sistema de defensa antioxidante (SDA), su relación con la lipoperoxidación y la función hepática. Ratas machos *wistar* de 200-260 g de peso fueron tratadas durante 7 días (agudo) y 120 días (crónico) con dosis orales de CyA de 5 y 20 mg/kg/día. Se estudió el SDA midiendo el contenido hepático total de glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT); el perfil de funcionamiento hepático (PFH) se realizó determinando aspartato aminotransferasa (AST), alanín aminotransferasa (ALT) y bilirrubina total (Bt) y para la lipoperoxidación se midieron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT). Los resultados fueron confirmados con estudios histológicos. El tratamiento agudo con 20 mg/kg/día de CyA mostró aumento significativo de SRAT ($30,51 \pm 1,97$ nmol/g), pérdida de GSH ($2,47 \pm 0,06$ μ mol/g), incremento significativo de GPx ($663,25 \pm 1,88$ mU/mg) y CAT ($290,65 \pm 3,31$ mU/mg). El tratamiento crónico con 5 mg/kg/día de CyA mostró disminución tiempo-dependiente del SDA con disminución de GSH ($3,19 \pm 0,05$ μ mol/g), GPx ($569,6 \pm 2,67$ mU/mg) y CAT ($223,3 \pm 2,78$ mU/mg), sin cambios en SRAT. Los resultados del tratamiento crónico y agudo con 20 mg/kg/día de CyA son coincidentes y sólo en esta dosis se observaron alteraciones de la histo-arquitectura del parénquima hepático. Se concluye que dosis de 20 mg/kg/día de CyA en tratamiento agudo y crónico provocan lipoperoxidación con compromiso del SDA y alteración del hepatocito; dosis de 5 mg/kg/día de CyA en tratamiento crónico producen deterioro reversible del SDA sin lipoperoxidación. La inmunosupresión aplicada en clínica con dosis de 3 a 8 mg/kg/día produciría disminución del SDA sin cambios en la histo-arquitectura del parénquima hepático.

Palabras clave: ciclosporina A * sistema de defensas antioxidantes * glutatión * glutatión peroxidasa * catalasa * lipoperoxidación

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Summary

Cyclosporin A (CyA), an immunosuppressive agent, exerts adverse effects such as hepatotoxicity. The effect of CyA on the Antioxidant Defence System (ADS), its relation to lipoperoxidation, and liver function were studied. Assays were performed on male wistar rats weighing 200-260 g during acute (7 days) and chronic (120 days) treatment with oral doses of CyA of

5 and 20 mg/kg/day. ADS was studied in rat liver homogenate by measuring the liver content of total glutathion (GSH), glutathion peroxidase (GPx) and catalase (CAT); the Liver Profile Test (LPT) was measured by determining aspartate amino transferase (AST), alanin amino transferase (ALT) and total bilirubin (TB), and lipoperoxidation by determining thiobarbituric acid reactive substances (TRAS). The results were confirmed by histological studies. In the acute treatment, 20 mg/kg/day with CyA, a significant increase in TRAS (30.51 ± 1.97 nmol/g), a loss of GSH (2.47 ± 0.06 μ mol/g) and a significant increase in GPx (663.25 ± 1.88 mU/mg) and CAT (290.65 ± 3.31 mU/mg) were observed. In the chronic treatment, 5 mg/kg/day with CyA, a time-dependent decrease in the ADS with a diminution in GSH (3.19 ± 0.05 μ mol/g), GPx (569.6 ± 2.67 mU/mg) and CAT (223.3 ± 2.78 mU/mg) were observed, with no changes in TRAS. The results for the chronic and acute treatment with 20 mg/kg/day of CyA are coincident, only this dose causing alterations in liver parenchyma histoarchitecture. CyA doses of 20 mg/kg/day during acute and chronic treatment cause lipoperoxidation with ADS involvement and hepatocyte alteration. CyA doses of 5 mg/kg/day during chronic treatment cause deterioration in the ADS with no lipoperoxidation, hepatotoxicity being reversible. Immunosuppression in human patients with 3 to 8 mg/kg/day doses, would cause a decrease in the ADS with no structural or functional changes in the hepatocyte.

Key words: cyclosporin A * antioxidant defence system * glutathion * glutathion peroxidase * catalase * lipoperoxidation

Introducción

El hígado, órgano principal involucrado en el metabolismo de los fármacos, está expuesto al estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno, tanto en el sistema mitocondrial como en el microsómico y por la formación de derivados de oxígeno reducido catalizados por la NADPH oxidasa en las células de Küpffer, los polimorfonucleares y los macrófagos (1).

Numerosos autores han reconocido a los radicales libres de oxígeno como agentes beneficiosos en circunstancias patológicas, tales como procesos inmunitarios del organismo frente a las infecciones, respuesta a la inflamación tisular, actividad fagocítica de neutrófilos o poder bactericida de leucocitos. Pero también se pueden comportar como agentes patógenos *per se*, desencadenando graves consecuencias como el daño en la isquemia intestinal, injuria gástrica por hemorragia, distrés respiratorio del adulto, enfermedades autoinmunes, rechazo de órganos transplantados y cáncer, entre otras (2).

Para combatir el estrés oxidativo el hígado está dotado de un conjunto de mecanismos conocido como "sistema de defensa antioxidante" (SDA) el que incluye micronutrientes tales como las vitaminas C y E, proteínas ricas en grupos tioles y proteínas secuestradoras de metales como la ferritina y enzimas que metabolizan los metabolitos reactivos, como la epóxido hidrolasa, y los derivados del oxígeno reactivo como la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (3).

Sin embargo, el mecanismo antioxidante más importante es el mediado por el glutatión (GSH). El contenido hepático de GSH oscila entre 5 y 10 nmol/L y está influenciado por varios factores: la disponibilidad

de aminoácidos precursores, la actividad de gamma glutamylcistein sintetasa (GGCS), el flujo de GSH desde el hígado, el uso intracelular del GSH como agente reductor de peróxidos tóxicos, la conjugación con metabolitos electrofílicos y por la combinación de todos estos factores (4).

Así también las especies reactivas de oxígeno han sido involucradas en los mecanismos de toxicidad por drogas de uso terapéutico (5). Entre ellas, la Ciclosporina A (CyA), un decapeptido cíclico de origen fúngico actúa como un potente inmunosupresor y es usado en el tratamiento de pacientes transplantados. Su uso está asociado con efectos adversos principalmente en hígado y riñón, observados en humanos y ratas (6-12). Dichos efectos son atribuidos tanto a la droga madre como a los metabolitos resultantes de su biotransformación por el sistema de citocromo P450 (13).

El efecto tóxico de CyA sobre el parénquima hepático en períodos de corto tratamiento y altas dosis se manifiesta como un síndrome colestásico en ratas y humanos. Diferentes autores han mencionado como procesos responsables de este síndrome a los cambios en la fluidez de la membrana plasmática, a la alteración de los transportadores de membrana y al GSH reducido del hepatocito y su secreción en la bilis (10) (14).

Resultados discordantes han sido reportados sobre el contenido de GSH en la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad inducida por CyA (14-17).

Ha sido publicado recientemente que el estrés oxidativo inducido por CyA en dosis de 10 y 20 mg/kg/día en fase aguda produce disminución en el SDA, especialmente alteraciones en la homeostasis del GSH, lo que compromete a los procesos basados en la detoxificación y protección contra el estrés oxidativo (18) (19).

Otros autores que trabajan en cultivo de células han señalado al desbalance entre las enzimas antioxidantes SOD y CAT como responsable del principal mecanismo de acumulación de peróxidos y muerte del hepatocito (20).

Algunos investigadores han publicado cambios en el metabolismo del GSH en ratas tratadas con CyA. Los cambios fueron observados en hígado y en riñón. Las alteraciones observadas en hígado no fueron relacionadas con las dosis y el tiempo de tratamiento (21).

Sin embargo, la posible progresión de los efectos hepatotóxicos de CyA cuando se incrementan las dosis y el tiempo de tratamiento, aún no ha sido investigada.

En el presente trabajo se estudió el SDA midiendo el contenido hepático total de GSH y las enzimas antioxidantes GPx y CAT y la lipoperoxidación midiendo SRAT, en ratas tratadas con CyA a dosis de 5 y 20 mg/kg/día en periodos cortos de una semana y prolongados de 16 semanas. Estos resultados se relacionaron con los obtenidos en el *test* de perfil hepático que comprendió la determinación de bilirrubina total (Bt), aspartato aminotransferasa (AST) y alanin aminotransferasa (ALT). Los hallazgos se correlacionaron con la observación microscópica del parénquima hepático y el cálculo del radio hepatosómico.

Materiales y Métodos

ANIMALES, TRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO

Los experimentos se realizaron en ratas machos *wistar* de 200 a 260 g de peso corporal, hospedadas en jaulas estándares en un ambiente de 12 horas de luz a 21 °C y 50-70% de humedad. Fueron alimentadas con dieta estándar para roedores y agua corriente de bebida, bajo estricto cumplimiento de las Normas Internacionales de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y de Laboratorio (GLP).

Se utilizó CyA soluble en agua (Sandimmun Neoral 10 mg) de Laboratorios Novartis. Se preparó una solución de CyA de 1 mg/mL en agua destilada a temperatura ambiente.

Se dividieron los animales al azar en cinco grupos de ocho cada uno (n=8).

Grupo A (control): alimentados exclusivamente con dieta estándar.

Grupo B1: alimentados con dieta estándar suplementada con CyA 5 mg/kg/día durante una semana.

Grupo B16: alimentados con dieta estándar suplementada con CyA 5 mg/kg/día durante 16 semanas.

Grupo C1: alimentados con dieta estándar suplementada con CyA 20 mg/kg/día durante una semana (7 días).

Grupo C16: alimentados con dieta estándar suplementada con CyA 20 mg/kg/día durante 16 semanas (120 días).

Los tiempos de tratamiento permitieron reproducir el esquema de inmunosupresión que se aplica en humanos y de este modo evaluar los efectos del tratamiento agudo y crónico con diferentes dosis de CyA.

Al comienzo del ensayo se pesaron los animales y se recogieron muestras de sangre por punción de la vena de la cola. Al final del tratamiento agudo y crónico se recogieron muestras de sangre por punción intracardiaca sin anticoagulante para obtener suero y determinar el perfil hepático y con EDTA para determinar la concentración en sangre de CyA.

A los días 8° y 121° de los tratamientos con CyA, los animales se pesaron nuevamente y se sacrificaron por decapitación para asegurar el desangrado total, sin uso de anestésicos para evitar interferencias o resultados falsos. Los hígados se removieron rápidamente y se lavaron *in situ* con solución salina isotónica fría. Se pesaron con el objeto de calcular el radio hepatosómico. Se preparó el homogenato pesando 1 g de hígado y colocándolo en 10 mL de *buffer* frío $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.40. Se utilizó un homogeneizador Potter - Elvehjem provisto con tubo de vidrio y paleta de teflón. El procedimiento se efectuó en baño de hielo.

Para la observación microscópica se removieron pequeñas porciones de cada hígado, se lavaron con solución fisiológica y se colocaron en solución de formol al 10%. Las porciones se incluyeron en parafina, se corataron con micrótomo en láminas de 5 a 6 μ de espesor y se colorearon con hematoxilina-eosina.

ENSAYOS BIOQUÍMICOS EN HOMOGENATO DE HÍGADO

El contenido hepático total de GSH se determinó pesando una parte de homogenato de hígado en cinco volúmenes de ácido pícrico al 1% como desproteinizante. La solución resultante se centrifugó y al sobrenadante libre de proteínas se agregó 2-vinilpiridina (2 μ L por cada 100 μ L de sobrenadante). Se mezcló vigorosamente durante 1 min y se dejó en reposo entre 20 a 60 min a 25 °C para que el GSH reducido presente se transforme en glutatión oxidado (GSSG). Una alícuota (100 μ L) de esta solución se colocó en una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz con la siguiente mezcla: 700 μ L de NADPH 0,3 mM, 100 μ L de ditio-bis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) 6 mM y se llevó a un volumen final de 1 mL con agua destilada (pH final: 7-7.40).

Con el agregado de 10 μ L de glutatión reductasa (GR) (50 U/mL) a la mezcla equilibrada a 30 °C se determinó el contenido hepático total de GSH de la alícuota ensayada, de acuerdo al método de Griffith (22).

El contenido de GSH + GSSG hepático se expresó en $\mu\text{mol/g}$ de proteína.

La actividad catalítica de CAT se determinó por espectrofotometría a 240 nm, según Aebi (23). Se consideró una unidad de actividad igual a 1 μM de H_2O_2 degradada por minuto, por mg de proteína. Se expresó en mU/mg de proteína.

Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (generalmente 30 s) o la formación de burbujas en la cubeta debido a la liberación de O_2 , es necesario usar una concentración relativamente baja de H_2O_2 (10 mM). La dependencia de la temperatura es mínima, por ello la medida puede hacerse entre 0 y 37 °C; en este ensayo se seleccionó 20 °C. Las medidas se realizaron a pH 7.40.

Se utilizaron los siguientes reactivos: *buffer* fosfato 50 mM pH 7.40; peróxido de hidrógeno 30 mM diluido en *buffer* fosfato, concentración final 10 mM.

Para medir CAT en el homogenato de hígado obtenido se hicieron diluciones con *buffer* fosfato pH 7.40 (1:100 a 1:500).

La enzima es muy estable hasta 6 días a 2 °C, sin embargo, en los homogenatos su actividad declina rápidamente. Las diluciones del homogenato se analizaron entre 5 y 10 min después de obtenido.

La actividad de GPx se determinó con el método de Flohe y Gunsler (24). La actividad se expresó en mU/mg de proteína.

El GSSG formado durante la reacción de la GPx es instantáneo y continuamente reducido por un exceso de GR. Esta reducción se monitoreó espectrofotométricamente por la oxidación concomitante de NADPH a NADP.

Se utilizaron los siguientes reactivos: *buffer* fosfato 0,1 M pH: 7,40, EDTA 1 mM; 2,4 U/mL de GR (de levadura) preparada a partir de una suspensión comercial cristalina (5 mg/mL; 120 U/mg). Preparación diaria y conservación en frío, GSH 10 mM en agua, NADPH 1,5 mM en NaHCO_3 0,1% y H_2O_2 1,5 mM al 30%.

Para medir GPx se usaron 100 μL de homogenato preincubado a 37 °C con 500 μL de *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,40, 100 μL de GR que equivalen a 0,24 U y 10 μL de GSH 10 mM. Luego se agregaron 100 μL de NADPH y 100 μL de H_2O_2 . Durante 5 minutos se midió la disminución de la absorbancia a 340 nm.

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT) son marcadoras de peroxidación lipídica; fueron determinadas en homogenato de hígado, según el método de Ohkawa y col (25); un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^5 \text{ l/mol} \times \text{cm}$ se usó en el cálculo de los equivalentes de concentración de malondialdehído (MDA). Los resultados se expresaron en nmol/g de tejido.

Las proteínas totales en el homogenato de hígado de ratas se determinaron según Lowry (26), con albúmina bovina sérica como estándar.

ENSAYOS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE SANGRE

SUERO

El perfil de funcionamiento hepático (PFH) incluyó la determinación en suero de las aminotransferasas (ALT y AST) por método UV y de bilirrubina total (Bt) por diazorreacción (27-29).

PLASMA

Se determinó CyA en sangre por un inmunoensayo de polarización de la fluorescencia (FPIA) (30) con un equipo AXSYM (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

REACTIVOS

Las actividades enzimáticas de aminotransferasas y Bt se ensayaron con equipos de Wiener Lab. (Rosario, Argentina).

Las drogas y reactivos usados en la preparación de los *buffers* y GSH, DTNB, glutatión reductasa, NADPH, 2 vinilpiridina, GPx, CAT, SRAT y MDA fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La CyA fue de Sandimmun (Novartis, Basle, Switzerland).

ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis de la varianza y la posterior comparación de medias se realizó mediante el *Test* de Tukey con un alfa de 5%.

Resultados

Los cuatro grupos de ratas tratadas se sometieron a diferentes dosis de CyA. Grupos B: 5 mg/kg/día y Grupos C: 20 mg/kg/día durante períodos distintos: de 7 días y de 120 días con la finalidad de reproducir en ellos el tratamiento agudo y crónico del inmunosupresor usado en humanos.

Durante el ensayo a cronicidad, 120 días, los animales de los diferentes grupos aumentaron de peso, lo cual coincidió con hallazgos reportados por otros autores (19) (31). Los valores del radio hepatoesómico se midieron al final del tratamiento y después de sacrificados los animales; no mostraron diferencias significativas en los Grupos B1, B16 y C1 respecto de A. El Grupo C16 mostró disminución significativa respecto de A. Estos resultados se observan en la Tabla I.

Todos los animales conservaron su estado de salud y ninguno de ellos murió durante el tratamiento.

La CyA administrada por vía oral es absorbida de modo variable e incompleto a nivel del tracto gastrointestinal. Para determinar su concentración en sangre,

Tabla I. Radio hepatosómico en los diferentes grupos tratados con CyA

Grupos	Radio hepatosómico
A (control)	3,62±0,06
B1 (5 mg/kg/día durante 7 días)	3,22±0,08
B16 (5 mg/kg/día durante 120 días)	3,12±0,08
C1 (20 mg/kg/día durante 7 días)	3,35±0,06
C16 (20 mg/kg/día durante 120 días)	2,25±0,05

Radio hepatosómico:	$\frac{\text{Peso de hígado} \times 100}{\text{Peso corporal total}}$
---------------------	---

a los días primero, octavo y ciento veintiuno de los diferentes grupos se extrajeron muestras de sangre.

La Figura 1 muestra la concentración de CyA en sangre de ratas tratadas con dosis de 5 y 20 mg/kg/día. Se observa que la cantidad de CyA en sangre es directamente proporcional a las dosis administradas y es equivalente para los animales de los Grupos B (B1 y B16) y de los Grupos C (C1 y C16) en fase aguda (7 días) y fase crónica (120 días). Dosis de 5 mg/kg/día dieron concentraciones en sangre de CyA de 200±24 ng/mL en los grupos B1 y B16. Dosis de 20 mg/kg/día dieron concentraciones en sangre de CyA de 598±57 ng/mL en los grupos C1 y C16.

El SDA se estudió midiendo el contenido hepático total de GSH y las enzimas antioxidantes GPx y CAT. Para corroborar la lipoperoxidación inducida por el tratamiento de CyA se midieron las SRAT expresadas en nmol/g de hígado.

Concentración de CyA en animales tratados en fases aguda y crónica

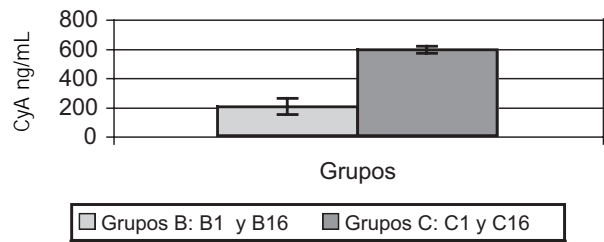


Figura 1. Concentraciones de CyA en sangre de ratas tratadas con dosis de 5 y 20 mg/kg/día. Los valores para los distintos Grupos (n=8) son:

Grupos B (B1 y B16): 200 ± 24 ng/mL de CyA en sangre.

Grupos C (C1 y C16): 598 ± 57 ng/mL de CyA en sangre.

La Figura 2 muestra la disminución, estadísticamente significativa, en el contenido hepático de GSH en los Grupos C, tanto en fase aguda (C1) como en fase crónica (C16) respecto del Grupo A (control). Dosis de 20 mg/kg/día produjeron una disminución del contenido hepático de GSH total en un 32% en fase aguda (Grupo C1) y en un 45% en fase crónica (Grupo C16).

El contenido hepático de GSH en los Grupos B tiene un comportamiento variable con el tiempo de exposición a CyA. Mientras el Grupo B1 no exhibe diferencias significativas respecto de A, el Grupo B16 muestra una disminución de 22% en el contenido de GSH en fase crónica, respecto del Grupo A.

Contenido hepático de glutatión en los grupos control y tratados con diferentes dosis de CyA en fase aguda y crónica

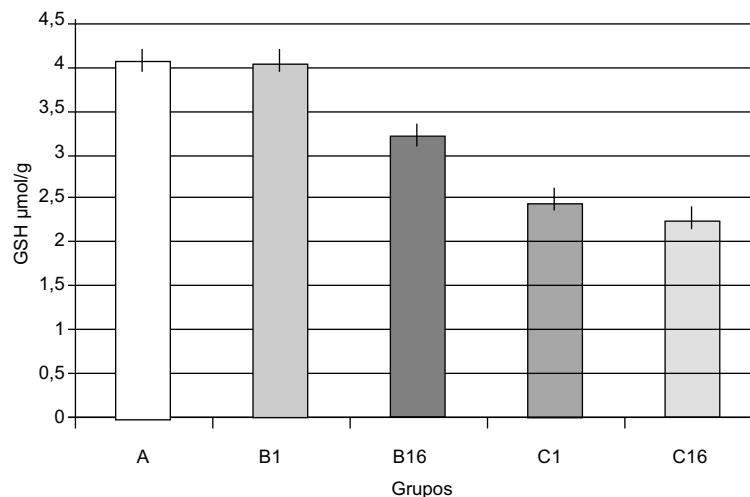


Figura 2. Glutatión hepático total en homogenato de hígados de ratas tratadas con CyA. Se observa que los grupos con dosis de 20 mg/kg/día (C1 y C16) presentan disminución del contenido total de glutatión. En dosis de 5 mg/kg/día sólo en tratamiento crónico durante 120 días (B16) presenta una disminución estadísticamente significativa de GSH respecto de A.

Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico con dosis de 5 y 20 mg/kg/día de CyA en fase aguda y crónica

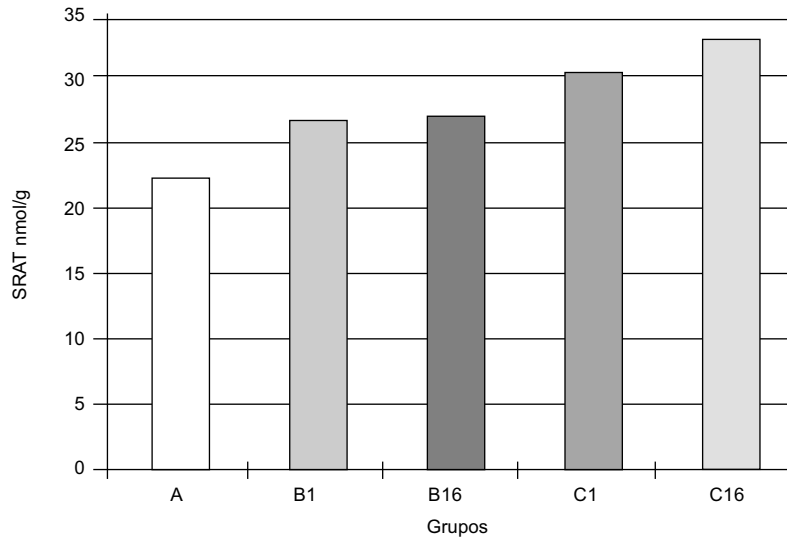


Figura 3. SRAT en homogenato de hígado de ratas tratadas con CyA. Se observa que dosis de 20 mg/kg/día, Grupos C1 y C16, presentan un aumento estadísticamente significativo de SRAT respecto de A. El incremento de C16 respecto de C1 muestra que es tiempo-dependiente.

En la Figura 3 se observa que dosis de 5 mg/kg/día no produjeron aumento significativo de SRAT. Dosis de 20 mg/kg/día exhibieron un aumento significativo de SRAT respecto de A. Se interpretó que los niveles de SRAT son tiempo-dependiente.

Para determinar el posible mecanismo responsable

de los cambios observados en el contenido de GSH (Figura 2), se midió la actividad de GPx en homogenato de hígado. La Figura 4 muestra el incremento, estadísticamente significativo, de GPx en el grupo C1 respecto del Grupo A. Dosis de 20 mg/kg/día durante 7 días disminuyeron el contenido de GSH hepático e incremen-

Actividad de glutatión peroxidasa en grupos control vs. grupos tratados con CyA a diferentes dosis en fase aguda y crónica

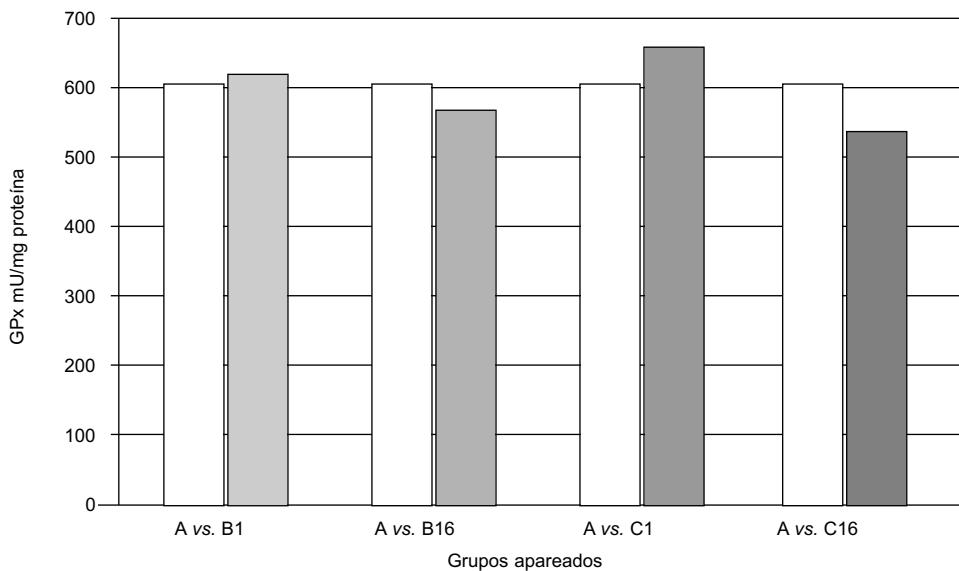


Figura 4. Actividad de GPx en mU/mg de proteína de homogenato de hígados de ratas. El gráfico muestra los valores promedios de los Grupos tratados B1, B16, C1 y C16 apareados con el Grupo Control A.

taron los niveles de GPx, en un intento por neutralizar las especies reactivas de oxígeno o compuestos electrofílicos resultantes de la biotransformación de CyA.

La disminución, estadísticamente significativa, de GPx en el Grupo C16 respecto del Grupo A -dosis de 20 mg/ kg/ día durante 120 días- se relacionó con el incremento, estadísticamente significativo concomitante, de los niveles de SRAT en este grupo (Figura 3) (Figura 4).

La Figura 5 muestra la disminución, estadísticamente significativa, de la actividad de CAT en los grupos B16 y C16, en tratamiento crónico, respecto del grupo A. Un incremento significativo de CAT se observa en

el Grupo C1 respecto del Grupo A y del Grupo C16. Es posible que este comportamiento "dispar" de esta enzima para una misma dosis de CyA (20 mg/kg/día) se deba al agotamiento en el tiempo de los mecanismos antioxidantes enzimáticos.

El perfil de función hepática que incluye las determinaciones de Bt, AST y ALT, para los diferentes grupos tratados, no mostró efectos colestásicos ya que no se detectaron incrementos significativos de Bt y ALT. Sólo AST mostró para el Grupo C16 un aumento significativo respecto de A (datos no mostrados).

La Figura 6 muestra el parénquima hepático normal

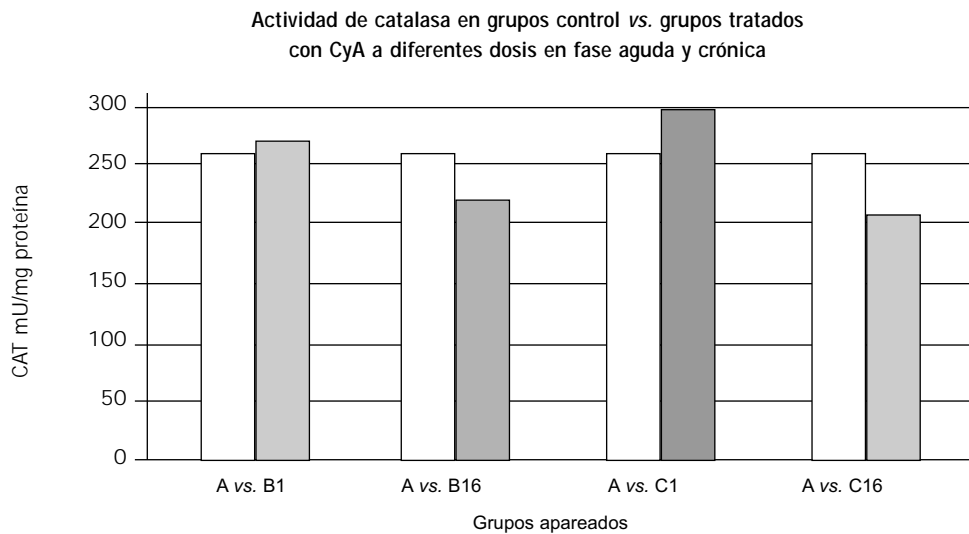


Figura 5. Actividad de CAT en mU/mg de proteínas de homogenato de hígado de ratas. El gráfico muestra los valores promedios de los Grupos tratados B1, B16, C1 y C16 apareados con el Grupo control A

Corte histológico del parénquima hepático de ratas del Grupo Control A.
Técnica de hematoxilina-eosina (10x)

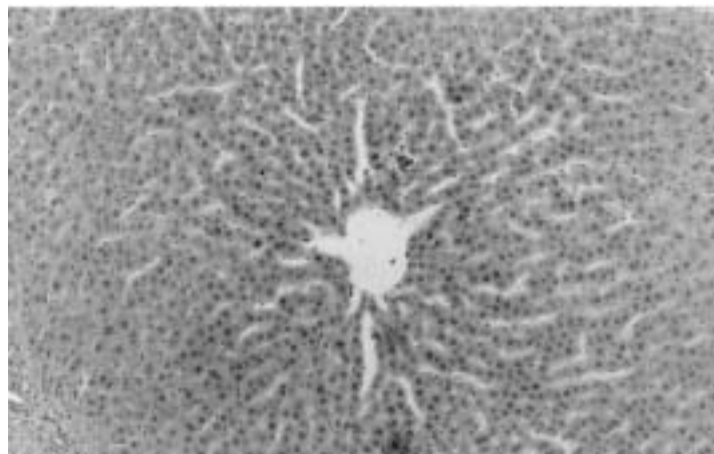


Figura 6. Vista panorámica del parénquima hepático normal. Se observan hepatocitos formando hileras. Los espacios en blanco corresponden a los sinusoides.

del Grupo A, control. Pueden observarse los hepatocitos dispuestos en cordones alrededor de la vena central, con tinción de hematoxilina-eosina (10x).

En la Figura 7 se observa un corte histológico del Grupo C16, tratado con 20 mg/kg/día durante 120 días. Cambios en la histo-arquitectura del parénquima hepático, con infiltrados de elementos mononucleares en el intersticio, se indican con flecha. Los grupos restantes no presentaron modificaciones estructurales en el parénquima hepático (datos no mostrados).

Discusión

El estudio del efecto hepatotóxico inducido por CyA ha dado lugar a numerosas publicaciones que tratan de explicar el o los posibles mecanismos de toxicidad.

La disminución o alteración de la función bioquímica de los hepatocitos puede ser inducida directamente por el inmunosupresor o por los metabolitos resultantes de su biotransformación.

Entre los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno de hepatotoxicidad pueden citarse el desbalance energético por incremento del consumo de ATP o disminución en la producción de ATP, evento temprano en el curso de la toxicidad inducida por drogas que precede a los estados irreversibles de injuria celular. La mitocondria ha sido propuesta frecuentemente como blanco de acción hepatotóxica. Varios mecanismos pueden estar involucrados: inhibición del metabolismo mitocondrial a nivel del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa; daño estructural de la mitocondria por peroxidación de los lípidos de membrana, alteración del potencial de membrana, da-

ño del ADN mitocondrial (32). En trabajos anteriores estos autores han encontrado en experimentos *in vivo* que dosis de 15 y 20 mg/kg/día provocan alteración de las mitocondrias, observada por el aumento de GLDH sérica y alteración funcional de los complejos enzimáticos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta alteración mitocondrial podría ser un importante mecanismo para explicar la hepatotoxicidad por CyA (33).

Otro mecanismo propuesto es la alteración de las vías intrínseca y/o extrínseca que intervienen en la apoptosis hepatocelular (34). La CyA se considera un inhibidor de la denominada Transición de la Permeabilidad Mitocondrial por unión específica con la ciclofilina D en la membrana interna de la mitocondria. Este mecanismo explicaría la prevención de los efectos apoptóticos producidos por un aumento en la Permeabilidad de la Membrana Mitocondrial que permite la liberación del citocromo c y activación de la caspasa 3.

Los resultados de estudios concernientes al rol del estrés oxidativo y lipoperoxidación en la hepatotoxicidad inducida por CyA son aún contradictorios.

El rol de los radicales libres ha sido postulado en el mecanismo patogénico de la citotoxicidad por CyA. Varios autores que trabajaron con modelos *in-vitro* han reconocido la acumulación de peróxidos como otro mecanismo de hepatotoxicidad por CyA, reportando reducción del estrés oxidativo con el agregado a los medios de cultivo celulares de agentes antioxidantes como vitamina E, aminoácidos como glicina y serina, GSH y enzimas antioxidantes como SOD y CAT (17-20). Algunos de ellos han atribuido este efecto protector a la capacidad de estabilizar las membranas celulares, inhibiendo la lipoperoxidación (17-20).

Corte histológico de parénquima hepático de ratas tratadas con 20 mg de CyA/kg/día durante 120 días (C16). Técnica hematoxilina-eosina (400x).

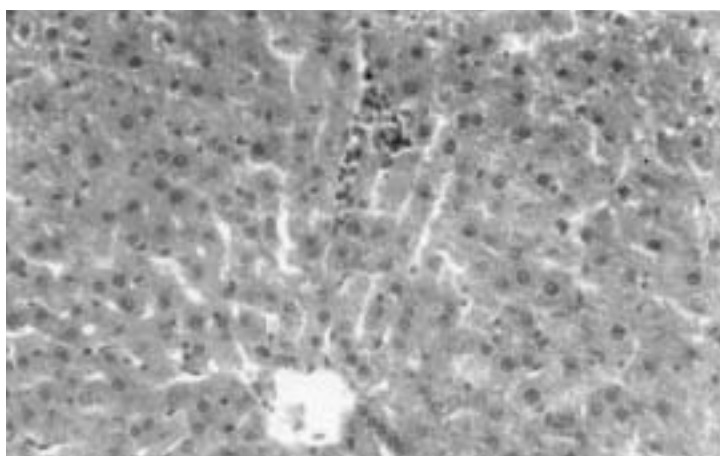


Figura 7. Se destaca el parénquima hepático y la infiltración de elementos mononucleados en el intersticio. Hallazgos que sólo fueron encontrados en el Grupo C16 con dosis de 20 mg/kg/día de CyA durante 120 días.

El presente trabajo plantea un modelo experimental realizado en ratas machos *wistar* con la finalidad de dilucidar la participación del SDA en el tratamiento agudo y crónico con CyA, tal como se aplica en humanos y con dosis idénticas a las usadas en clínica.

Se observó disminución estadísticamente significativa del contenido hepático de GSH en los Grupos B16 y C16, ambos en tratamiento crónico (120 días). Se deduce que el mismo provoca una disminución del tri péptido que impediría la conjugación de los metabolitos electrofílicos intermedios resultantes de la biotransformación de CyA. La disminución significativa de GSH observada en C1 y no en B1 explicaría que la depleción de GSH es dosis-dependiente. Estos hallazgos no coinciden con los reportados por otros autores que, trabajando con modelos *in-vivo*, con dosis de 10 y 20 mg/kg/día durante períodos cortos de 7 días y prolongados de 1 mes, concluyeron que la depleción de GSH hepático se produce a la semana del tratamiento y es dosis- y tiempo- independiente (21).

La depleción de GSH correlaciona con el incremento de la concentración de SRAT. Evidentemente, el tratamiento crónico con 20 mg/kg/día de CyA induce a la peroxidación lipídica y los niveles de los metabolitos resultantes de su biotransformación superan la capacidad de conjugación de GSH, lo que compromete al componente enzimático del SDA a través de la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y CAT.

La disminución significativa de GPx y CAT en el Grupo C16 (20 mg/kg/día durante 120 días) respecto del Grupo A es una medida del compromiso de la funcionalidad hepática y de la integridad del hepatocito. Altas dosis de CyA se traducen en niveles de CyA de 598 ± 57 ng/mL en sangre, lo que induce al estrés oxidativo comprometiendo a los componentes del SDA.

La acción conjunta de SOD y CAT ha sido descrita como el principal mecanismo de defensa contra la toxicidad del oxígeno (35-38). Se ha analizado la disminución de actividad de CAT en los Grupos B16 y C16 con tratamiento crónico y se interpretó que la inhibición de la enzima es debida a peróxidos formados en el tiempo.

Estos cambios en el SDA coinciden con los reportados por investigadores que utilizaron un modelo *in-vitro*, incubando por 24 horas, en concentraciones de 0-50 mM de CyA cultivos primarios de hepatocitos de rata (36).

Otros investigadores que trabajaron con hígados de conejos y midieron las actividades de enzimas antioxidantes en el tratamiento con CyA, durante 10 días y altas dosis de 25 mg/kg/día encontraron incrementos en CAT y malondialdehído y no encontraron cambios de GPx (37) (38). Estos resultados coincidirían con lo observado en el Grupo C1 en cuanto a CAT y SRAT pero no con GPx donde se halló un incremento significativo.

El tratamiento crónico con dosis de 5 mg/kg/día de CyA presenta una disminución progresiva en el tiempo del SDA, evidenciado por la disminución de GSH, GPx y CAT sin modificaciones en las SRAT.

El PFH se ensayó en busca de un marcador que pudiera ser utilizado en pacientes sometidos a tratamiento crónico con este inmunosupresor (39-42). Los resultados revelaron que sólo AST, enzima de localización mitocondrial, podría dar alguna información al respecto.

La Ciclosporina A prevendría los efectos apoptóticos por unión específica a ciclofilina D presente en la membrana interna de la mitocondria. Por ello es considerada un inhibidor de la denominada Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (TPM) (34).

Los hallazgos bioquímicos del grupo tratado con 20 mg/kg/día durante 120 días se relacionan con alteraciones en la histo-arquitectura del parénquima hepático, con infiltrado de elementos mononucleares como marcadores tempranos de fibrosis. No se observaron efectos apoptóticos al microscopio óptico (Figura 7). En dosis de 5 mg/kg/día no se observaron cambios histológicos (datos no mostrados). Asimismo, estos hallazgos se correlacionan con la disminución estadísticamente significativa del radio hepatosómico en el grupo C16 (Tabla I).

Conclusiones

Dosis de 20 mg/kg/día de CyA en tratamiento agudo y crónico provocan lipoperoxidación con compromiso del SDA y alteración del hepatocito. Dosis de 5 mg/kg/día de CyA en tratamiento crónico disminuyen el SDA sin lipoperoxidación, siendo a estas dosis reversible el proceso de hepatotoxicidad. Se infiere que la inmunosupresión aplicada en clínica, en dosis de 3 a 8 mg/kg/día produce disminución del SDA sin cambios estructurales y funcionales del hepatocito.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán por el subsidio otorgado.

A Wiener Lab por la donación de reactivos.

Al Ingeniero Miguel Morandini por el estudio estadístico.

A la Bioquímica María del Rosario Rey por el estudio histológico.

A los laboratorios del Instituto de Bioquímica Aplicada de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

CORRESPONDENCIA

DRA. LILIA CRISTINA DE LA CRUZ RODRÍGUEZ

Diagonal 9 N° 1.025 (Barrio Padilla)

4000 SAN MIGUEL DE TUCUMÁN, Argentina

Tel. 54-0381-4345233

Tel/Fax: 54-0381-4248169

E-mail: vicedecanato@fbqf.unt.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Farrell G. Drug- induced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12 (Suppl): 242-50.
2. De la Cruz Rodríguez LC, Farías RN, Massa EM. Damage of *Escherichia coli* cells by T-butylhidroperoxide involves the respiratory chain but is independent of the presence of oxygen. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1015: 510-6.
3. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91: 31 S.
4. Meister A, Anderson M.E. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 711-60.
5. Borel JF, Baumann G, Chapman L, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA, *et al.* *In vivo* pharmacological effects of cyclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol* 1996; 35: 115-246.
6. Myers BD, Ross J, Newton L. Cyclosporine-associated chronic nephrotoxicity. *New Engl J Med* 1984; 311: 699-705.
7. Mason J. Renal side effects of cyclosporin A. *Br J Dermatol* 1990; 36 (Suppl): 71-7.
8. Van Buren DH, Burke YF, Lewis RM. Renal function in patients receiving long-term cyclosporine therapy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 517-22.
9. Duruibe VA, Okonmah A, Blyden GT. Effect of cyclosporine A on rat liver and kidney glutathione content. *Pharmacology* 1989; 39: 205-12.
10. Galán AI, Fernández E, Morán D, Muñoz ME, Jiménez R. Cyclosporine A hepatotoxicity: effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 260-5.
11. Deters M, Strubelt O, Younes M. Reevaluation of cyclosporine induced hepatotoxicity in the isolated perfused rat liver. *Toxicology* 1997; 123 (3): 197-206.
12. Inselmann G, Lawrenz HU, Nellessen U, Heidemann HT. Enhancement of cyclosporin A induced hepato and nephrotoxicity by glutathione depletion. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 355-9.
13. Dunn JC, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin. *Drugs* 2001; 61(13): 1957-2016.
14. Morán D, González de Buitrago E, Fernández AI, Galán M, Muñoz E, Jiménez R. Inhibition of biliary glutathione secretion by cyclosporine A in the rat: possible mechanisms and role in the cholestasis induced by the drug. *J Hepatol* 1998; 29: 68-77.
15. Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cysteine. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 313-29.
16. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 331-43.
17. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez Fernández C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, *et al.* Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 1328-34.
18. Pérez de Lema G, Arribas Gómez L, Ruiz Ginés JA, de Arriba G, Rodríguez Puyol D, Rodríguez Puyol M. Reactive oxygen species mediate the effects of cyclosporine A on human cultured mesangial cells. *Transplant Proc* 1997; 29: 1241-3.
19. Hagggar HH. The protective effect of taurine against cyclosporine A - induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 2004; 151 (2): 335-43.
20. Andrés D, Cascales M. Novel mechanism of vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 267-76.
21. Jimenez R, Galan AI, Gonzalez de Buitrago JM, Palomero Muñoz ME. Glutathione metabolism in cyclosporine A treated rats: dose and time related changes in liver and kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27 (12): 991-6.
22. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinilpyridine. *Anal Biochem* 1980; 106: 207-12.
23. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
24. Gunsler WA. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 115-21.
25. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
26. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 139: 265-8.
27. Bergmeyer H, Bowers G, Jr, Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for all measurements of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC, methods for aspartate aminotransferase. *Clin Chem* 1977; 23: 887-99.
28. Bergmeyer HU, Scheile P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 1978; 24: 58-73.
29. Colombo J, Peheim E, Kyburz S, Hoffman S. *Clin Chim Acta* 1974; 51 (2): 217.
30. Gerson B. Cyclosporine. *J Clin Immunoassay* 1985; 8: 177-84.
31. Palomero J, Galán AI, Muñoz ME, Tuñón MJ, González-Gallego J, Jiménez R. Effects of aging and cyclosporin treatment on the hepatobiliary efflux of glutathione. *Life Sciences* 2003; 73: 3387-97.
32. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Molecular mechanisms of diclofenac hepatotoxicity: cell injury is associated to the metabolism of the drug and is precluded by a decrease in ATP levels. *Toxicol in Vitro* 1990; 9: 439-44.
33. Araujo CR, De la Cruz Rodríguez LC, Posleman SE, Rey MR. Efecto del tratamiento crónico con Ciclosporina A sobre la respiración mitocondrial en hepatocitos. *Bioquim Patol Clín* 2005; 69 (1): 05-13.
34. Fernández-Checa JC. Mecanismos de muerte celular y relevancia en hepatología. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29 (1): 81-9.
35. Kalinsky RE, Alexander DP, Francklin MR. Effect of

- cyclosporine on hepatic oxidative and conjugative metabolism in rats. *Drug Metab Dispos* 1987; 15: 731-3.
36. Andrés D, Sanz N, Zaragoza A, Alvarez AM, Cascales M. Changes in antioxidant defence systems induced by cyclosporine A in cultures of hepatocytes from 2- and 12- month – old rats. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1091-100.
 37. Durak I, Kacmaz M, Cimen MT, Buyukkocak S, Elgun S, Ozturk HS. The effects of cyclosporine on antioxidant enzyme activities on malondialdehyde levels in rabbit hepatic tissues. *Transplant Immunol* 2002; 10 (4): 255-8.
 38. Actis GC, Debernardi-Venon W, Lagget M, Marzano A, Ottobrelli A, Ponzetto A, *et al.* Hepatotoxicity of intravenous Cyclosporin A in patients with acute ulcerative colitis on total parenteral nutrition. *Liver* 1995; 15: 320-3.
 39. Moore RA, Greenberg E, Tangen L. Cyclosporine-induced worsening of hepatic dysfunction in a patient with Crohn's disease and enterocutaneous fistula. *South Med J* 1995; 88 (8): 843-4.
 40. Chicharro MF, Guarner L, Vilaseca J, Planas M, Malagelada J. Does cyclosporin A worsen liver function in patients with inflammatory bowel disease and total parenteral nutrition? *Rev Esp Enferm Dig* 2000; 92 (2): 68-77.
 41. Karamelic J, Asceric M, Tulumovic T, Kabil E, Uzeribegovic M, Hadzibegic N. Hepatotoxicity of cyclosporine in patients with kidney transplants. *Med Arch* 1999; 53 (4): 193-5.
 42. Cadranel JF, Erlinger S, Desruenne M, Luciani J, Lunell F, Grippon P, *et al.* Chronic administration of cyclosporin A induces a decrease in hepatic excretory function in man. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1473-6.

Aceptado para su publicación el 29 de septiembre de 2006