

B.

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Facultat de Ciències Biològiques

**Toxicidad de los Fármacos Opiáceos
en Hepatocitos Humanos en Cultivo**

Tesis Doctoral Presentada por:
Ramiro Jover Atienza
Valencia, Enero de 1991



UMI Number: U607665

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607665

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

№ 187765x

R.9257

HOSPITAL "LA FE"

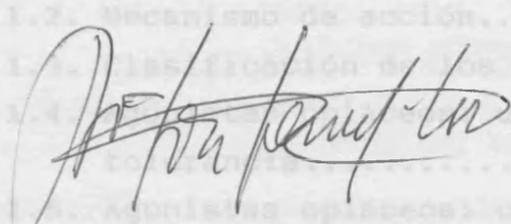
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....7

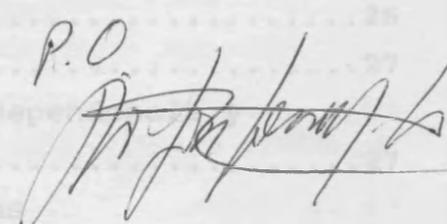
Dña. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER, Doctora en Ciencias Biológicas y Jefa del Laboratorio de Cultivos Celulares del Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia, y D. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL, Doctor en Ciencias Químicas y en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València, y Jefe del Laboratorio de Enzimología del Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia,

CERTIFICAN: que D. RAMIRO JOVER ATIENZA, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado "Toxicidad de los Fármacos Opiáceos en Hepatocitos Humanos en Cultivo", que presenta como Tesis Doctoral.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación,

en Valencia a 23 de Enero de 1991.


Fdo. Dra. M^a José Gómez-Lechón


Fdo. Dr. José V. Castell

INDICE GENERAL

N° Pág.

ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	7
------------------------------	---

INTRODUCCION

1. LA HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA AL USO DE FARMACOS.....	11
1.1. La vulnerabilidad del hígado a la lesión tóxica.....	13
1.2. Tipos de hepatotoxinas y efectos hepáticos asociados.....	15
1.3. Mecanismos de toxicidad que ocasionan la hepatitis medicamentosa.....	16
1.3.1. Biotransformación hepática y hepatotoxinas latentes.....	17
1.3.2. Acciones moleculares de las hepatotoxinas latentes.....	19
1.3.3. Hepatotoxinas latentes e idiosincrasia.....	21
2. LA HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA A FARMACOS ANALGESICOS OPIACEOS.....	23
2.1. Fármacos analgésicos opiáceos.....	25
2.1.1. Receptor opiáceo y péptidos opiáceos endógenos.....	25
2.1.2. Mecanismo de acción.....	26
2.1.3. Clasificación de los opiáceos.....	27
2.1.4. Agonistas opiáceos: uso clínico, dependencia y tolerancia.....	27
2.1.5. Agonistas opiáceos: características farmacocinéticas.....	29
2.1.6. Morfina, meperidina, metadona y buprenorfina.....	30
2.2. La hepatotoxicidad de los opiáceos.....	32
2.3. Mecanismos de la hepatotoxicidad de lo opiáceos.....	34

3. MODELOS BIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATOTOXICIDAD.....	39
3.1. Modelos in vivo.....	41
3.2. Modelos in vitro.....	42
3.3. Hepatocitos humanos en cultivo primario como modelo biológico para estudios de hepatotoxicidad.....	44
4. OBJETIVOS.....	49

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. BIOPSIAS HEPATICAS QUIRURGICAS.....	55
2. PRODUCTOS.....	55
3. APARATAJE.....	56

METODOS

1. OBTENCION DE LA SUSPENSION DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	57
1.1. Soluciones de perfusión.....	57
1.2. Procedimiento de aislamiento.....	58
1.3. Control de viabilidad y recuento celular.....	61
2. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	62
2.1. Medio de cultivo.....	62
2.2. Soporte del cultivo.....	64
2.3. Siembra celular y desarrollo del cultivo.....	64
3. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA.....	65

4. CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES CONTINUAS.....	68
5. PREPARACION DE LOS OPIACEOS.....	69
6. METODOS PARA LA EVALUACION DE LOS EFECTOS CITOTOXICOS.....	69
6.1. Etapas del cultivo en las que se evaluaron los efectos citotóxicos.....	71
6.1.1. Adhesión celular.....	71
6.1.2. Extensión celular.....	72
6.1.3. Monocapa confluyente.....	72
6.2. Parámetros de citotoxicidad.....	73
6.2.1. Determinación de la actividad LDH por micrométodo.....	74
6.2.2. Valoración de proteína celular en microplaca.....	77
6.2.3. Test del MTT.....	79
7. METODOS PARA LA EVALUACION DE ALTERACIONES DE FUNCIONES METABOLICAS.....	81
7.1. Efecto de los opiáceos en el metabolismo del glucógeno.....	82
7.1.1. Diseño experimental. Degradación de glucógeno.....	82
7.1.2. Diseño experimental. Síntesis de glucógeno.....	83
7.1.3. Determinación de glucógeno.....	83
7.2. Efecto de los opiáceos en la síntesis de urea.....	85
7.2.1. Diseño experimental. Síntesis de urea.....	85
7.2.2. Determinación de urea.....	86
7.3. Efecto de los opiáceos en la síntesis de albúmina.....	88
7.3.1. Diseño experimental. Síntesis de albúmina.....	88
7.3.2. Determinación de albúmina.....	89
7.4. Efecto de los opiáceos sobre el contenido de GSH.....	91
7.4.1. Diseño experimental. Depleción del GSH con el tiempo.....	92
7.4.2. Diseño experimental. Curva dosis-respuesta.....	92
7.4.3. Determinación de GSH.....	93

8. ESTUDIO DE LA METABOLIZACION DE LA MORFINA EN DISTINTOS SISTEMAS CELULARES MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).....	95
9. ESTUDIO ESTADISTICO Y TRATAMIENTO MATEMATICO DE LOS RESULTADOS.....	96
10. CRITERIOS PARA LA EXTRAPOLACION DE RESULTADOS AL HOMBRE.....	98

RESULTADOS

1. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	101
2. EFECTOS CITOTOXICOS DE LOS OPIACEOS EN LOS DISTINTOS ESTADIOS DEL CULTIVO DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	107
2.1. Efecto de los opiáceos sobre la adhesión celular.....	109
2.2. Citotoxicidad de los opiáceos durante la extensión celular.....	112
2.3. Efecto de los opiáceos sobre el cultivo establecido (Monocapa confluyente).....	115
3. EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE LAS FUNCIONES METABOLICAS DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.....	119
3.1. Efecto de los opiáceos sobre el metabolismo del glucógeno.....	121
3.1.1. Efecto de los opiáceos sobre la degradación del glucógeno.....	121
3.1.2. Efecto de los opiáceos sobre la síntesis de glucógeno.....	123
3.2. Efecto de los opiáceos sobre la síntesis de urea.....	125
3.3. Efecto de los opiáceos sobre la síntesis de albúmina....	127
3.4. Efecto de los opiáceos sobre el GSH celular.....	129

4. CITOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA Y LINEAS CELULARES CONTINUAS.....	133
4.1. Efecto citotóxico de los opiáceos sobre hepatocitos de rata en cultivo primario.....	135
4.2. Citotoxicidad de los opiáceos en líneas celulares continuas.....	138
5. ESTUDIO DE LA METABOLIZACION DE LA MORFINA EN DISTINTOS SISTEMAS CELULARES MEDIANTE CROMATOGRAFIA HPLC.....	143

DISCUSION

1. EL CULTIVO DE HEPATOCITOS HUMANOS COMO MODELO BIOLOGICO DE ELECCION PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA HEPATOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS.....	157
2. HEPATOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	161
2.1. Parámetros de citotoxicidad y tratamientos realizados con los opiáceos.....	163
2.2. Efectos citotóxicos de los opiáceos: análisis comparativo y discusión de los resultados.....	164
2.3. Parámetros metabólicos.....	168
2.4. Efectos metabólicos de los opiáceos: análisis comparativo y discusión de los resultados.....	170
2.5. Extrapolación de los resultados obtenidos <i>in vitro</i> al hombre.....	177

3. HEPATOTOXICIDAD COMPARADA DE LOS OPIACEOS EN DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.....	185
3.1. Efecto de los opiáceos sobre los hepatocitos de rata y líneas celulares continuas. Comparación con los hepatocitos humanos.....	187
3.2. Estudio comparativo de la metabolización de la morfina en los distintos sistemas celulares.....	191
CONCLUSIONES.....	195
BIBLIOGRAFIA.....	199

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABTS	Acido 2,2'-Azino(3-etil-benzotiazolina) 6-sulfónico
BUP	Buprenorfina
BSA	Albúmina sérica bovina
CTAB	N-cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro
DMEM	Medio de Eagle modificado según Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EGTA	Acido etilen-glicol-bis-(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético
GPT	Glutamato piruvato transaminasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HEPES	Acido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano-sulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC ₁₀	Concentración que produce un efecto inhibitor del 10% en el parámetro evaluado
IC ₅₀	Concentración que produce un efecto inhibitor del 50% en el parámetro evaluado
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEP	Meperidina
MET	Metadona
MOR	Morfina
MTT	3-[4,5-dimetiltiazolil-(2)]-2, 5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio
NAD	Nicotin adenín dinucleótido
NADH:dye-DH	NADH: dye oxidoreductasa
OPT	O-ftaldialdehido
PBS	Tampón fosfato salino (fosfato 20 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,2)
SBF	Suero bovino fetal
ST	Suero de ternera recién nacida
TCA	Acido tricloroacético
R _T	Indice del riesgo de toxicidad
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

INTRODUCCION

**1) La hepatotoxicidad asociada
al uso de fármacos**

El hombre está potencialmente expuesto a una gran variedad de agentes que pueden producir lesión hepática. Algunas hepatotoxinas se encuentran en la naturaleza como productos derivados del metabolismo de plantas, hongos y bacterias, o como compuestos minerales (140, 203). Otros muchos agentes hepatotóxicos provienen de la industria química o farmacéutica, y pueden llegar al hombre por distintas vías, incluso como contaminantes del medio ambiente (138, 211, 236).

La hepatotoxicidad ocasionada por fármacos está aumentando recientemente de un modo alarmante. En la actualidad, la afección hepática asociada al uso de medicamentos es, junto con la hepatopatía tóxica producida por el alcohol, la causa más importante del daño hepático en el hombre después de las hepatitis víricas.

El creciente número de fármacos introducidos en las últimas décadas junto con su mayor consumo, en particular por ciertas capas de la población, ha sido la causa del aumento paralelo del número de hepatopatías atribuibles al uso de medicamentos (85, 133, 152, 206). Así mismo, los programas de seguimiento y farmacovigilancia instaurados en la mayoría de los países han puesto de manifiesto la existencia de efectos hepatotóxicos causados no solo por medicamentos recién introducidos, si no también por fármacos que se creían inócuos (54, 148, 185).

En definitiva, podemos decir que la hepatotoxicidad asociada al uso de fármacos (yatrogénica), prácticamente inexistente a principios de este siglo es, hoy día, la segunda causa etiológica de las hepatopatías tóxicas después del alcohol.

1.1. LA VULNERABILIDAD DEL HIGADO A LA LESION TOXICA

La especial susceptibilidad del hígado al daño causado por xenobióticos se ha atribuido a cuatro causas fundamentales:

1.- La elevada concentración de compuestos extraños en el tejido hepático.

Es un hecho demostrado que muchos xenobióticos se acumulan en el hígado con una concentración muy superior a la plasmática (24). Este fenómeno tiene una difícil explicación pero quizás esté relacionado con una mayor unión de los xenobióticos a las proteínas del hepatocito, al citocromo P-450 y a otros lugares moleculares donde ocurren procesos de conversión metabólica y excreción (162).

2.- Su ubicación anatomofuncional.

La posición "portal" del hígado en nuestro organismo, puede contribuir a la hepatotoxicidad de los fármacos ingeridos. La vía oral es la ruta más frecuente de administración de medicamentos, los cuales, una vez absorbidos en el tracto gastrointestinal tienden a pasar casi exclusivamente a la vena porta hepática, alcanzando concentraciones elevadas en el hígado (231). Este factor es especialmente importante en el caso de xenobióticos que son transformados en productos tóxicos por enzimas de la flora intestinal o del propio intestino (144), y cuando las substancias absorbidas sufren una gran extracción a su paso por el hígado (efecto de primer paso hepático)(24, 162).

3.- La excreción biliar de compuestos extraños y de sus metabolitos.

Los metabolitos de muchos xenobióticos son excretados por la bilis para entrar en la circulación enterohepática o para ser eliminados fuera del organismo (137). Este factor es especialmente importante en la hepatotoxicidad de los agentes que lesionan la membrana del canalículo biliar o que interfieren en la formación de la bilis dando lugar al desarrollo de ictericia colestásica (135, 224).

4.- La biotransformación de xenobióticos.

El factor más importante en la vulnerabilidad del hígado a la lesión por agentes extraños está relacionado con su papel en la biotransformación de xenobióticos. Esta importante función hepática es un arma defensiva de doble filo, ya que mientras que algunos agentes potencialmente tóxicos son convertidos en metabolitos inócuos tal como corresponde al papel detoxificador del hígado, otros xenobióticos no tóxicos u oligotóxicos son transformados en productos dañinos que ejercen *in situ* su acción perjudicial (83, 147, 163, 169, 170).

1.2. TIPOS DE HEPATOTOXINAS Y EFECTOS HEPATICOS ASOCIADOS

A las sustancias capaces de producir daño hepático se les denomina de modo genérico hepatotoxinas. Entre ellas se suele discernir entre las hepatotoxinas intrínsecas y las idiosincrásicas (233).

Las hepatotoxinas intrínsecas son aquellas que por encima de una cierta concentración, producen sistemáticamente daño hepático en todos los individuos expuestos y, por lo tanto, su efecto puede predecirse con gran probabilidad. Las hepatotoxinas idiosincrásicas producen daño hepático solamente en algunos individuos y la intensidad de la lesión no se correlaciona con la dosis administrada. Como consecuencia, los efectos de estas hepatotoxinas no son fáciles de predecir y se manifiestan únicamente en individuos particularmente susceptibles.

El daño hepático ocasionado por las hepatotoxinas se puede traducir en tres tipos de respuesta (237):

Efectos citotóxicos que consisten en alteraciones morfológicas manifiestas (necrosis de una zona del tejido, hinchamiento, acidofilia, esteatosis, etc.); liberación de enzimas intracelulares a la sangre, y disminución generalizada de la capacidad funcional del hígado (conversión de lactato a glucosa, de amonio a urea, captación de colorantes, etc.)(194, 240).

Efectos colestásicos, que consisten en alteraciones del flujo biliar e ictericia, sin que generalmente aparezca un patrón de alteraciones morfológicas claro. Esto es debido a que el daño no suele estar relacionado siempre con el canalículo biliar, si no que más bien suele ser el resultado de alteraciones de la capacidad funcional de la membrana del hepatocito (137).

Efectos cancerígenos cuando aparece un carcinoma hepático (238).

La mayor parte de los tóxicos intrínsecos son citotóxicos; por el contrario, el efecto generalmente observado en los tóxicos idiosincrásicos es colestásico. No obstante, algunos tóxicos intrínsecos actúan a la vez como citotóxicos y colestásicos (237).

1.3. MECANISMOS DE TOXICIDAD QUE OCASIONAN

LA HEPATITIS MEDICAMENTOSA

Los mecanismos moleculares por los que las hepatotoxinas intrínsecas producen la lesión hepática son en general solo parcialmente conocidos para algunos compuestos.

Hay varias maneras de clasificar a las hepatotoxinas en relación con su mecanismo de toxicidad. En un primer lugar se clasificaron en dos grupos:

1) Hepatotoxinas directas: aquellas que producen daños directamente a las estructuras celulares: membrana celular, retículo endoplásmico, membrana mitocondrial, aparato de Golgi, etc. (235).

2) Hepatotoxinas indirectas: que actúan de manera más selectiva interfiriendo procesos metabólicos específicos (239).

Pero esta clasificación, básicamente fenomenológica, no daba ninguna información mecanística sobre su actuación, por lo que es preferible su clasificación en:

1) Hepatotoxinas activas: son tóxicas *per se* y actúan directamente sobre el hepatocito sin necesidad de biotransformación.

2) Hepatotoxinas latentes: no son tóxicas directamente, pero tras su biotransformación por el propio hepatocito dan origen a metabolitos tóxicos.

Las evidencias recogidas en los últimos años, que demuestran la gran abundancia de hepatotoxinas latentes entre los fármacos comercializados, hacen que el mecanismo de acción de este tipo de hepatotoxinas merezca ser estudiado con una especial atención.

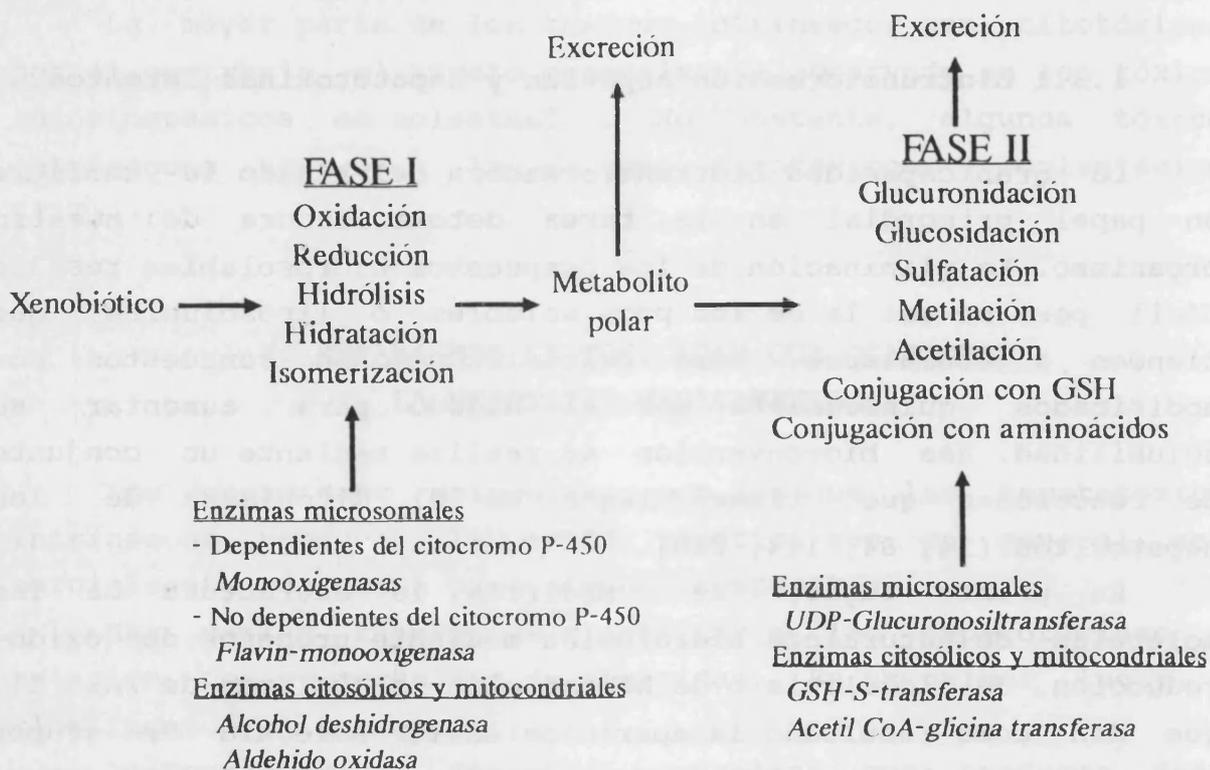
1.3.1 Biotransformación hepática y hepatotoxinas latentes.

La gran capacidad biotransformadora del hígado le confiere un papel primordial en la tarea detoxificadora de nuestro organismo. La eliminación de los compuestos hidrosolubles resulta fácil pero no así la de los poco solubles o liposolubles, que tienden a acumularse. Para evitarlo, dichos compuestos son modificados químicamente por el hígado para aumentar su solubilidad. Esa bioconversión se realiza mediante un conjunto de reacciones que tienen lugar en el citoplasma de los hepatocitos (14, 84, 114, 230).

En primer lugar, se modifica la estructura de las moléculas de naturaleza hidrofóbica mediante procesos de óxido-reducción, de hidrólisis o de hidratación (reacciones de Fase I), que dan como resultado la aparición en la molécula de grupos polares (generalmente -OH, -NH₂, -COOH, =C=O, =S=O, -SH, etc.) (4) (Esquema 1).

El grupo de enzimas más versátil en cuanto a su capacidad para modificar a los xenobióticos es el de los enzimas microsomales asociados al citocromo P-450, o más propiamente, las monoxigenasas. Estas enzimas catalizan la mayoría de las reacciones de óxido-reducción y tienen en común: a) el poseer como grupo prostético un citocromo con un máximo de absorción alrededor de los 450 nm cuando reacciona con CO, b) requerir NADPH, y c) funcionar asociados a la NADPH-citocromo P-450 reductasa. Los enzimas están inmersos en la membrana lipídica del retículo endoplásmico rugoso y requieren la presencia de un entorno fosfolipídico para su correcto funcionamiento (189).

Las reacciones de la Fase II consisten en la conjugación de las moléculas más polares resultantes del proceso anterior, con metabolitos hepáticos endógenos. Generalmente mediante reacciones con ácido glucorónico, con glutation, con sulfato y con glicina. El producto resultante es mucho más soluble que el xenobiótico original lo que facilita su eliminación del organismo por vía renal o biliar (37) (Esquema 1).



Esquema 1. Biotransformación hepática de los xenobióticos mediante reacciones de Fase I y Fase II

Un hecho experimentalmente constatado es el que estas reacciones, en particular las óxido-reducciones de Fase I pueden disminuir pero también en algunos casos aumentar la toxicidad de un compuesto (83, 147, 163, 169, 170). Como consecuencia de los procesos redox catalizados por las monooxigenasas se generan en el interior del propio hepatocito a partir del compuesto inicial, nuevas especies químicas que en algunos casos son altamente reactivas (radicales libres e intermediarios electrofílicos).

Ello convierte indirectamente a los hepatocitos en las primeras células vulnerables a la potencial acción tóxica de los xenobióticos. Es por ello por lo que la denominación global de "reacciones de detoxificación" es conceptualmente incorrecta.

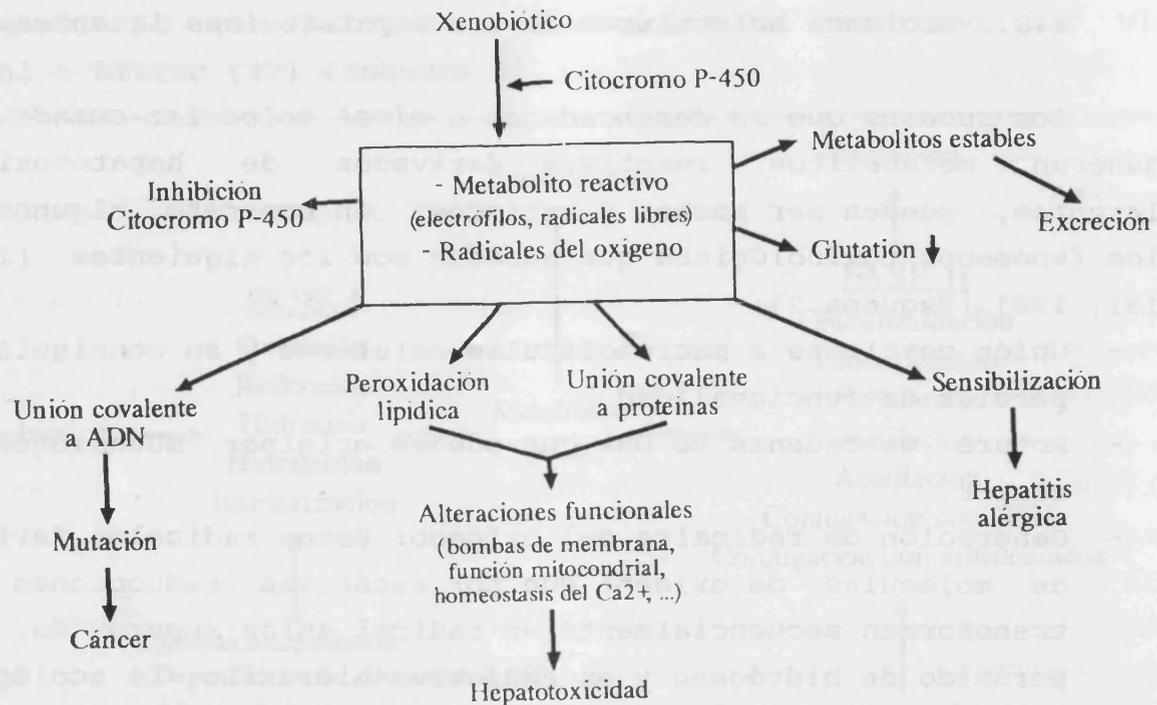
1.3.2 Acciones moleculares de las hepatotoxinas latentes.

Los sucesos que se desencadenan a nivel molecular cuando se generan metabolitos reactivos derivados de hepatotoxinas latentes, pueden ser muchos y variados; en concreto, algunos de los fenómenos toxicológicos que suceden son los siguientes (133, 191, 198) (Esquema 2):

- Unión covalente a macromoléculas celulares y su consiguiente pérdida de funcionalidad.
- Rotura de cadenas de DNA que pueden originar mutaciones y cancer.
- Generación de radicales del oxígeno: Estos radicales derivan de moléculas de oxígeno que por sucesivas reducciones se transforman secuencialmente en radical anión superóxido, en peróxido de hidrógeno y en radicales hidroxilo. La acción de todos ellos conduce a un estado celular mas oxidado lo que indirectamente origina la oxidación de cofactores, proteínas y ácidos nucleicos.
- Peroxidación lipídica: Radicales libres reactivos (como por ejemplo el radical hidroxilo), pueden robar un átomo de hidrógeno a los lípidos; lo que, en presencia de oxígeno, conduce a una reacción autocatalítica con generación de otros radicales que finalmente llevan a la destrucción del lípido, su degradación en productos potencialmente tóxicos tal como el malonildialdehido, y la alteración de las propiedades de las membranas celulares.

Las defensas de los sistemas celulares son diversas y estan presentes en diferentes compartimentos celulares para poder combatir de modo localizado las agresiones oxidativas. Entre los sistemas de defensa no-enzimáticos tenemos: Tocoferol (vit. E), ácido ascórbico (vit. C), β -caroteno, ácido úrico, flavonoides,

etc.; y entre los sistemas enzimáticos de defensa tenemos: Superóxido dismutasa, GSH-peroxidasa, GSSG-reductasa, catalasa, etc. (146, 198, 207).



Esquema 2. Mecanismos que desencadenan la hepatotoxicidad tras la generación de metabolitos reactivos.

El tripéptido glutatión (GSH) juega un papel crítico en la toxicidad química inducida en sistemas celulares (164). Sin embargo, la formación masiva de metabolitos reactivos (por ejemplo con una sobredosis del fármaco, o en un individuo con una capacidad metabólica superior o distinta a los demás), y la subsecuente conjugación con glutatión, puede llevar a unos niveles tan bajos en las reservas de grupos tioles, que resulte imposible evitar que los metabolitos reaccionen con otras biomoléculas provocando su inactivación (143, 164, 197).

El mecanismo preciso que conduce a la muerte celular no está totalmente aclarado pero se cree que está implicada la *desorganización de la homeostasis del calcio*.

La unión covalente y la peroxidación lipídica pueden provocar una alteración en la estructura y función de las proteínas de membrana y, entre ellas, las bombas dependientes de energía responsables del mantenimiento del volumen celular, gradiente iónico, potencial de membrana, pH y homeostasis del calcio (11, 133, 175).

La concentración de calcio citosólico se mantiene a un bajo nivel gracias al secuestro activo por parte de la mitocondria y del retículo endoplasmático. Una alteración en la captación de calcio por estos orgánulos determina un incremento en la concentración de calcio citosólico que, a su vez, se asocia con alteraciones importantes en el citoesqueleto, manifestadas morfológicamente por la aparición de blebs en la superficie del hepatocito (130). El elevado nivel de calcio citosólico provoca además un gran número de efectos perjudiciales sobre la funcionalidad celular, que incluyen inhibición enzimática y activación de procesos catabólicos mediados por fosfolipasas y proteasas (11, 133, 175).

En definitiva se puede decir que una combinación de unión covalente, oxidación y desorganización de la homeostasis iónica puede ser la responsable de la toxicidad inducida a nivel molecular.

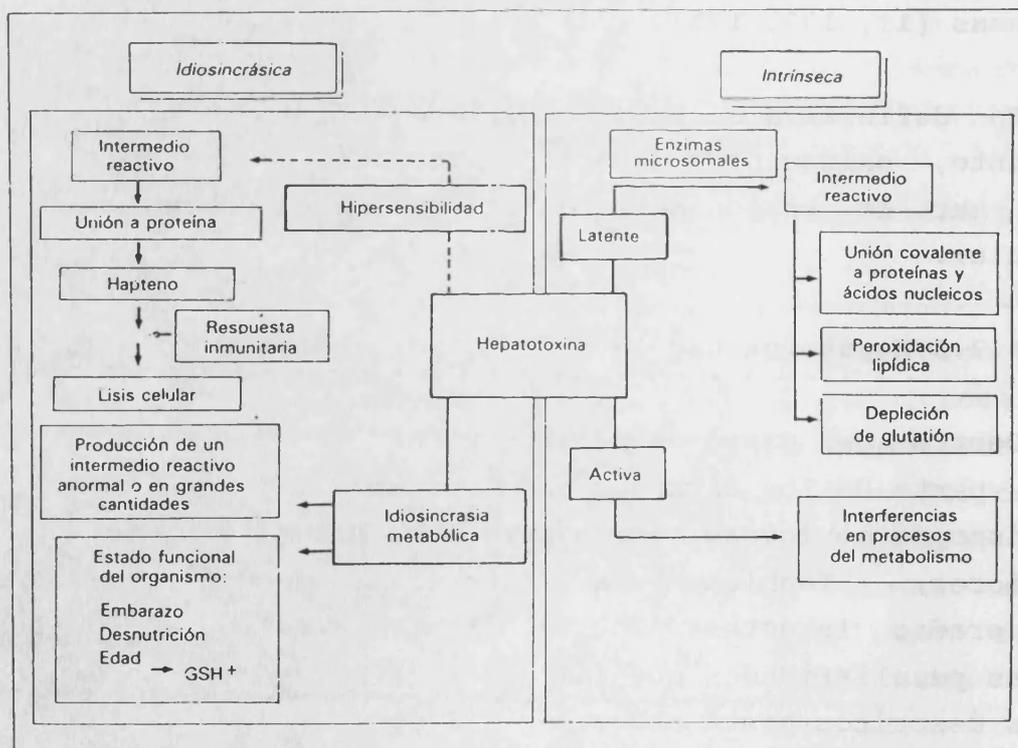
1.3.3 Hepatotoxinas latentes e idiosincrasia.

Dentro del grupo de hepatotoxinas latentes se encuentra la mayor parte de los fármacos con hepatotoxicidad intrínseca. Su mecanismo de toxicidad respondería a lo descrito en los apartados anteriores. También hay hepatotoxinas idiosincrásicas consideradas latentes; los mecanismos en estos casos presentan ciertas peculiaridades que los diferencian en mayor o menor grado de los descritos hasta ahora.

El mecanismo por el que las hepatotoxinas idiosincrásicas producen daño hepático está asociado, básicamente a una particularidad metabólica del individuo o a una hipersensibilidad alérgica (Esquema 3):

1) En el primero de los casos, existe por lo general una variación individual en la capacidad y en el modo de biotransformación del fármaco, lo que puede dar origen a la formación de un metabolito particularmente tóxico en esos individuos. Un ejemplo, ya clásico, es el mecanismo de toxicidad de la isoniacida (109, 171).

2) En los casos de hipersensibilidad suele haber generalmente un proceso alérgico que ha sido instaurado por repetida administración del fármaco con la consiguiente sensibilización. En algunos casos ha podido demostrarse que es la consecuencia una particularidad metabólica del individuo, donde los metabolitos reactivos formados por el hepatocito se unen a proteínas celulares, y actuando de haptenos, desencadenan con la repetida administración un proceso inmunológico de autodestrucción del hepatocito, como por ejemplo en la hepatotoxicidad por halotano (179, 180, 201).



Esquema 3. Mecanismos por los que las hepatotoxinas idiosincrásicas e intrínsecas producen la lesión hepática.

2) La hepatotoxicidad asociada a fármacos analgésicos opiáceos

2.1. FARMACOS ANALGESICOS OPIACEOS

Bajo la denominación de opiáceo se incluye a todos los fármacos naturales o sintéticos que muestran, en mayor o menor grado, propiedades similares a la morfina.

2.1.1. Receptor opioide y péptidos opioides endógenos.

Los fármacos opiáceos interaccionan con receptores opioides específicos que se encuentran distribuidos de modo irregular en el SNC y en los tejidos periféricos (80). Los estudios realizados sugieren la existencia de cuatro categorías principales de receptores (208), designados μ (mu), κ (Kappa), δ (delta) y σ (sigma), cuya activación puede relacionarse con efectos farmacológico concretos. Por ejemplo, la analgesia ha sido asociada con los receptores μ y κ , mientras que la disforia o los efectos psicotomiméticos se han adjudicado a los receptores σ . La activación de los receptores δ no se ha podido asociar todavía a un efecto farmacológico concreto pero su localización en las regiones límbicas del cerebro ha llevado a asociarlo con las alteraciones del comportamiento afectivo (47).

Los fármacos opiáceos tienen propiedades muy similares a las de un grupo de péptidos endógenos naturales, denominados péptidos opioides, que se agrupan en tres familias distintas: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor genéticamente distinto y tiene una distribución anatómica característica. Estos precursores se denominan proencefalina, pro-opio-melanocortina y prodinorfina. Cada uno de estos precursores contienen una serie de péptidos biológicamente activos tanto opioides como no-opioides (3).

Estos péptidos endógenos tiene afinidad selectiva por los receptores opioides aunque su potencia varía mucho según el tipo de receptor que se considere. Se encuentran intraneuronalmente, ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, tejido cromafín, y glándulas endocrinas, en especial la hipófisis, y pueden ser liberados por estimulación eléctrica y por despolarización con K^+ (80).

2.1.2. Mecanismo de acción.

Los fármacos opiáceos y los péptidos endógenos (especialmente los agonistas μ y δ) producen una disminución de la actividad neuronal en áreas concretas del SNC, responsables de la regulación de funciones tales como la respiración, la percepción del dolor, y el comportamiento afectivo. Esta disminución de la actividad neuronal en puntos concretos del SNC se debe a que los opiáceos y los péptidos endógenos inhiben selectivamente la excitación de determinadas neuronas (125).

En relación con estos fenómenos se ha demostrado que la acción específica de los opiáceos consiste en la inhibición de la liberación de neurotransmisores desde las terminales de las células nerviosas que transmiten el estímulo. Sin embargo, también se ha demostrado que, en determinadas ocasiones, la acción inhibitoria de los opiáceos se ejerce a nivel postsináptico (125).

A nivel celular, los efectos electrofisiológicos de los opiáceos se han relacionado con un incremento en la conductividad del K^+ y/o una alteración en la movilización del Ca^{2+} intracelular; pero la interrelación entre los dos fenómenos no está totalmente aclarada.

La hipótesis con más evidencias a su favor sugiere que la unión del opiáceo al receptor se traduce en un aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular, que a su vez provoca un incremento en la conductividad del K^+ , asociado con la hiperpolarización de la membrana nerviosa. El resultado final es una disminución de la excitabilidad de la neurona tanto a nivel presináptico como postsináptico; en otras palabras, la respuesta neuronal resulta inhibida (66, 183).

En diversas células y sistemas se ha demostrado que el opiáceo produce inhibición de la actividad basal de la adenilato ciclasa, o bien, inhibición del incremento de su actividad en respuesta a la estimulación producida por la prostaglandina E. Cuando la acción del opiáceo es prolongada, la acción inhibitoria va seguida de un aumento o hipertrofia de la actividad de la

adenilato ciclasa, que puede ser responsable del síndrome de abstinencia, una vez que la acción inhibidora del opiáceo desaparece (55, 88, 124).

2.1.3. Clasificación de los opiáceos.

No existe una clasificación enteramente satisfactoria para los opiáceos. Si se atiende al tipo de receptor activado y al grado de actividad intrínseca que ejercen en dichos receptores, los opiáceos se pueden clasificar en cuatro grupos (125):

a) Agonistas puros: son aquellos que mejor imitan las acciones de la morfina, tanto agudas como crónicas. Actúan como agonistas principalmente en los receptores μ y κ . Junto con la morfina, la meperidina y la metadona son representantes típicos de este grupo.

b) Antagonistas puros: son sustancias como la naloxona y la naltrexona cuya actividad farmacológica intrínseca es nula en cualquier tipo de receptor opioide.

c) Agonistas/antagonistas mixtos: son agonistas en otro receptor opioide diferente del activado por la morfina, y antagonistas competitivos a nivel del receptor activado por morfina. Pertenecen a este grupo opiáceos como nalorfina o pentazocina.

d) Agonistas parciales: actúan sobre el receptor opioide más específico de la morfina pero con actividad intrínseca menor; en presencia de ésta pueden comportarse, pues, como antagonistas. El representante típico es la buprenorfina.

2.1.4. Agonistas opiáceos: uso clínico, dependencia y tolerancia.

Los agonistas opiáceos son usados generalmente para suministrar analgesia temporal en el tratamiento sintomático tanto del dolor moderado como del severo (parto, cólico renal o biliar, infarto de miocardio, traumatismo agudo, dolor postoperatorio, cáncer terminal, etc.). En pacientes con edema agudo de pulmón los agonistas opiáceos se utilizan por sus

efectos cardiovasculares y para aliviar la ansiedad asociada a este estado. Estos fármacos se utilizan también para la sedación preoperativa y como suplemento en la anestesia (160, 161, 216).

Algunos agonistas opiáceos con características especiales se utilizan en los tratamientos de detoxificación y mantenimiento, como substitutos de la heroína y de otros opiáceos similares para suprimir el síndrome de abstinencia en pacientes dependientes a estas drogas. La metadona y más recientemente la buprenorfina son los opiáceos mas utilizados con estos fines (10, 19, 128, 165, 166, 182).

En los pacientes que reciben agonistas opiáceos puede aparecer tolerancia y dependencia física (88, 124, 141, 181).

La *tolerancia* a muchos de los efectos de estos fármacos (analgesia, sedación, euforia, etc..) se desarrolla durante los tratamientos prolongados, si bien la tolerancia a unos efectos de los agonistas aparece más pronto que a otros. En cualquier caso, la sobredosis incluso en pacientes que han desarrollado tolerancia puede llegar a causar depresión respiratoria y muerte.

La administración continuada de los agonistas opiáceos puede conducir a la *dependencia física*, que está estrechamente relacionada con la tolerancia. Los individuos que son físicamente dependientes de uno de estos compuestos pueden permanecer relativamente asintomáticos tanto tiempo como sean capaces de mantener su requerimiento diario de agonista opiáceo. Si la administración del fármaco se suspende bruscamente aparece en el individuo un estado fisiopatológico conocido como síndrome de abstinencia.

La tolerancia y la dependencia que originan los opiáceos están estrechamente ligadas a la *adicción o toxicomanía*, que puede definirse como un estado de intoxicación periódica o crónica producida por el consumo de una droga y que conduce a un efecto nocivo en el individuo. La adicción a los opiáceos no es solo un fenómeno que puede aparecer tras una terapia clínica prolongada, ya que su abuso extramédico, con el fin de obtener sensaciones de satisfacción, placer o evitar molestias, se ha traducido en una patología social que ha alcanzado unas

proporciones alarmantes con implicaciones de tipo político y económico, más allá de las típicamente sanitarias y jurídicas.

2.1.5. Agonistas opiáceos: características farmacocinéticas.

Una fracción muy elevada de los opiáceos (90-100%) es absorbida rápidamente desde el tracto gastrointestinal. También tienen una buena absorción desde la mucosa nasal, desde los pulmones, y tras inyección subcutánea o intramuscular.

Con la mayoría de los opiáceos el efecto de una dosis determinada es menor tras la administración oral que tras la administración parenteral, y esto es debido a la importante, aunque variable, extracción hepática que ocurre durante el primer paso por el hígado. Esto supone que la biodisponibilidad de las preparaciones orales suele ser baja en relación a la gran fracción absorbida por el intestino.

Los opiáceos se unen a proteínas plasmáticas en proporción variable según el compuesto. El opiáceo que permanece libre en el plasma suele distribuirse rápidamente en orden de concentración decreciente en músculo esquelético, riñones, hígado, tracto intestinal, pulmones, bazo y cerebro. Los opiáceos agonistas son metabolizados mayoritariamente en el hígado, siendo el lugar principal de la biotransformación el retículo endoplasmático.

Estos fármacos son excretados principalmente en la orina tanto en forma inalterada como los metabolitos derivados. Pero, dependiendo del compuesto, una fracción importante puede también ser eliminada por heces previa excreción biliar; en estos últimos casos, la circulación enterohepática suele jugar un papel importante en la permanencia prolongada de estos compuestos en el interior del organismo (80, 125, 160, 161, 216).

En la Tabla 1 se recogen las características farmacocinéticas más importantes de los cuatro opiáceos estudiados en esta Tesis.

Tabla 1. Características farmacocinéticas de los cuatro opiáceos de este estudio (12, 80, 125, 160, 161, 216):

	Biodisponibilidad oral (%)	Vd (l)	Cl (ml/min)	t _{1/2} (h)	Duración analgesia (h)
Morfina	20-33	168-240	910-1190	1,8-4,2	2-4
Meperidina	49-55	245-270	840-1540	2,4-4,0	2-4
Metadona	71-100	224-308	63-133	23-47	12-24
Buprenorfina	---	97-150	900-1200	1,2-7,2	4-10

2.1.6. Morfina, Meperidina, Metadona y Buprenorfina.

Algunas propiedades químicas, farmacológicas y farmacocinéticas particulares de cada uno de los cuatro opiáceos que se incluyen en esta Tesis son descritas a continuación brevemente (80, 125, 160, 161, 216):

Morfina

La morfina es un opiáceo agonista derivado del fenantreno. Es el principal alcaloide del opio y esta considerado como el prototipo del agonista opiáceo.

Este fármaco es metabolizado principalmente en el hígado donde la mayoría de la morfina es conjugada con ácido glucurónico en los grupos 3-hidroxilo y 6-hidroxilo. Otras vías metabólicas descritas son la N-demetilación (normorfina), la N-oxidación y la conjugación con grupos sulfato.

Meperidina

La meperidina es un agonista sintético representante principal del grupo de opiáceos agonistas derivados de la fenilpiperidina.

La meperidina parece tener una acción más rápida y una menor duración que la morfina; su potencia analgésica también es menor (10 mg de morfina IM o SC son equivalentes a 75-100 mg de meperidina), pero comparte con ella las mismas características farmacológicas.

Esta droga es metabolizada principalmente en el hígado. En primer lugar la meperidina es biotransformada por hidrólisis a ácido meperidínico y a continuación es conjugada parcialmente con ácido glucurónico. La meperidina también puede sufrir en primer lugar N-demetilación a normeperidina y posteriormente hidrólisis y conjugación parcial.

Metadona

La metadona es un agonista sintético representante principal de grupo de opiáceos derivados del difenilheptano. Tiene una acción más prolongada que la morfina, pero comparte con ella las mismas propiedades farmacológicas y tiene una potencia analgésica similar (10 mg de morfina IM o SC son equivalentes a 8-10 mg de metadona).

Este fármaco es metabolizado principalmente en el hígado; la vía metabólica más importante es la N-demetilación que da lugar a dos derivados inestables (metadona mono- y di-metilada) que forman por ciclación espontánea pirrolidinas y pirrolinas. Otra vía metabólica descrita es la hidroxilación a metadol, seguida de la N-demetilación a normetadol.

Buprenorfina

La buprenorfina es un opiáceo sintético que se considera agonista parcial ya que muestra características de agonista o de antagonista dependiendo de la dosis utilizada. Deriva de la tebaína y estructuralmente está bastante relacionado con la morfina.

Es mucho más potente que la morfina (10 mg de morfina IM o SC son equivalentes a 0,3 mg de buprenorfina); si bien la duración de sus efectos es aproximadamente similar.

Este fármaco es casi completamente metabolizado en el hígado mediante N-demetilación para formar norbuprenorfina, ambos compuestos son también conjugados con ácido glucurónico. Tras la administración oral la buprenorfina es metabolizada intensamente en la mucosa gastrointestinal y en el hígado por lo que sufre un importante efecto de primer paso hepático.

2.2. LA HEPATOTOXICIDAD DE LOS OPIÁCEOS

Las enfermedades hepáticas, tanto agudas como crónicas, derivadas de la utilización y del abuso de los opiáceos, constituyen una de las complicaciones más frecuentes y de mayor gravedad por sus secuelas. La mayoría de disfunciones hepáticas asociadas con estos fármacos se han detectado en individuos drogodependientes que utilizan los opiáceos sin prescripción médica. Como dato concreto podemos decir que en nuestro país, las enfermedades hepáticas representan el 53,5% de los procesos patológicos observados en adictos a los opiáceos por vía parenteral (2). También, aunque en proporción muy inferior, se han descrito hepatopatías relacionadas con la utilización clínica de los opiáceos (17, 22, 112, 222).

La patogénesis de la disfunción hepática asociada al abuso de los opiáceos no está claramente establecida, y ha sido una fuente de controversia durante los últimos años.

Las *investigaciones clínicas* han conducido a posturas distintas respecto al papel de los opiáceos en la disfunción hepática. El punto clave de la controversia ha girado entorno a la siguiente cuestión: ¿La disfunción hepática, tan frecuente en los adictos a los opiáceos, se debe a las infecciones víricas y al abuso del alcohol ó está causada por un efecto hepatotóxico producido por estas drogas?.

La transmisión de la hepatitis vírica aguda entre los adictos a los opiáceos es un hecho frecuente que ya se describió por primera vez en 1950 (209); desde entonces el número de

observaciones ha ido en aumento paralelamente a la escalada de la adicción a los narcóticos (34, 35, 50, 204). Este fenómeno se ha atribuido habitualmente a la transmisión parenteral del virus mediante la utilización de agujas hipodérmicas contaminadas (97, 199) sin que pueda desdeñarse como factor adicional la promiscuidad sexual.

El consumo de alcohol (82) y la presencia de adulterantes en la droga (167) también son fenómenos relacionados frecuentemente con el abuso de los opiáceos; y, algunos autores como Gelb y col. (82) llegan a la conclusión de que el alcohol es el factor más importante en el desarrollo de enfermedades hepáticas irreversibles, tanto en heroinómanos como en ex-heroinómanos en tratamiento con metadona.

En oposición a los estudios anteriores existen otros trabajos clínico-epidemiológicos en los que se demuestra que las hepatopatías encontradas en adictos a los opiáceos no tienen solamente una etiología vírica o alcohólica:

- Muchos adictos a los opiáceos asintomáticos, que no presentan marcadores serológicos de infección hepática vírica, presentan una elevación persistente de las transaminasas séricas. Este fenómeno se observa en un porcentaje superior al 50% entre los drogadictos que son admitidos en un programa de deshabituación (51, 60).

- Tras el estudio de biopsias hepáticas o de necropsias de individuos asintomáticos adictos a la heroína, se ha encontrado que un 60-80% mostraban la existencia de hepatopatía no vírica (6, 52).

- Otros estudios también recogen la existencia de anomalías en la función hepática en adictos a los opiáceos que no se administraban la droga por vía intravenosa y que, por lo tanto, se podía excluir en ellos la transmisión vírica parenteral (48).

Esta serie de evidencias clínicas ha llevado a algunos autores a sugerir que los opiáceos por sí mismos son capaces de provocar la disfunción hepática (52, 156).

La investigación con *animales de experimentación* parece apoyar la hipótesis del papel hepatotóxico de los opiáceos. Los trabajos, realizados principalmente con roedores, demuestran que el tratamiento con morfina produce una elevación de las transaminasas séricas (48), induce una depleción del GSH hepático (126), provoca cambios ultraestructurales a nivel del retículo endoplasmático liso (30) y hace disminuir el contenido en citocromo P-450 y la actividad oxidativa microsomal (5, 108).

Los trabajos realizados con metadona y otros opiáceos utilizando animales de experimentación también sugieren el posible efecto hepatotóxico de estos fármacos (67, 117, 127, 159).

Así mismo, las investigaciones realizadas con *sistemas celulares in vitro* demuestran que la morfina y la metadona no solo afectan la viabilidad celular si no que también alteran funciones metabólicas importantes (16, 71, 98, 99, 177, 187, 217).

Todos estos resultados permiten concluir que, si bien hay evidencias de que la hepatitis vírica, el abuso del alcohol, los adulterantes y el modo de vida de los drogadictos son causas importantes en el desarrollo de las hepatopatías observadas en los adictos a los opiáceos, el efecto en el hígado del propio opiáceo es un factor que también ha de ser tenido en cuenta.

2.3. MECANISMOS DE LA HEPATOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS

El mecanismo molecular a través del cual los opiáceos ejercen su efecto hepatotóxico en el organismo ha sido también un asunto controvertido que aún no está resuelto en su totalidad.

Las investigaciones con animales de experimentación llevaron a varios autores a postular que el efecto hepatotóxico de la morfina esta mediado por el sistema nervioso central (48). En estos trabajos se demostró que la elevación de las transaminasas séricas provocada por la morfina no se producía en absoluto en animales previamente hipofisectomizados y, se prevenía parcialmente en los adrenosectomizados. Esto está directamente

relacionado con el hecho conocido de que dosis únicas de narcóticos estimulan la respuesta adrenocortical mediante la hipersecreción de ACTH. En trabajos similares se demostró además que el antagonista opiáceo naltrexona atenuaba la elevación de las transaminasas (48) y bloqueaba la depleción del GSH (126) producida por la morfina, lo que también permitía sugerir que el mecanismo podía ser dependiente del SNC.

Sin embargo una serie de evidencias posteriores a las descritas han permitido sugerir que el efecto hepatotóxico de los opiáceos no está exclusivamente mediado por el SNC.

En primer lugar, se ha demostrado que la naltrexona no antagoniza los efectos del propoxifeno y de otros análogos de la metadona (126, 127) por lo que no puede asegurarse que el mecanismo tóxico de todos los opiáceos es dependiente del SNC.

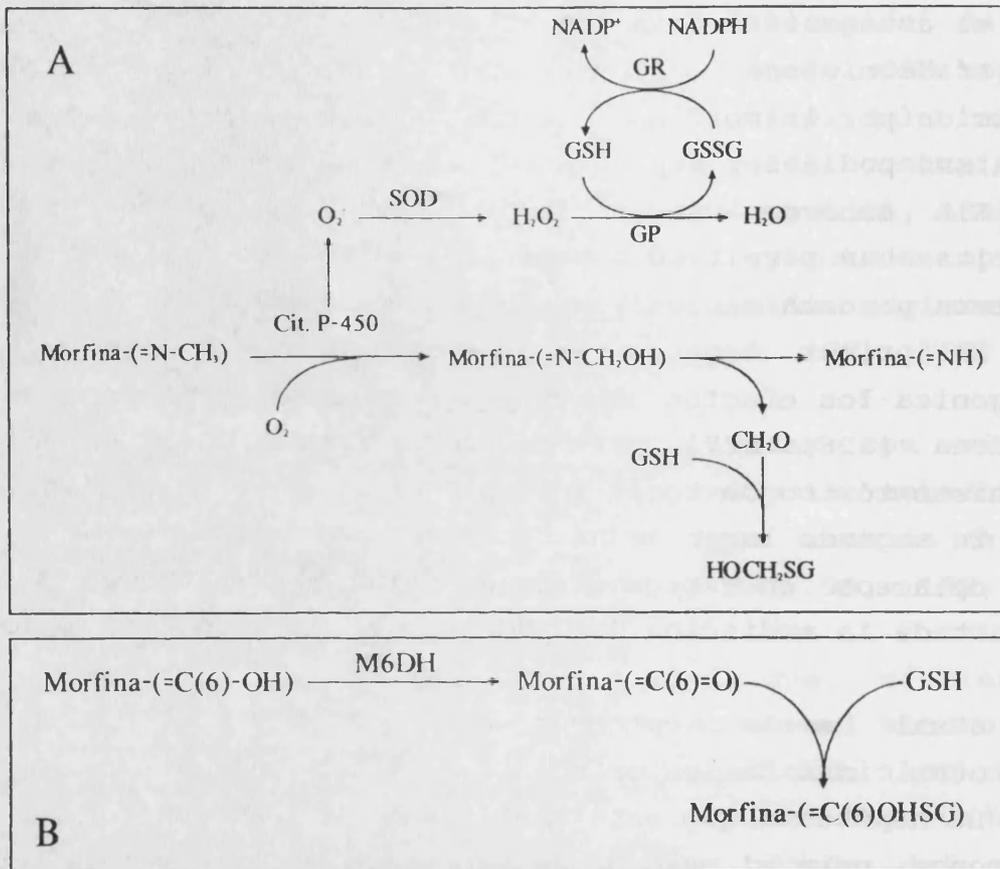
En segundo lugar se ha demostrado el efecto hepatotóxico de los opiáceos en varios sistemas celulares *in vitro* donde está descartada la mediación del SNC (16, 71, 98, 99, 177, 187, 217).

¿Cual sería entonces el mecanismo molecular de la hepatotoxicidad de los opiáceos?

La hipótesis que está recibiendo más evidencias a su favor, al menos para el caso de la morfina, es la que relaciona el efecto hepatotóxico de los opiáceos con su metabolización y con la aparición de metabolitos intermediarios reactivos, que ocasionarían lesiones de distinta naturaleza en el hepatocito.

Algunos autores, de acuerdo con la hipótesis anterior, sugieren que el metabolito reactivo se generaría durante la metabolización de la morfina por el citocromo P-450 (71, 127). La depleción del GSH, previa a la lesión hepática, se produciría por dos mecanismos distintos (71); uno sería el estrés oxidativo sufrido como consecuencia de la oxidación de NADPH por el citocromo P-450 en los microsomas hepáticos y la consecuente generación de H_2O_2 (que se elimina por la acción de la GSH peroxidasa y/o de la catalasa); el mecanismo más importante sería la formación de un conjugado con GSH como consecuencia de la denitilación de la morfina por el citocromo P-450 (Esquema 4.A). Tras la depleción del GSH los intermediarios electrofílicos de la

morfina generados por el citocromo P-450, serían los causantes de la lesión a los hepatocitos.



Esquema 4. Depleción de GSH por morfina y generación de intermediarios electrofílicos (SOD, superóxido dismutasa; GP glutation peroxidasa; GR, glutation reductasa; M6DH, morfina-6-deshidrogenasa).

Por el contrario Nagamatsu y col. (177), trabajando también con hepatocitos de rata, concluyen que la hepatotoxicidad inducida por morfina podría ser debida a la formación de morfina (un intermediario reactivo electrofílico no derivado del citocromo P-450 y que ataca nucleófilos intracelulares tales como GSH y proteínas) (Esquema 4.B).

Yamano y col. (227) demuestran que la enzima citosólica morfina-6-deshidrogenasa cataliza la deshidrogenación de la morfina para dar morfina, y que a su vez es capaz de reducir a

la naloxona a 6-alfa-naloxol. Por lo que concluyen que el antagonista opiáceo naloxona suprimiría la hepatotoxicidad de la morfina por inhibición competitiva a nivel de sustrato y la consiguiente disminución en la producción del metabolito reactivo morfinona.

En otro trabajo similar Ohno y col. (187) llegan a la conclusión de que el papel del citocromo P-450 en la mediación de la hepatotoxicidad de morfina en ratas, aunque no se puede descartar, es poco importante y probablemente la morfina-6-deshidrogenasa es la enzima mediadora fundamental.

En cualquier caso, los acontecimientos que suceden desde la aparición del metabolito reactivo hasta la muerte celular no se conocen en la actualidad. Si que se han descrito varios efectos negativos derivados de la toxicidad a nivel molecular como por ejemplo, la depleción de las reservas energéticas (98, 99), la inhibición de la síntesis de proteínas (16), la disminución del contenido en citocromo P-450 y actividades asociadas (5, 108), la acumulación de vesículas lipídicas (217), y la destrucción de membranas celulares y liberación de enzimas citosólicos (48, 126, 177).

La mayoría de estudios sobre el mecanismo molecular de la hepatotoxicidad se han realizado con morfina.

En el caso de metadona también se ha demostrado su efecto directo, tanto sobre la viabilidad como sobre funciones metabólicas de células de origen hepático (16, 117). Por otra parte, en trabajos realizados con roedores se ha relacionado la letalidad de la metadona con su mayor o menor metabolización en el hígado (159).

En relación con la hepatotoxicidad de otros opiáceos (meperidina o buprenorfina), hay muy pocas o ninguna evidencia descrita. Únicamente alguna referencia clínica (112) y ciertos estudios que relacionan la alteración de su metabolización hepática y la toxicidad general (26, 53, 154), sirven como sugerencia del potencial hepatotóxico que otros opiáceos pueden tener también en el hombre.

3) Modelos biológicos para el estudio de la hepatotoxicidad

Tal y como ha quedado reflejado en el apartado anterior la hepatotoxicidad de los opiáceos es un tema controvertido en el que aún quedan bastantes incógnitas por resolver. En concreto se puede decir, que pese a las evidencias obtenidas mediante la experimentación animal y los ensayos *in vitro*, no existe una demostración clara del efecto hepatotóxico directo de los opiáceos en el hepatocito humano. Por otra parte la mayoría de estos estudios se han realizado con morfina; queda por analizar el potencial hepatotóxico de otros muchos opiáceos integrantes de este grupo.

Las evidencias clínicas son una ayuda importante cuando se estudia el potencial hepatotóxico de compuestos utilizados como fármacos. Pero en el caso de los opiáceos las evidencias clínicas son contradictorias, consecuencia del uso extramédico de estos compuestos.

Los ensayos de hepatotoxicidad, por razones obvias, no pueden realizarse en el ser humano, y hay que utilizar otros modelos biológicos alternativos que reproduzcan, en la medida de lo posible, las características del hígado humano.

3.1 MODELOS IN VIVO

El animal de laboratorio usado con mayor frecuencia ha sido la rata, y la inmensa mayor parte de los resultados han sido obtenidos en este animal. La rata tiene, no obstante, un patrón de metabolismo de fármacos y una susceptibilidad a hepatotoxinas distinta en parte a la del hombre (103) por lo que es necesario para una mayor seguridad la utilización en paralelo de otras especies animales.

Los parámetros utilizados en este tipo de estudios son de tres tipos (194, 229, 237, 240): 1) *Exámen histológico* (microscopía óptica). 2) *Indicadores bioquímicos de lesión celular* (valoración en plasma de actividades enzimáticas específicas, indicadoras de lesión hepática y marcadoras de procesos colestásicos).

3) *Indicadores metabólicos de función hepática* (test dirigidos a comprobar la acción del fármaco sobre las funciones metabólicas más importantes del hepatocito: glucólisis-gluconeogénesis, síntesis y degradación de glucógeno, síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, síntesis de proteínas plasmáticas, síntesis de urea, síntesis y excreción de sales biliares, etc..).

Dado que entre el hombre y los animales de laboratorio existen diferencias significativas cualitativas y cuantitativas en el modo de metabolizar los medicamentos (103), los resultados obtenidos con animales de laboratorio aun siendo de gran valor en la evaluación del riesgo tóxico, no son extrapolables en un 100% al hombre. El hecho de que un fármaco no se haya manifestado como hepatotóxico en animales de experimentación no excluye el que no pueda serlo en un pequeño porcentaje para humanos. La literatura médica está llena de ejemplos de daño hepático por el uso de fármacos, que sin embargo habían sido considerados como seguros en los test rutinarios con animales (54, 148, 185).

Por otra parte, la actual exigencia social sobre una mayor seguridad en los nuevos fármacos contrasta con la creciente oposición al uso masivo de animales de laboratorio, por otra parte necesarios para evaluar los riesgos tóxicos. Ello ha promovido el interés científico por desarrollar modelos *in vitro* complementarios y en parte alternativos a la experimentación *in vivo*.

3.2. MODELOS IN VITRO

Mediante el uso de modelos hepáticos *in vitro* se examinan los efectos de los fármacos en condiciones en las que se desvinculan los efectos de otros órganos, facilitando así el estudio de los mecanismos por los que los compuestos ejercen su acción hepatotóxica.

Históricamente fueron el *hígado perfundido* y los *cortes de hígado* los primeros en ser utilizados para la evaluación de la hepatotoxicidad *in vitro* (9, 57, 87, 226).

El uso de los *hepatocitos en suspensión* para estudios toxicológicos, comenzó durante la pasada década cuando las técnicas de disgregación del hígado mediante perfusión con colagenasa permitió la obtención de hepatocitos aislados e intactos (15). Los hepatocitos, si se obtienen en condiciones de disgregación del hígado suaves, conservan su actividad metabólica y actividades enzimáticas de biotransformación (21, 172) durante algunas horas. Las células son incubadas en medios muy simples (sales glucosa y aminoácidos) y en este sistema biológico pueden estudiarse los efectos citotóxicos de xenobióticos y su interferencia con el metabolismo celular (105, 136). Este sistema es relativamente simple, pero dado que la supervivencia celular es muy reducida su uso queda limitado a la evaluación de la citotoxicidad aguda a corto plazo.

Los *cultivos celulares* son un desarrollo metodológico posterior en donde hepatocitos obtenidos bien directamente del hígado de un animal (cultivo primario) o procedentes de una línea celular (establecida por lo general a partir de hepatomas), se mantienen en cultivo a lo largo de varios días expuestos a la acción de xenobióticos, evaluando en ellos una serie de parámetros bioquímicos indicadores de la toxicidad hepática.

El uso de hepatomas para estudios de hepatotoxicidad ha sido revisada recientemente con relativa amplitud (78, 79, 155), en cualquier caso, es importante señalar que el hecho de que la mayor parte de las hepatotoxinas lo sean tras su transformación por los enzimas microsomales del hígado, y el que las líneas celulares actualmente existentes carecen en parte o en todo de la capacidad de expresar dichas actividades enzimáticas (58, 101, 200), hace que la utilidad por el momento de tales sistemas sea reducida.

El cultivo primario de hepatocitos es una aproximación más real al estatus bioquímico de esas células en el hígado (23, 44, 90, 93, 119) y es un modelo de elección frecuentemente utilizado para el estudio del efecto tóxico de medicamentos (40, 41, 43, 45, 46, 102, 107, 213, 218).

Este sistema *in vitro* tiene en principio una serie de ventajas objetivas:

- 1) Su uso es posible durante las fases iniciales de desarrollo de un fármaco.
- 2) Requiere muy poco principio activo.
- 3) Reduce drásticamente el número de animales necesario.
- 4) Permite, como en el caso de hepatocitos humanos, tener una información muy específica y muy directa sobre los efectos potenciales sobre el hígado humano.

Sin embargo para que la información que tal sistema proporciona tenga la "calidad" requerida hace falta tener en cuenta varios factores:

- 1) Uso de un sistema biológico que reproduzca en gran medida el comportamiento del hígado en el organismo.
- 2) Selección adecuada de los parámetros indicadores de toxicidad, para poder evaluar los efectos hepatotóxicos *in vitro* con la menor probabilidad de error.
- 3) Diseño adecuado de los experimentos de manera que los resultados obtenidos *in vitro* sean extrapolables a *in vivo*.

3.3. HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO PRIMARIO COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDIOS DE HEPATOTOXICIDAD

El desarrollo de técnicas para el aislamiento y cultivo de hepatocitos humanos ha puesto a disposición de los investigadores un modelo celular enormemente valioso. En la actualidad, la facilidad para obtener células de biopsias quirúrgicas muy pequeñas (7, 91, 94, 104, 212) ha hecho que sea posible el obtener los cultivos de manera regular y de múltiples donantes. Esto facilita, por primera vez, el que sea posible examinar los efectos de los medicamentos sobre el hígado humano antes de experimentar con el hombre.

Pero ¿el cultivo de hepatocitos humanos cumple con los requisitos necesarios para que la información derivada de ellos sea aplicable al hombre?

La primera premisa para que un modelo celular sea de uso práctico en un estudio bioquímico y toxicológico es que en el cultivo se reproduzca el comportamiento bioquímico del hígado humano y conserve la capacidad de biotransformación.

Los hepatocitos humanos expresan su funcionalidad hepática típica en condiciones de cultivo químicamente definidas, y lo hacen durante más tiempo que los hepatocitos de rata (7, 90, 91, 94). En particular, mantienen durante más tiempo los niveles de citocromo P-450 basales y las actividades monooxigenasas asociadas (Fase I) (64, 100). Así mismo, los hepatocitos humanos son capaces de responder a la inducción *in vitro* por 3-metilcolantreno y fenobarbital, los dos inductores del citocromo P-450 más conocidos (25, 64).

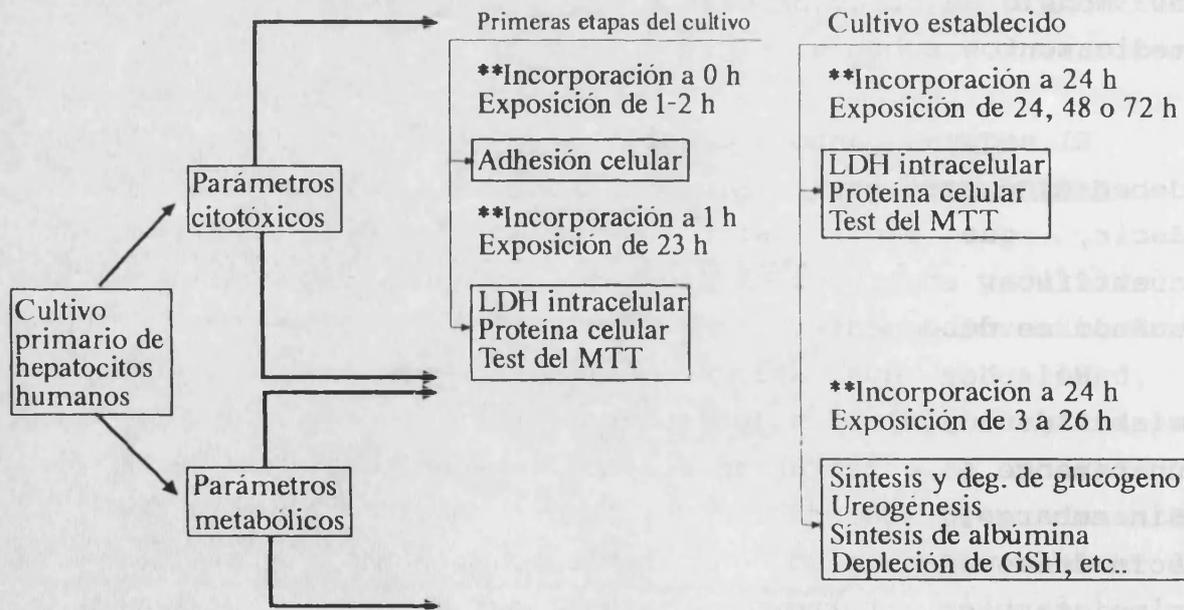
Por otra parte, y a diferencia de lo observado con las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, los hepatocitos humanos mantienen las actividades de conjugación (Fase II) prácticamente invariables a lo largo del cultivo (40, 90, 100).

La capacidad de los hepatocitos humanos de expresar enzimas de Fase I y II en cultivo, convierte a este sistema biológico en el modelo de elección para el estudio de los efectos tóxicos de medicamentos sobre el hígado (103, 106).

El segundo punto a considerar es qué parámetros indicadores deben escogerse para evaluar la toxicidad hepática in vitro. Es decir, qué medir (elección del indicador para detectar y cuantificar un efecto citotóxico, metabólico o colestásico), y cuándo se debe medir.

No hay que aplicar únicamente criterios simples de viabilidad celular en los ensayos *in vitro*, ya que de este modo únicamente se detectarían efectos tóxicos claros (42, 92, 95). Sin embargo, los efectos tóxicos sobre el hepatocito abarcan, no solo daño morfológico constatable, mutagénesis y muerte celular, sino también alteraciones metabólicas que, sin comprometer la supervivencia celular, tienen repercusión sobre el funcionamiento del hígado a nivel del organismo y su homeostasis (41, 43, 45, 46, 145, 157).

Los criterios aplicados han de tener en cuenta que la mayor parte de los fármacos hepatotóxicos son capaces de alterar de forma notable el metabolismo de los hepatocitos aun a concentraciones a las que no producen efecto citotóxico aparente. Por ello es conveniente evaluar tanto parámetros indicadores de citotoxicidad, como parámetros indicadores de daño metabólico; utilizando en este segundo caso concentraciones del fármaco compatibles con la supervivencia del hepatocito. Además, los parámetros indicadores de daño metabólico han de ser los suficientes para poder examinar la potencial acción hepatotóxica en la mayoría de funciones metabólicas del hepatocito; de este modo, las acciones hepatotóxicas específicas en rutas bioquímicas concretas no escaparán a la investigación. En este sentido en nuestro laboratorio se ha desarrollado un test de hepatotoxicidad completo, que abarca ambos tipos de parámetros y que se encuentra resumido en el Esquema 5. La utilidad de este test en el estudio de la hepatotoxicidad de xenobióticos ya ha sido demostrada ampliamente (41, 43, 45, 46, 145, 157).



Esquema 5. Protocolo experimental para el estudio *in vitro* de la hepatotoxicidad de xenobióticos.

La extrapolación de los resultados experimentales observados *in vitro* a *in vivo* es hoy en día el aspecto crucial en la utilización de modelos celulares. Los modelos *in vitro* proporcionan una información clara cuando de lo que se trata es de decidir cuál, de entre una familia de compuestos, es el menos tóxico en términos de concentración, o si un compuesto es más o menos hepatotóxico que otro. Sin embargo, es difícil predecir con seguridad absoluta si un determinado fármaco será o no hepatotóxico *in vivo*. En este segundo caso, los resultados obtenidos con estos sistemas son aproximados pero no absolutos. Ahora bien, si se tienen en cuenta una serie de requisitos y consideraciones los resultados obtenidos *in vitro* pueden ser lo suficientemente fiables como para que puedan extrapolarse al hombre con una razonable precisión.

Uno de los requisitos fundamentales es la *sensibilidad del modelo biológico*:

Un sistema *in vitro* debe ser suficientemente sensible para detectar todas las hepatotoxinas potenciales que ocasionan efectos *in vivo* sin falsos negativos ni falsos positivos.

Durante los últimos años se ha dirigido un gran esfuerzo para establecer el grado de sensibilidad y la validez de los modelos *in vitro* en la predicción de la toxicidad humana; en este sentido se están desarrollando importantes proyectos multicéntricos como los denominados FRAME (139) o MEIC (28). El objetivo general de estos proyectos es la evaluación de la toxicidad producida por compuestos tóxicos conocidos, con mecanismos de acción distintos, en un gran número de laboratorios diferentes, mediante la utilización exclusiva de modelos *in vitro*. Los resultados obtenidos se han correlacionado después con los datos conocidos referentes a la toxicidad aguda y crónica de estos mismos compuestos en el hombre. Estos estudios revelan que los sistemas biológicos *in vitro* son capaces de predecir la toxicidad en el hombre, de las toxinas de acción conocida, tan bien e incluso mejor que los roedores (rata y ratón), generalmente utilizados para estos fines (72, 73, 75).

En el caso concreto de los hepatocitos en cultivo también se han realizado bastantes trabajos que demuestran su sensibilidad y

predictividad de la hepatotoxicidad en el hombre (42, 92, 95, 219, 220). Estudios realizados en nuestro laboratorio con hepatocitos en cultivo, mediante la aplicación del protocolo de hepatotoxicidad anteriormente descrito a tres hepatotoxinas de acción conocida (α -amanitina, D-galactosamina y tioacetamida); llevaron a la conclusión de que los parámetros citotóxicos y metabólicos que resultaron afectados más sensiblemente guardaban una estrecha correlación con las alteraciones morfológicas y metabólicas descritas *in vivo* para cada una de estas hepatotoxinas. Además los efectos encontrados se observaron a concentraciones iguales o inferiores a las estimadas como tóxicas para el hombre (42, 92, 95).

Para la extrapolación al hombre de los efectos encontrados *in vitro* es necesario también tener en cuenta una serie de *consideraciones farmacocinéticas*, que permiten traducir los datos de concentración tóxica encontrados en el modelo *in vitro* a valores de concentración plasmática en el hombre.

Las consideraciones farmacocinéticas necesarias para la interpretación correcta del efecto tóxico observado *in vitro* son tanto más complejas cuanto mayor es el número de características del fármaco tomadas en consideración. Las más importantes son: volumen de distribución del fármaco, vida media, vía de administración, biodisponibilidad, y porcentaje de unión a proteínas plasmáticas. El objetivo final es averiguar las concentraciones del fármaco libre que se alcanzan en sangre periférica o portal tras la administración de dosis terapéuticas, ya que es evidente, que un fármaco podrá considerarse tanto más seguro cuanto su concentración tóxica *in vitro* se aleje más de su concentración plasmática tras dosis terapéuticas.

Por otra parte, en el caso concreto de la predicción de la hepatotoxicidad también es importante considerar los siguientes factores: porcentaje de extracción hepática tras su absorción intestinal, relación concentración plasmática / concentración hepática (acumulación en el hígado), y porcentaje de la dosis que sufre excreción biliar y circulación enterohepática.

4) Objetivos

Tal y como ha quedado reflejado en los apartados anteriores, la hepatotoxicidad de los opiáceos es un tema controvertido en el que aún quedan bastantes incógnitas por resolver. En concreto se puede decir, que pese a las evidencias obtenidas mediante la experimentación animal y los ensayos *in vitro*, no existe una demostración clara del efecto hepatotóxico directo de los opiáceos en el hepatocito humano. Por otra parte la mayoría de estos estudios se han realizado con morfina; queda por analizar el potencial hepatotóxico de otros muchos opiáceos integrantes de este grupo.

Teniendo en cuenta estos hechos nos hemos propuesto dos objetivos fundamentales en esta Tesis:

El primero de los objetivos tiene por finalidad examinar el efecto hepatotóxico de los opiáceos, morfina, meperidina, metadona y buprenorfina, sobre los hepatocitos humanos en cultivo; estableciendo su potencia hepatotóxica relativa e interpretando los resultados obtenidos *in vitro* en relación a su posible repercusión *in vivo*; es decir extrapolando los resultados al hombre.

El segundo de los objetivos propuestos consiste en estudiar el efecto hepatotóxico de estos cuatro opiáceos sobre otros sistemas celulares: cultivo de hepatocitos de rata y cultivos de líneas celulares continuas, de origen hepático (HepG2 y FaO) y de origen no hepático (Hela y 3T3).

La finalidad que se persigue es la de poder realizar un análisis comparativo de la hepatotoxicidad de estos compuestos en todos los sistemas celulares (hepáticos y no hepáticos; humanos y no humanos), para poder responder a dos cuestiones principales:

1.- ¿Son los hepatocitos humanos especialmente susceptibles a la acción de los opiáceos, o presentan una sensibilidad similar a la de otras especies?

2.- ¿El efecto citotóxico de los opiáceos es órgano-específico (selectivo hacia los hepatocitos), o bien es toxicidad de tipo basal, que se expresa de modo similar en cualquier tipo celular?

MATERIALES y METODOS

Materiales

1. BIOPSIAS HEPATICAS QUIRURGICAS

El aislamiento y cultivo de los hepatocitos humanos se realizó a partir de biopsias hepáticas quirúrgicas obtenidas en pacientes que fueron sometidos a colecistectomía y que previamente dieron su consentimiento.

Los pacientes no padecían ninguna otra patología hepática conocida, no eran consumidores habituales ni de alcohol ni de ningún tipo de droga, y no recibieron medicación durante la semana anterior a la operación.

La biopsia obtenida con una sola superficie de corte y dos o tres ramificaciones laterales de la arteria hepática fue puesta inmediatamente en medio Ham F-12 frío y fue procesada dentro de la hora siguiente a la resección.

2. PRODUCTOS

La morfina y la meperidina (Unión Químico-Farmacéutica S.A., Barcelona) se obtuvieron a través de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios (Control de Estupefacientes y Sicotrópicos). La buprenorfina y la metadona se obtuvieron de los Laboratorios Dr. Esteve S.A. (Barcelona).

Los reactivos de uso habitual en el laboratorio se adquirieron rutinariamente de las marcas comerciales Merck, Sigma, Scharlau, Boehringer Manheim y Panreac, de grado analítico o de grado HPLC en su caso.

Las placas de cultivo empleadas (placas tipo Petri de 3.5 y 6 cm de diámetro, multiplacas de 24 pocillos y microplacas de 96 pocillos) se obtuvieron de Nunc.

A continuación se detalla el origen de los reactivos más específicos empleados:

Medio de cultivo Ham F12	Flow
Medio de cultivo DMEM	Gibco

Medio de cultivo RPMI	Gibco
ST	Gibco
SBF	Gibco
Insulina	Nordisk
Dexametasona	Merck
Glucagón	Novo
Estreptomycin	Wasserman
Penicilina	CEPASA
Colagenasa	Boehringer Manheim

3. APARATAJE

- Baño de ultrasonidos Bransonic B-1200 E1 de Branson.
- Baño termostatzado con agitación Unitronic 6320100 de Selecta.
- Bomba peristáltica Multiperpex 2115 de LKB.
- Cabina de flujo laminar Esteril 2005 HPS de Captair.
- Cámara de flujo laminar de Air Flux.
- Centrífugas de mesa MSE Multex y CR1000 Jouan.
- Centrífuga de eppendorf Biofuge de Heraeus Christ.
- Centrífuga de placas de 24 pocillos Labofuge GL de Heraeus.
- Cromatógrafo líquido KNK-500 G de Konik equipado con:
 - . Inyector de muestras de 20 μ l 7125 de Reodyne.
 - . Detector UV/VIS SPD-6AV de Shimadzu.
 - . Registrador-integrador Chromatopac CR-3A de Shimadzu.
 - . Columna de fase reversa (C-18) Spherisorb S5 ODS2, 200 x 4,6 mm, de Phase Separation Ltd.
- Espectrofluorímetro Aminco-Browman de American Instrument.
- Espectrofotometro UV/VIS Graphicord UV-240, con un registrador Graphic Printer PR-1, ambos de Shimadzu.
- Estufa con atmósfera húmeda y ambiente de CO₂/O₂ controlado B5060 EK/O2 de Heraeus.
- Lector de microplacas MR600 de Dynatech.
- Microscopio invertido de contraste de fases modelo Diavert de Leitz-Wetlar, con cámara fotográfica incorporada.
- Ordenador personal 87XM de Hewlett Packard.
- pH/mV metro Digit 501 de Crison.

Métodos

1. OBTENCION DE LA SUSPENSION DE HEPATOCITOS HUMANOS

El aislamiento de los hepatocitos humanos se realizó mediante perfusión de la biopsia y digestión con colagenasa en dos etapas, según la técnica descrita por Strom y col. (212) con algunas modificaciones que describiremos a continuación.

El mantenimiento prolongado de los hepatocitos en cultivo requiere que tanto el proceso de aislamiento como todas las manipulaciones posteriores, se realicen en condiciones de máxima asépsia que aseguren la ulterior esterilidad del cultivo. Todas las operaciones que vamos a describir se realizaron por lo tanto en cámara estéril equipada con una cabina de flujo laminar horizontal.

El instrumental quirúrgico y material de vidrio necesario, se esterilizó por calor seco. Las soluciones salinas, agua, y medio de cultivo, se esterilizaron también convenientemente (calor húmedo en autoclave o filtración a través de filtros Millipore de 0,22 μm de poro). El material de plástico se esterilizó a su vez con óxido de etileno.

1.1. Soluciones de perfusión

La perfusión de la biopsia hepática se realiza con la solución salina tamponada que figura en la TABLA 1. Esta solución está ajustada a un pH de 7,5, se mantiene durante todo el proceso a 37 °C y se gasea continuamente con carbógeno (95% O₂ : 5% CO₂).

TABLA 1: SOLUCION DE PERFUSION BASE

<u>PRODUCTO</u>	<u>Conc. mM</u>	
NaCl	137,0	
KCl	2,7	
Na ₂ HPO ₄	0,7	pH 7,5
HEPES.....	10,0	
Glucosa.....	10,0	

La perfusión se realiza en dos etapas:

A) Inicialmente se perfunde la biopsia con salida libre utilizando 300 ml de la solución de perfusión base con EGTA 0,5 mM.

B) En la segunda etapa se perfunde la biopsia de modo recirculante con 100 ml de la solución de perfusión base sin EGTA en este caso, pero con CaCl₂ 5 mM y con 0,5-0,6 mg/ml de colagenasa con una actividad enzimática específica de 0,34-0,29 U/mg.

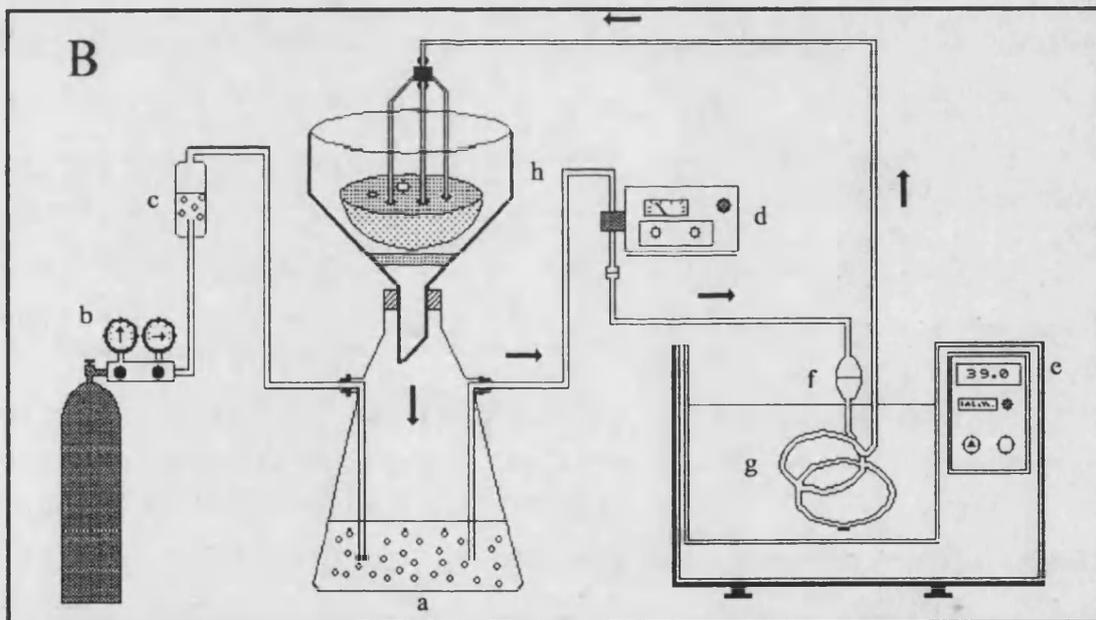
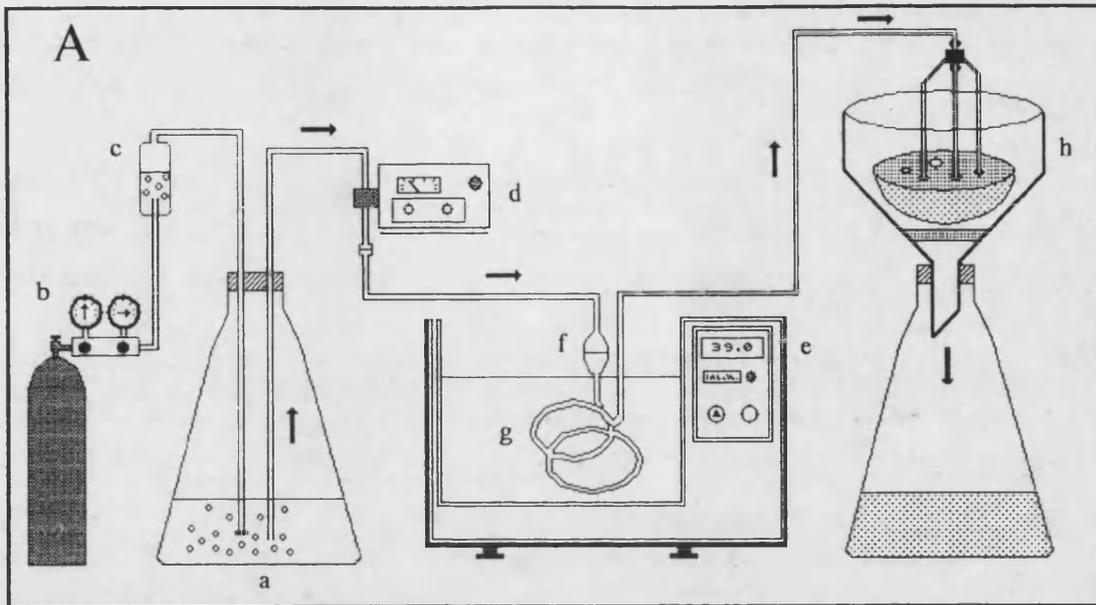
1.2. Procedimiento de aislamiento

El sistema de perfusión y el proceso general de aislamiento, estan representados en el ESQUEMA 1.

El circuito consta de:

- Un depósito que contiene la solución de perfusión (a), la cual se mantiene constantemente gaseada con carbógeno (b). Este gas pasa previamente por un frasco lavador de gases (c) que contiene NaCl 0,9% estéril y antibióticos (penicilina sódica 50 U/ml y sulfato de estreptomicina 50 µg/ml).

- Una bomba peristáltica (d) que impulsa la solución a través de un tubo de silicona de 2 mm de diámetro, y que suministra un flujo y una presión hidrostática regulada a voluntad.



ESQUEMA 1: A.- Etapa inicial, perfusión con salida libre.

B.- Segunda etapa, perfusión recirculante.

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| a) Depósito con solución de perfusión | b) Carbógeno |
| c) Frasco lavador de gases | d) Bomba peristáltica |
| e) Baño termostatizado | f) Ampolla captadora de burbujas |
| g) Serpentin | h) Biopsia canulada. |

- Un baño termostatzado (e) a 39°C, por el que discurre la solución de perfusión pasando a través de una ampolla captadora de burbujas (f) y un serpentín (g), con longitud suficiente para que la solución de perfusión alcance una temperatura constante de 37°C.

- El tubo de silicona termina en 1-3 catéteres (0,75 mm diámetro) que se insertan en el lumen de los orificios arteriales y venosos que se presentan en la única superficie de corte de la biopsia (h).

Tanto la temperatura como el pH de la solución de perfusión se controlan durante todo el proceso.

En la primera etapa de la perfusión la solución salina tamponada va atravesando la red vascular de la biopsia con objeto de lavar el hígado de su contenido hemático y facilitar la ruptura de desmosomas; esta acción es más efectiva si se adiciona el quelante EGTA que secuestra el calcio. Tras su salida libre, la solución de perfusión se recoge en un depósito colector y se desecha. El flujo óptimo es de 16-18 ml/min. ESQUEMA 1.A.

En la segunda etapa de la perfusión la solución salina con el CaCl_2 y la colagenasa se coloca en un depósito desde el cual es impulsada por la bomba peristáltica, y sobre el cual se situa el embudo-soporte de la biopsia para que la perfusión se convierta en recirculante ESQUEMA 1.B.

La colagenasa requiere calcio para su actuación, por lo que este debe ser añadido junto al enzima en este segundo periodo. La disgregación enzimática del hígado es óptima cuando se mantiene un compromiso entre la conservación de la integridad celular para obtener células viables sin daño, y la rapidez de la digestión para reducir la anoxia que se produce cuando se destruye la red vascular del hígado. Las colagenasas más efectivas no son precisamente las más purificadas. La obtenida directamente de Vibrio colerae, que contiene otras actividades proteolíticas que facilitan la disgregación celular, es mucho más efectiva.

Se mantiene un flujo de 12-14 ml/min y tras 30 min de perfusión con colagenasa se consigue la digestión casi completa de la trama conectiva del hígado, dándose por finalizado el

proceso de perfusión.

La biopsia hepática en este punto se transfiere a una placa Petri, donde se disgregan suavemente las células con la ayuda de una espátula. Esta suspensión se transfiere a un vaso de precipitados donde se completa la dispersión celular agitando suavemente con 100 ml de solución de perfusión base a 4°C (Tabla 1).

La suspensión celular se somete a continuación a una serie de procesos que incluye: filtración a través de doble gasa para eliminar los restos de tejido no digeridos, y centrifugación a 50 x g durante un min. El sobrenadante se desecha y el sedimento celular es de nuevo suspendido en 100 ml de medio de cultivo base a 4°C (medio nutritivo Ham F-12 complementado con 0,2% de albúmina y antibióticos). A continuación la suspensión celular vuelve a ser centrifugada en las mismas condiciones. Con estos lavados aseguramos la eliminación completa de la colagenasa, así como de células no parenquimáticas más ligeras y restos celulares. Finalmente, las células se resuspenden en medio de cultivo completo a 37°C, y se mantiene con agitación suave y gaseo constante con carbógeno, en la cabina de flujo laminar hasta el momento de la siembra.

Este método proporciona un rendimiento muy elevado en el aislamiento de hepatocitos humanos a partir de biopsia quirúrgica (15-20 x 10⁶ células viables por g de hígado).

1.3. Control de viabilidad y recuento celular

La viabilidad de la suspensión se determinó en varias alícuotas de la suspensión final mediante el test de exclusión del azul tripán. Este colorante es excluido por las células viables, que mantienen su membrana íntegra, y tiñe las células con la membrana dañada. El porcentaje de células capaces de excluir el colorante se determinó en una mezcla a partes iguales de suspensión celular y una solución de azul tripán 0,4% en cloruro sódico 0,9%. Según este criterio, nuestras suspensiones muestran una viabilidad entre el 85-95%.

El número de células/ml de suspensión final fue determinado basándonos en que la absorción a 660 nm de una suspensión celular puede correlacionarse con la concentración celular.

La relación entre ambas es lineal en un rango de concentraciones celulares comprendido entre $0,5-9 \times 10^5$ células/ml, o lo que es lo mismo, para lecturas comprendidas entre 0,1-1 O.D.

La ecuación de la recta experimental obtenida es:

$$\text{O.D.} = \text{Blanco} + 1,29 \times n^{\circ} \text{ células/ml (r=0,998)}$$

donde blanco es la lectura en O.D. a 660 nm del sobrenadante de la suspensión tras centrifugar un min a $50 \times g$.

Las alícuotas de la suspensión celular se diluyen convenientemente en NaCl 0,9%, para proceder a la lectura a 660 nm de la suspensión y el blanco, calculando mediante la fórmula el n° de células/ml de suspensión. Rutinariamente, y dependiendo del peso de la biopsia, se aislaron alrededor de 20×10^6 hepatocitos/g.

Una vez determinada la concentración celular y la viabilidad (proceso cuya duración en estas condiciones no sobrepasa los 5 min), la suspensión de hepatocitos se diluye con medio de cultivo y se ajusta a una concentración final determinada de n° células viables/ml dependiendo del tipo de soporte plástico que se vaya a utilizar, quedando así preparada para la siembra celular.

2. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS HUMANOS

2.1. Medio de cultivo

Como medio de cultivo utilizamos el Ham F-12, cuya composición se detalla en la TABLA 2, complementado con un 0,2% de BSA, insulina 10^{-8} M y antibióticos (penicilina sódica 50 U/ml y sulfato de estreptomina 50 $\mu\text{g/ml}$). El medio Ham F-12 está tamponado con bicarbonato y contiene glucosa 10 mM.

Este es el medio que consideramos como basal. Durante las primeras 24 h de cultivo este medio se complementa con un 2% de ST. A partir de las primeras 24 h el medio que se emplea esta libre de ST pero complementado con dexametasona 10^{-8} M.

TABLA 2: COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO Ham F-12

RODUCTO	mg/l
L-Alanina	8,91
L-Arginina HCl	210,70
L-Asparagina H ₂ O	15,01
Ac. L-aspártico ²	13,31
L-Cisteína HCl	31,53
Ac. L-glutámico	14,71
L-Glutamina	146,20
Glicina	7,51
L-Histidina HCl H ₂ O	20,96
L-Isoleucina	3,94
L-Leucina	13,12
L-Lisina HCl	36,53
L-Metionina	4,48
L-Fenilalanina	4,96
L-Prolina	34,54
L-Serina	10,51
L-Treonina	11,91
L-Triptófano	2,04
L-Tirosina (sal disódica)	6,76
L-Valina	11,72
Biotina	0,0073
Pantotenato cálcico	0,238
Colina (cloruro)	13,96
Ac. Fólico	1,32
Inositol	18,02
Nicotinamida	0,037
Piridoxina HCl	0,062
Riboflavina	0,038
Tiamina HCl	0,337
Vitamina B12	1,36
CaCl ₂ · 2H ₂ O	44,10
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,8346
KCl	223,70
MgSO ₄ · 7H ₂ O	147,90
NaCl	7600,00
Na HPO ₄	142,00
NaHCO ₃	1176,00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,863
D-Glúcose ²	1802,00
Piruvato sódico	110,00
Hipoxantina	4,08
Ac. lipoico	0,206
Metil linoleato	0,088
Putrescina · 2H ₂ O	0,1611
Timidina	0,727
Rojo fenol (sal disódica)	12,00

2.2. Soporte del cultivo

Como soporte sólido se han utilizado tres tipos de placas de cultivo de plástico: placas tipo Petri de 3 o 6 cm de diámetro, multiplacas de 24 pocillos y microplacas de 96 pocillos.

La superficie donde se adhieren los hepatocitos se recubrió con fibronectina mediante adsorción directa de esta proteína al plástico. El recubrimiento se realiza añadiendo a cada placa o pocillo una cantidad variable de ST en función del tamaño del área a recubrir ($5 \mu\text{l ST/cm}^2$, equivalente a $3,6 \mu\text{g}$ de fibronectina/ cm^2), que se extiende sobre la superficie del plástico con la ayuda de una espátula. Las placas así tratadas se dejan 30 min a temperatura ambiente en la cabina de flujo laminar y a continuación se lavan con agua bidestilada estéril y se dejan secar 15 min. De este modo se asegura la adsorción selectiva de la fibronectina del ST al plástico de la placa; el resto de los componentes del suero son eliminados mediante el lavado con agua bidestilada.

El tratamiento del plástico se realiza el mismo día de su utilización antes del inicio de la perfusión.

2.3. Siembra celular y desarrollo del cultivo

Para cada tipo de placa de cultivo el número de células sembradas y el volumen de medio fue el siguiente:

Placas de 6 cm \emptyset	1.750.000 células/3,5 ml.
Placas de 3,5 cm \emptyset	750.000 células/1,5 ml.
Placas de 24 pocillos	130.000 células/1,0 ml.
Placas de 96 pocillos	25.000 células/0,1 ml.

Esto equivale a una densidad final de 80.000 células por cm^2 de superficie, siendo la capacidad máxima de adhesión de los hepatocitos humanos 65-70.000 células/ cm^2 .

Inmediatamente las placas se transfieren a una estufa de cultivo con ambiente controlado (5% CO_2 / 95% aire) y atmósfera saturada de humedad, donde se mantienen a 37°C durante todo el tiempo del cultivo.

El medio se renueva una hora después de la siembra cuando el proceso de adhesión celular ya se ha completado, eliminando de esta manera las células muertas y las no adheridas, así como los restos celulares. Una vez adheridos a la placa de cultivo, los hepatocitos inician el proceso de extensión. A partir de este momento el medio se renueva cada 24 h.

3. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA

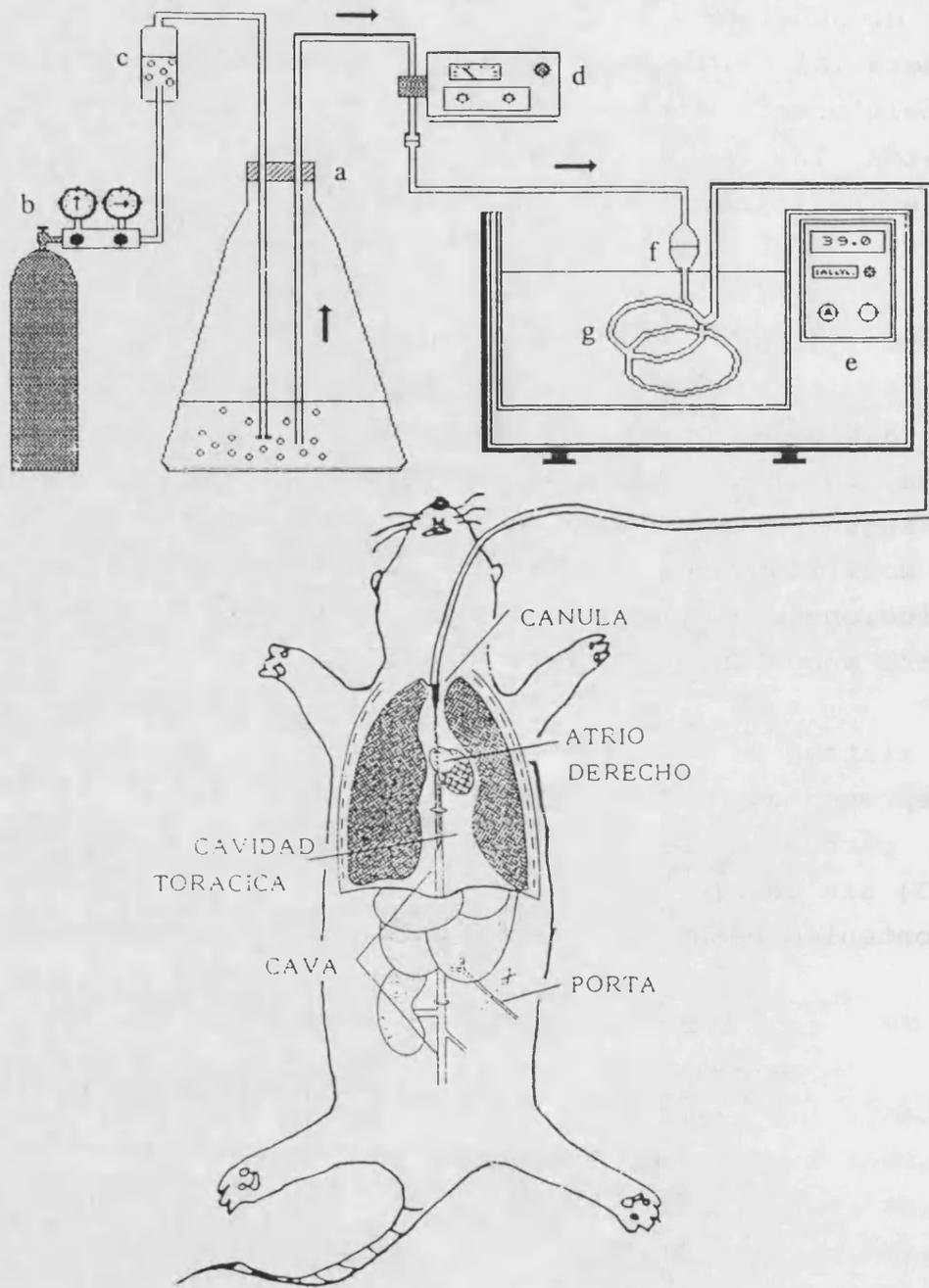
El aislamiento de los hepatocitos se realizó mediante perfusión *in situ* del hígado y digestión con colagenasa en dos etapas según la técnica descrita por Berry y Friend (15), con algunas modificaciones tanto en el proceso de perfusión como en las soluciones y tiempos de digestión, que describiremos brevemente a continuación.

El sistema de perfusión y el proceso general de aislamiento, están representados en el ESQUEMA 2.

La perfusión se inicia con 200 ml de medio Krebs-Ringer (TABLA 3) sin calcio pero con EGTA (80 μ M), para lavar el hígado de su contenido hemático y facilitar la ruptura de desmosomas.

TABLA 3: SOLUCION KREBS-RINGER

<u>PRODUCTO</u>	<u>Conc. mM</u>
NaCl	118,0
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2 pH 7,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
glucosa	10,0



ESQUEMA 2: Perfusión *in situ* del hígado de rata.

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| a) Depósito con solución de perfusión | b) Carbógeno |
| c) Frasco lavador de gases | d) Bomba peristáltica |
| e) Baño termostatzado | f) Ampolla captadora de burbujas |
| g) Serpentín | |

La solución sale libremente a la cavidad abdominal, y los primeros 100 ml de medio que lavan el hígado son desechados. En este momento se incorpora a los 100 ml restantes la colagenasa (30-50 mg según actividad) disuelta en cloruro cálcico (2,5 mM concentración final), con lo que se inicia la segunda etapa de la perfusión. En esta etapa la solución de perfusión es recogida de la cavidad abdominal, tras su salida del hígado y, previa esterilización por filtración se devuelve al depósito de partida para su recirculación.

Tras unos 10 minutos de digestión con colagenasa en las condiciones descritas, se consigue la disgregación casi completa de la trama conectiva del hígado, dándose por finalizado el proceso de perfusión.

Tras extraer el hígado de la cavidad abdominal la disgregación y dispersión celular se realiza con 100 ml de Krebs-Ringer con calcio. La suspensión celular obtenida se lava dos veces mediante centrifugación a 50 x g durante 1 min, resuspendiendo el sedimento celular con la misma solución salina.

El sedimento final se resuspende en 100 ml de medio de cultivo y se procede al recuento del número de células y de la viabilidad. Generalmente, y dependiendo del peso de la rata, se aislaron entre $250-400 \times 10^6$ hepatocitos, con una viabilidad 85-90%.

La siembra celular y posteriores cambios de medio se realizaron en condiciones similares a las descritas para el cultivo de hepatocitos humanos. Del mismo modo, los diseños experimentales para la determinación del efecto citotóxico de los opiáceos en cultivo de hepatocitos de rata fueron idénticos a los protocolos empleados para hepatocitos humanos, que se describen más adelante.

4. CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES CONTINUAS

Las líneas celulares utilizadas en esta Tesis se obtuvieron de la Sociedad Europea de Cultivos de Tejidos y fueron las siguientes:

L.celular	Origen	Tipo celular	Código
3T3 (A31)	Embrión de ratón Balb/C	Fibroblasto	86110401
FaO	Carcinoma hepatocelular de rata	Hepatocito	(63)
Hela	Carcinoma cervical humano	C. epitelial	85011430
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	Hepatocito	85060701

Las líneas celulares se cultivaron sobre frascos de cultivo de 75 cm² y se incubaron a 37°C en una estufa con una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 85% de humedad. Los medios de cultivo empleados fueron RPMI (81) para la línea celular FaO y DMEM (81) para las otras tres, complementados ambos con L-glutamina 2mM, antibióticos (sulfato de estreptomicina 50 µg/ml y penicilina sódica 50 U/ml), bicarbonato sódico 20 mM y un 10% de SBF.

En el momento de iniciar su cultivo en microplacas, las células fueron tratadas con tripsina 0,25% a pH 7,4 con objeto de despegarlas de la superficie del frasco de cultivo. A continuación se resuspendieron en el medio nutritivo correspondiente y se ajustaron a una densidad de 140.000 células viables/ml. La suspensión celular así obtenida se sembró en microplacas con un volumen de 0,1 ml/pocillo (14.000 células/pocillo). El cultivo se dejó crecer libremente en estas circunstancias durante 24 h hasta que las células alcanzaron un 75% de confluencia. En este momento se cambió el medio de cultivo (0,1 ml/pocillo) y se incorporaron los opiáceos (20 µl/pocillo). Tras 24 h de tratamiento se procesaron las microplacas y se determinaron los parámetros de citotoxicidad, tal como se describe en los siguientes apartados.

5. PREPARACION DE LOS OPIACEOS

La morfina se obtuvo en forma base cristalina y debido a su escasa solubilidad en medio acuoso fue necesario obtener previamente el clorhidrato mediante tratamiento con ácido clorhídrico 1 N en la proporción 1 mol morfina : 1.5 mol HCl. Posteriormente se añadió PBS hasta obtener una solución 50 mM.

La meperidina y la metadona se obtuvieron en forma de clorhidrato y se disolvieron en PBS. Las soluciones stock preparadas fueron en ambos casos 50 mM.

El clorhidrato de buprenorfina no se disolvió bien en PBS. En este caso se utilizó como disolvente acuoso HCl 1 mM y la solución stock de buprenorfina fue 3 mM.

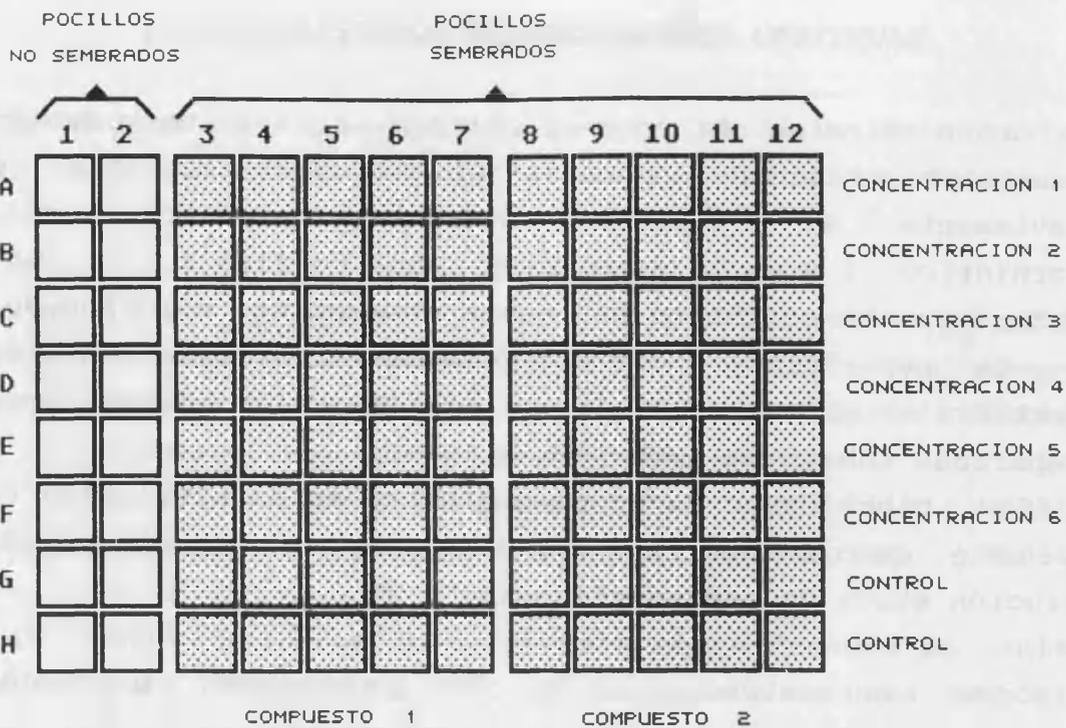
Las concentraciones de las soluciones preparadas se determinaron a partir de su absorción molar:

morfina,	λ_{\max}	= 284 nm,	E_{284}	= 1483,2 l ⁻¹ M ⁻¹ cm ⁻¹ ;
meperidina,	λ_{\max}	= 256 nm,	E_{256}	= 167,1 l ⁻¹ M ⁻¹ cm ⁻¹ ;
metadona,	λ_{\max}	= 292 nm,	E_{292}	= 433,9 l ⁻¹ M ⁻¹ cm ⁻¹ ;
buprenorfina,	λ_{\max}	= 285 nm,	E_{285}	= 1424,5 l ⁻¹ M ⁻¹ cm ⁻¹ .

Los opiáceos una vez preparados se esterilizaron por filtración a través de nitrocelulosa (Millipore de 0,22 μm φ) y se mantuvieron en oscuridad a 4° C. Las soluciones stock se renovaron cada 3-4 semanas. Las diluciones posteriores necesarias para su incorporación a las placas se realizaron en medio de cultivo, el mismo día de la incorporación.

6. METODOS PARA LA EVALUACION DE LOS EFECTOS CITOTOXICOS

La evaluación de los efectos citotóxicos de los opiáceos se hizo en microplacas de 96 pocillos especiales para cultivos celulares. En cada microplaca se sembraron 80 de los 96 pocillos, reservándose 16 para su uso posterior (curvas patrón, blancos de lectura, etc.) según el siguiente esquema:



En cada pocillo previamente recubierto con fibronectina, se sembraron 25000 células/100 μ l. En los cambios de medio posteriores el volumen de medio se redujo a 50 μ l/pocillo.

Los opiáceos se añadieron en un volumen de 10 μ l/pocillo cuando el volumen de medio era de 50 μ l, y en un volumen de 20 μ l/pocillo cuando el volumen de medio era de 100 μ l (por ejemplo en la siembra). Las incorporaciones de cada una de las concentraciones de los opiáceos se hicieron por quintuplicado.

Los lavados al final de los tratamientos se hicieron con 50 μ l de PBS (37°C)/pocillo, dos veces.

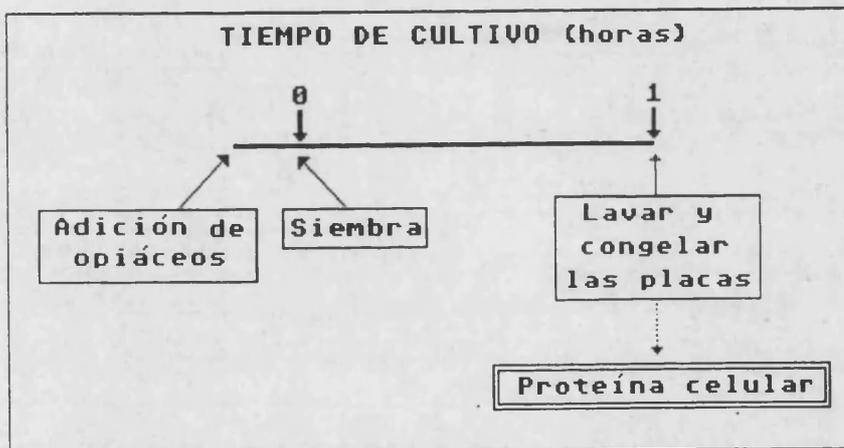
El vaciado y llenado en las microplacas se realizó con la ayuda de pipetas multicanal (12 canales), agitando suavemente las microplacas tanto durante los lavados con PBS como antes de los cambios de medio para facilitar la eliminación de las células muertas.

6.1. Etapas del cultivo en las que se evaluaron los efectos citotóxicos

6.1.1. Adhesión celular

La adhesión celular mediada por fibronectina es un proceso activo y selectivo para células vivas cuya alteración puede atribuirse a daños en la membrana celular o a interferencias en la unión fibronectina-receptor y conduce a la no adhesión de las células al pocillo.

Para estudiar el efecto de los opiáceos sobre el proceso normal de adhesión celular se siguió el diseño experimental que se muestra en el siguiente esquema:



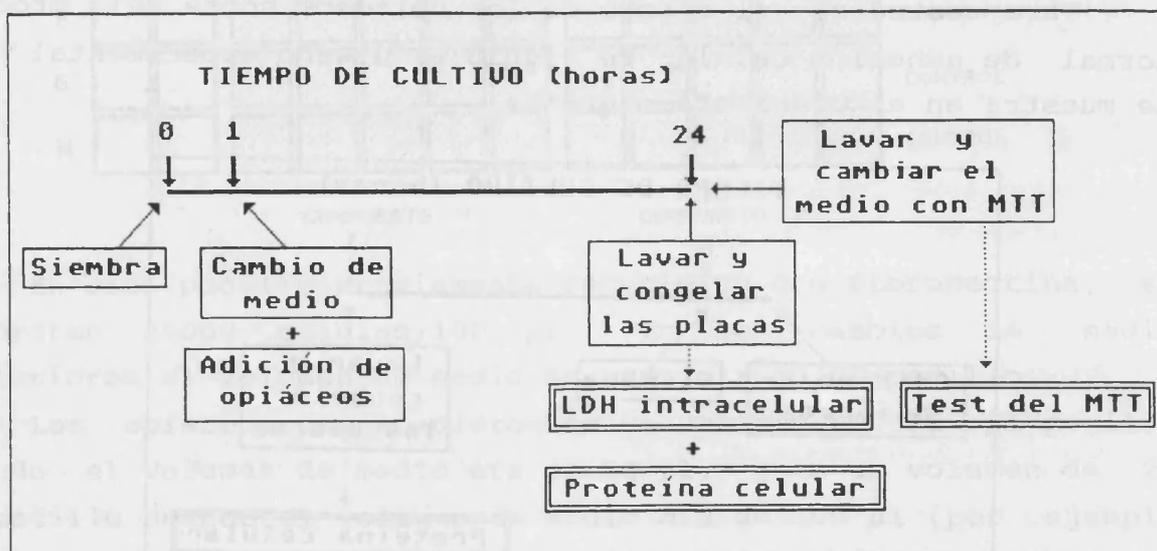
En primer lugar se añadieron a los pocillos diluciones seriadas de los opiáceos y a continuación se sembró la suspensión celular a la densidad adecuada. Tras 60-80 min de incubación a 37°C las microplacas se vaciaron y lavaron para eliminar las células no adheridas.

Para evaluar el efecto de los opiáceos sobre la adhesión se determinó la cantidad de proteína celular que había quedado retenida a los pocillos tras el tratamiento y se comparó con la de los pocillos control. Este parámetro de citotoxicidad se evaluó tal como se describe en el apartado 3.2.2, y está en relación directa con el número de células vivas adheridas en la placa de cultivo.

6.1.2 Extensión celular

En el desarrollo de este proceso están implicadas, de modo directo, la síntesis de RNA y proteínas, y la reorganización del citoesqueleto. Si el xenobiótico añadido afecta alguna de estas funciones celulares, entonces el proceso de extensión normal se ve alterado.

Para evaluar el efecto de los opiáceos en el cultivo durante el proceso de extensión se siguió el diseño experimental descrito en el siguiente esquema:



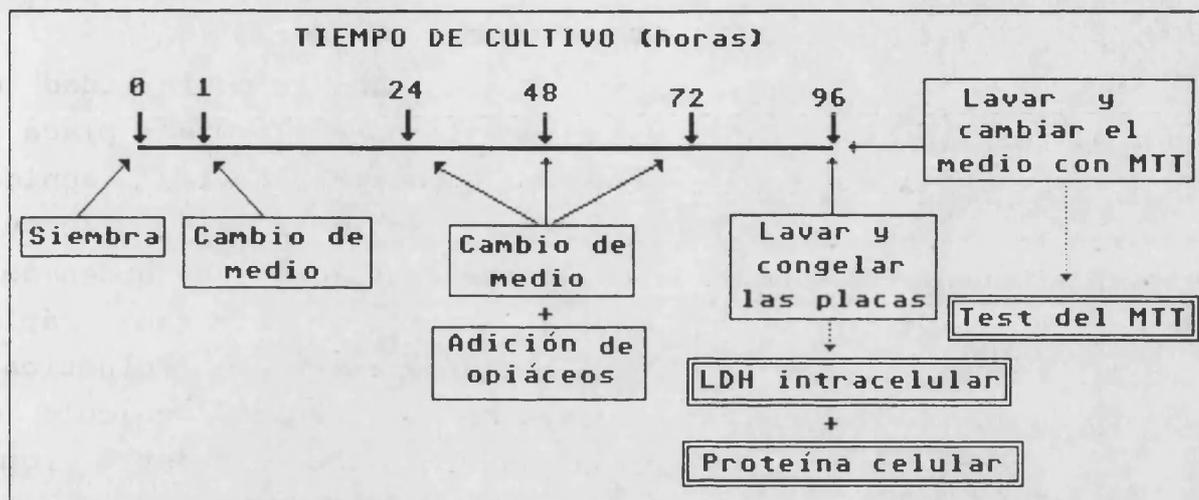
Una vez adheridas las células se cambió el medio de cultivo y a continuación se añadieron los opiáceos. Se incubaron las células a 37°C durante 23 h y una vez finalizado el tratamiento se determinaron tres parámetros de citotoxicidad para evaluar el efecto de los opiáceos durante este proceso. Estos tres parámetros de citotoxicidad fueron: contenido de LDH intracelular, proteína celular de la monocapa y test del MTT (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3).

6.1.3 Monocapa confluyente

La mayor duración de este periodo de estudio en el cultivo, en comparación con las dos anteriores, permite realizar estudios de supervivencia celular a largo plazo o de toxicidad con dosis

repetitivas, con lo que se se puede imitar en cierta medida las situaciones de administración crónica o múltiple de una droga.

Para evaluar el efecto de los opiáceos en el cultivo durante el estado de monocapa confluyente se siguió el diseño experimental descrito en el siguiente esquema:



A las 24 h de cultivo se cambió el medio y a continuación se incorporaron los opiáceos, este proceso se repitió a las 48 y 72 horas de cultivo, con lo que el tiempo total de exposición a los opiáceos fué de 3 días. Una vez finalizado el tratamiento se determinaron los tres parámetros de citotoxicidad. Alternativamente se puede obtener más información si los tres parámetros se determinan también tras 24 y 48 h de exposición, ya que de este modo se observa más claramente la evolución de los efectos citotóxicos de los opiáceos durante exposiciones prolongadas.

6.2. Parámetros de citotoxicidad

Para evaluar los efectos citotóxicos de los opiáceos en los distintos periodos del desarrollo del cultivo, se escogieron tres parámetros de citotoxicidad con los que se determina por procedimientos distintos la viabilidad celular (proporción de células vivas tras el tratamiento con los tóxicos). Estos tres parámetros de citotoxicidad fueron: actividad LDH intracelular, proteína celular de la monocapa y test del MTT.

Todas las técnicas utilizadas han sido adaptadas para su realización en placas de 96 pocillos. El empleo de microplacas reduce de forma considerable el número de células necesarias en comparación con las placas de cultivo convencionales (para sembrar 80 pocillos de una microplaca hacen falta menos células que para sembrar 3 placas de 3,5 cm de diámetro), obteniéndose en cambio la misma información.

Existen dos ventajas adicionales que son la posibilidad de manejar múltiples variables al mismo tiempo en la misma placa y la realización in situ o el desarrollo completo de las técnicas en la misma microplaca hasta realizar la lectura espectrofotométrica automatizada y computerizada. Un ordenador, conectado al lector de microplacas, realiza de forma muy rápida todos los cálculos matemáticos necesarios (cinéticas, interpolación en curvas, realización de medias, cálculo de IC_{50} , ...) mediante unos programas desarrollados en nuestro propio laboratorio en lenguaje BASIC.

6.2.1 Determinación de la actividad LDH por micrométodo

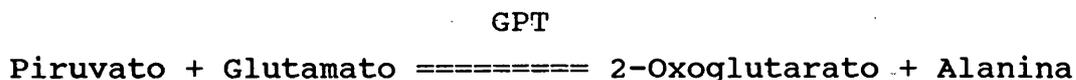
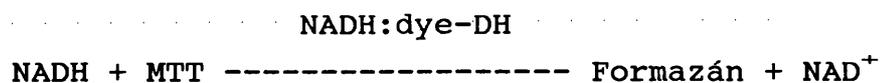
- **Fundamento:**

La liberación hacia el exterior de la célula de esta enzima citoplasmática ha sido un indicador clásico de viabilidad celular. Debido a su tamaño relativamente pequeño atraviesa la membrana celular cuando esta se hace más permeable como consecuencia de los daños ocasionados por la acción citotóxica de un xenobiótico. Por lo tanto una vez expuesto el cultivo de hepatocitos a los tóxicos, la actividad LDH intracelular nos indica cual es el porcentaje de células que permanecen viables en comparación con los cultivos controles no tratados.

La determinación de la actividad LDH intracelular en lugar de la extracelular, liberada al medio de cultivo, obedece no solo a razones de tipo práctico como son la mayor facilidad de manipulación y procesamiento, si no también al hecho de que el isoenzima V de la LDH, mayoritario en los hepatocitos humanos, es bastante labil e inestable y se inactiva en el medio

extracelular.

El ensayo esta basado en el método colorimétrico de Deneke (61) pero ha sido adaptado por nosotros para la determinación *in situ* de la actividad LDH intracelular de cultivos en microplacas (192). El principio básico de este método es la siguiente reacción:



La cantidad de L-(+)-lactato que reacciona por unidad de tiempo determinada por el aumento de absorbancia debido a la aparición de formazán, es la medida de la actividad catalítica de la LDH.

- Reactivos:

1) Solución Tris/Lactato-glutamato/MTT: TRIS 143,4 mM, L-(+)-Lactato (sal de Litio) 57,30 mM, Acido glutámico 5,74 mM, CTAB 0,3%, Tritón X-100 1,0 %, ajustar el pH a 8 y añadir MTT 0,287 mM.

2) NAD 80 mM.

3) Enzimas auxiliares e indicadores: Centrifugar 110 μ l (88 U) de suspensión de GPT (800 U/ml) eliminar el sobrenadante y añadir 1 ml de tampón Tris-Citrato 50 mM, pH=7,6. Añadir 0,6 mg (15 U) de NADH: dye-DH (NADH: dye oxidoreductasa) (26.7 U/mg).

Mezclar las tres disoluciones anteriores (1,2 y 3) en la proporción 28:1:1 respectivamente, en el momento de usar.

La estabilidad de las soluciones es la siguiente:

1.- Cuatro semanas a 0-4°C en una botella de vidrio opaco.

2 y 3.- Una semana como máximo a 0-4°C.

- Procedimiento:

Una vez finalizado el tratamiento se lavan los pocillos con PBS. Después, o bien se congela la microplaca con N₂ líquido o se procesa inmediatamente como sigue:

1) Añadir a cada pocillo 50 µl de NaCl 0.9% y lisar las células con ayuda de un baño de ultrasonidos (4-5 pulsaciones de 3 segundos).

2) Diluir la muestra convenientemente para que quede con valores de actividad comprendidos en el rango 0.05-0.75 mU/pocillo/50 µl. Esta dilución se realiza con la ayuda de la pipeta multicanal en otra microplaca, que se utilizará para la medida de LDH. La muestra se diluye con NaCl 0.9%.

3) Añadir a cada pocillo 150 µl de la mezcla de reactivos con la menor pérdida de tiempo entre el inicio y el final de la placa. Homogenizar la mezcla en el baño de ultrasonidos y rápidamente proceder a la primera lectura antes de 4 min desde la adición del reactivo.

Las placas con los homogenados celulares se han de mantener hasta el momento de la adición de los reactivos sobre hielo. Todos los reactivos han de añadirse a los pocillos a 25°C.

- Lectura y procesado de los datos:

1) Ajustar el lector de microplacas a 570 nm

2) Con cada microplaca efectuar 3 ó 4 ciclos de lectura hasta un tiempo máximo de 20 minutos, con un intervalo mínimo de 4 minutos entre lecturas. Anotar con exactitud el tiempo en cada lectura.

3) La transformación de la pendiente ($\Delta A/\Delta t$) en las correspondientes U/l se realiza según la fórmula siguiente:

$$b = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_{ens}}{V_{mue}} \times \frac{1000}{E \times d} \quad U/l \quad (\mu mol \times min^{-1} \times l^{-1})$$

Para $E = 1,72 \text{ l} \times mmol^{-1} \times mm^{-1}$ y $d = 5mm$, $b = 465,11 \times \Delta A/\Delta t \text{ (U/l)}$.

6.2.2 Valoración de proteína celular en microplaca

- Fundamento:

Cuando la acción tóxica de un xenobiótico ocasiona la muerte de las células del cultivo las interacciones con la biomatriz dejan de ser estables y la unión con el soporte del cultivo se rompe. Así pues, las células muertas que se desprenden y permanecen flotando son eliminadas fácilmente cuando se renueva el medio de cultivo y se lava la monocapa. En estas circunstancias la determinación de la proteína celular que permanece retenida en los pocillos en comparación con la de los cultivos controles es un indicador del porcentaje de células viables.

La valoración de la proteína celular se basa en el método de Lowry y col. (151) con algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones limitantes de volumen de las microplacas. Este método consiste en la ya clásica asociación de las reacciones del Biuret y de Folin.

- Reactivos:

Los reactivos utilizados para la valoración son los habituales, pero como el volumen está limitado por la capacidad de los pocillos los hemos adaptado con distinto volumen y concentración:

1) Mezcla A-B-C en H₂O:

A.- Carbonato sódico (Na₂CO₃)..... 4%.

B.- Tartrato de sodio y potasio.... 4%.

C.- Sulfato de cobre (CuSO₄)..... 2%.

Los tres reactivos se mezclan en la proporción A:B:C=100:1:1

2) Reactivo de Folin: Reactivo de Folin diluido 1/2 con H₂O.

3) Recta patrón: Se prepara justo antes de la valoración en los pocillos que se reservan en la microplaca para este fin, a partir de una solución 1% de BSA en NaOH 0,5 M, y es lineal en el rango de concentraciones 5-50 μg /pocillo.

- Procedimiento:

Una vez finalizado el tratamiento se lavan los pocillos con PBS. Después se añaden 50 μl de NaOH 0,5 N en cada pocillo y se congela la placa a -20°C .

Cuando se estudian alteraciones de funciones metabólicas del hepatocito, también hay que valorar la proteína de los cultivos para poder expresar el parámetro metabólico evaluado en función de la proteína existente. En estos ensayos el soporte del cultivo son placas tipo Petri o multiplacas de 24 pocillos. Por ello, para valorar la proteína se preparan homogenados celulares en un volumen adecuado de NaOH 0,5 N. Si esto no es posible, las muestras se homogenizan en el tampón correspondiente y se toma una alícuota para proteína que se diluye utilizando NaOH con una molaridad tal que su concentración final sea 0,5 N. De cada homogenado celular se toman tres alícuotas de 50 μl que se transfieren a la microplaca. La disposición de las muestras se hace dejando siempre las dos columnas de la derecha libres para la recta patrón.

En el momento de la valoración se procede de la siguiente manera:

1) Una vez descongelada la microplaca y preparada la recta patrón en NaOH 0,5 N, añadir 125 μl de mezcla A-B-C con pipeta multicanal a cada pocillo y agitar 5 segundos en el baño de ultrasonidos. Esperar 10 min.

2) Añadir, con el mismo orden, 25 μl de reactivo Folin a cada pocillo y agitar en el baño de ultrasonidos. Esperar 30 min para proceder a la lectura del color desarrollado.

- Lectura y procesado de los datos:

1) Conectar el lector automático de microplacas a 630 nm.

2) Ajustar los puntos de la curva patrón a una recta según el método de los mínimos cuadrados representando en ordenadas A_{630} y en abcisas $\mu\text{g BSA/pocillo}$. Interpolar en dicha recta los valores de A_{630} de las muestras problema y multiplicar por la dilución correspondiente.

6.2.3 Test del MTT

- **Fundamento:**

Cuando la sal de tetrazolio MTT se incorpora al medio de cultivo, las células viables la incorporan a su interior y una vez en el citoplasma atraviesa la doble membrana mitocondrial donde la enzima succinato-deshidrogenasa reduce el MTT soluble a un formazán insoluble de color azul. La succinato-deshidrogenasa es una flavoproteína que contiene FAD unido covalentemente, se halla unida intimamente a la membrana mitocondrial interna y, en forma reducida, puede ceder electrones a distintos aceptores electrónicos artificiales. Las células dañadas (membrana plasmática o función mitocondrial alterada) o muertas como consecuencia de la acción citotóxica de un xenobiótico no pueden reducir el MTT y por lo tanto no producen formazán azul. Una vez se solubiliza convenientemente el producto final, la lectura del color desarrollado en comparación con el de los cultivos control es un indicador directo del número de células que permanecen funcionales.

El test del MTT se ha realizado conforme al protocolo descrito por Borenfreund y col. (29), pero utilizando como disolvente del formazán DMSO puro conforme al procedimiento de Denizot y Lang (62).

- Reactivos:

1) Solución stock de MTT 5 mg/ml de PBS. Una vez disuelta se esteriliza por filtración y se conserva en una botella de vidrio opaco a 4°C. Esta solución stock se diluye antes del ensayo en el medio de cultivo adecuado en la proporción: 1 ml de MTT por cada 10 ml de medio, (dilución 1/11), y se mantiene a 37°C.

3) Para redissolver el formazán insoluble en agua se utiliza DMSO puro.

- Procedimiento:

Una vez finalizado el tratamiento se lavan los pocillos con PBS (37 °C) ayudándose de una pipeta multicanal.

1) Se añade a cada pocillo 100 µl de medio de cultivo (HF-12, DMEM, RPMI) con el MTT ya incorporado tal como se describe en el apartado de reactivos.

2) Se incuban las microplacas a 37°C durante 2-3 horas.

3) Finalizada la incubación, el medio se vacía como en el primer punto pero apurando totalmente el contenido de los pocillos. Si quedan restos de medio de cultivo con rojo fenol se producirán interferencias en el color final.

4) Se añaden a cada pocillo 100 µl de DMSO. Para resuspender el formazán precipitado basta con golpear ligeramente la microplaca por los cuatro costados; también es posible facilitar la disolución del formazán con la ayuda del baño de ultrasonidos.

5) Esperar 10 min a temperatura ambiente y proceder a leer el color desarrollado.

- Lectura y procesado de los datos:

1) Conectar el lector de microplacas ajustándolo a 570 nm y leer el color desarrollado.

2) La disminución de la A_{570} en los pocillos donde se incorporaron los xenobióticos en relación con la A_{570} de los controles es una estimación directa de la viabilidad celular.

7. METODOS PARA LA EVALUACION DE ALTERACIONES DE FUNCIONES METABOLICOS

Para medir las alteraciones metabólicas producidas por las drogas sobre los hepatocitos, se emplearon concentraciones sub-tóxicas ($\leq IC_{10}$), es decir, que no comprometían la viabilidad celular.

Los efectos metabólicos de los opiáceos se estudiaron sobre cultivos de hepatocitos en placas de 3,5 cm de diámetro o en multiplacas de 24 pocillos, los volúmenes de medio de cultivo son 1,5 y 0,5 ml respectivamente y los volúmenes empleados para las incorporaciones de los opiáceos oscilaron entre 25 y 100 μ l. Los tratamientos para este tipo de experimentos siempre comenzaron a las 24 horas de cultivo, una vez ya establecida la monocapa.

Tras la exposición de los hepatocitos a distintas concentraciones de las drogas estudiadas, en las condiciones y tiempos señalados para cada caso concreto, el medio de cultivo fue eliminado (a excepción de cuando se valoró la producción y excreción de metabolitos o proteínas), las placas de cultivo se lavaron dos veces con PBS y fueron congeladas con N_2 líquido. Se guardaron a $-20^\circ C$ hasta el momento de su utilización.

Cuando el medio de cultivo había que conservarlo para realizar en él valoraciones (por ejemplo urea), se recogió en tubos de eppendorf, se centrifugó en una centrífuga de eppendorf (9000 x g) para eliminar restos celulares, se recogió el sobrenadante y se congeló a $-20^\circ C$ hasta el momento de su utilización.

Previamente a la valoración, todas las muestras descongeladas se mantuvieron en un baño con hielo para evitar la degradación de los metabolitos que se iban a determinar. Una vez finalizado el ensayo, el tiempo transcurrido entre éste y el momento de la lectura del color o de la fluorescencia producidos fue el menor posible para evitar la descomposición del cromóforo o del complejo fluorescente.

Todos los parámetros metabólicos determinados se expresaron en relación al contenido de proteína celular de la placa de cultivo.

Los parámetros metabólicos determinados están relacionados con las funciones más importantes que el hepatocito realiza *in vivo*: metabolismo del glucógeno (degradación del contenido de glucógeno, e inhibición de su síntesis a partir de un precursor), metabolismo del nitrógeno (inhibición de la síntesis de urea estimulada por un precursor nitrogenado), síntesis y excreción de proteínas plasmáticas (síntesis y excreción de albúmina), biotransformación y conjugación (depleción del GSH).

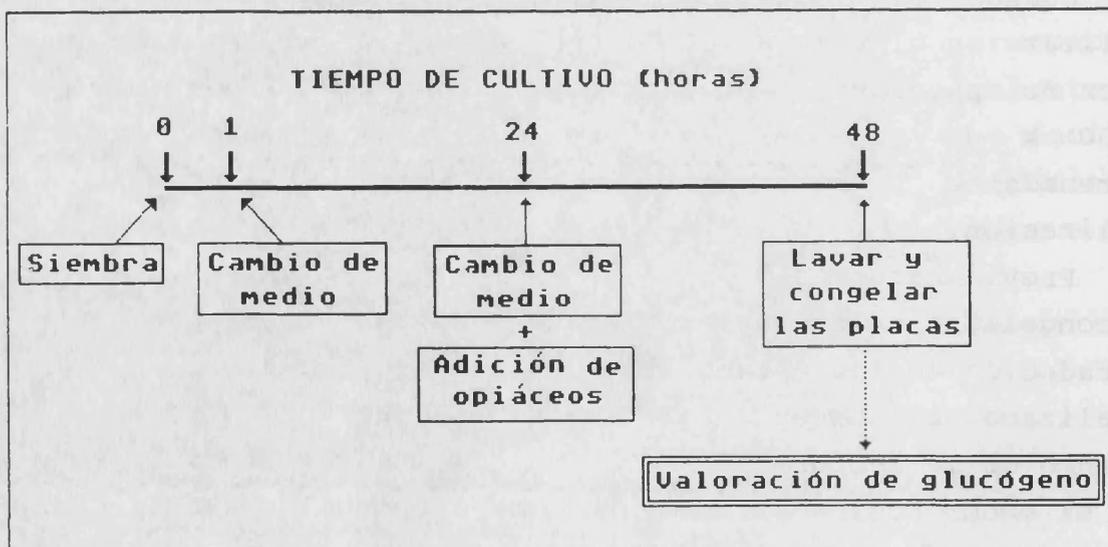
7.1. Efecto de los opiáceos en el metabolismo del glucógeno

El efecto de los opiáceos se evaluó sobre dos aspectos del metabolismo del glucógeno: su degradación y su síntesis a partir de glucosa como precursor.

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 3.5 cm de diámetro.

7.1.1. Diseño experimental. Degradación de glucógeno

El diseño experimental para evaluar el efecto de los opiáceos en el contenido de glucógeno fue el siguiente:



Los opiáceos se incorporaron a las 24 h de cultivo y tras 24 h de exposición se valoró el contenido de glucógeno.

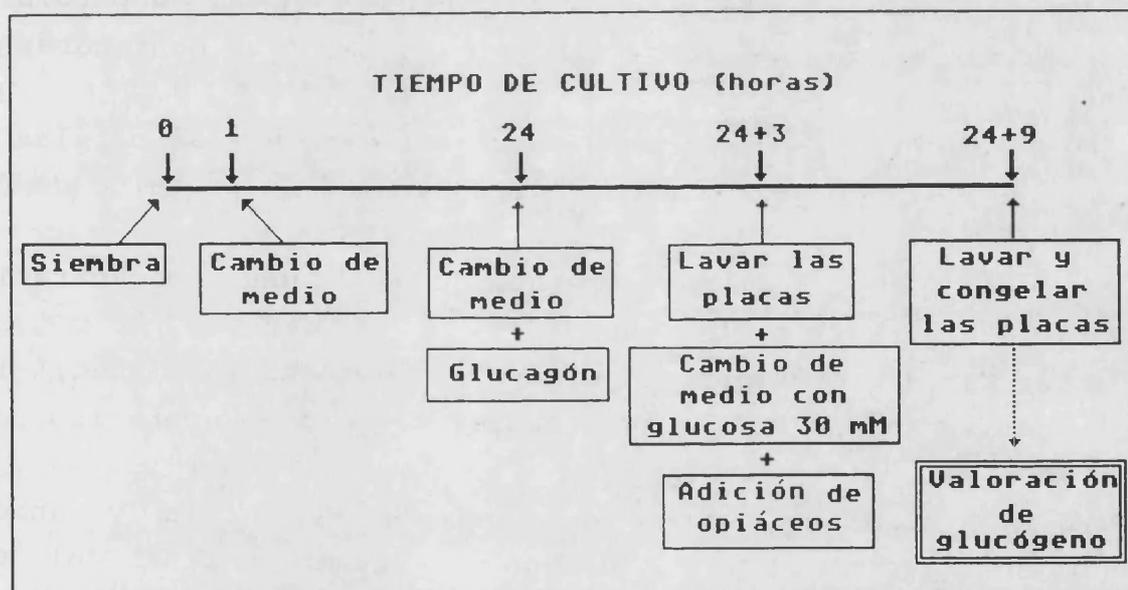
7.1.2. Diseño experimental. Síntesis de glucógeno.

A las 24 h de cultivo el medio se suplementó con glucagón 10^{-7} M, con el fin de deplecionar el contenido de glucógeno de los hepatocitos.

A las 24 + 3 horas, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron 5 veces las placas cuidadosamente con PBS a 37°C para así eliminar todo el glucagón que hubiera en las placas. Se añadió nuevamente medio de cultivo pero ahora complementado con glucosa para conseguir una concentración final 30 mM (el medio de cultivo lleva normalmente glucosa 10 mM).

Tras cada uno de los periodos, a las 24 h, 24 + 3 h y a las 24 + 9 h se lavaron y congelaron varias placas no tratadas con los opiáceos, que se utilizaron como controles.

En este caso el esquema de tiempos de incubación fue el siguiente:



7.1.3 Determinación de glucógeno

- Fundamento:

La determinación de glucógeno se realiza tras una extracción por digestión con KOH y posterior precipitación con etanol, según el método de Hassid y Abraham (110), para purificarlo.

Tras la extracción y purificación, el glucógeno se valora por el método colorimétrico de Good y col. (96). La técnica se basa en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y simultánea deshidratación de la glucosa a hidroximetil furfural en medio ácido, que condensa con la antrona dando coloración a 620 nm.

- Procedimiento de extracción y purificación:

Todo el material de vidrio utilizado debe ser lavado exhaustivamente y sometido a un baño prolongado en mezcla crómica.

A). Reactivos:

- Solución de KOH 60%

Se prepara en un baño con hielo.

- Etanol absoluto.

B). Recoger las células en 500 μ l de H₂O destilada (para placas de 3.5 cm de diámetro) con la ayuda de una espátula y depositarlos en tubos de punta cónica. Los tubos se mantendrán en un baño con hielo.

C). Agitar bien los tubos para el lisado de las células y extraer una alícuota para valorar el contenido en proteína de la placa.

D). Añadir KOH al 60% para que quede a una concentración final del 30% y agitar los tubos.

E). Mantener durante 30 minutos en un baño a 100°C; los tubos se tapan con una canica para evitar la evaporación del contenido.

F). Enfriar los tubos en un baño de agua fría y añadir alcohol absoluto hasta que quede una concentración final del 66% y agitar bien los tubos.

G). Guardar los tubos a 0°C durante una noche. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Decantar los tubos y resuspender el sedimento en 500 μ l de H₂O destilada con una pipeta Pasteur.

H). Añadir de alcohol absoluto hasta una concentración final del 66% y agitar bien los tubos.

I). Repetir el paso G).

- Procedimiento para la valoración:

A). Reactivos:

- Solución patrón de sacarosa 0.5 mM

Se conserva congelada a -20°C .

- Reactivo de la antrona: antrona 6.86 mM

H_2SO_4 12.0 M

Se prepara el día de su utilización en un recipiente contenido en un baño con hielo.

B). Preparar una curva patrón a partir de una solución de sacarosa 0.5 mM con concentraciones en el rango 0-500 nmoles de glucosa en 500 μl de volumen de muestra (1 nmol de sacarosa \equiv 2 nmol de glucosa).

C). Añadir a los tubos problema y a los patrones, que deben estar en un baño con hielo, 1 ml de H_2SO_4 .

D). Añadir a todos los tubos 1.5 ml del reactivo de la antrona.

(El volumen final de ensayo es de 3 ml y las concentraciones finales de los reactivos son de H_2SO_4 12.0 M y antrona 3,43 mM)

E). Agitar muy bien los tubos. Tapar los tubos con canicas e incubar durante 10 minutos en un baño a 100°C .

F). Enfriar rápidamente en un baño con hielo.

G). Leer frente a blanco a 620 nm los tubos con patrones y problemas, interpolar la absorbancia de los tubos problema en la curva de calibración y los resultados se expresan como nmoles de glucosa; y, si se mide el contenido de proteína, como nmoles de glucosa/mg proteína celular.

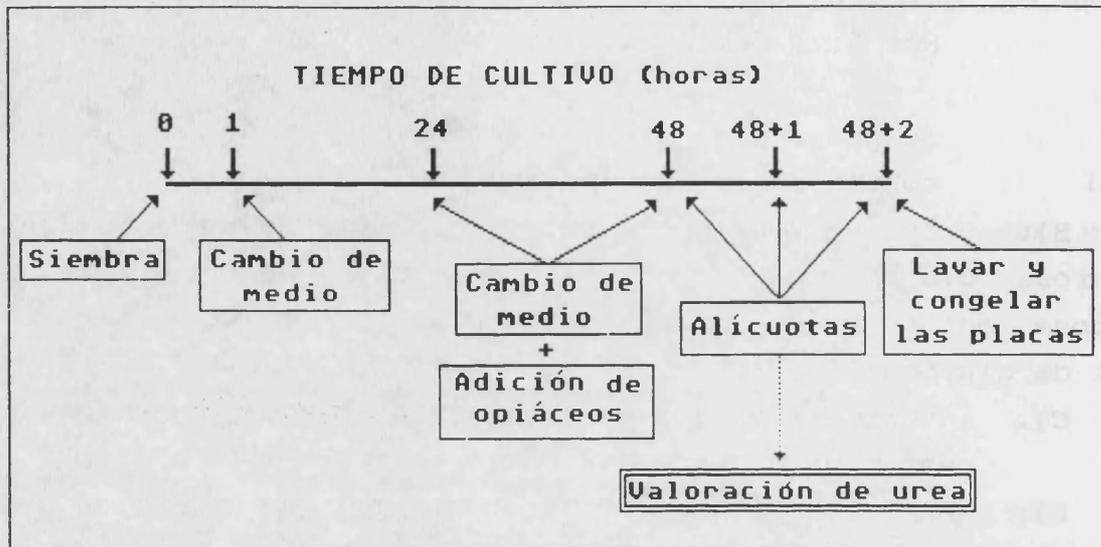
7.2. Efecto de los opiáceos en la síntesis de urea

7.2.1 Diseño experimental. Síntesis de urea

Otro parámetro metabólico determinado fue la actividad ureogénica de los hepatocitos en presencia de NH_4Cl 3 mM. Para ello se midió la cantidad de urea liberada al medio de cultivo durante 2 horas en presencia de las drogas tras un tratamiento

con las mismas de 24 h.

Los experimentos se realizaron en placas de cultivo de 3.5 cm de diámetro, siendo el esquema general de los tratamientos el siguiente:



A las 48 horas de cultivo para el cambio de medio se utilizó medio habitual suplementado con NH_4Cl 3 mM para que la producción de urea fuera máxima. Tras dejar unos minutos las placas en la estufa para que se equilibraran la temperatura y el pH, se tomó una alícuota del medio de cultivo, tomándose otra a la hora y por último otra a las dos horas. Las alícuotas se trataron como ya se ha explicado anteriormente y se guardaron a -20°C hasta su valoración.

Una vez tomada la última alícuota las placas de cultivo se lavaron y se congelaron de la manera habitual para luego valorar en ellas la proteína celular.

7.2.2. Determinación de urea

- Fundamento:

El método de valoración de la urea existente en las alícuotas tomadas es un método colorimétrico (184) basado en la formación de un cromógeno, que absorbe a 464 nm, entre la urea y la diacetilmonoxima en medio ácido. La presencia de antipirina en

la mezcla de reacción aumenta la sensibilidad del ensayo.

- Procedimiento para la valoración:

A). Reactivos:

- Patrón de urea 2 mM

Este medio de cultivo debe ser el mismo empleado para el último cambio de medio realizado con las células.

- Reactivo ácido: antipirina 19.66 mM
sulfato férrico amónico 8.8 mM
 H_2SO_4 4.5 M
 H_3PO_4 3.67 M

Este reactivo se prepara en un baño con hielo y se conserva a temperatura ambiente en un frasco de color topacio.

- Solución de diacetilmonoxima:

diacetilmonoxima 39.56 mM
NaCl 7.5%

Se conserva como el reactivo ácido.

- Reactivo color: 2 partes de reactivo ácido
1 parte de solución de diacetilmonoxima
Se prepara el día de su utilización.

B). Preparar curva patrón de urea con concentraciones comprendidas entre 0 y 80 nmoles de urea en 200 μ l de volumen de muestra.

C). Descongelar las alícuotas y agitar para que se homogenicen. Colocar en cada tubo 200 μ l de muestra.

D). Añadir a cada tubo 1.5 ml de reactivo color. Agitar los tubos, taparlos con canicas e incubarlos a 100°C durante 15 minutos. Los tubos deben estar protegidos de la luz durante este tiempo y hasta el momento de la lectura de la absorbancia.

E). Enfriar los tubos en un baño con hielo y leer frente a blanco a 464 nm. No deben pasar más de 30 minutos desde que finaliza la incubación hasta que se leen.

F). Valorar la proteína celular por el método explicado anteriormente en las placas de cultivo que se lavaron y congelaron tras tomar la última alícuota.

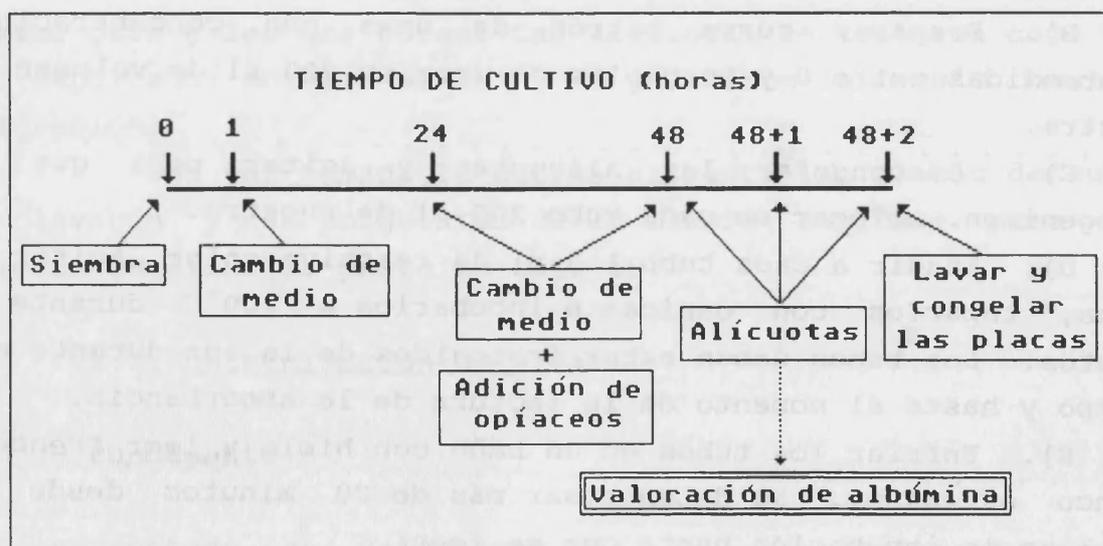
Una vez determinado el número de nmoles de urea presentes en la muestra, se calcula la velocidad de síntesis de cada placa de cultivo durante las dos horas del ensayo, teniendo en cuenta el volumen inicial de medio de cultivo, el volumen tomado en cada alícuota y el número de nmoles de urea presentes en la alícuota. El resultado se expresa como: nmoles de urea producidos/mg prot x h.

7.3. Efecto de los opiáceos en la síntesis de albúmina

7.3.1 Diseño experimental. Síntesis de albúmina

Otro parámetro metabólico determinado fue la síntesis de proteínas plasmáticas y en concreto la síntesis de albúmina. Para ello se midió la cantidad de albúmina liberada al medio de cultivo durante 2 horas en presencia de las drogas tras un tratamiento de 24 h.

Los experimentos se realizaron en placas de cultivo de 3.5 cm de diámetro, siendo el esquema general de los tratamientos el siguiente:



7.3.2 Determinación de albúmina

- **Fundamento:**

La albúmina sintetizada por los hepatocitos humanos y excretada al medio de cultivo, fue determinada mediante un ELISA competitivo indirecto. El método se basa en la capacidad de un antígeno para inhibir la reacción de un antisuero específico frente al propio antígeno previamente adsorbido sobre la superficie de poliestireno de las placas.

Parte del antisuero queda unido al antígeno libre y otra parte queda unido al al antígeno adherido al plástico. Tras lavar y eliminar los complejos no unidos a la fase sólida, el antisuero específico adherido es incubado en presencia de un antisuero secundario (IgG-peroxidasa) y finalmente la cantidad de enzima unido a la fase sólida se visualiza por la adición de un sustrato adecuado. El ensayo debe realizarse en condiciones tales que el primer antisuero sea un factor limitante para asegurar la competencia efectiva entre el antígeno unido a la fase sólida y el presente en disolución.

- **Procedimiento para la valoración:**

A). REACTIVOS:

- Tampón carbonato 100 mM pH 9,6.
- PBS-Tween: PBS con un 0,05% de Tween 20.
- Sustrato de peroxidasa: sal amónica de ABTS 0,2 mM y H_2O_2 2 mM, en tampón citrato 0,15 M pH 4,2.
- Albúmina humana pura para recubrimiento, en tampón carbonato.
- Patrón de albúmina humana (0.001-10 μ g/pocillo) en PBS-Tween 20 0,05%.
- Inmunoglobulinas de conejo anti-albúmina humana.
- Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de conejo, marcadas con peroxidasa.

B). Para determinar las condiciones óptimas del ELISA, se llevó a cabo previamente una serie de ELISAs directos no competitivos, en los que simultáneamente se evaluó la respuesta de diferentes diluciones del antisuero primario, frente a diferentes concentraciones del antígeno adsorbido a la placa. Según estos ensayos las condiciones óptimas para el ELISA competitivo indirecto fueron:

- Concentración de albúmina humana para el recubrimiento y unión a los pocillos..... 0,03 $\mu\text{g/pocillo}$.

- Dilución óptima del antisuero primario (IgG de conejo anti-albúmina humana) para que resulte limitante en la etapa de competencia..... 1/50000.

- Dilución del antisuero secundario (IgG de cabra anti-IgG de conejo) marcado con peroxidasa... 1/5000.

C). Para el ensayo de valoración de albúmina humana presente en las muestras de medio de cultivo se recubrieron los pocillos con 100 μl de solución de albúmina 0,3 $\mu\text{g/ml}$, en tampón carbonato. Las placas se mantienen así durante 12 h a 4°C para permitir la adsorción de la proteína al plástico y a continuación se lavaron 4 veces con PBS-Tween.

D). Seguidamente se añadió a cada pocillo una mezcla conteniendo 50 μl del antisuero primario a la dilución adecuada y, 50 μl de PBS-Tween conteniendo cantidades patrón de albúmina humana ó 50 μl de medio de cultivo convenientemente diluido con PBS-Tween. Las mezclas de antígeno y anticuerpo se incuban durante 2 h a 37°C en la cámara húmeda y se lavan de nuevo cuatro veces igual que en el caso anterior.

E). A continuación se añadió a cada pocillo 100 μl de antisuero secundario a la dilución óptima y se incubó durante 30 min a 37°C.

F). Tras la incubación las placas volvieron a ser lavadas del mismo modo tras lo cual se añadieron 100 μl de solución substrato para peroxidasa a cada pocillo. La reacción se incubó durante 45 min a 37°C y el color desarrollado se lee a 405 nm en un lector automático de microplacas.

- Tratamiento matemático de los datos:

La representación gráfica de la curva patrón del ELISA competitivo indirecto es una sigmoidea decreciente, sobre la cual resulta difícil interpolar gráficamente los valores de absorción, correspondientes a los problemas. Con objeto de facilitar el cálculo y mejorar la calidad de los resultados, se aplicó una transformación matemática que convierte la gráfica sigmoidea en una recta:

Siendo $Y = f(X)$, la ecuación matemática de la curva patrón de ELISA, donde $X = \mu\text{g}$ de proteína patrón e $Y = \text{absorción a } 405 \text{ nm}$, la transformación consiste en representar $Y' = f(X')$, donde:

$$X' = -\log(X)$$

$$Y' = \text{LOGIT}(Y) = \ln \frac{Y - Y_{00}}{Y_0 - (Y - Y_{00})}$$

siendo Y_0 e Y_{00} las asíntotas superior e inferior de la sigmoidea respectivamente.

La recta patrón resultante se ajusta de forma habitual mediante análisis de regresión lineal. En los datos problema se calcula Y' a partir de la absorción a 405 nm. Tras interpolar en la recta y obtener X' , la cantidad de albúmina humana en el ensayo vendrá dada por la expresión $10^{-X'}$. La velocidad de síntesis de albúmina se calcula de modo similar a la de síntesis de urea.

7.4. Efecto de los opiáceos sobre el contenido de GSH

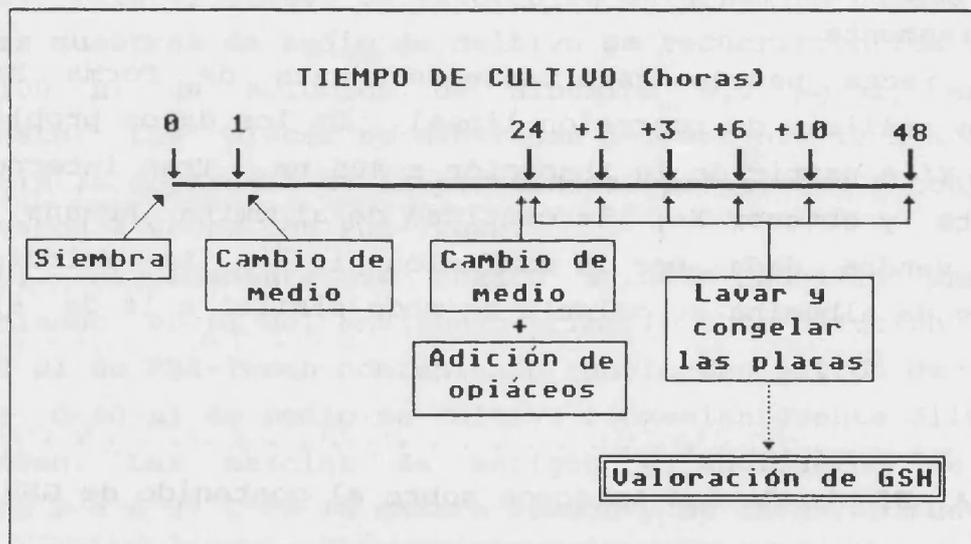
Dado que la vía metabólica de cada fármaco no es la misma en todos los casos, el momento en que aparecen los metabolitos reactivos susceptibles de conjugarse con el GSH puede variar de unos compuestos a otros. Teniendo estas consideraciones en cuenta, se diseñaron dos tipos de experimentos: en primer lugar se analizó el tiempo de máxima depleción determinando la variación del contenido de GSH a lo largo del tiempo de incubación con los opiáceos (1 o 2 concentraciones); en segundo lugar se estudió el efecto en el GSH de un amplio rango de

concentraciones tras incubar durante el tiempo de máxima depleción escogido para cada opiáceo (curva dosis-respuesta).

7.4.1. Diseño experimental. Depleción del GSH con el tiempo

Realizado en placas de 3.5 cm de diámetro que se lavaron y congelaron en N_2 líquido a distintos tiempos tras el cambio de medio y la incorporación de los opiáceos (incluido el tiempo cero tras cambiar el medio). Los tiempos se indican a modo orientativo, pudiendo variar de unos casos a otros, pero el esquema sería similar.

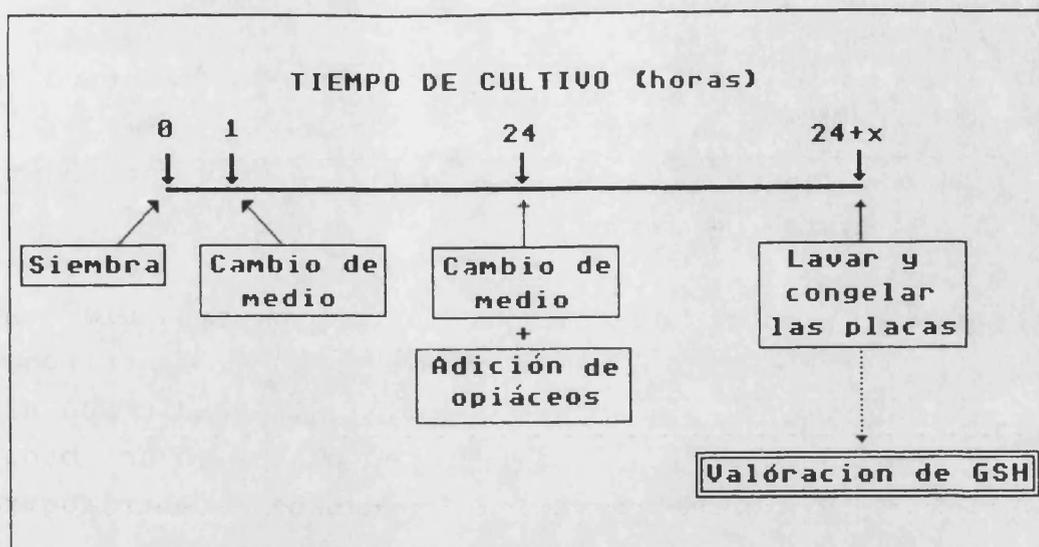
Cuando finalizó el experimento se determinó el contenido de GSH tanto en los controles como en los tratados y al tiempo de máxima depleción de los tratados con respecto a los controles se realizó el experimento de dosis-respuesta.



7.4.2 Diseño experimental. Curva dosis-respuesta

Se realiza preferentemente en placas de 24 pocillos.

Se trata de un experimento dosis-respuesta como los anteriormente descritos, en los que se emplea un rango amplio de concentraciones. El tiempo x al cual se lavaron y congelaron las placas, tras el cambio de medio e incorporación de las 24 horas, se determinó en cada caso concreto mediante la correspondiente curva de tiempos realizada a partir de las 24 horas.



7.4.3 Determinaci3n de GSH

- **Fundamento:**

Se trata de un m3todo fluorim3trico (113) basado en la reacci3n del GSH con el o-ftaldialdehido, dando lugar a un complejo fluorescente con m3ximos de excitaci3n y emisi3n a 340 y 420 nm respectivamente. En las condiciones en que se realiza el ensayo, pH 8, s3lo se valora el GSH y no el GSSG.

- **Procedimiento de valoraci3n:**

A). **Reactivos:**

- Soluci3n de homogenizaci3n: TCA 5% con EDTA 2 mM
Se conserva a temperatura ambiente.
- Tamp3n de valoraci3n: tamp3n fosfato s3dico 0.1 N, pH 8 con EDTA 5 mM
Se conserva a 4°C. En el momento de su utilizaci3n hay que a±adir 30 µl NaOH 1 M/ml tamp3n para que al mezclarlo con la muestra el pH resultante sea 8.
- Soluci3n patr3n GSH 10 mM.
Se prepara el d3a de su uso. De ella se realizar3n diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 para realizar la curva patr3n.

- Solución de OPT 7.46 mM en metanol (reactivo para fluorescencia).

Se prepara el día de su utilización y se mantiene protegido de la luz.

B). Placas de 3.5 cm: Añadir 0.5 ml de solución de homogenización, recoger las células con una espátula en un eppendorf y centrifugar durante 10 min en una centrífuga de eppendorf (9000 x g). Placas de 24 pocillos: Añadir 200 μ l de solución de homogenización, sonicar las placas en un baño de ultrasonidos con varios golpes de 1-2 segundos, centrifugar en una centrífuga de placas a 3000 rpm durante 20 minutos.

C). Realizar la curva patrón de GSH con concentraciones comprendidas entre 0 y 10 nmoles en 100 μ l de muestra. Las diluciones del patrón se realizan con la solución de homogenización.

D). Recoger el sobrenadante y poner 100 μ l en cada tubo para realizar la valoración. El precipitado ácido una vez resuspendido en NaOH 0,5 N se utilizará para determinar la proteína celular por el método ya descrito.

E). Añadir a todos los tubos 1 ml de tampón de valoración (al que se le ha añadido NaOH 1 M como se ha dicho anteriormente) y 50 μ l de solución de OPT.

F). Agitar y guardar en oscuridad durante 30 minutos.

G). Leer la fluorescencia con los siguientes filtros:

- excitación: 340 nm

- emisión: 420 nm

Una vez medida la emisión de fluorescencia de las muestras, el contenido de GSH se calcula mediante interpolación en la curva de calibración. Una vez tenido en cuenta el contenido de proteína de cada placa los resultados se expresan como nmol GSH/mg prot. cel.

**8. ESTUDIO DE LA METABOLIZACION DE LA MORFINA
EN DISTINTOS SISTEMAS CELULARES
MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)**

Para evaluar la capacidad para metabolizar la morfina de los distintos sistemas celulares en los que se estudió el efecto citotóxico de los opiáceos, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución.

Los cuatro sistemas celulares para este estudio fueron: hepatocitos humanos, hepatocitos de rata, líneas celulares de origen hepático (HepG2 y FaO) y líneas celulares no hepáticas (3T3 y Hela). Se sembraron en placas de 6 cm de diámetro. La capacidad metabolizadora de los hepatocitos se estudio en dos periodos distintos del cultivo, durante el periodo 1-4 h y durante el periodo 24-27 h. En el caso de las líneas continuas solo se estudió tras 24 h de cultivo en placa (75% de confluencia) durante el periodo 24-27 h.

Cuando llegó el momento del ensayo el medio de cultivo se eliminó y las placas se lavaron 2 veces con PBS a 37°C, se añadió a cada placa 4,5 ml de la solución salina Krebs-Henseleit (TABLA 4) y acto seguido se incorporó la morfina. Se tomaron alícuotas de 500 µl a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h) y las placas de cultivo se lavaron y congelaron del modo habitual para posteriormente determinar en ellas la proteína celular.

TABLA 4: SOLUCION KREBS-HENSELEIT

<u>PRODUCTO</u>	<u>Conc. mM</u>	
NaCl	118,0	
KCl	4,7	
CaCl ₂	2,5	
KH ₂ PO ₄	1,2	pH 7,5
MgSO ₄	1,2	
NaHCO ₃	25,0	

Las alícuotas se centrifugaron a 9.000 x g durante 10 min y el sobrenadante se congeló a -20°C. En el momento del análisis las alícuotas se descongelaron y se filtraron a través de nitrocelulosa (0,22 μm φ), quedando así listas para el análisis.

La velocidad de metabolización de la morfina se determinó con un aparato de HPLC con inyector manual de muestras (bucle de 20 μl), y un detector UV/VIS ajustado a 284 nm. Las muestras se cromatografiaron a temperatura ambiente en una columna para HPLC de fase reversa ODS (fase estacionaria C-18). La elución fue isocrática con una fase móvil compuesta de: H₂O / acetonitrilo / trietilamina / ácido acético (195:3:1:1); y un flujo constante de 1,75 ml/min (177). El uso de un estándar interno no fue necesario debido a la gran reproducibilidad del método descrito. el rango ensayado (0,1-1 mM).

La concentración de la morfina en el medio extracelular se determinó a partir del área del pico de elución correspondiente, que se registró en el cromatograma con un tiempo de 4,7 min. El valor del área se interpoló en una recta patrón con distintas concentraciones de morfina en Krebs-Henseleit que se analizó previamente y que tuvo la siguiente ecuación: $\text{Area} = \mu\text{mol MOR} \times 43.203.100 - 1800$.

La concentración de morfina en las distintas alícuotas se obtuvo mediante interpolación en la recta patrón. La representación de la concentración de morfina en las alícuotas frente al tiempo de metabolización también se ajustó linealmente; siendo la pendiente de la recta resultante la velocidad de desaparición de morfina del medio de cultivo. El dato obtenido se expresó referido a la proteína celular presente en la monocapa.

9. ESTUDIO ESTADISTICO Y TRATAMIENTO MATEMATICO **DE LOS RESULTADOS**

Los resultados mostrados en el presente estudio se han obtenido utilizando un total de 31 biopsias, de las cuales 12 correspondieron a hombres y 19 a mujeres.

Cada experimento se ha realizado en 2-3 cultivos de biopsias

hepáticas distintas. La variabilidad interensayo (con biopsias de diferentes donantes) oscila habitualmente entre el 5 y el 35%. Este rango amplio de oscilación es consecuencia no solo de los factores intrínsecos propios del ensayo si no también de las diferencias existentes en los distintos donantes, consecuencia de la particular idiosincrasia de cada individuo, que es muy difícil de evitar con este tipo de material biológico.

Los valores de citotoxicidad se obtuvieron ensayando cada una de las concentraciones incorporadas por quintuplicado. Los valores metabólicos se obtuvieron ensayando cada concentración de opiáceo en tres o cuatro placas del cultivo. A partir de los resultados obtenidos se calculó el valor medio \pm desviación estándar y se transformaron en % con respecto a su control. La significación estadística de las diferencias encontradas a este nivel se determinó por el test de la t de Student.

La representación gráfica de los resultados, mostrando en abcisas el log de la concentración ensayada y en ordenadas el valor del parámetro evaluado, dió por lo general curvas dosis-respuesta con forma sigmoidea decreciente. Para calcular los índices de toxicidad IC_{50} e IC_{10} se aplicó a los resultados globales (obtenidos tras la repetición del experimento en 2-3 cultivos de biopsias hepáticas distintas) una transformación matemática LOGIT que convierte la gráfica sigmoidea en una recta. Una vez realizada la linearización de los resultados es fácil interpolar los valores 50 y 10% para averiguar las concentraciones teóricas que los ocasionarían. La transformada matemática LOGIT se explica con detalle en el apartado 7.3.2.

Para poder comparar los valores IC_{50} e IC_{10} de la citotoxicidad de cada opiáceo se utilizó el siguiente procedimiento estadístico: en primer lugar se realizó un análisis de varianza de doble entrada (214) para evaluar la variabilidad de los resultados obtenidos con cada opiáceo a dos niveles: entre los tres parámetros de citotoxicidad, y entre los distintos tratamientos. En segundo lugar se aplicó el test de Newman-Keuls (215) para averiguar cuáles son los parámetros o tratamientos en concreto que dan resultados significativamente distintos del resto.

10. CRITERIOS PARA LA EXTRAPOLACION DE RESULTADOS AL HOMBRE

La interpretación correcta de un efecto lesivo debe ser enfocada desde un punto de vista terapéutico, es decir considerando cual es la concentración plasmática con la que cada fármaco es capaz de originar sus acciones farmacológicas.

Por ello, para la extrapolación de los resultados obtenidos *in vitro* con la situación potencial *in vivo*, hemos establecido el cociente RT (riesgo de toxicidad):

$$R_{T10} = \frac{\text{máxima concentración plasmática}}{\text{mínima concentración tóxica } in vitro (IC_{10})}$$

Cuanto mayor es esta relación (más cerca de la unidad) mayor será el riesgo potencial de hepatotoxicidad del fármaco en cuestión. De este modo se puede comparar con mayor aproximación los riesgos de hepatotoxicidad esperados *in vivo*, dentro de una familia de fármacos.

RESULTADOS

1) Cultivo primario de hepatocitos humanos

Una vez aislados los hepatocitos humanos, la suspensión celular se ajusta a la densidad adecuada teniendo en cuenta la viabilidad y el recuento celular. A continuación, se siembran los hepatocitos y se inicia el proceso de **adhesión celular**.

La cinética de adhesión de los hepatocitos humanos mediada por fibronectina puede seguirse experimentalmente, valorando a distintos tiempos tras la siembra, la proteína celular retenida en las placas de cultivo.

Como se muestra en la *figura 1*, el proceso de adhesión de los hepatocitos humanos tiene una cinética sigmoide que alcanza su máximo a los 60-80 minutos de la siembra. La eficiencia de adhesión (número de células adheridas/número de células sembradas) se ha estimado alrededor del 80% cuando se siembran sobre plástico recubierto de fibronectina; y el número final de hepatocitos adheridos oscila entre 65.000 y 70.000 por cm^2 . Cuando, por el contrario, la siembra se realiza sobre plástico no recubierto la eficiencia de adhesión es muy inferior.

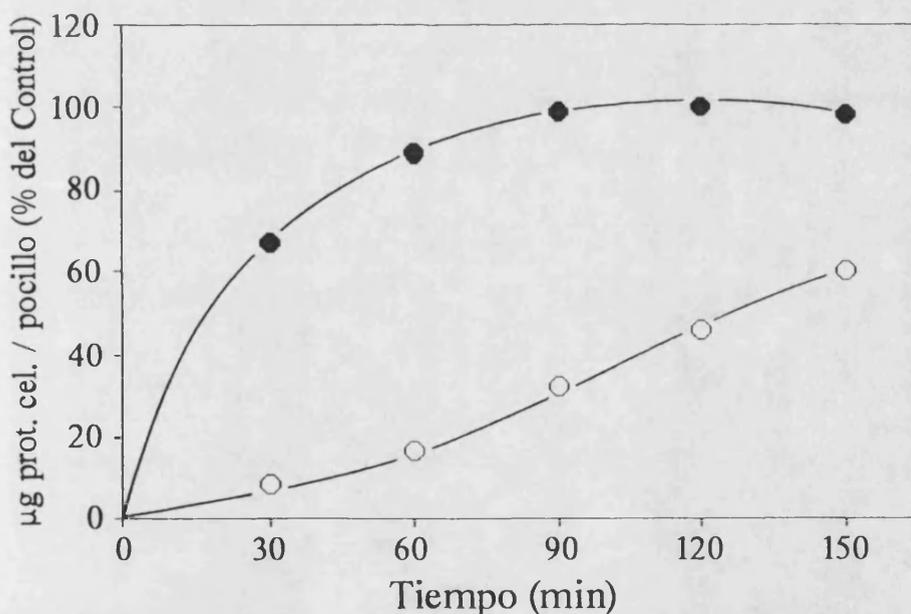


Figura 1.- Cinética de adhesión de los hepatocitos humanos. Efecto del recubrimiento con fibronectina. La suspensión celular se sembró a la densidad adecuada en pocillos previamente recubiertos con fibronectina ($3,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (puntos negros) o no recubiertos (puntos blancos). Tras distintos tiempos de incubación se valoró la proteína celular que había quedado retenida en los pocillos. Los puntos representan el valor promedio de 10 pocillos al tiempo especificado y están expresados como porcentaje con respecto al valor de adhesión máxima a los 150 min.

La alteración de este proceso activo como consecuencia de la acción de un xenobiótico puede atribuirse a daños en la membrana celular o a interferencias en la unión fibronectina-receptor.

Una vez adheridos a la placa de cultivo, los hepatocitos inician el proceso de extensión celular.

Tal como se muestra en las *figuras 2.A-2.C*, durante el proceso de extensión los hepatocitos humanos, inicialmente esféricos, se van aplanando y extendiendo sobre la superficie de la placa. A lo largo del primer día de cultivo, los hepatocitos van adquiriendo la morfología poligonal típica, reestablecen los contactos intercelulares y se reorganizan hasta formar una monocapa confluyente a las 24 h.

En esta etapa del cultivo los hepatocitos desarrollan nuevas estructuras de anclaje y reorganizan su citoesqueleto. El proceso de extensión depende de modo directo de la síntesis de RNA y proteínas; como consecuencia, si el xenobiótico añadido al medio de cultivo afecta alguna de estas funciones celulares, el proceso de extensión normal se ve alterado.

Figura 2.- Proceso de extensión de los hepatocitos humanos. Tras la adhesión celular se cambió el medio de las placas y a las 3 (A), 9 (B) y 24 h (C) se tomaron fotografías del cultivo de hepatocitos humanos.

Finalizada la extensión de los hepatocitos su morfología poligonal no sufre cambios aparentes durante varios días, presentando el aspecto de monocapa confluyente (*figuras 3.A-3.C*).

En esta etapa del cultivo los hepatocitos desarrollan su actividad funcional normal, imitando en mayor o menor medida el comportamiento del hepatocito humano adulto.

La actividad funcional del hepatocito humano en cultivo ha sido bien caracterizada en nuestro laboratorio y puede decirse que, por lo general, las funciones metabólicas específicas del hepatocito se expresan y mantienen en el cultivo durante un tiempo relativamente prolongado, si bien, algunas actividades metabólicas son estables más tiempo que otras (64, 91, 94).

Figura 3.- Cultivo de hepatocitos humanos en monocapa confluyente. Tras la extensión celular se cambió el medio de las placas y a las 48 (A), 72 (B) y 96 h (C) se tomaron fotografías del cultivo de hepatocitos humanos.

2) Efectos citotóxicos de los opiáceos en los distintos estadios del cultivo de hepatocitos humanos

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* del efecto citotóxico de los opiáceos sobre los hepatocitos humanos en cultivo.

Las células se expusieron a un amplio rango de concentraciones y tras el tratamiento se evaluaron los parámetros de citotoxicidad que se indican en cada caso.

2.1 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE LA ADHESION CELULAR

La presencia de los opiáceos durante esta etapa inicial del cultivo alteró el proceso de adhesión de los hepatocitos humanos al soporte celular.

En la *figura 4* se muestra el efecto inhibitor de cada uno de los opiáceos en la cinética de adhesión de los hepatocitos humanos.

Se observa que la morfina y la meperidina a concentraciones inferiores a 0,5 mM no alteraron aparentemente el proceso de adhesión celular, pero a concentraciones mayores (1 y 5 mM) si que tuvieron un efecto inhibitor claro (*figuras 4.A y 4.B*).

La metadona y la buprenorfina fueron más citotóxicas en esta etapa del cultivo, ya que con concentraciones inferiores a las de morfina y meperidina inhibieron marcadamente la adhesión (*figura 4.C y 4.D*).

Por otra parte, cabe destacar que el efecto inhibitor de los opiáceos no se observó con claridad hasta los 50 min de incubación. Tras solo 20 min, los hepatocitos tratados con los opiáceos mostraban un porcentaje de adhesión similar al de los hepatocitos control. Por el contrario, a los 80 min el efecto citotóxico era tan evidente, e incluso más acusado, que a los 50 min.

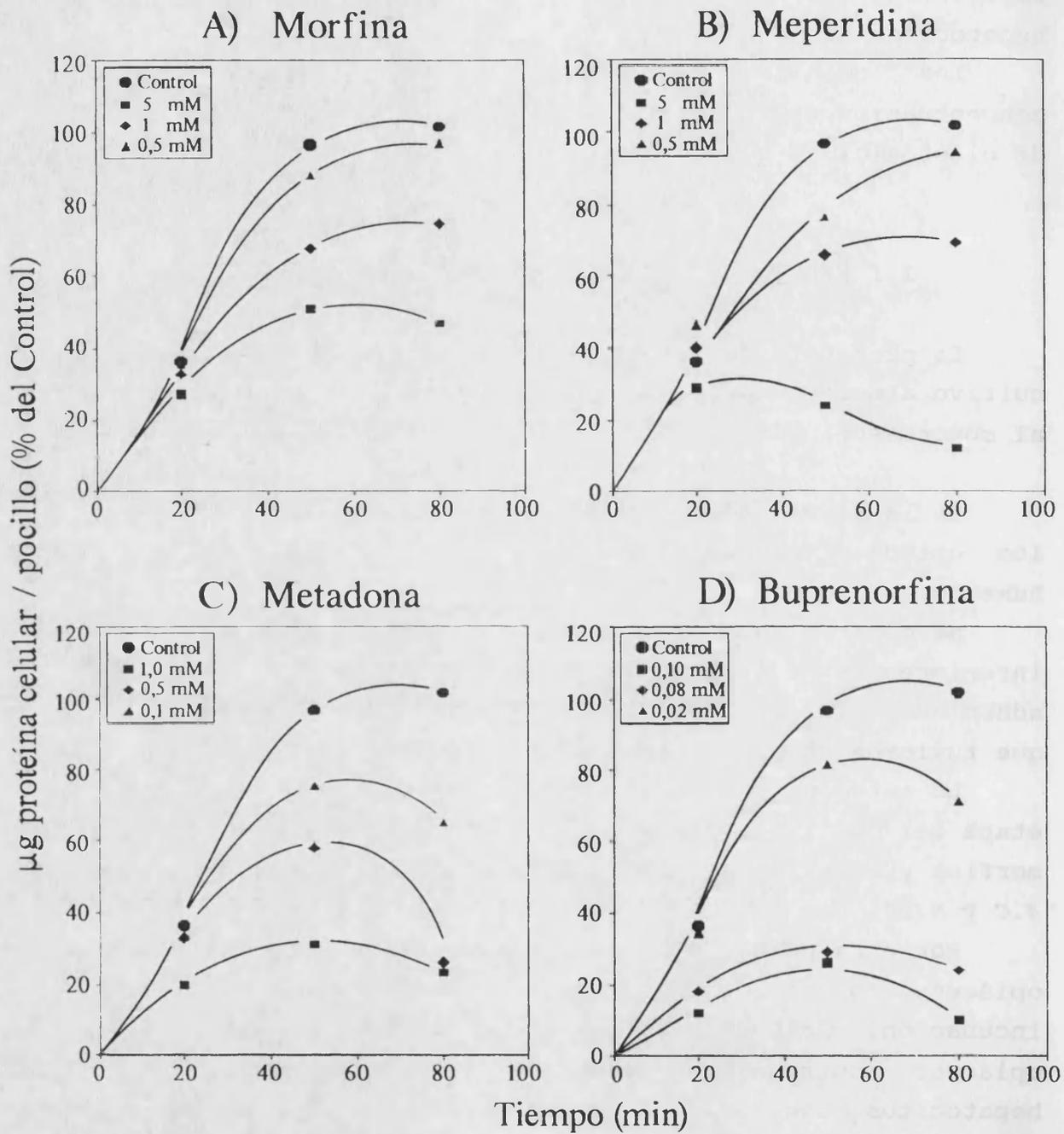


Figura 4.- Efecto de los opiáceos en la cinética de adhesión de los hepatocitos humanos. Tras 20, 50 y 80 min de incubación de los hepatocitos en presencia o ausencia de los opiáceos se valoró la proteína celular que había quedado retenida en los pocillos a cada tiempo. Los datos corresponden a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control de adhesión a los 80 min ($29,44 \pm 2,10 \mu\text{g/pocillo}$). Cada punto representa el valor promedio de cinco pocillos con el mismo tratamiento.

En la figura 5 se comparan los efectos de los opiáceos sobre la adhesión tras 80 min de exposición, con un rango más amplio de concentraciones.

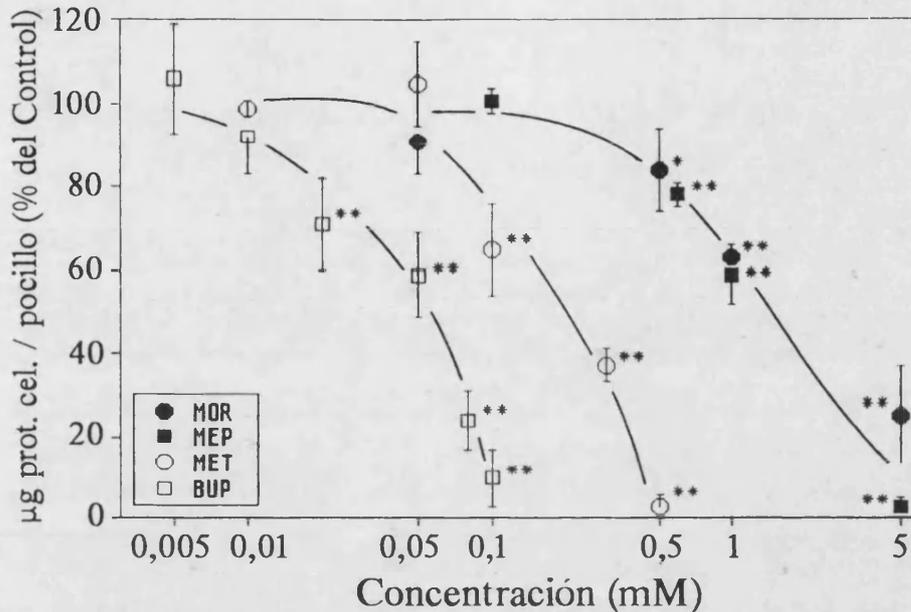


Figura 5.- Efecto de los opiáceos sobre la adhesión celular. Curvas dosis-respuesta. Tras 80 min de incubación de los hepatocitos en presencia o ausencia de los opiáceos se valoró la proteína celular que había quedado retenida en los pocillos. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control ($23,20 \pm 0,86 \mu\text{g/pocillo}$). Cada punto representa la media \pm D.S. de cinco pocillos con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Se observan los siguientes resultados:

- La morfina y la meperidina afectaron el proceso de adhesión a concentraciones muy similares. Los primeros efectos (IC_{10}) comenzaron a observarse claramente a concentraciones superiores a 0,3 mM. Las dosis que inhiben el proceso de adhesión un 50% (IC_{50}) se encontraron alrededor de 1-2 mM en el caso de estos dos opiáceos.

- La metadona tuvo un potencial citotóxico intermedio en esta etapa del cultivo. Su IC_{50} fue 6-10 veces inferior al de los dos opiáceos anteriores, y sus primeros efectos comenzaron a concentraciones superiores a 0,09 mM (IC_{10}).

- La buprenorfina fue el opiáceo más citotóxico en la adhesión celular; por encima de 0,01 mM (IC_{10}) se observaron los primeros efectos y el IC_{50} fue 25-50 veces inferior al de morfina y meperidina.

El valor promedio de adhesión celular alcanzado por los hepatocitos de los cultivos controles tras 80 min de la siembra fue de $25,46 \pm 2,80 \mu\text{g prot. cel./pocillo}$ (media \pm E.S.M., de 4 cultivos de biopsias diferentes).

Tabla 1: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a la inhibición del proceso de adhesión celular.

	<u>MOR</u>	<u>MEP</u>	<u>MET</u>	<u>BUP</u>
IC_{50} :	1,85	1,02	0,18	0,04
IC_{10} :	0,31	0,35	0,09	0,01

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,95.

2.2 CITOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS DURANTE LA EXTENSION CELULAR

Para estudiar el efecto de los opiáceos durante el periodo de extensión celular (1-24 h de cultivo), los compuestos se incorporaron tras el cambio de medio que se realiza después de la adhesión y se mantuvieron hasta las 24 h de cultivo. Una vez finalizado el tratamiento, se evaluaron tres parámetros de citotoxicidad: LDH intracelular, proteína celular y test del MTT.

En condiciones control, los valores estimados a las 24 h para cada uno de los parámetros fueron: $1,77 \pm 0,26 \text{ mU LDH/pocillo}$, $20,12 \pm 2,01 \mu\text{g prot.cel./pocillo}$ y $233 \pm 29 \text{ D.O./pocillo}$, para LDH intracelular, proteína celular adherida y test del MTT respectivamente (media \pm E.S.M., de 4 cultivos de biopsias diferentes).

Los tres parámetros de citotoxicidad evaluados dieron curvas dosis-respuesta y valores IC_{50} e IC_{10} similares para cada opiáceo; en otras palabras, no se apreciaron diferencias significativas entre los tres parámetros de citotoxicidad (tabla 2 y figuras 6.A., 6.B. y 6.C.).

En la tabla 2 se muestran los índices IC_{50} e IC_{10} obtenidos por interpolación en las curvas de citotoxicidad. Resumiendo, podemos decir que morfina y meperidina son los menos citotóxicos con IC_{50} entre 0,8 y 1,9 mM; metadona tiene una citotoxicidad intermedia con IC_{50} alrededor de 0,25 mM; y buprenorfina es el de mayor potencial citotóxico con un IC_{50} promedio de 0,1 mM.

Tabla 2: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su citotoxicidad en el periodo de extensión celular.

	<u>MOR</u>	<u>MEP</u>	<u>MET</u>	<u>BUP</u>
IC_{50} (mM)				
LDH :	1,33	1,75	0,30	0,10
PROT :	1,25	1,94	0,20	0,11
MTT :	0,78	1,49	0,25	0,10
IC_{10} (mM)				
LDH :	0,39	0,65	0,09	0,05
PROT :	0,59	0,91	0,11	0,05
MTT :	0,20	0,49	0,09	0,04

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,94.

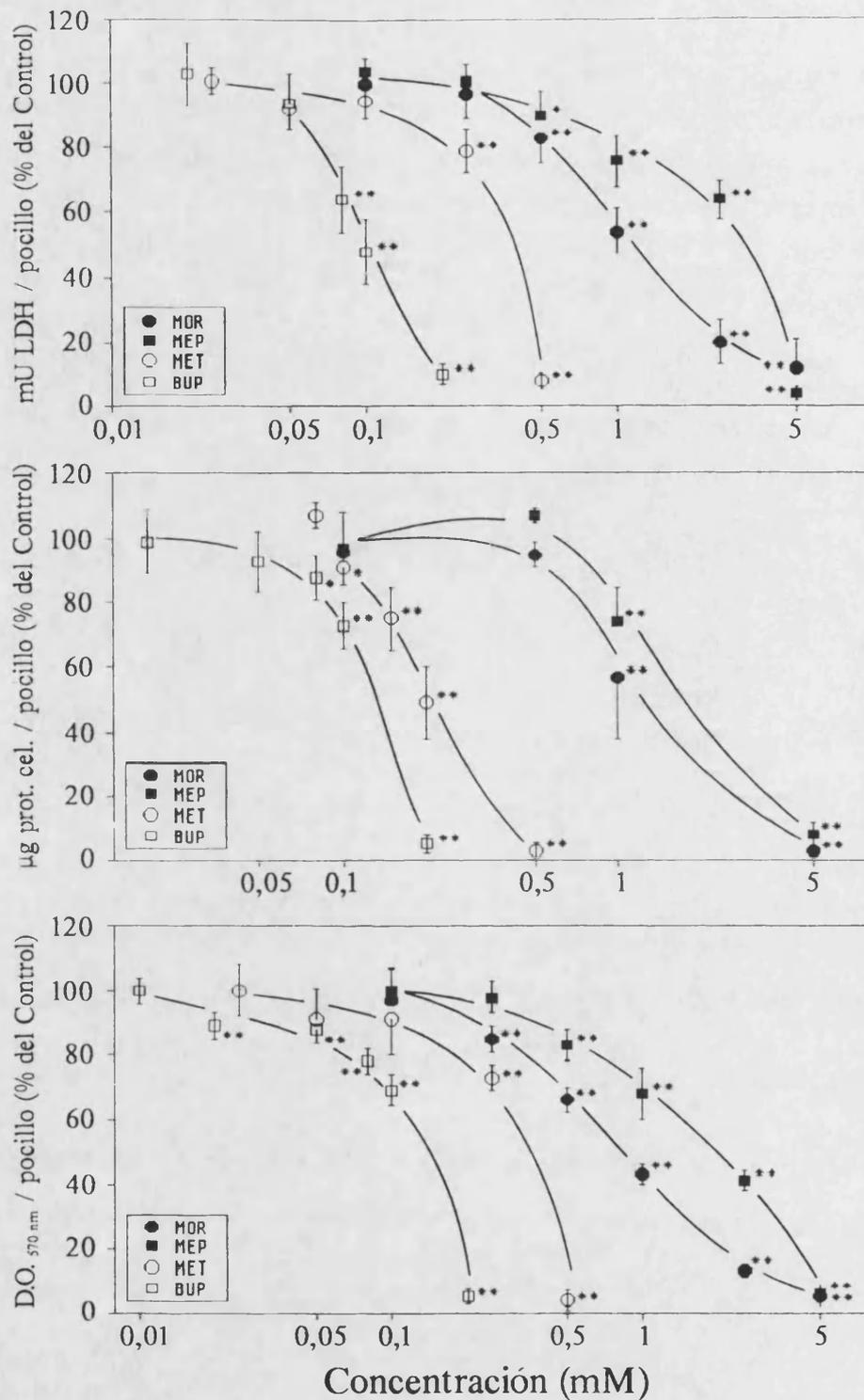


Figura 6.- Efecto citotóxico de los opiáceos durante el periodo de extensión celular. Los opiáceos se añadieron tras el cambio de medio posterior a la adhesión (1 h), y a las 24 h las microplacas fueron tratadas adecuadamente para determinar en ellas (A) la actividad LDH intracelular, (B) la proteína retenida en los pocillos, ó (C) el test del MTT. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control ($19,5 \pm 0,14$ mU LDH/pocillo,(A); $19,14 \pm 0,47$ µg prot./pocillo, (B); 356 ± 19 D.O./pocillo (C)). Cada punto representa la media \pm D.S. de cinco pocillos tratados con la misma concentración de opiáceo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Los valores de toxicidad IC_{10} , obtenidos por interpolación matemática en las curvas dosis-respuesta, en la práctica son indicativos de la concentración mínima por encima de la cual se va a producir un efecto citotóxico significativo. Morfina, y meperidina tienen su IC_{10} alrededor de 0,5 mM, metadona alrededor de 0,09 mM y buprenorfina alrededor de 0,05 mM.

El IC_{10} encontrado en todos los casos suele ser 1/2 - 1/5 del IC_{50} lo que refleja curvas dosis-respuesta con una pendiente bastante pronunciada (*figuras 6.A., 6.B. y 6.C.*).

2.3 CITOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS EN EL CULTIVO ESTABLECIDO (MONOCAPA CONFLUENTE)

Para estudiar el efecto de los opiáceos en el cultivo establecido, los compuestos se incorporaron tras el cambio de medio que se realiza a las 24 h y se mantuvo la exposición durante 1, 2 o 3 días. Tras cada período de tratamiento se evaluaron los tres parámetros de citotoxicidad (LDH intracelular, proteína celular y test del MTT). De este modo se observa claramente la evolución de los efectos citotóxicos que ocasiona cada opiáceo tras exposiciones prolongadas.

En las *figuras 7.A.-7.D.* se muestran las curvas dosis-respuesta de cada opiáceo tras los distintos periodos de exposición. El parámetro de citotoxicidad que se muestra es el test del MTT. Se observa claramente cómo la citotoxicidad aumenta con el tiempo global de exposición y la repetida incorporación de los opiáceos.

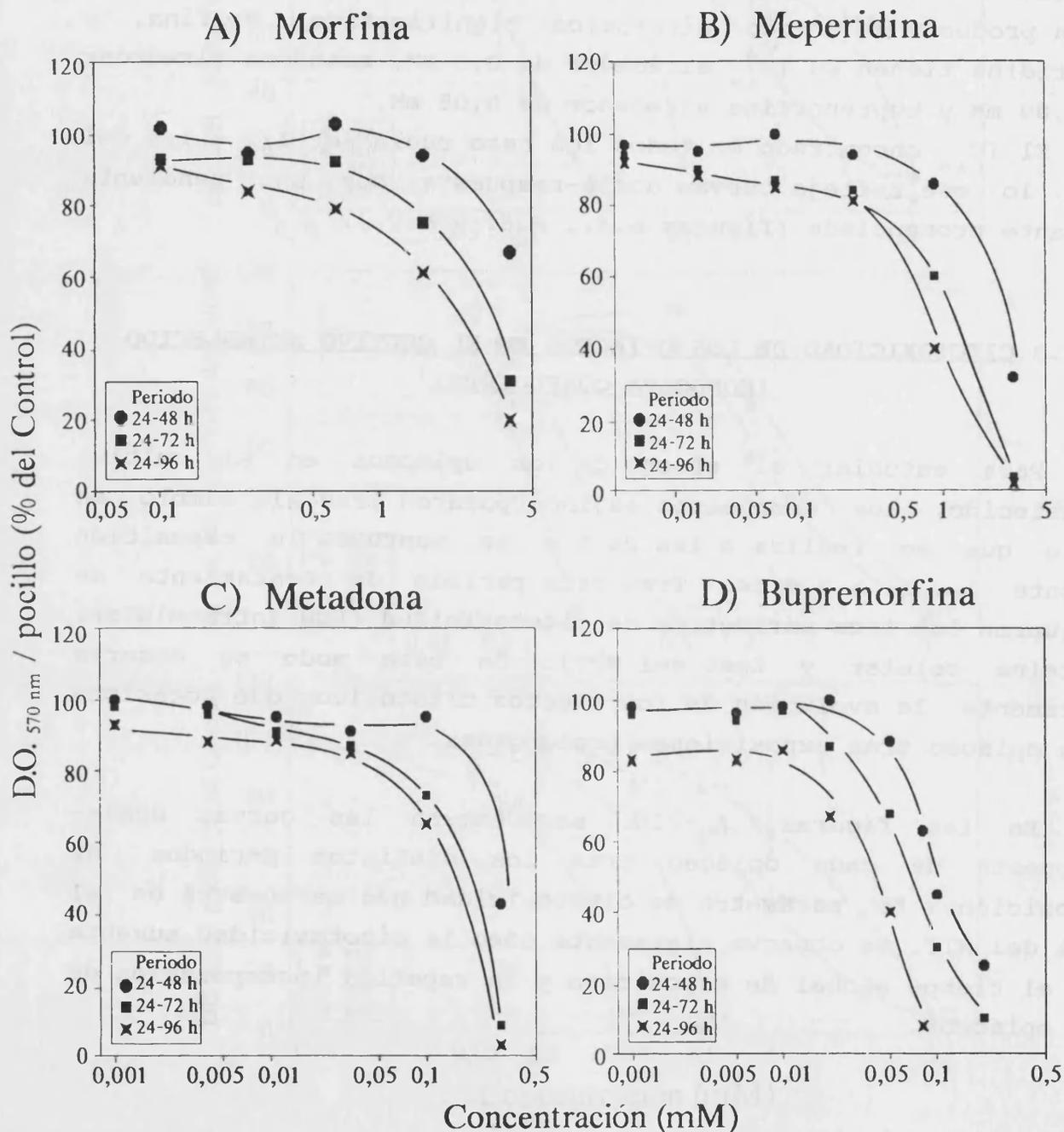


Figura 7.- Efecto citotóxico de los opiáceos tras una exposición de 1, 2 ó 3 días, durante el periodo de monocapa confluyente. El tratamiento con los opiáceos comenzó a las 24 h y a las 48, 72 ó 96 h, las microplacas fueron tratadas adecuadamente para realizar en ellas el test del MTT. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control (238 ± 13 (48 h), 218 ± 21 (72 h) y 193 ± 16 (96 h) D.O./pocillo). Cada punto representa el valor promedio de cinco pocillos con el mismo tratamiento.

Los índices IC_{50} e IC_{10} obtenidos con los tres parámetros de citotoxicidad se muestran en la tabla adjunta:

Tabla 3: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su citotoxicidad en el cultivo de hepatocitos en monocapa confluyente, tras 1, 2 ó 3 días de exposición.

PERIODO	IC_{50}			IC_{10}		
	24-48 h	24-72 h	24-96 h	24-48 h	24-72 h	24-96 h
MOR. LDH :	4,54	2,68	0,55	2,10	0,31	0,09
PROT :	3,88	2,34	0,59	1,28	0,70	0,15
MTT :	3,92	2,70	1,61	1,36	0,60	0,19
MEP. LDH :	2,38	0,66	0,28	0,49	0,15	0,04
PROT :	2,81	0,72	0,51	0,57	0,15	0,07
MTT :	2,17	0,71	0,61	0,42	0,09	0,08
MET. LDH :	0,290	0,103	0,073	0,159	0,012	0,025
PROT :	0,316	0,062	0,038	0,180	0,026	0,011
MTT :	0,299	0,110	0,093	0,109	0,019	0,021
BUP. LDH :	0,112	0,089	0,043	0,081	0,051	0,023
PROT :	0,105	0,077	0,038	0,051	0,031	0,019
MTT :	0,109	0,061	0,029	0,046	0,018	0,010

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,94.

 El incremento relativo de la citotoxicidad, cuando pasamos del tratamiento 24-48 h al tratamiento 24-96 h, fué muy similar en el caso de morfina, meperidina y metadona; los valores IC_{50} promedio descendieron entre 4,5 y 5,5 veces con estos tres opiáceos; en el caso de buprenorfina el descenso fue solo de unas 3 veces. Esto significa, en términos generales, que tras tres días de exposición se produce el mismo daño citotóxico que con concentraciones 3-6 veces superiores durante 1 día de exposición.

Los valores IC_{10} descendieron algo más que los IC_{50} . Tras 3 días de tratamiento con buprenorfina los valores IC_{10} quedaron divididos alrededor de 3,5 veces. El caso de morfina, meperidina y metadona fue más significativo ya que sus IC_{10} promedio descendieron entre 8 y 11 veces.

Los valores de citotoxicidad de la Tabla 3 también muestran que la buprenorfina fue, en este periodo del cultivo, el compuesto más citotóxico (IC_{50} : 0,11-0,03 mM), seguido de metadona (IC_{50} : 0,3-0,04 mM), meperidina (IC_{50} : 2,8-0,3 mM) y morfina (IC_{50} : 4,5-0,5 mM).

Los valores encontrados con cada uno de los parámetros de citotoxicidad en los cultivos control, a las 48 h y a las 96 h de cultivo fueron los siguientes:

- LDH intracelular: $1,62 \pm 0,29$ y $1,49 \pm 0,20$ mU LDH/pocillo.
- Proteína celular: $17,14 \pm 1,63$ y $10,06 \pm 0,91$ μ g prot./pocillo
- Test del MTT : 203 ± 30 y 185 ± 19 D.O./pocillo.
(media \pm E.S.M., de 4 cultivos de biopsias diferentes).

**3) Efecto de los opiáceos sobre las
funciones metabólicas de los
hepatocitos humanos en cultivo**

En este apartado se describen las alteraciones metabólicas inducidas *in vitro* por los cuatro opiáceos.

El estudio se realizó sobre cultivo de hepatocitos humanos en monocapa confluyente; es decir, tras 24 h de cultivo. El periodo de exposición a los opiáceos nunca superó las 24-26 h. El rango de dosis ensayadas en esta etapa del estudio se determinó teniendo como límite los valores de citotoxicidad IC_{10} del periodo 24-48 h del cultivo.

3.1 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE EL METABOLISMO DEL GLUCOGENO

Se estudió el efecto de los opiáceos sobre dos aspectos del metabolismo del glucógeno: su degradación y su síntesis.

3.1.1 Efecto de los opiáceos sobre la degradación del glucógeno.

Los hepatocitos humanos en cultivo tienen un contenido de glucógeno elevado (1102 ± 90 nmol glucosa/mg prot., media \pm E.S.M. de 10 cultivos de biopsias diferentes). El contenido de glucógeno es estable durante varios días cuando las células se mantienen en las condiciones estándar del cultivo (glucosa 10 mM e insulina y dexametasona 10^{-8} M). Estas condiciones experimentales, que son comparables al estado normal del hombre alimentado, fueron las escogidas para el estudio del efecto de los opiáceos sobre la degradación del glucógeno.

En primer lugar se estudió el efecto de los opiáceos sobre el contenido de glucógeno a lo largo del tiempo de exposición. Como se observa en la *figura 8*, la presencia de morfina 1 mM en el medio de cultivo indujo la degradación progresiva del glucógeno celular a lo largo del tiempo. En las mismas condiciones, no se afectó de modo significativo el contenido de proteína celular de la monocapa; la depleción del glucógeno fue producida por concentraciones subletales de morfina.

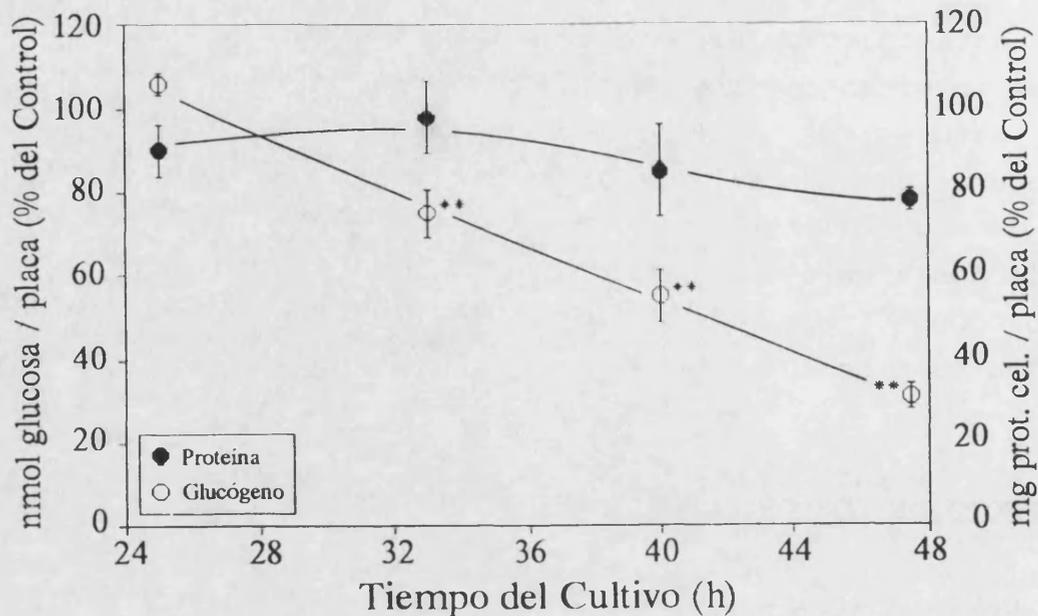


Figura 8.- Efecto de la morfina 1 mM sobre el contenido de glucógeno y proteína celular a lo largo del tiempo. La morfina se incorporó en las placas a las 24 h de cultivo y tras distintos tiempos de incubación se determinó a partir del mismo homogenado, la proteína celular retenida y el contenido de glucógeno. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control a cada tiempo. Cada punto representa la media \pm D.S. de tres placas al tiempo especificado. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Una vez demostrada la acción progresiva de los opiáceos sobre la degradación de glucógeno, se estudió el efecto dosis-respuesta de estos cuatro compuestos sobre el glucógeno, tras un tratamiento de 24 h.

Tabla 4: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su efecto en la degradación del glucógeno.

	MOR	MEP	MET	BUP
IC_{50}	0,936	1,064	0,204	0,052
IC_{10}	0,165	0,366	0,047	0,0084

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,95.

Como se observa en la *figura 9*, la morfina y la meperidina indujeron la degradación del glucógeno a concentraciones similares ($IC_{50} \cong 1$ mM). La metadona produjo el mismo efecto negativo sobre el glucógeno a concentraciones inferiores ($IC_{50} \cong 0,2$ mM); pero la buprenorfina fue el opiáceo más tóxico en este aspecto ($IC_{50} \cong 0,05$ mM, e IC_{10} estimado en el rango μ M).

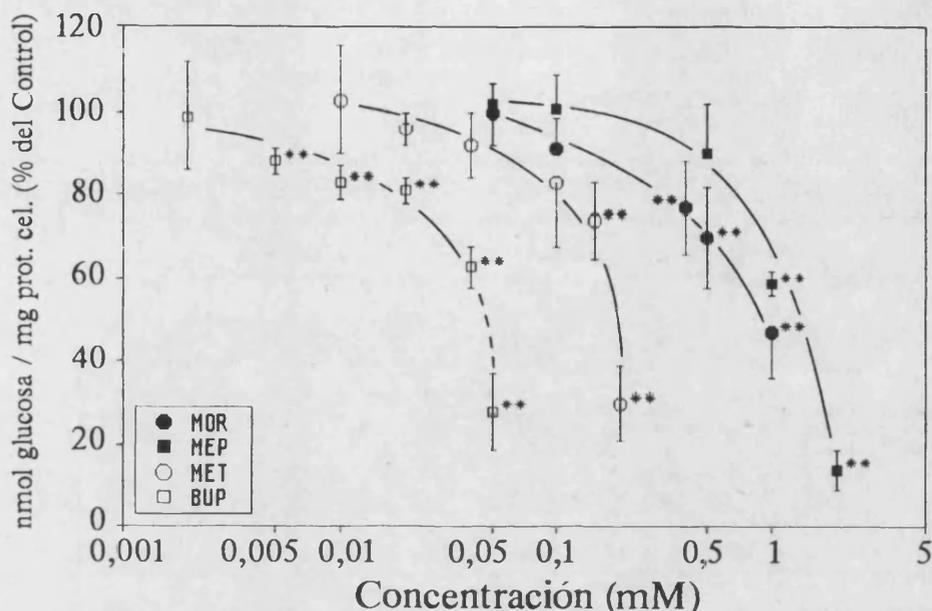


Figura 9.- Efecto de los opiáceos en el contenido de glucógeno. Los opiáceos se incorporaron a las 24 h, y a las 48 h se determinó el glucógeno celular de las placas. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control (948 ± 26 nmol glucosa/mg prot.). Cada punto representa la media \pm D.S. de cuatro placas con el mismo tratamiento. (**) $p < 0,01$. (---) Concentraciones con efecto citotóxico moderado.

3.1.2 Efecto de los opiáceos sobre la síntesis de glucógeno

La situación experimental escogida para evaluar el efecto de los opiáceos sobre la síntesis de glucógeno en hepatocitos humanos cultivados, fue distinta a la situación escogida para el estudio del efecto en la degradación.

En primer lugar, los hepatocitos fueron deplecionados de su contenido en glucógeno mediante 3 h de incubación con glucagón 10^{-8} M; a continuación, en presencia de los opiáceos, se estimuló la ruta glicogénica mediante concentraciones elevadas de glucosa (30 mM). La elevada concentración de glucosa empleada, aunque

alejada del rango fisiológico, asegura la síntesis de glucógeno por incorporación directa del monosacárido.

Tras 3 h de tratamiento con glucagón, el glucógeno celular se redujo a 270 ± 28 nmol glucosa/mg prot. Este contenido en glucógeno aumentó en los cultivos control hasta un valor de 626 ± 59 nmol glucosa/mg prot. tras las 6 h en presencia de glucosa 30 mM. (Los valores indicados representan la media \pm E.S.M. de 8 cultivos de biopsias diferentes).

La síntesis del polisacárido resultó inhibida por los opiáceos de un modo dosis dependiente tal como se muestra en la figura 10.

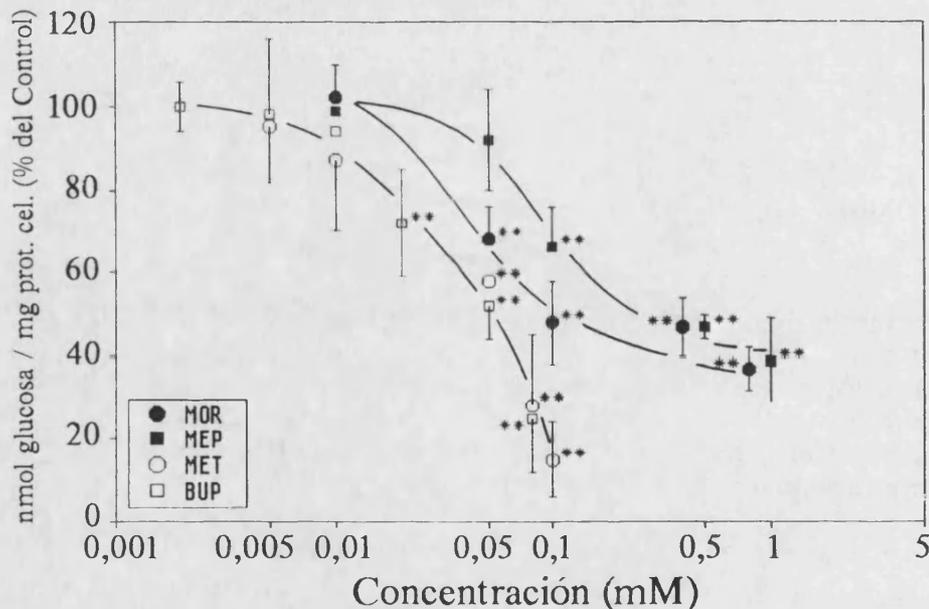


Figura 10.- Efecto de los opiáceos en la síntesis de glucógeno. A las 24 h de cultivo las placas fueron deplecionadas de glucógeno con glucagón 10^8 M. A continuación se mantuvieron con glucosa 30 mM durante 6 h de recarga, en presencia o ausencia de los opiáceos. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor de síntesis neta en los controles tras 6 h de recarga (326 ± 34 nmol glucosa/mg prot.). Cada punto representa la media \pm D.S. de cuatro placas con el mismo tratamiento. (**) $p < 0,01$.

En nuestras condiciones experimentales, los opiáceos ejercieron un efecto más tóxico sobre la síntesis de glucógeno que sobre su degradación, ya que se vió afectada negativamente a

concentraciones inferiores, incluso con un tratamiento más breve (6 h). Este hecho fue especialmente llamativo con morfina, meperidina y metadona; pero en el caso de buprenorfina la toxicidad sobre el proceso de síntesis fue provocada a concentraciones similares a las que inducen la degradación del polisacárido.

En términos comparativos, se puede decir que metadona y buprenorfina ($IC_{50} \cong 0,04-0,05$ mM) mostraron de nuevo un mayor potencial tóxico que morfina y meperidina ($IC_{50} \cong 0,3-0,4$ mM).

Tabla 5: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su efecto en la síntesis de glucógeno.

	<u>MOR</u>	<u>MEP</u>	<u>MET</u>	<u>BUP</u>
IC_{50}	0,338	0,442	0,048	0,046
IC_{10}	0,043	0,058	0,0096	0,0127

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,94.

3.2 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE LA SINTESIS DE UREA

El hígado es el órgano fundamental en la síntesis de urea a partir de amonio. La ureogénesis se expresa durante un tiempo relativamente prolongado en los hepatocitos humanos en cultivo.

En el medio de cultivo se detecta normalmente la presencia de urea como consecuencia del catabolismo hepático de los aminoácidos y proteínas; sin embargo, la medida de la capacidad ureogénica del hepatocito se hace tras una sobrecarga de amonio (3 mM $ClNH_4$) para estimular al máximo la síntesis de urea, lo que permite medir el efecto de los opiáceos sobre esta ruta catabólica en condiciones de actividad máxima.

La producción de urea por los hepatocitos humanos, en condiciones control, a las 48 h de cultivo y tras una sobrecarga de amonio fue de 210 ± 32 nmol/mg prot. x h (media \pm E.S.M. de 4 cultivos de biopsias distintas). Esta velocidad de síntesis fue lineal durante las dos horas siguientes al cambio de medio.

El efecto de los opiáceos en la síntesis de urea se caracterizó por una inhibición de dicha síntesis, significativa a concentraciones muy bajas, pero que, excepto en el caso de meperidina, nunca superó el 50% con las dosis subletales más altas (figura 11).

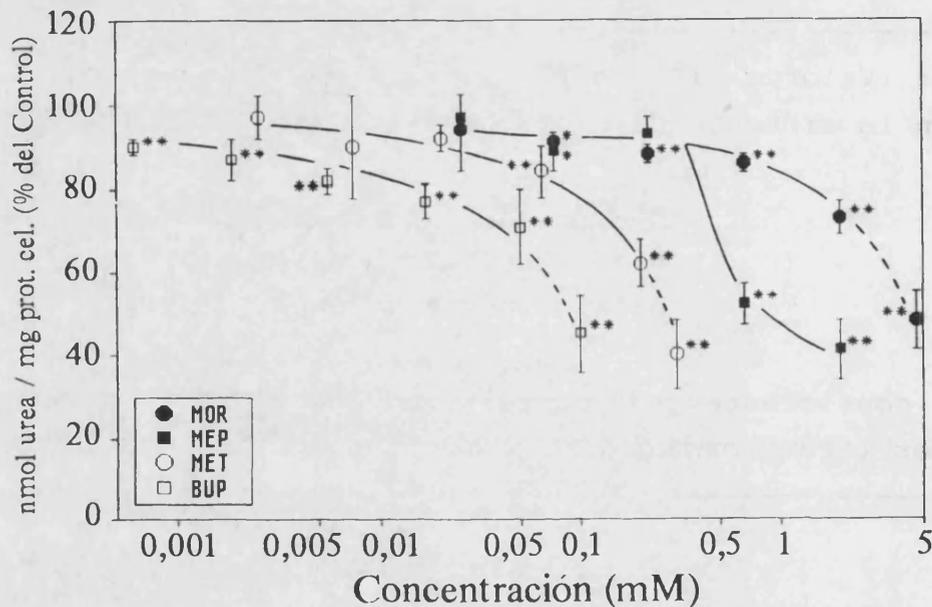


Figura 11.- Efecto de los opiáceos en la síntesis de urea. Los opiáceos se incorporaron a las 24 h, y a las 48 h se renovó el medio de cultivo suplementado con NH_4Cl , mM, y se incorporaron de nuevo los opiáceos. Durante las 2 h siguientes se tomaron alicuotas del medio de cultivo para determinar la velocidad de síntesis de urea. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control (260 ± 39 nmol urea/mg prot. x h). Cada punto representa la media \pm D.S. de cuatro placas con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. (---) Concentraciones con efecto citotóxico moderado.

La máxima inhibición encontrada con la mayor concentración subletal de morfina ensayada (2 mM) fue solo de un 30%; por el contrario el IC_{50} se consiguió con una concentración 20 veces inferior (0,1 mM). Del mismo modo, la inhibición producida por metadona y buprenorfina dió lugar a curvas dosis-respuesta muy

tendidas que comenzaron a concentraciones más bajas de lo normal. Cabe destacar que el IC_{10} de buprenorfina se estimó próximo a $10^{-7}M$.

La meperidina tuvo un efecto distinto ya que su curva dosis-respuesta fue de mayor pendiente y similar a la encontrada cuando se evaluó su efecto en otras funciones metabólicas del hepatocito (figura 11).

Tabla 6: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su efecto en la síntesis de urea.

	<u>MOR</u>	<u>MEP</u>	<u>MET</u>	<u>BUP</u>
IC_{50}	5,434	0,990	0,254	0,108
IC_{10}	0,111	0,082	0,047	0,0006

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,93.

3.3 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE LA SINTESIS DE ALBUMINA

Las proteínas plasmáticas, a excepción de las inmunoglobulinas, son sintetizadas por el hígado, y más concretamente por los hepatocitos. La albúmina es el punto de referencia clásico en el estudio de la síntesis de proteínas plasmáticas. Los hepatocitos humanos en cultivo sintetizan y escretan albúmina al medio en cantidad suficiente como para ser evaluada sin dificultad mediante ELISA competitivo indirecto.

La síntesis de albúmina por los hepatocitos humanos aumenta paulatinamente a lo largo de los días de cultivo. La máxima capacidad de síntesis de albúmina se alcanza al cuarto día, decreciendo a continuación de modo progresivo. En concreto, la velocidad de síntesis a las 48 h de cultivo en condiciones control fue de $1,30 \pm 0,18 \mu g/mg \text{ prot. } \times h$ (media \pm E.S.M. de 4

cultivos de biopsias distintas). Esta velocidad de síntesis fue lineal durante las 2 h siguientes al cambio de medio.

La síntesis de albúmina fue una de las funciones metabólicas del hepatocito más afectadas por los opiáceos (figura 12).

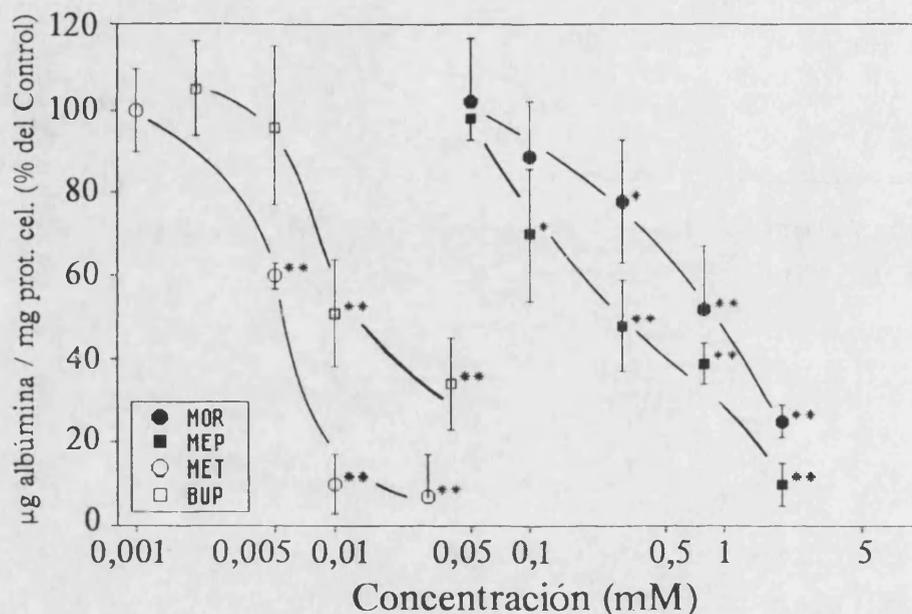


Figura 12.- Efecto de los opiáceos en la síntesis de albúmina. Los opiáceos se incorporaron a las 24 h, y a las 48 h se renovó el medio de cultivo y se incorporaron de nuevo los opiáceos. Durante las 2 h siguientes se tomaron alícuotas del medio de cultivo y se determinó la velocidad de síntesis de albúmina. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control ($1,52 \pm 0,38 \mu\text{g albúmina/mg prot.} \times \text{h}$). Cada punto representa la media \pm D.S. de cuatro placas con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Estos cuatro compuestos podrían clasificarse en dos grupos atendiendo a la capacidad inhibidora de la síntesis de albúmina:

- La morfina y la meperidina fueron las menos tóxicas; sus IC_{50} estuvieron alrededor de 0,8 y 0,4 mM respectivamente.
- La metadona fue, de los cuatro opiáceos estudiados, el de mayor capacidad inhibidora de la síntesis de albúmina; su IC_{50} fue 140 veces inferior al de morfina, y su IC_{10} estuvo alrededor de 2 μM . La buprenorfina mostró una toxicidad similar a la de metadona aunque a concentraciones ligeramente superiores.

Tabla 7: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su efecto en la síntesis de albúmina.

	<u>MOR</u>	<u>MEP</u>	<u>MET</u>	<u>BUP</u>
IC_{50}	0,808	0,390	0,0058	0,0119
IC_{10}	0,164	0,082	0,0021	0,0054

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,96.

3.4 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE EL GSH CELULAR

El contenido de GSH en hepatocitos humanos aislados es inferior que en el hígado humano, pero a lo largo de los días de cultivo incrementa gradualmente alcanzando, al cuarto día de cultivo, el máximo nivel (similar al del hígado humano) y descendiendo después de un modo paulatino.

Los efectos de los opiáceos sobre el GSH se evaluaron durante el segundo día de cultivo; en este periodo los niveles de GSH oscilan entre $14,8 \pm 1,2$ nmol GSH/mg prot., a las 24 h, y $47,7 \pm 4,3$ nmol GSH/mg prot., a las 48 h. (media \pm E.S.M. de 6 cultivos de biopsias distintas).

Dependiendo de las características de cada xenobiótico y de su metabolización la depleción de GSH se produce más o menos rápidamente. Por ello, para estudiar el efecto de los opiáceos sobre el GSH se averiguó, en primer lugar, la disminución con el tiempo del contenido de GSH en presencia de cada opiáceo; posteriormente se estudió el efecto dosis-respuesta al tiempo de máxima depleción.

Las curvas de tiempos obtenidas con cada uno de los opiáceos se muestran en la *figura 13*.

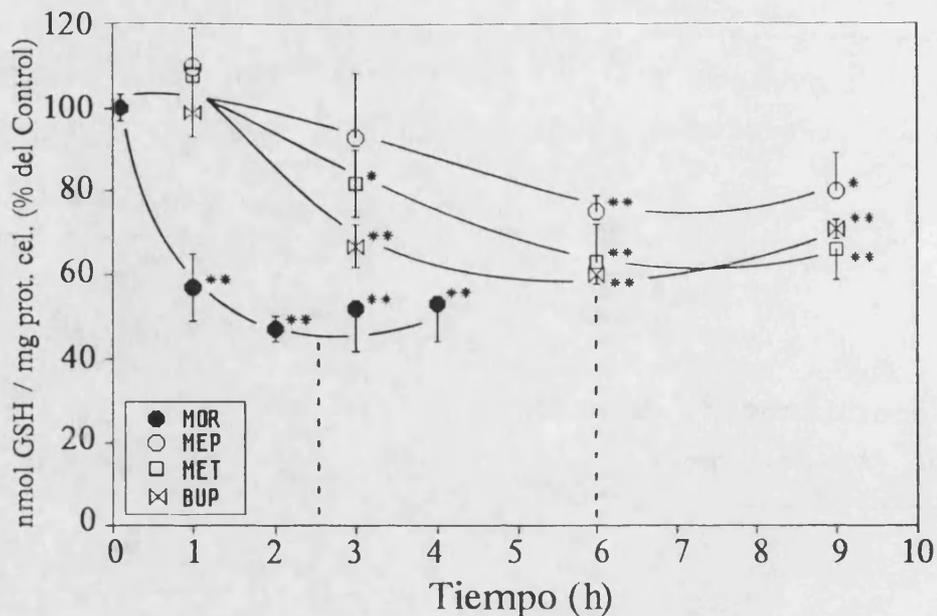


Figura 13.- Cinéticas de depleción del GSH inducidas por los opiáceos. Los compuestos se incorporaron a las 24 h, y tras distintos tiempos de incubación se determinó el GSH celular de las placas. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control a cada tiempo. Cada punto representa la media \pm D.S. de tres placas con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

A las 24 h de cultivo se cambió el medio y se incorporaron los opiáceos; tras 2-3 h de incubación con morfina 2 mM se alcanzó la máxima depleción de GSH, superior al 50%. Por el contrario meperidina, metadona y buprenorfina actuaron de modo distinto; la depleción inducida por estos tres opiáceos no comenzó hasta 1 h después de su incorporación, el GSH alcanzó el nivel mínimo tras 6 h de exposición, y la depleción osciló entre el 25 y el 40%.

A los tiempos de máxima depleción de cada opiáceo se estudió la relación dosis-respuesta. Los resultados se muestran en la figura 14.

La morfina y la meperidina, aunque con tiempos de exposición diferentes, mostraron un efecto bastante similar; la depleción originada por estos dos opiáceos comenzó a partir de 0,5 mM (IC_{10}), y alcanzó el 50% alrededor de 1,5-2,5 mM. La buprenorfina fue de nuevo la más tóxica de los cuatro opiáceos con valores de IC_{10} en el rango μ M. La metadona actuó con una

potencia intermedia dando una curva dosis-respuesta similar a la de morfina y meperidina pero en un rango de concentraciones unas 10 veces inferior.

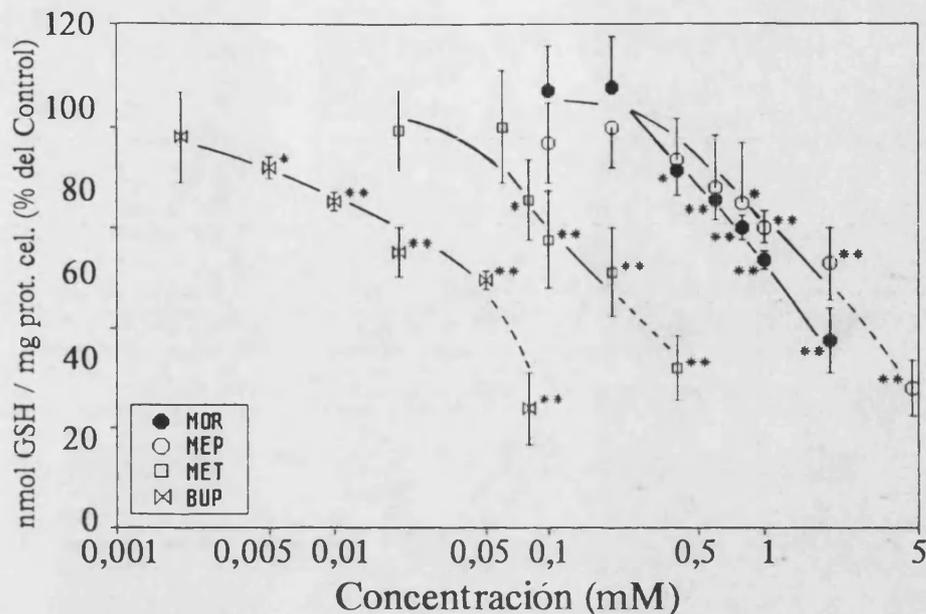


Figura 14.- Efecto de los opiáceos en el contenido de GSH. Curvas dosis-respuesta. Los opiáceos se incorporaron a las 24 h, y a los tiempos de máxima depleción de cada uno de los compuestos se determinó el GSH celular de las placas. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control ($19,8 \pm 2,61$ (MOR) y $26,4 \pm 3,9$ (MEP, MET y BUP) nmol GSH/mg prot.). Cada punto representa la media \pm D.S. de cuatro placas con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. (---) Concentraciones con efecto citotóxico moderado.

Tabla 8: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su efecto en la depleción del GSH.

	MOR	MEP	MET	BUP
IC_{50}	1,51	2,32	0,21	0,059
IC_{10}	0,489	0,535	0,075	0,0062

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,96.

4) Citotoxicidad de los opiáceos en cultivo primario de hepatocitos de rata y líneas celulares continuas

En este apartado se muestran los resultados derivados del estudio de la toxicidad de los opiáceos en otros sistemas celulares, distintos a los hepatocitos humanos en cultivo.

El posterior análisis conjunto de los resultados nos permitirá comparar los efectos observados en estos sistemas con los encontrados en hepatocitos humanos.

Los sistemas celulares escogidos para este fin son: hepatocitos de rata en cultivo y líneas celulares continuas de origen diverso: animal y humano, hepáticas y no hepáticas.

4.1 CITOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS EN HEPATOCITOS DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO

El efecto de los opiáceos en cultivo primario de hepatocitos de rata se evaluó únicamente a nivel citotóxico, determinando los tres parámetros de citotoxicidad ya mencionados. Se escogieron dos periodos de exposición distintos correspondientes a dos etapas del cultivo con características también distintas: El periodo 1-24 h, en el cual el hepatocito de rata conserva la máxima capacidad de biotransformación; y el periodo 24-48 h en el cual, si bien el cultivo ya esta establecido como monocapa confluyente, la actividad biotransformadora es solo un 25% de la actividad inicial (221, 158).

En la tabla 9 se muestran los índices de toxicidad IC_{50} e IC_{10} de los tres parámetros evaluados en los dos periodos de exposición en el cultivo.

Podemos decir resumiendo el contenido de la tabla que en el periodo 1-24 h, meperidina es el menos citotóxico de los cuatro opiáceos con un IC_{50} promedio de 2,5 mM; morfina y metadona presentarían una citotoxicidad intermedia con sus IC_{50} alrededor de 0,2-0,4 mM; y buprenorfina sería el de mayor potencial citotóxico con un IC_{50} de 0,04 mM.

En el periodo 24-48 h los resultados no son idénticos; aunque los cuatro opiáceos pueden ordenarse del mismo modo atendiendo a su potencial citotóxico, en este periodo morfina y

buprenorfina presentan valores IC_{50} 3-4 veces superiores a los del periodo 1-24 h, lo que significa que requieren concentraciones 3-4 veces superiores en el periodo 24-48 h para conseguir los mismos efectos citotóxicos que en el periodo 1-24 h.

Tabla 9: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su citotoxicidad en dos periodos distintos del cultivo primario de hepatocitos de rata.

	<u>1-24 h</u>			<u>24-48 h</u>		
	LDH	PROT	MTT	LDH	PROT	MTT
IC_{50}						
MOR :	0,40	0,22	0,22	1,30	1,10	1,10
MEP :	2,50	3,20	1,70	2,20	2,00	4,50
MET :	0,35	0,37	0,15	0,29	0,34	0,50
BUP :	0,041	0,037	0,042	0,13	0,12	0,12
IC_{10}						
MOR :	0,19	0,15	0,14	0,36	0,46	0,23
MEP :	1,13	1,87	0,82	0,57	0,82	1,19
MET :	0,26	0,28	0,06	0,11	0,20	0,09
BUP :	0,029	0,027	0,029	0,050	0,081	0,046

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,95.

 Los valores IC_{10} coinciden por lo general, con los valores IC_{50} , en cuanto a la citotoxicidad relativa de los compuestos.

Por otra parte, los cocientes IC_{50}/IC_{10} obtenidos con los opiáceos en el periodo 1-24 h del cultivo, da valores entre 1,25 y 1,75. Sin embargo, el cociente IC_{50}/IC_{10} obtenido con los resultados del periodo 24-48 h está, en la mayoría de los casos, entre 2,0 y 3,5. Esto indica que el tratamiento con los opiáceos en el cultivo de hepatocitos de rata origina curvas dosis-respuesta de mayor pendiente en el periodo 1-24 h que en el periodo 24-48 h.

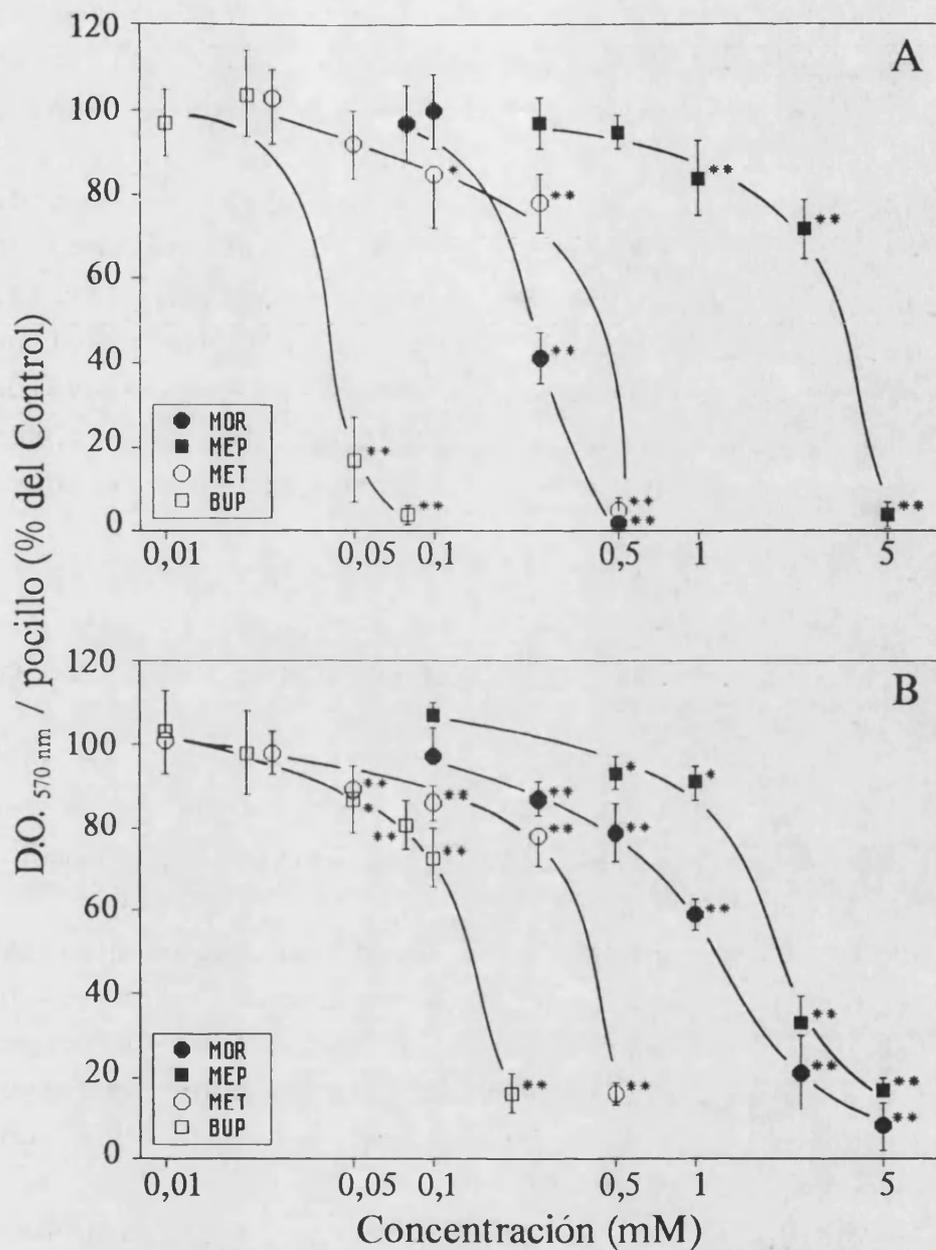


Figura 15.- Efecto citotóxico de los opiáceos sobre cultivo de hepatocitos de rata. Los cultivos fueron expuestos a los opiáceos durante el periodo 1-24 h (A), ó durante el periodo 24-48 h (B), y tras el tratamiento se realizó en las microplacas el test del MTT. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control (277 ± 21 D.O./pocillo). Cada punto representa la media \pm D.S. de cinco pocillos con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

En las *figuras 15.A y 15.B* se muestra las curvas dosis respuesta obtenidas tras la evaluación con el test del MTT de los efectos citotóxicos de los opiáceos sobre el cultivo de hepatocitos de rata en el periodo 1-24 h (*figura 15.A*) y en el periodo 24-48 h (*figura 15.B*). Obsérvese la distinta posición en ambas gráficas de las curvas dosis-respuesta correspondientes a la morfina y a la buprenorfina; el desplazamiento hacia la izquierda de estas dos curvas observado en la *figura 15.A* refleja la mayor toxicidad de estos dos opiáceos en el periodo 1-24 h. Las curvas dosis-respuesta obtenidas con la evaluación de la LDH intracelular y la proteína celular (no representadas) fueron de características muy similares a las obtenidas con el test del MTT.

4.2 CITOTOXICIDAD DE LOS OPIACEOS EN LINEAS CELULARES CONTINUAS

El efecto de los opiáceos se evaluó también en cultivos de líneas continuas de origen hepático: HepG2 (humano) y FaO (rata); y de origen no hepático: Hela (tipo epitelial, humano) y 3T3 (tipo fibroblasto, ratón).

El efecto citotóxico de los cuatro opiáceos estudiados sobre las líneas celulares se evaluó determinando los tres parámetros de citotoxicidad ya mencionados. Se escogió un único periodo de exposición comprendido entre las 24 y 48 h de cultivo que en nuestras condiciones experimentales coincide con un 75% de confluencia en el cultivo.

A la vista de los resultados (tabla 10, *figuras 16.A. y 16.B.*) podemos decir que la sensibilidad de las distintas líneas celulares a los opiáceos fue bastante similar en todos los casos. El opiáceo menos citotóxico resultó ser la morfina con un IC_{50} promedio entre 3 y 6 mM. A continuación, y en orden creciente de toxicidad, tendríamos a la meperidina, la metadona y la buprenorfina, con IC_{50} promedio próximos a 1, 0,1 y 0,05 mM respectivamente.

El orden establecido con los IC_{50} es el mismo que resulta si tomamos como criterio los IC_{10} : Morfina < Meperidina < Metadona <

Buprenorfina. La relación entre IC_{50} e IC_{10} da cocientes que en la mayoría de los casos están entre 2 y 4. Son por lo tanto curvas dosis-respuesta de pendiente similar a las obtenidas en cultivo de hepatocitos de rata en el periodo 24-48 h.

Tabla 10: Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a su citotoxicidad en cuatro líneas celulares continuas.

	<u>HepG2</u>			<u>FaO</u>		
	LDH	PROT	MTT	LDH	PROT	MTT
IC_{50}						
MOR :	2,74	1,68	7,88	5,14	5,80	6,71
MEP :	0,60	0,67	2,04	1,45	0,60	0,69
MET :	0,089	0,077	0,135	0,125	0,151	0,196
BUP :	0,033	0,027	0,063	0,062	0,032	0,025
IC_{10}						
MOR :	0,49	0,37	1,09	2,87	2,72	2,92
MEP :	0,17	0,19	1,01	0,44	0,26	0,30
MET :	0,026	0,025	0,053	0,052	0,034	0,060
BUP :	0,017	0,014	0,037	0,033	0,019	0,015

	<u>Hela</u>			<u>3T3</u>		
	LDH	PROT	MTT	LDH	PROT	MTT
IC_{50}						
MOR :	2,26	6,66	5,98	1,95	2,46	4,39
MEP :	1,19	0,64	1,95	0,51	0,67	2,47
MET :	0,150	0,128	0,238	0,052	0,044	0,119
BUP :	0,112	0,060	0,074	0,021	0,020	0,091
IC_{10}						
MOR :	0,63	2,84	1,12	1,05	1,13	1,97
MEP :	0,47	0,25	1,08	0,21	0,27	1,20
MET :	0,064	0,039	0,120	0,024	0,016	0,067
BUP :	0,043	0,024	0,031	0,011	0,013	0,058

Los coeficientes de correlación del ajuste lineal de los resultados (transformada LOGIT) fueron superiores a 0,95.

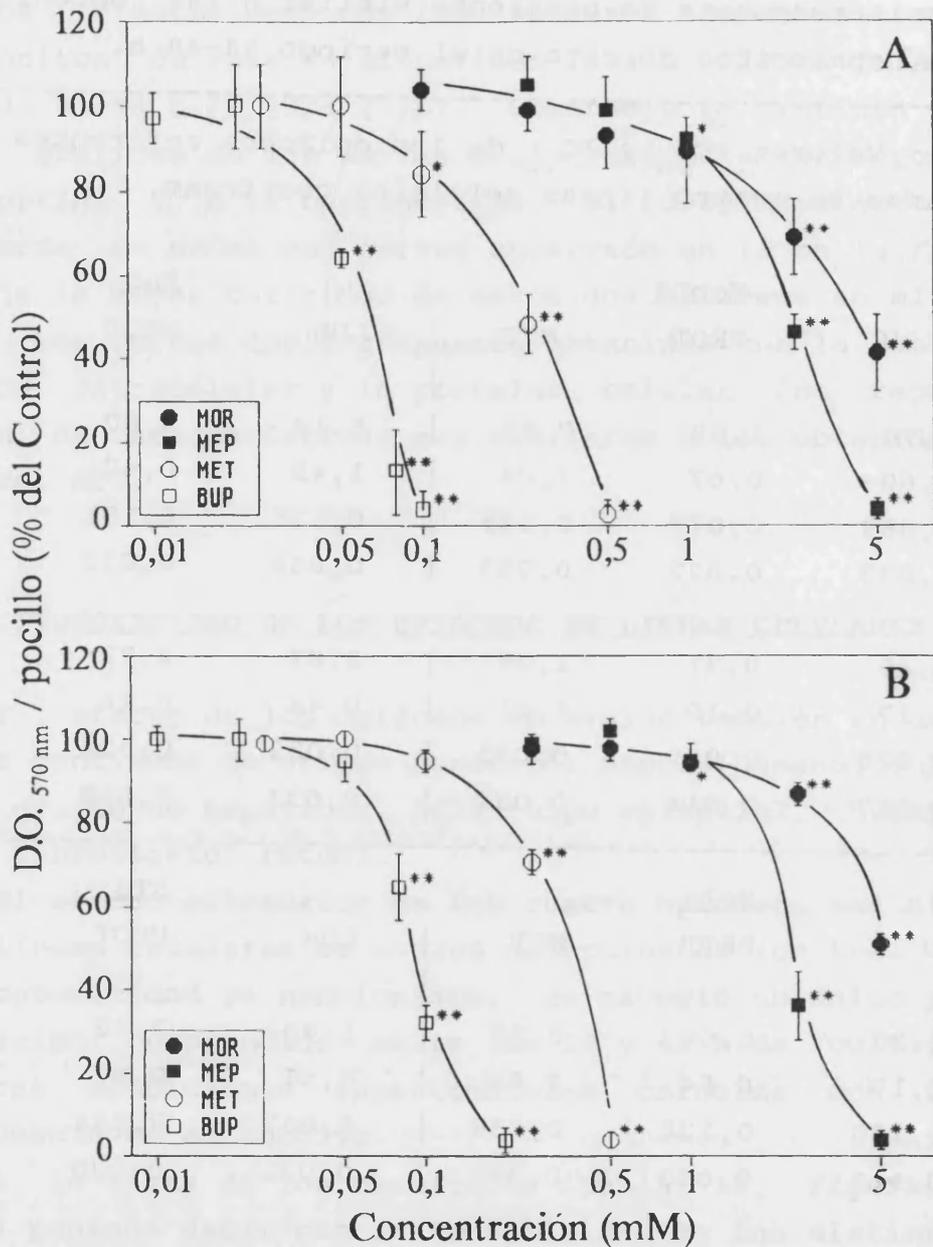


Figura 16.- Efecto citotóxico de los opiáceos sobre líneas celulares continuas. Las líneas celulares HepG2 (A) y Hela (B) fueron expuestas a los opiáceos durante el periodo 24-48 h de cultivo, y tras el tratamiento se realizó en las microplacas el test del MTT. Los datos pertenecen a un cultivo representativo y están expresados como porcentaje respecto al valor control (385 ± 41 D.O./pocillo). Cada punto representa la media \pm D.S. de cinco pocillos con el mismo tratamiento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

En las *figuras 16.A y 16.B* se muestran gráficamente los resultados obtenidos (test del MTT) con la línea hepática HepG2 y con la no-hepática Hela. Como puede apreciarse el distinto origen tisular de estas dos líneas celulares humanas no influyó en el patrón de toxicidad de los cuatro opiáceos ensayados. Las curvas dosis-respuesta obtenidas con la evaluación de la LDH intracelular y la proteína celular (no representadas) fueron de características muy similares a las obtenidas con el test del MTT.

5) Estudio de la metabolización de la morfina en distintos sistemas celulares mediante cromatografía HPLC

La concentración de la morfina en el medio extracelular se determinó en las alícuotas tomadas a distintos tiempos mediante HPLC tal como se describe en el apartado 8 de METODOS.

La representación de los valores de concentración (expresados como $\mu\text{moles MOR/mg prot.}$) con respecto al tiempo de exposición en el cultivo dió lugar a curvas de pendiente negativa en las que se calculó la velocidad de desaparición del opiáceo mediante un ajuste lineal de los tres primeros puntos. Los coeficientes de correlación de los ajustes variaron entre 1,00 y 0,96. La pendiente negativa resultante se tomó como la velocidad de desaparición de la morfina del medio de cultivo (expresados como $\mu\text{moles MOR/mg prot. x h}$)

En la *figura 17.A* se muestran los resultados obtenidos con dos cultivos distintos de hepatocitos de rata, expuestos a una concentración de morfina 0,25 mM. Los resultados obtenidos con el tratamiento realizado en el periodo 1-4 h de cultivo permitieron calcular una velocidad de desaparición promedio de 0,172 $\mu\text{moles MOR/mg prot. x h}$. Los resultados obtenidos con el ensayo realizado en el periodo 24-27 h del cultivo dieron una velocidad 3 veces inferior: 0,058 $\mu\text{moles MOR/mg prot. x h}$.

En la *figura 17.B* se muestran los resultados obtenidos cuando variamos únicamente la concentración del opiáceo. Con una concentración 0,5 mM de morfina las velocidades de metabolización promedio fueron las siguientes: 0,181 y 0,082 $\mu\text{moles MOR/mg prot. x h.}$, para los periodos de exposición de 1-4 h y 24-27 h respectivamente.

En ambas figuras se observa la mayor capacidad de metabolización que tienen los hepatocitos de rata en las primeras horas del cultivo (1-3 h) con respecto al periodo 24-27 h. Esta diferencia se aprecia también claramente en las *figuras 18 y 19*, en las que se comparan los perfiles cromatográficos correspondientes a alícuotas de placas control y de placas tratadas con morfina 0,25 mM, en los dos periodos del cultivo estudiados.

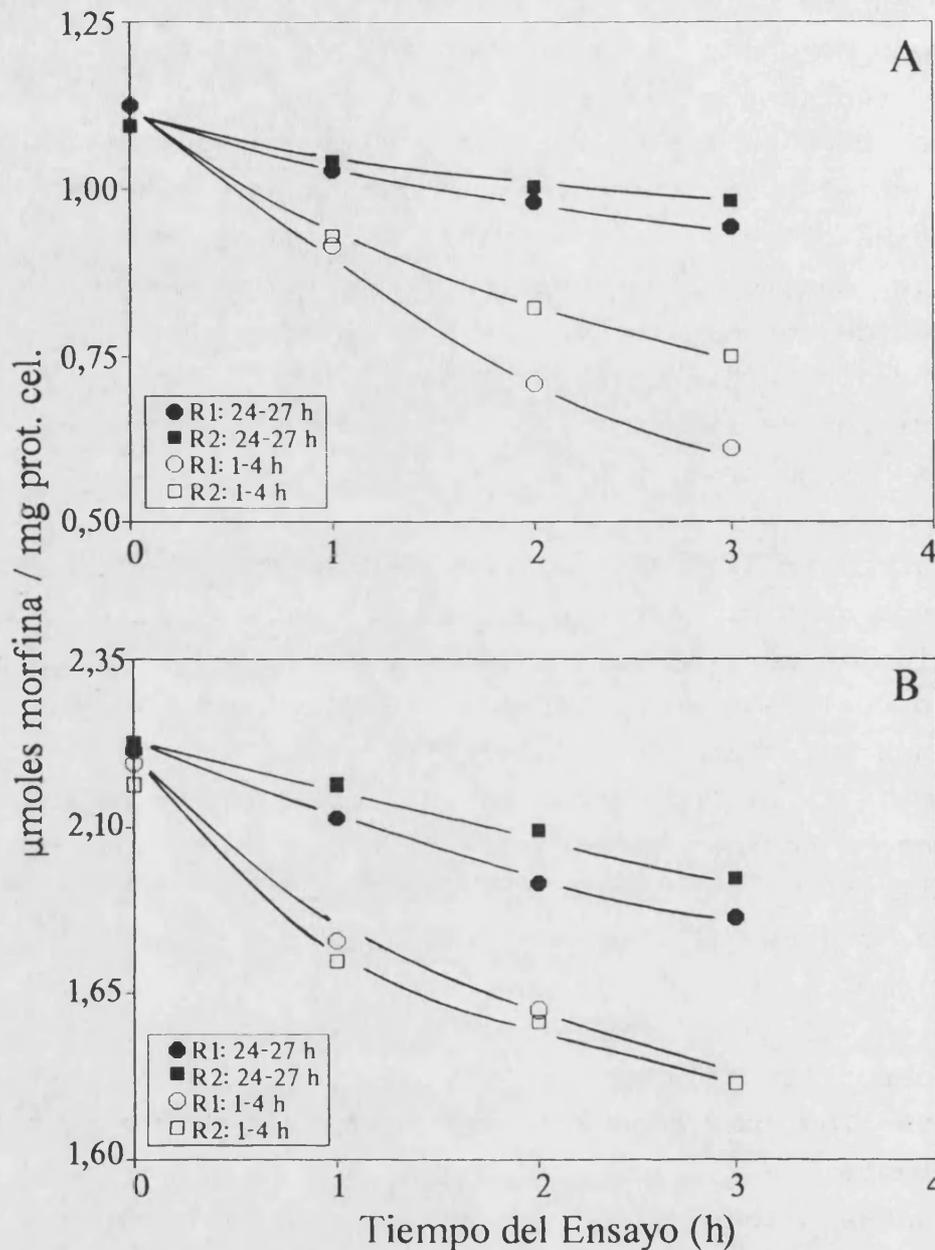


Figura 17.- Cinéticas de metabolización de morfina por hepatocitos de rata en cultivo. La morfina se incorporó al medio Krebs-Henseleit a 1 h (símbolos blancos) ó a las 24 h de cultivo (símbolos negros), y en las alícuotas tomadas durante las 3 h siguientes se determinó por HPLC la concentración del opiáceo. Los ensayos se hicieron con dos concentraciones distintas de morfina: 0,25 mM (A) y 0,50 mM (B). Los puntos redondos y cuadrados representan los resultados obtenidos en dos cultivos distintos. Cada punto es el valor promedio de tres alícuotas tomadas de tres placas distintas.

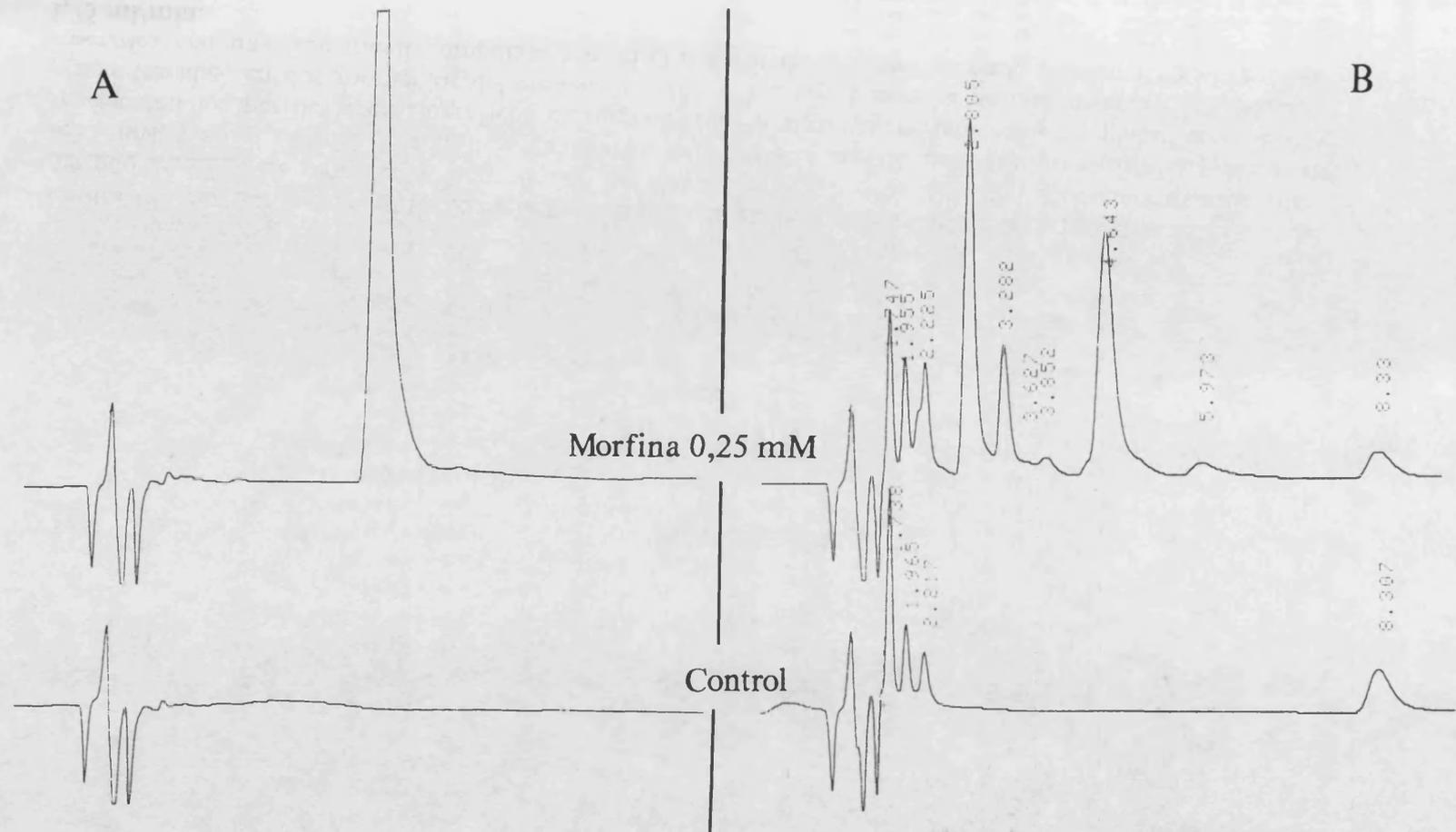


Figura 18.- Perfiles cromatográficos de la metabolización de morfina en cultivo de hepatocitos de rata en el periodo 1-4 h. La morfina se incorporó en las placas a 1 h de cultivo con una concentración final de 0,25 mM, y a 0, 1, 2 y 3 h tras la incorporación se tomaron alícuotas de todas las placas. En las gráficas se representan los perfiles cromatográficos correspondientes a alícuotas pertenecientes a placas control y a placas tratadas, en dos momentos del ensayo: 0 h (A) y 3 h (B). Columna de fase reversa C-18. Elución isocrática con una fase móvil compuesta por: H₂O/acetonitrilo/trietilamina/ácido acético (195:3:1:1). Flujo 1,75 ml/min.

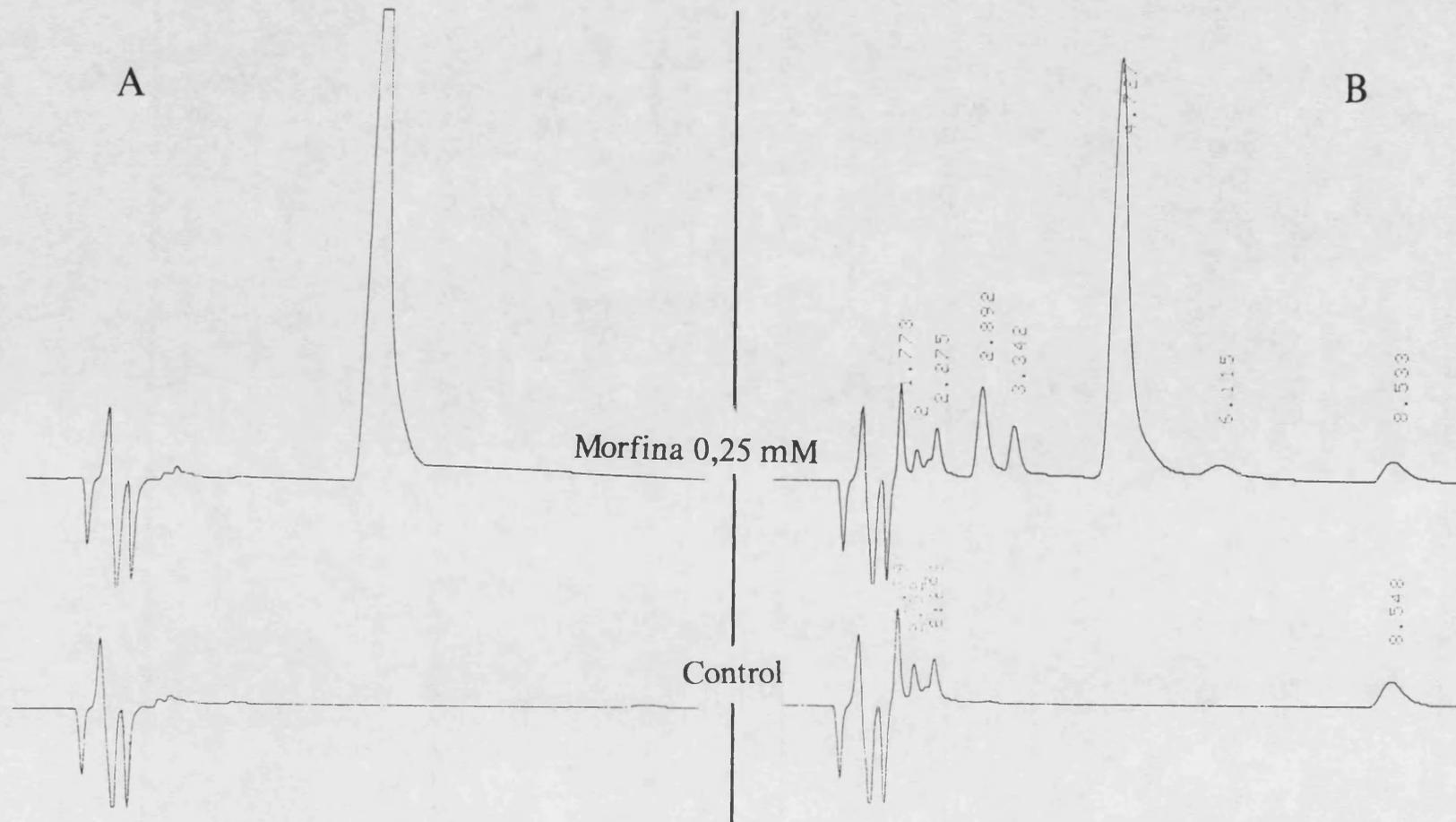


Figura 19.- Perfiles cromatográficos de la metabolización de morfina en cultivo de hepatocitos de rata en el periodo 24-27 h. La morfina se incorporó en las placas a las 24 h de cultivo con una concentración final 0,25 mM, y a 0, 1, 2 y 3 h tras la incorporación se tomaron alicuotas de todas las placas. En las gráficas se representan los perfiles cromatográficos correspondientes a alicuotas pertenecientes a placas control y a placas tratadas, en dos momentos del ensayo: 0 h (A) y 3 h (B). Columna de fase reversa C-18. Elución isocrática con una fase móvil compuesta por: H₂O/acetonitrilo/trietilamina/ácido acético (195:3:1:1). Flujo 1,75 ml/min.

En la figura 18, donde se muestran los resultados pertenecientes al periodo 1-3 h; puede apreciarse de modo visual, como el pico de elución correspondiente a morfina tiene un área inferior tras 3 h de tratamiento. Paralelamente se detecta también la aparición de nuevos picos, que no están presentes en el cromatograma equivalente de las placas control, y que corresponden por lo tanto a moléculas que aparecen como consecuencia de la metabolización de morfina.

Los cromatogramas correspondientes al periodo 24-27 h (figura 19), por el contrario, muestran una disminución menor del área correspondiente al pico de morfina, en comparación con la observada en la figura 18. La metabolización es evidentemente inferior, lo que se corresponde también con una menor aparición (tanto en número como en área) de nuevos picos en el cromatograma correspondiente a las 27 h del ensayo.

En el caso de hepatocitos humanos el estudio se hizo de forma similar al realizado con hepatocitos de rata.

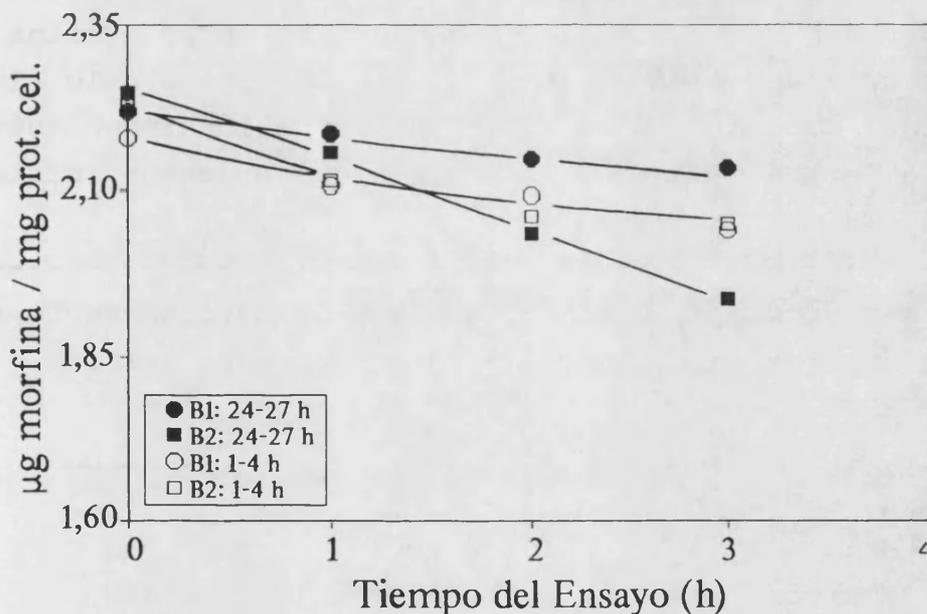


Figura 20.- Cinéticas de metabolización de morfina por hepatocitos humanos en cultivo. La morfina se incorporó al medio Krebs-Henseleit a 1 h (símbolos blancos) ó a las 24 h de cultivo (símbolos negros) con una concentración final 0,25 mM, y en las alícuotas tomadas durante las 3 h siguientes se determinó por HPLC la concentración del opiáceo. Los puntos redondos y cuadrados representan los resultados obtenidos en dos cultivos pertenecientes a distintas biopsias. Cada punto es el valor promedio de tres alícuotas tomadas de tres placas distintas.

En la *figura 20* se muestran las curvas de metabolización de morfina 0,25 mM a lo largo del tiempo, de 2 biopsias distintas. Las velocidades iniciales calculadas variaron entre 0,065 y 0,072 μ moles MOR/mg prot. x h; y no se vió una diferencia clara entre los dos periodos del cultivo tal como se veía con hepatocitos de rata. Los resultados obtenidos con MOR 0,5 mM (no mostrados) fueron muy similares, no aparecieron diferencias entre los periodos de tratamiento y las velocidades de metabolización estuvieron alrededor de 0,07 μ moles MOR/mg prot. x h.

Los perfiles de metabolización que se presentan en la *figura 21* mostraron también la aparición de nuevos picos tras 3 h de incubación.

Los resultados sugieren que los hepatocitos humanos, independientemente del periodo del cultivo, metabolizan la morfina a una velocidad similar a como lo hacen los hepatocitos de rata en el periodo 24-27 h.

Los estudios de metabolización también se realizaron en las cuatro líneas celulares continuas utilizadas en esta tesis, pero los resultados mostraron que la concentración de morfina en el medio de cultivo no descendió significativamente a lo largo de las 3 h que duró el ensayo. Tampoco apareció ningún nuevo pico tras 3 h de tratamiento, sugiriendo que en estos sistemas la morfina no es metabolizada.

Tabla 11: Velocidades de metabolización de morfina en hepatocitos humanos y de rata en dos periodos distintos del cultivo.

	<u>1-4 h</u>	<u>24-27 h</u>
<i>H. de rata:</i>		
MOR 0,25 mM	0,172	0,058
MOR 0,50 mM	0,181	0,082
<i>H. humanos:</i>		
MOR 0,25 mM	0,065	0,072
MOR 0,50 mM	0,091	0,047

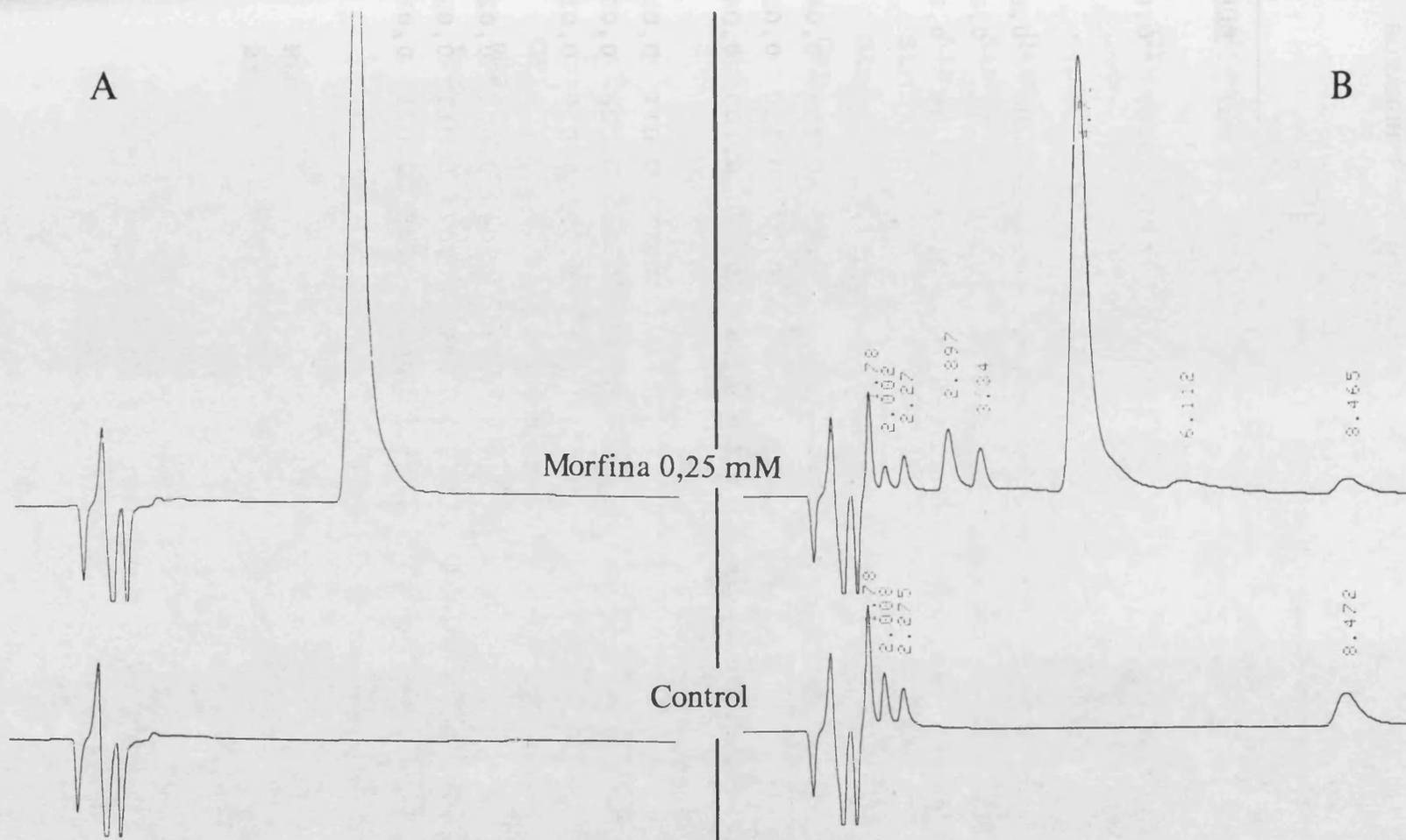


Figura 21.- Perfiles cromatográficos de la metabolización de morfina en cultivo de hepatocitos humanos. La morfina se incorporó en las placas de cultivo con una concentración final 0,25 mM, y a 0, 1, 2 y 3 h tras la incorporación se tomaron alícuotas de todas las placas. En las gráficas se representan los perfiles cromatográficos correspondientes a alícuotas pertenecientes a placas control y a placas tratadas, en dos momentos del ensayo: 0 h (A) y 3 h (B). Columna de fase reversa C-18. Elución isocrática con una fase móvil compuesta por: H₂O/acetonitrilo/trietilamina/ácido acético (195:3:1:1). Flujo 1,75 ml/min.

TABLA RESUMEN: EFECTOS CITOTOXICOS SOBRE HEPATOCITOS HUMANOS

	IC ₅₀				IC ₁₀			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
OPIACEO :								
Adhesión								
PROT :	1,85	1,02	0,18	0,04	0,31	0,35	0,09	0,01
PERIODO								
1-24 h								
LDH :	1,33	1,75	0,30	0,10	0,39	0,65	0,09	0,05
PROT :	1,25	1,94	0,20	0,11	0,59	0,91	0,11	0,05
MTT :	0,78	1,49	0,25	0,10	0,20	0,49	0,09	0,04
PERIODO								
24-48 h								
LDH :	4,54	2,38	0,290	0,112	2,10	0,49	0,159	0,081
PROT :	3,88	2,81	0,316	0,105	1,28	0,57	0,180	0,051
MTT :	3,92	2,17	0,299	0,109	1,36	0,42	0,109	0,046
24-72 h								
LDH :	2,68	0,66	0,103	0,089	0,31	0,15	0,012	0,051
PROT :	2,34	0,72	0,062	0,077	0,70	0,15	0,026	0,031
MTT :	2,70	0,71	0,110	0,061	0,60	0,09	0,019	0,018
24-96 h								
LDH :	0,55	0,28	0,073	0,043	0,09	0,04	0,025	0,023
PROT :	0,59	0,51	0,038	0,038	0,15	0,07	0,011	0,019
MTT :	1,61	0,61	0,093	0,029	0,19	0,08	0,021	0,010

TABLA RESUMEN: EFECTOS METABOLICOS SOBRE HEPATOCITOS HUMANOS

OPIACEO :	IC ₅₀				IC ₁₀			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
Glucógeno								
Degrada. :	0,936	1,064	0,208	0,052	0,165	0,366	0,0480	0,0084
Síntesis :	0,338	0,442	0,041	0,046	0,043	0,058	0,0088	0,0127
Urea								
Síntesis :	5,434	0,990	0,254	0,108	0,111	0,082	0,0150	0,0006
Albúmina								
Síntesis :	0,808	0,390	0,006	0,012	0,164	0,082	0,0021	0,0054
Glutation								
Depleción:	1,51	2,32	0,21	0,059	0,489	0,535	0,0750	0,0062

TABLA RESUMEN: EFECTOS CITOTOXICOS SOBRE HEPATOCITOS DE RATA

OPIACEO :	IC ₅₀				IC ₁₀			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
PERIODO								
1-24 h								
LDH :	0,40	2,44	0,35	0,041	0,19	0,93	0,26	0,029
PROT :	0,22	3,20	0,37	0,037	0,15	1,87	0,28	0,027
MTT :	0,22	2,02	0,21	0,042	0,14	0,82	0,08	0,029
PERIODO								
24-48 h								
LDH :	1,30	2,20	0,29	0,130	0,36	0,57	0,11	0,050
PROT :	1,10	4,50	0,50	0,120	0,46	1,19	0,09	0,081
MTT :	1,10	2,00	0,34	0,120	0,23	0,82	0,20	0,046

TABLA RESUMEN: EFECTOS CITOTOXICOS SOBRE LINEAS CELULARES

	IC ₅₀				IC ₁₀			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
OPIACEO :								
L. HEPATICA								
HepG2								
LDH :	2,74	0,60	0,089	0,033	0,49	0,17	0,026	0,017
PROT :	1,68	0,67	0,077	0,027	0,37	0,19	0,025	0,014
MTT :	5,51	2,04	0,135	0,063	1,09	0,48	0,053	0,037
L. HEPATICA								
FaO								
LDH :	5,14	1,45	0,125	0,062	2,87	0,44	0,052	0,033
PROT :	5,80	0,60	0,151	0,032	2,72	0,26	0,034	0,019
MTT :	6,71	0,69	0,196	0,025	2,92	0,30	0,060	0,015
LINEA								
3T3								
LDH :	1,95	0,51	0,052	0,021	1,05	0,21	0,024	0,011
PROT :	2,46	0,67	0,044	0,020	1,13	0,27	0,016	0,013
MTT :	4,39	2,47	0,119	0,091	1,97	1,20	0,067	0,058
LINEA								
Hela								
LDH :	2,26	1,19	0,150	0,112	0,63	0,47	0,064	0,043
PROT :	6,66	0,64	0,128	0,060	2,84	0,25	0,039	0,024
MTT :	5,98	1,95	0,238	0,074	1,12	1,08	0,120	0,031

DISCUSSION

1) El cultivo primario de hepatocitos humanos como modelo biológico de elección para el estudio experimental de hepatotoxicidad de los opiáceos

La gran cantidad y diversidad de productos químicos y farmacéuticos que existe en la actualidad, a los que potencialmente puede verse expuesto el hombre, ha generado en nuestra sociedad la necesidad de una evaluación más rigurosa del riesgo de toxicidad que su uso o exposición conlleva.

Los ensayos de hepatotoxicidad, por razones obvias, no pueden realizarse directamente en el ser humano, y hay que utilizar otros modelos biológicos alternativos que reproduzcan, en la medida de lo posible, las características del hígado humano.

El animal de laboratorio ha sido el modelo de elección utilizado tradicionalmente en el estudio de la hepatotoxicidad de xenobióticos. Sin embargo, la utilización de animales de experimentación para estos fines tiene una serie de limitaciones e inconvenientes:

- El animal de laboratorio tiene un patrón de metabolismo de fármacos y una susceptibilidad a hepatotoxinas distinta en parte a la del hombre (103).

- El estudio directo de los mecanismos de hepatotoxicidad en el animal plantea problemas de interpretación, debido a la imposibilidad de eliminar la influencia de otros tejidos y a la propia heterogeneidad celular del hígado.

- El cada vez mayor número de animales que sería necesario para la evaluación de todos y cada uno de los xenobióticos, los elevados costes de compra y mantenimiento, la nueva legislación para experimentación animal (CEE) y la creciente oposición social al uso masivo de animales de laboratorio, son otros factores negativos a tener en cuenta.

El cultivo primario de hepatocitos humanos reúne una serie de características que lo aproximan a un modelo idóneo para el estudio de la hepatotoxicidad de los xenobióticos en el hombre:

- Los hepatocitos humanos en cultivo primario poseen prácticamente intactos sus sistemas enzimáticos y su organización subcelular, y reproducen en gran medida el comportamiento bioquímico del hígado humano (7, 64, 90, 91, 100, 103, 107).

- Un modelo como este permite estudiar los efectos de los xenobióticos evitando las posibles interferencias de otros tejidos *in vivo*, facilitando de este modo el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad.

- La posibilidad de obtener células de biopsias quirúrgicas (7, 94, 104, 212) ha hecho que sea posible el obtener cultivos de múltiples donantes.

El objetivo principal de esta Tesis ha sido el estudio del efecto hepatotóxico de los opiáceos en el cultivo primario de hepatocitos humanos.

Para la realización de este trabajo se emplearon 31 biopsias de diferentes donantes. Las características clínicas de estos donantes fueron escogidas cuidadosamente (ver M&M) para conseguir una población de muestras hepáticas lo más homogénea posible.

Para la evaluación de la hepatotoxicidad de los opiáceos se utilizó el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio, el cual ya ha sido empleado con anterioridad para otros compuestos (41, 43, 45, 46, 145, 157). Una característica importante de este test de hepatotoxicidad es que incluye la evaluación tanto de parámetros citotóxicos como de parámetros metabólicos.

**2) Hepatotoxicidad de los opiáceos en
cultivo primario de hepatocitos
humanos**

2.1 PARAMETROS DE CITOTOXICIDAD Y TRATAMIENTOS REALIZADOS CON LOS OPIACEOS

Los efectos citotóxicos de los opiáceos se evaluaron mediante tres parámetros de citotoxicidad: LDH intracelular, proteína celular de la monocapa, y test del MTT. Su utilidad en la investigación toxicológica *in vitro* ha sido demostrada en múltiples ocasiones (38, 49, 62, 69, 139, 168, 178).

Los tres parámetros son indicadores de daño celular irreversible pero están basados en principios distintos: la liberación al medio extracelular de la enzima citosólica LDH es un indicador clásico de daño en la integridad de la membrana plasmática (49, 168, 178), mientras que una menor reducción del MTT por la enzima succinato deshidrogenasa indica pérdida de funcionalidad a nivel mitocondrial (176). La evaluación de la proteína de la monocapa celular es un parámetro de citotoxicidad considerado en la literatura como menos sensible que los otros dos (1, 18) pero nos indica de un modo inequívoco el porcentaje de células muertas que se han desprendido del soporte celular. La determinación conjunta de los tres parámetros permite evaluar con mayor fiabilidad el efecto citotóxico de un xenobiótico.

Los tratamientos con los opiáceos, para estudiar su efecto citotóxico, se han realizado en tres etapas distintas del cultivo: durante la adhesión, en el periodo de extensión celular y sobre los hepatocitos en monocapa confluyente.

El proceso de adhesión celular mediado por fibronectina puede ser perturbado por alteración directa de la unión de la fibronectina con el receptor celular, o indirectamente cuando el compuesto ocasiona la muerte celular (89).

Los hepatocitos humanos en el periodo de extensión celular (1-24 h) son particularmente sensibles; durante esta etapa se realiza de un modo activo la síntesis de RNA y proteínas, y se reorganiza el citoesqueleto (42). Los xenobióticos que ejerzan su acción inhibiendo alguno de estos procesos tendrán un mayor efecto perjudicial en este periodo del cultivo.

A partir de las 24 h, el cultivo de hepatocitos humanos presenta el aspecto de monocapa confluyente y desarrolla una actividad funcional bastante similar a la de los hepatocitos humanos *in vivo* (44, 105, 119); esto permite que la respuesta defensiva sea más fiel a la realidad.

Por otra parte, la estabilidad morfológica y funcional del cultivo durante este periodo también permite la evaluación de la supervivencia celular a largo plazo, imitando en cierta medida las situaciones de administración crónica de un xenobiótico.

En definitiva podemos concluir que la evaluación de los tres parámetros de citotoxicidad en los distintos periodos del cultivo nos aporta, no solo una idea clara de las concentraciones citotóxicas, si no también información sobre el tipo de efecto ocasionado, a través del análisis comparativo de los resultados obtenidos en los distintos periodos del cultivo.

2.2 EFECTOS CITOTOXICOS DE LOS OPIACEOS: ANALISIS COMPARATIVO Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los efectos citotóxicos de los cuatro opiáceos están resumidos en las Tablas 1, 2 y 3 del capítulo de RESULTADOS.

Para poder comparar los valores IC_{50} e IC_{10} de la citotoxicidad de los opiáceos se ha seguido el siguiente procedimiento estadístico: en primer lugar se ha realizado un análisis de varianza de doble entrada (214) para evaluar la variabilidad de los resultados obtenidos con cada opiáceo a dos niveles: entre los tres parámetros de citotoxicidad, y entre los distintos tratamientos. En segundo lugar se ha utilizado el test de Newman-Keuls (215) para averiguar cuáles son los parámetros o tratamientos en concreto que dan resultados significativamente distintos del resto.

El análisis de varianza indicó que los parámetros de citotoxicidad (LDH, PROT y MTT) dan resultados que no difieren entre sí significativamente para cada opiáceo ($F_{calc} < F_{crit}$;

$p < 0,05$). En otras palabras, puede decirse que los tres parámetros dan un resultado equivalente, sin diferir uno de ellos con respecto a los otros dos de un modo consistente y reiterativo. Como consecuencia, los tres valores IC_{50} o IC_{10} pertenecientes a cada tratamiento y a cada opiáceo pueden promediarse entre sí.

El análisis de varianza mostró, sin embargo, que entre los distintos tratamientos aplicados a las células con cada opiáceo, sí que hay diferencias significativas. El test de Newman-Keuls nos indica cuales son los tratamientos en concreto que difieren entre sí significativamente (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio IC_{50} e IC_{10} referentes a la citotoxicidad de los opiáceos en cultivo de hepatocitos humanos.

	IC_{50}				IC_{10}			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
Adhesión	1,85**	1,02**	0,18**	0,04**	0,31**	0,35	0,09**	0,01**
Periodo								
1-24 h	1,12**	1,73**	0,25	0,10	0,39**	0,68**	0,10*	0,05
24-48 h	4,11	2,45	0,30	0,11	1,58	0,49	0,15	0,06
24-72 h	2,57**	0,70**	0,09**	0,08**	0,54**	0,13**	0,02**	0,03
24-96 h	0,92**	0,47**	0,07**	0,04**	0,14**	0,06**	0,02**	0,02**

(**) diferencia significativa ($p < 0,01$) con respecto al valor IC del tratamiento 24-48 h de cada opiáceo, según el test de Newman-Keuls.

Para analizar con mayor comodidad estas diferencias podemos reunir a los distintos tratamientos en dos grupos: tratamientos agudos, en los que solo se incorporan los opiáceos una vez (adhesión, 1-24 h y 24-48 h); y tratamientos crónicos, en los que se incorporan los opiáceos varias veces (24-72 h y 24-96 h).

Tratamientos agudos:

El análisis estadístico nos confirma que la citotoxicidad aguda de los cuatro opiáceos aumenta significativamente a medida que el tratamiento se realiza en etapas más tempranas del cultivo. En concreto, podemos decir que los efectos citotóxicos tras el tratamiento en el periodo 24-48 h son menos acusados que los efectos encontrados durante la adhesión o durante la extensión (1-24 h) (Tabla 1).

Este fenómeno, común a los cuatro opiáceos, puede atribuirse a la concurrencia de varios factores en las primeras etapas del cultivo: 1) La proximidad temporal del proceso de aislamiento y de las posibles lesiones causadas por la colagenasa confiere a los hepatocitos una mayor sensibilidad frente a los tóxicos (105, 119). 2) Durante los procesos de adhesión y extensión los hepatocitos desarrollan procesos específicos (unión al substrato mediada por fibronectina) y gran actividad metabólica (síntesis de RNA y de proteínas, y reorganización del citoesqueleto) (42). 3) En las etapas tempranas del cultivo los hepatocitos disponen de los niveles más elevados de actividades de biotransformación y pueden producir con mayor facilidad metabolitos reactivos con acción hepatotóxica (64, 100).

Tratamientos crónicos:

El análisis estadístico de los tratamientos crónicos confirma, por otra parte, que tras exposiciones prolongadas (24-72 h y 24-96 h) la citotoxicidad es significativamente mayor que tras exposiciones más breves (24-48 h). Este fenómeno se observó con los cuatro opiáceos y los descensos en los valores IC (aumentos de la citotoxicidad) oscilaron entre 3 y 5 veces para los IC_{50} y entre 3 y 11 veces para los IC_{10} .

Tanto si atendemos a los tratamientos agudos como si atendemos a los tratamientos crónicos, la clasificación de los opiáceos según su potencial citotóxico sería la siguiente:

	Buprenorfina	> Metadona	> Meperidina	≥ Morfina
IC ₅₀ (mM)	0,04-0,10	0,07-0,30	0,5-2,5	0,9-4,1
IC ₁₀ (mM)	0,01-0,06	0,02-0,15	0,06-0,7	0,14-1,6

La elevación de las transaminasas séricas en ratones y ratas tras tratamiento con morfina (48, 108, 126) y con análogos estructurales de la metadona (126, 127), fueron las primeras evidencias experimentales de la hepatotoxicidad de los opiáceos narcóticos.

Nagamatsu y col. (177) en un estudio *in vitro* con hepatocitos de rata aislados encuentra un descenso en la viabilidad celular alrededor del 50% (IC₅₀) tras exponer a los hepatocitos con morfina 0,5 mM durante 90 min. El parámetro de citotoxicidad utilizado fue la evaluación de la LDH liberada. Eklöw-Lastbom y col. (71) por su parte, trabajando también con hepatocitos de rata aislados, encuentran que la morfina 1 mM mata al 50% de las células en 90 min conforme al test de captación del azul Trypan. Estos valores de citotoxicidad son similares a los encontrados en este trabajo cuando los hepatocitos humanos se trataron con morfina en las primeras etapas del cultivo (IC₅₀ = 1-2 mM, en adhesión y 1-24 h).

Por otra parte, los efectos citotóxicos agudos de la metadona, que se producen alrededor de 0,25-0,1 mM (IC₅₀-IC₁₀), en cultivo de hepatocitos humanos son comparables a los encontrados por Beverley y col. (16) en hepatoma de rata (32IIIA, clon 6/2d). Estos autores observan los efectos citotóxicos de la metadona, tras exposición de 48 h, en el rango 0.25-0.025 mM. El criterio utilizado en su caso para estimar la viabilidad fué el conteo directo de las células vivas tras el tratamiento.

Con respecto a la meperidina y a la buprenorfina cabe decir que no se ha descrito ningún trabajo de toxicidad *in vitro* similar al que aquí se presenta.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, podemos concluir que los opiáceos morfina, meperidina, metadona y buprenorfina son citotóxicos para los hepatocitos humanos en cultivo primario. Sus efectos tras exposiciones agudas se producen a concentraciones incluidas en el rango 0,01-4 mM, siendo dicho efecto más acusado en las primeras etapas del cultivo. Los tratamientos prolongados con dosis repetitivas durante 2 o 3 días aumentan el potencial citotóxico de los opiáceos entre 3 y 11 veces.

2.3 PARAMETROS METABOLICOS

El test de hepatotoxicidad aplicado a los opiáceos también ha incluido la evaluación de diversos parámetros metabólicos. La mayor parte de los fármacos hepatotóxicos son capaces de alterar de forma notable el metabolismo de los hepatocitos aún a concentraciones a las que no producen efecto citotóxico aparente (41, 43, 45, 46, 145, 157). Los efectos sobre el metabolismo intermediario, aunque no son siempre críticos para el propio hepatocito, tienen un significado toxicológico importante ya que la homeostasis general del organismo sí que puede alterarse seriamente como consecuencia de la disfunción metabólica (42, 92, 95).

Los hepatocitos desempeñan una gran variedad de funciones metabólicas; entre las más importantes cabe destacar: el metabolismo de los glúcidos y el almacenamiento de glucógeno como fuente energética; el metabolismo de los aminoácidos y la producción de urea; la síntesis de proteínas plasmáticas; el metabolismo lipídico, la síntesis de lipoproteínas, la síntesis de colesterol y de ácidos biliares; la degradación de porfirinas; la biotransformación de xenobióticos; etc...(118).

En la estrategia para el estudio de la hepatotoxicidad desarrollada en nuestro laboratorio se tiene en cuenta la acción de los xenobióticos en varios puntos clave del metabolismo del hepatocito. En concreto se evalúa: la síntesis y degradación de glucógeno, la síntesis de albúmina, la ureogénesis y la depleción de GSH.

La síntesis y degradación de glucógeno es una ruta bioquímica que enlaza a través de la glucosa-6-fosfato con otras muchas rutas del metabolismo intermediario del hepatocito. Su interferencia puede ser consecuencia no solo de alteraciones enzimática a varios niveles, si no también de la perturbación del balance energético en el interior del hepatocito (205).

Los hepatocitos invierten un gran porcentaje de su energía metabólica en la síntesis de proteínas plasmáticas. De ellas, casi el 60% representa albúmina. La síntesis de proteínas es un proceso complejo que requiere el funcionamiento coordinado de todo el metabolismo celular (228). La síntesis y excreción de albúmina al medio es un parámetro adecuado para evaluar los efectos a este nivel.

La síntesis de urea a partir de amonio es otra de las funciones exclusivas del hígado cuya alteración tiene efectos importantes en el organismo (acumulación de amonio libre altamente neurotóxico) (193).

Por último se valora el contenido intracelular de GSH, que es de gran importancia en los mecanismos de defensa celular. Este metabolito endógeno reacciona con intermediarios electrofílicos reactivos impidiendo su unión a macromoléculas (143, 164, 197). Una depleción importante del contenido de GSH libre de la célula indica que el xenobiótico causante tiene un elevado potencial tóxico.

Con la evaluación conjunta de éstos indicadores bioquímicos se pretende conseguir una visión general y amplia del grado y nivel de interferencia que producen los opiáceos en el metabolismo hepático.

El estudio del efecto de los opiáceos sobre el metabolismo de los hepatocitos humanos se realizó sobre cultivo en monocapa confluyente; es decir, a partir de las 24 h, cuando los hepatocitos adquieren su óptima funcionalidad metabólica (44, 105, 119). En este periodo del cultivo se reproduce en gran medida la bioquímica del hígado adulto diferenciado y, por lo tanto, la respuesta celular a los factores externos se produce de una forma más fiel y precisa.

El rango de dosis ensayadas en esta etapa del estudio se determinó teniendo en consideración las concentraciones de opiáceos que causaron efectos citotóxicos en las misma etapa del cultivo en la que se evaluaron los efectos metabólicos. Se escogieron, siempre que fue posible, concentraciones subletales; pero en algunas ocasiones, para poder completar la curva dosis respuesta con los parámetros metabólicos, fue necesario utilizar concentraciones que ocasionaban un efecto citotóxico moderado. En cualquier caso las valoraciones metabólicas siempre están referidas al número de células vivas, ya que previamente a la valoración, las células muertas son eliminadas con los lavados de las monocapas.

2.4 EFECTOS METABOLICOS DE LOS OPIACEOS: ANALISIS COMPARATIVO Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los efectos metabólicos de los cuatro opiáceos estudiados están resumidos en la Tabla 2. Para poder analizar mejor la mayor sensibilidad de los parámetros metabólicos se han incluido en esta Tabla los valores promedio IC_{50} e IC_{10} referentes a la citotoxicidad de los opiáceos en el periodo 24-48 h.

Tabla 2. Valores IC_{50} e IC_{10} de los opiáceos referentes a las alteraciones de las funciones metabólicas del hepatocito humano.

	IC_{50}				IC_{10}			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
Viabilidad								
24-48h	4,11	2,45	0,30	0,11	1,58	0,49	0,15	0,06
Glucógeno								
Degrada. :	0,94	1,06	0,208	0,052	0,17	0,37	0,048	0,008
Síntesis :	<i>0,34</i>	<i>0,44</i>	<i>0,041</i>	<i>0,046</i>	<i>0,04</i>	<i>0,06</i>	<i>0,009</i>	<i>0,013</i>
Urea								
Síntesis :	5,43	0,99	0,254	0,108	0,11	0,08	0,015	0,0006
Albúmina								
Síntesis :	0,81	0,39	0,006	0,012	0,16	0,08	0,002	0,005
Glutation								
Depleción:	1,51	2,32	0,210	0,059	0,49	0,54	0,075	0,006

En **negrita** los valores de citotoxicidad correspondientes al periodo de cultivo en el que se hicieron los ensayos metabólicos. En *cursiva* los valores metabólicos que más se alejan del correspondiente valor citotóxico.

 A la vista de estos resultados se puede decir que los parámetros metabólicos más sensibles fueron aquellos en los que se evaluó una función sintética o anabólica del hepatocito. En efecto, la síntesis de glucógeno y de albúmina fueron los parámetros metabólicos más afectados. Por el contrario, la degradación de glucógeno y depleción de GSH fueron las actividades metabólicas menos sensibles, ya que se afectaron a concentraciones de opiáceos relativamente elevadas. La síntesis de urea fue un caso algo peculiar debido a que resultó ser un parámetro muy sensible si consideramos los valores IC_{10} pero también uno de los peores indicadores de alteración metabólica cuando consideramos los IC_{50} .

Si comparamos los resultados obtenidos con los parámetros metabólicos más sensibles, con los valores de citotoxicidad, encontramos que: para morfina, meperidina y buprenorfina, los IC_{50} de los parámetros metabólicos son entre 4 y 7 veces inferiores a los citotóxicos; en el caso de metadona la diferencia es de unas 13 veces (Tabla 2). Si comparamos los IC_{10} las diferencias son mucho más llamativas: los IC_{10} de los parámetros metabólicos son 20-30 veces inferiores a los citotóxicos, excepto para la meperidina que sigue presentando una diferencias de 7 veces (Tabla 2).

En definitiva, todos los opiáceos alteraron el metabolismo del hepatocito humano a concentraciones subletales, más o menos alejadas de aquellas que afectan la viabilidad celular.

Si promediamos los valores IC_{50} e IC_{10} obtenidos con los cinco parámetros metabólicos evaluados; el potencial relativo de cada opiáceo para alterar el metabolismo hepático sería el siguiente:

	Buprenorfina > Metadona > Meperidina = Morfina		
IC_{50} (mM)	0,06	0,14	1-1,8
IC_{10} (mM)	0,007	0,028	0,23-0,19

La clasificación resultante es practicamente igual a la encontrada con los efectos citotóxicos.

Es un hecho conocido que la administración aguda sistémica de morfina produce un incremento en la glucosa sanguínea en animales de laboratorio no anestesiados (31, 122, 153). En el caso del hombre también se ha descrito un efecto hiperglicémico moderado de los opiáceos (36, 195). Este fenómeno podría estar relacionado con la degradación del glucógeno producida por los opiáceos en los hepatocitos humanos en cultivo.

Sin embargo, el efecto hiperglicémico de la morfina ha sido atribuido a otras causas que varían según los distintos autores:

1) La acción de la morfina en el sistema nervioso central (SNC) induce una respuesta hormonal que finaliza con la liberación de catecolaminas por la médula adrenal; y estas, a su vez, debido al efecto glicogenolítico que tienen en el hígado, producen la elevación de la glucosa plasmática (27, 77).

2) La morfina también estimula en el páncreas la secreción de insulina y glucagón (121, 122, 195). Este efecto se ha demostrado que es producido por la acción directa de la morfina en islotes pancreáticos de rata aislados (121). Por otra parte, se ha demostrado *in vivo* que la secreción de glucagón inducida por la morfina es ligeramente superior a la secreción de insulina; esto redundaría en un efecto glicogenolítico en el hígado (122).

3) La diabetes o el estrés son circunstancias en las que los niveles de glucagón están altos y los de insulina bajos por lo que la morfina podría potenciar la hiperglicemia en estas circunstancias (122).

En este trabajo, por el contrario, se ha demostrado que los opiáceos tienen un efecto *per se* sobre el glucógeno (estimulando su degradación e inhibiendo su síntesis), que no está mediado por catecolaminas o glucagón. Por otra parte, los resultados obtenidos con hepatocitos humanos en cultivo están en consonancia con los trabajos de Gourley (98, 99) realizados *in vitro* sobre músculo esquelético de rata aislado:

En estos estudios *in vitro* se demuestra que la morfina a concentraciones 5 mM y superiores reduce el contenido de glucógeno. De los cuatro narcóticos opiáceos estudiados por Gourley, la metadona fue el de mayor potencia glicogenolítica (1mM \equiv IC50) seguido en orden decreciente por meperidina, morfina e hidromorfona. Investigando diversos mecanismos, este autor llega a la conclusión de que, el efecto glicogenolítico de la metadona en el músculo esquelético no esta mediado por la liberación de catecolaminas, ni puede explicarse por la diferente acción de las enzimas implicadas en la ruta del metabolismo del glucógeno muscular, y sugiere que la degradación del glucógeno por los opiáceos es consecuencia del requerimiento energético de

la célula ante la depleción de las reservas energéticas habituales.

Las concentraciones efectivas encontradas por Gourley (5 mM para morfina y meperidina, y 1 mM para metadona) son cinco veces superiores a las encontradas en este trabajo (1 mM para morfina y meperidina y 0,2 mM para metadona); pero su capacidad glicogenolítica relativa concuerda en ambos estudios.

Todos estos estudios sugieren que los opiáceos pueden tener un efecto directo sobre el glucógeno hepático, y este fenómeno, junto con la alteración del balance hormonal causado por los narcóticos, puede ser la causa del efecto hiperglicémico producido por estos compuestos que se observa *in vivo*.

La inhibición de la síntesis de albúmina fue una de las actividades metabólicas más sensible a la acción de los opiáceos. En relación con este fenómeno se ha descrito que la metadona altera la síntesis de RNA y proteínas plasmáticas en el ratón neonatal (117) y la síntesis de proteína celular y de albúmina en hepatoma de rata (16). En concreto, en los estudios *in vitro* con hepatoma de rata se observó una inhibición de la síntesis de albúmina cercana al 50% del control con una concentración de metadona 0,25 μM (16). En nuestro caso, con un sistema *in vitro* distinto, encontramos un IC_{50} para este parámetro metabólico de 6 μM y un IC_{10} de 2 μM .

Todos estos resultados sugieren que la metadona es capaz de inhibir significativamente la síntesis de albúmina a concentraciones en el rango μM ; aunque el efecto puede variar en magnitud dependiendo del sistema celular utilizado.

Por otra parte, cabe destacar que si bien todos los opiáceos inhibieron marcadamente la síntesis de albúmina, la metadona fue comparativamente el opiáceo que alteró esta ruta metabólica de un modo más acusado. Los valores IC_{50} e IC_{10} para la inhibición de metadona fueron entre 50 y 75 veces inferiores a los correspondientes valores IC_{50} e IC_{10} citotóxicos, mientras que con el resto de los opiáceos las diferencias nunca fueron mayores de 10 veces.

Parece, por lo tanto, que la metadona inhibe la síntesis de albúmina mediante un efecto específico directo, a concentraciones no citotóxicas, probablemente diferente al del resto de los opiáceos estudiados.

La ureogénesis fue otra de las funciones metabólicas claramente afectada por los opiáceos. Hay que destacar que el efecto inhibitor encontrado fue significativo a concentraciones relativamente bajas; de hecho, en el caso de morfina, meperidina y metadona los IC_{10} estimado fueron entre 6 y 14 veces inferiores a los correspondientes IC_{10} citotóxicos. El caso de buprenorfina fue mucho más espectacular ya que su IC_{10} para la ureogénesis (6×10^{-7} M) fue 100 veces inferior que el IC_{10} citotóxico.

Por otra parte, a medida que aumentó la concentración de los opiáceos el efecto inhibitor de la ureogénesis no creció de modo proporcional, no alcanzándose un 100% de inhibición incluso a concentraciones citotóxicas.

Parte de los enzimas que participan en el ciclo de la urea se hallan localizados en las mitocondrias de las células hepáticas proporcionando una compartimentación compleja de las reacciones de este ciclo (193). Por este motivo, en ocasiones, la inhibición de la síntesis de urea por xenobióticos se ha atribuido a una lesión o desorganización de la función mitocondrial (39, 86, 186).

Hay que recordar que la ureogénesis es una vía anabólica que, si bien no es un proceso biosintético comparable a la glucogenosíntesis o a la síntesis de proteínas plasmáticas, sí que está directamente relacionada con el estado energético celular (193). Por ello, no sorprende que la ureogénesis, la síntesis de glucógeno y la síntesis de albúmina, que tienen en común el ser procesos dependientes de substratos rico-energéticos, sean a su vez rutas metabólicas sensiblemente afectadas por los opiáceos.

La depleción de glutatión es un fenómeno crítico para los hepatocitos porque esta molécula desempeña muchas funciones importantes: el mantenimiento de los grupos sulfidrilo de las proteínas, la translocación de aminoácidos a través de la membrana, la destrucción de los peróxidos de hidrógeno, peróxidos lipídicos y radicales libres, y la biotransformación y detoxificación de xenobióticos (164).

En concreto, cuando un compuesto añadido al medio de cultivo depleciona el glutatión intracelular, se puede decir que ese compuesto o bien se ha conjugado con GSH durante su metabolización, o bien ha producido un importante estrés oxidativo, o han ocurrido ambos fenómenos (143, 197).

Los cuatro opiáceos estudiados en esta Tesis fueron capaces de deplecionar el GSH de los hepatocitos humanos en cultivo.

En el caso de meperidina, metadona y buprenorfina la máxima depleción se produjo 6 h después de la adición de los compuestos; en el caso de la morfina la máxima depleción se produjo 2-3 h después de la incorporación.

En el caso de meperidina, metadona y buprenorfina, los valores IC_{50} e IC_{10} para la depleción del GSH son bastante similares a los respectivos valores IC_{50} e IC_{10} citotóxicos. En el caso de morfina, por el contrario, la diferencia entre los valores IC_{50} e IC_{10} metabólicos y citotóxicos es de tres veces.

El efecto deplecionador del GSH de la morfina ha sido descrito tanto en animales de experimentación (126) como en sistemas celulares *in vitro* (71, 177): La administración de morfina intraperitoneal (200 mg/Kg) a ratones, produjo un descenso en el glutatión hepático que alcanzó su máximo a las 3 h de la inyección (50% respecto a los ratones controles); paralelamente, a las 3 h se duplicó la actividad plasmática de la GPT (126). En trabajos realizados con hepatocitos de rata en suspensión, los resultados son mucho más espectaculares ya que se observan depleciones del 90-100% del GSH tras 60-90 min de incubación con morfina 0,5-1 mM (71, 177). En nuestro caso con hepatocitos humanos en cultivo, el 50% de la depleción se alcanza con una concentración de morfina alrededor de 1,5 mM tras 3 h de incubación. Las diferencias entre los resultados obtenidos *in*

vitro con hepatocitos de rata en suspensión y los hepatocitos humanos en cultivo pueden ser consecuencia del distinto origen de los hepatocitos pero también por diferencias metodológicas: en los estudios realizados con hepatocitos en suspensión (71, 177) el medio de cultivo es un medio salino tamponado muy sencillo; en nuestro caso el medio es rico en todo tipo de precursores, como la metionina, que es un precursor del GSH; lo que permite un mejor funcionamiento de los mecanismos defensivos de los hepatocitos.

En relación con los otros tres opiáceos (meperidina, metadona y buprenorfina) no se ha descrito ningún trabajo en el que se evalúe su efecto en el GSH. Únicamente se ha descrito un efecto similar en ratones, causado por análogos estructurales de la metadona (L- α -acetilmetadol (LAAM) y nor-LAAM) (126, 127).

En definitiva, podemos concluir que los opiáceos son capaces de deplecionar el GSH de los hepatocitos humanos, si bien, en el caso de meperidina, metadona y buprenorfina esto sucede a concentraciones relativamente elevadas.

2.5 EXTRAPOLACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS *IN VITRO* AL HOMBRE

En apartados anteriores se ha demostrado que los cuatro opiáceos incluidos en este trabajo no solo afectan la viabilidad de los hepatocitos humanos en cultivo si no que también alteran el metabolismo hepático *in vitro* a concentraciones subletales.

Para la extrapolación de estos resultados al hombre, se ha definido un parámetro denominado "riesgo de toxicidad" R_T que relaciona la concentración plasmática que alcanza el compuesto estudiado en las distintas situaciones reales y la concentración que produce el efecto tóxico *in vitro* :

$$R_T = \frac{\text{máxima concentración plasmática}}{\text{mínima concentración tóxica } in vitro (IC_{10})}$$

Este parámetro cuando es menor que 1, indica que las concentraciones tóxicas *in vitro* son superiores a las que se alcanzan en plasma, y por lo tanto no es probable que el efecto tóxico observado *in vitro* ocurra en el hombre. Pero cuando el R_T es igual o superior a 1 entonces estamos en situación de afirmar que el efecto observado *in vitro* sucederá en el hombre con gran probabilidad.

Los valores de concentración plasmática de los opiáceos han sido obtenidas bien de las descritas en la literatura, o bien de las dosis administradas, en función del volumen de distribución de cada opiáceo. Esta aproximación farmacocinética es aceptablemente correcta para las dosis intravenosas. El caso opuesto sería el de las dosis orales, pero entre los cuatro opiáceos estudiados únicamente la metadona se suministra con frecuencia de forma oral. En cualquier caso, la metadona tiene una buena absorción intestinal y elevada biodisponibilidad oral (202), por lo que un gran porcentaje de la dosis administrada alcanza la circulación sistémica.

Obviamente la farmacocinética de un compuesto es más compleja que la simple distribución de un compuesto en el organismo. Factores adicionales como la vida media en plasma, unión a proteínas séricas, acumulación en tejidos, biotransformación y eliminación tienen también la suficiente importancia como para modificar la toxicidad del fármaco *in vivo*.

No obstante, este aspecto no debe ser sobrevalorado; tal como sugiere Ekwall (72), los acontecimientos farmacocinéticos están a menudo determinados por simples interacciones a nivel celular como son la unión a proteínas, la penetración y la acumulación en la célula, procesos que también ocurren *in vitro*. Así mismo el hepatocito cultivado presenta una actividad basal de biotransformación (7, 64, 91, 94, 100) capaz de asegurar una cierta metabolización y "eliminación" del fármaco al medio de cultivo, que se renueva con regularidad.

En la Tabla 3 se muestran los valores de "riesgo de toxicidad" de los cuatro opiáceos estudiados en esta Tesis.

Analizando los valores R_T de la Tabla podemos llegar a varias conclusiones:

1 .- Es improbable que los opiáceos, tras una administración aguda *in vivo*, causen un efecto citotóxico en los hepatocitos humanos. Ningún R_T citotóxico se acercó a la unidad, el valor R_T más alto (0,25) fue el de metadona en casos de dosis de abuso extremo (8).

2 .- Por el contrario, sí que es probable que algunos opiáceos alteren el metabolismo hepático en determinados regímenes de dosificación terapéutica o durante el abuso:

La morfina, para casos extremos de abuso (88, 223), presenta un R_T muy cercano a la unidad, lo que indica que en esos individuos es probable que se altere el metabolismo hepático y, de modo indirecto, la homeostasis general del organismo. En cualquier caso, la morfina no parece ser un opiáceo hepatotóxico cuando se administra según las pautas terapéuticas establecidas (160, 125, 216).

La meperidina presenta un R_T de 1,7 para casos de abuso; si consideramos más exactamente un rango que incluya desde las concentraciones inferiores durante el abuso en individuos tolerantes (225) hasta las concentraciones que han originado toxicidad y muerte por sobredosis (8) entonces el rango de R_T sería 0,3-1,7; esto indica en cualquier caso, que el abuso de meperidina por individuos tolerantes puede, dependiendo de la dosis, causar una alteración del metabolismo hepático con gran probabilidad. Al igual que la morfina, la meperidina parece ser un fármaco sin riesgo de hepatotoxicidad durante los tratamientos terapéuticos.

La metadona es probablemente el compuesto con mayor potencial hepatotóxico de los cuatro opiáceos de este trabajo. En la Tabla 3 se observa una cierta discrepancia entre las dos series de datos de concentración plasmática; los datos obtenidos directamente de la literatura son mayores que los calculados a partir de las dosis; probablemente estos últimos estén infravalorados puesto que en la consideración farmacocinética no se ha tenido en cuenta el hecho de que la metadona tiene un vida media muy larga y, como consecuencia, se acumula en el plasma con gran facilidad durante los tratamientos prolongados (202, 120), lo que puede favorecer su mayor hepatotoxicidad.

Tabla 3. Extrapolación de la hepatotoxicidad *in vitro* de los opiáceos a distintas situaciones reales en el hombre.

OPIACEO	DOSIS ^b (mg)	CONCENTRACION ^b Calculada (µM)	CONCENTRACION ^c Descrita (µM)	IC ₁₀ citot ^d (µM)	R _T citot.	IC ₁₀ metab ^e (µM)	R _T metab.
Morfina							
Terapéutica ^a	2,5-20	0,044-0,350	0,24-2,8	1580	0,002	80	0,035
Ter. toler.	30-440	0,526-7,710	4,2-4,5		0,005		0,096
Abuso	hasta 4000	< 70,09	1,4-15		0,044		0,876
Meperidina							
Terapéutica	15-150	0,243-2,426	1,6-3,2	490	0,007	70	0,046
Ter. toler.	---	---	---		---		---
Abuso	hasta 4000	< 64,69	20-120		0,245		1,714
Metadona							
Terapéutica	2,5-20	0,028-0,222	0,10-2,5	150	0,017	6	0,417
Ter. toler.	20-100	0,222-1,112	0,12-14		0,093		2,333
Abuso	hasta 400	< 4,45	3,0-12		0,080		2,000
Bupre.							
Terapéutica	0,2-0,6	0,0033-0,01	0,001-0,12	60	0,002	3	0,040
Ter. toler.	8	0,132	---		0,002		0,044
Abuso	---	---	---		---		---

a- Las concentraciones que los opiáceos alcanzan en el plasma humano se han clasificado para cada compuesto en tres apartados:

Terapéutica que incluye los tratamientos agudos en individuos no tolerantes y que, por lo general consisten en la administración de la misma dosis durante uno o varios días hasta que desaparece el dolor.

Ter. tolerantes que incluye las concentraciones que se alcanzan en tratamientos prolongados en los que se requiere un aumento paulatino de la dosis a medida que se desarrolla la tolerancia. Son un ejemplo los tratamientos aplicados en pacientes con cancer terminal. También se incluyen las concentraciones alcanzadas en tratamientos de detoxificación con metadona y buprenorfina en individuos que son, en su mayoría, tolerantes a los opiáceos.

Abuso que comprende las dosis y concentraciones más elevadas que se han descrito en individuos drogodependientes y en individuos adictos muertos por sobredosis. Son por lo tanto las concentraciones límite o máximas que si se sobrepasan tienen un efecto letal.

b- Las dosis que se muestran corresponden en la mayoría de los casos a administraciones intravenosas y en menor medida intramusculares y subcutáneas. Solo en el caso de metadona se han incluido dosis orales. El tratamiento farmacocinético (Dosis/Volumen de distribución) se traduce en las concentraciones plasmáticas del estado estacionario (13). (Los volúmenes de distribución de cada opiáceo pueden encontrarse en la Tabla 1 de INTRODUCCION).

c- Las rangos de concentraciones obtenidas directamente de la literatura incluyen tanto las concentraciones máximas que se alcanzan en el plasma (poco tiempo después de la administración) como las concentraciones del estado estacionario (que se alcanzan tras un tiempo determinado después de la administración).

d- Los IC₁₀ citotóxicos corresponden a los IC₁₀ promedios obtenidos con los tres parámetros de citotoxicidad (LDH, PROT. y MTT) en cultivos de hepatocitos humanos expuestos a los opiáceos durante el periodo 24-48 h. Los valores R_T resultaron del cociente entre la concentración plasmática más elevada y el IC₁₀ citotóxico correspondiente.

e- Los IC₁₀ metabólicos son el promedio de los IC₁₀ obtenidos con los dos parámetros metabólicos más sensibles (síntesis de glucógeno, síntesis de albúmina o ureogénesis; ver Tabla 2). Los valores R_T resultaron del cociente entre la concentración plasmática más elevada y el IC₁₀ metabólico promedio correspondiente.

Referencias: (Dosis: 33, 88, 124, 125, 128, 160, 161, 165, 166, 190, 216, 223)

(Conc. plasmáticas: 8, 12, 20, 70, 76, 115, 120, 125, 134, 149, 160, 161, 173, 174, 188, 190, 202, 225).

Los valores R_x son elevados para cualquier tipo de tratamiento *in vivo*: Los tratamientos clínicos se corresponden con valores de R_x muy variables desde 0,02 (125), hasta 0,4 (225), por lo tanto dependiendo de la dosificación y del individuo el riesgo de alteración funcional hepática es mayor o menor. En los tratamientos crónicos (pacientes con dolor crónico o detoxificación de drogadictos) las dosis son superiores debido al desarrollo de tolerancia; los R_x aumentan de modo paralelo superando la unidad. De todos modos, la variabilidad de respuesta en el hombre también es grande con estos tratamientos y como consecuencia se pueden encontrar R_x tan pequeños como 0,04 (33, 120). Por último, los casos de abuso de la metadona conllevan un elevado riesgo de alteración funcional hepática, así lo justifican los valores de R_x comprendidos entre 0,5 y 2 (8, 33, 225).

La buprenorfina presenta valores de R_x muy bajos, por lo que puede considerarse en principio un opiáceo de menor riesgo hepatotóxico. Este fármaco es utilizado al igual que la metadona en los tratamientos de deshabituación; pero según las conclusiones derivadas de este estudio la buprenorfina presenta un potencial hepatotóxico muy inferior al de la metadona. Su elevada potencia como opiáceo agonista permite la administración de dosis relativamente pequeñas tanto durante los tratamientos agudos como durante los crónicos (56, 65, 116, 132, 150); por otra parte, el desarrollo de tolerancia a la buprenorfina se ha calificado de muy poco frecuente (111, 129, 210). En cualquier caso, debido al breve periodo de tiempo que se viene comercializando este opiáceo, no se conoce su potencial adictivo.

Resumiendo, los resultados de este trabajo sugieren que los opiáceos morfina, meperidina y buprenorfina, a las dosis terapéuticas habituales, es poco probable que tengan efectos hepatotóxico o alteren el metabolismo hepático humano. Sin embargo, las dosis elevadas de morfina y meperidina utilizadas durante el abuso pueden alterar el metabolismo hepático y, de modo indirecto, la homeostasis general del organismo. La metadona, al contrario que los otros tres opiáceos, es probable

que tenga un efecto hepatotóxico o de alteración metabólica en el hepatocito humano incluso durante tratamientos terapéuticos crónicos en individuos habituados o bien durante su abuso.

En cualquier caso, hay otros factores relacionados con los opiáceos que si se tienen en consideración pueden suponer un mayor potencial hepatotóxico para estos compuestos:

- En primer lugar hay que destacar que los resultados *in vitro* extrapolados corresponden a tratamientos agudos en los que los opiáceos se incorporan una sola vez al cultivo. En la realidad, el empleo de estos fármacos durante el tratamiento del dolor crónico o durante los procesos de deshabitación, implica la administración repetitiva durante semanas, meses e incluso años (10, 19, 120, 131, 142, 182, 202). Este tipo de tratamiento es muy difícil de reproducir en el cultivo primario de hepatocitos humanos; de todos modos, los estudios realizados con tratamientos de 3 días indican que la citotoxicidad de estos compuestos aumenta considerablemente de un modo progresivo a lo largo del tiempo de tratamiento; como consecuencia, puede inferirse que, *in vivo*, dosis únicas que no tienen una repercusión apreciable en el hígado humano pueden originar una disfunción hepática cuando se administran repetitivamente en los tratamientos crónicos.

- Las concentraciones consideradas para la extrapolación de los resultados son concentraciones plasmáticas; sin embargo, es un hecho conocido el que muchos fármacos se acumulan en ciertos tejidos del organismo a concentraciones bastante superiores a las plasmáticas. En el caso de los opiáceos, se ha descrito su capacidad para acumularse en el tejido hepático (125, 160, 161, 216); este fenómeno puede estar relacionado con la metabolización hepática de los opiáceos y su elevado porcentaje de circulación enterohepática. Como dato concreto se puede decir que la meperidina y la metadona se han encontrado 3-7 veces más concentradas en el tejido hepático que en el plasma, en un número considerable de individuos fallecidos por sobredosis (8).

Por ello, cabe asumir que las concentraciones plasmáticas de los opiáceos que se muestran en la Tabla 3, puedan corresponderse con concentraciones en el tejido hepático varias veces superiores; esto supondría una elevación considerable de los R_T y de la potencia hepatotóxica de los opiáceos.

3) Hepatotoxicidad comparada de los opiáceos en distintos sistemas celulares

3.1 EFECTO DE LOS OPIACEOS SOBRE LOS HEPATOCITOS DE RATA Y

LINEAS CELULARES CONTINUAS.

COMPARACION CON LOS HEPATOCITOS HUMANOS

El estudio del efecto citotóxico de los opiáceos en otros sistemas celulares (hepáticos y no-hepáticos), distintos a los hepatocitos humanos, tuvo por finalidad resolver las siguientes cuestiones:

1.- ¿ Son los hepatocitos humanos especialmente susceptibles a la acción de los opiáceos, o es un fenómeno común en otras especies ?

2.- ¿ El efecto citotóxico de los opiáceos es órgano-específico (hepatotóxico en este caso), o se corresponde más bien con un fenómeno basal que se expresaría de modo similar en cualquier tipo celular ?

Para responder a la primera pregunta el efecto citotóxico de los opiáceos se estudió también en cultivo primario de hepatocitos de rata. La rata es el animal de laboratorio usado con mayor frecuencia en los ensayos de toxicidad, y la inmensa mayor parte de los resultados han sido obtenidos en este animal. La rata tiene, no obstante, un patrón de metabolismo de fármacos y una susceptibilidad a hepatotoxinas distinta, en parte, a la del hombre (103), por lo que no es extraño que en ocasiones un mismo fármaco tenga un mayor efecto hepatotóxico en el hombre que en la rata o viceversa.

En la Tabla 4 se muestra el resumen de los resultados obtenidos (IC_{50} e IC_{10} promedio) en los distintos sistemas celulares empleados. También se muestran como referencia, los resultados correspondientes a hepatocitos humanos.

Los resultados obtenidos en hepatocitos de rata con meperidina, metadona y buprenorfina, fueron bastante similares a los obtenidos en hepatocitos humanos, independientemente del periodo de exposición considerado. Sin embargo, la morfina resultó ser más citotóxica para los hepatocitos de rata que para los humanos.

Tabla 4. Citotoxicidad de los opiáceos en distintos sistemas celulares hepáticos y no-hepáticos.

	IC ₅₀				IC ₁₀			
	MOR	MEP	MET	BUP	MOR	MEP	MET	BUP
H. Humanos								
1-24 h	1,12	1,73	0,25	0,10	0,39	0,68	0,10	0,05
24-48 h	4,11	2,45	0,30	0,11	1,58	0,49	0,15	0,06
H. Rata								
1-24 h	0,28**	2,55	0,31	0,04**	0,16	1,21	0,21	0,03
24-48 h	1,17**	2,90	0,38	0,12	0,35**	0,86	0,13	0,06
HepG2	3,31°°	1,10°°	0,10°°	0,04	0,65	0,28°°	0,04°°	0,02
FaO	5,88°°	0,91°°	0,16°°	0,04	2,84°°	0,33°°	0,05°°	0,02
3T3	2,93°°	1,22°°	0,07°°	0,04	1,38	0,56°°	0,04°°	0,03
Hela	4,97°°	1,26°°	0,17°°	0,08	1,53°°	0,60	0,07°°	0,03

** Significativamente distinto ($p < 0,01$) respecto al correspondiente valor en hepatocitos humanos, en el mismo periodo de tratamiento, según el test de Newman-Keuls.

°° Significativamente distinto ($p < 0,01$) respecto al valor promedio correspondiente a hepatocitos diferenciados, según el test de Newman-Keuls.

 Por otra parte la morfina fué considerablemente más citotóxica en el periodo 1-24 h que en el periodo 24-48 h; este fenómeno se observó tanto en hepatocitos humanos como en hepatocitos de rata.

En las etapas tempranas del cultivo (1-24 h) las actividades de biotransformación son superiores que en las etapas posteriores (24-48 h) (59, 158, 221); como consecuencia, la metabolización de la morfina será también más intensa en las primeras etapas del cultivo, y esto puede estar asociado con una mayor producción de metabolitos reactivos con acción hepatotóxica. Esta hipótesis está en consonancia con los trabajos de varios autores que sugieren que la citotoxicidad de la morfina en hepatocitos de rata aislados es consecuencia de la generación de un metabolito reactivo (71, 177).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, podemos sugerir que la citotoxicidad de la morfina puede estar relacionada con su mayor o menor biotransformación tanto en hepatocitos humanos como en hepatocitos de rata; por otra parte, la posible existencia de distintos patrones de metabolización entre la rata y el hombre hacen que la citotoxicidad de la morfina sea unas 4 veces superior en hepatocitos de rata. Los otros tres opiáceos parecen ejercer su acción de modo distinto a la morfina sin presentar diferencias importantes entre los dos sistemas estudiados.

Para responder a la cuestión de si el efecto citotóxico de los opiáceos es órgano-específico (hepatotóxico), o es un fenómeno basal común para cualquier tipo celular, se utilizaron cuatro líneas celulares. HepG2 y FaO, que son de origen hepático y conservan varias características propias del hepatocito adulto diferenciado (63, 68, 78, 79); en el caso de HepG2 se ha detectado incluso la presencia de citocromo P-450 y actividades monooxigenasas asociadas (58, 101, 200). Hela y 3T3 no son de origen hepático y sirven como controles para examinar si los efectos observados son específicos o no de los hepatocitos (74).

El efecto citotóxico de los opiáceos fue muy similar en las cuatro líneas celulares y no se apreciaron diferencias de sensibilidad a los opiáceos entre líneas hepáticas y no-hepáticas. Tampoco hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos con líneas de origen humano (HepG2 y Hela) y los obtenidos con líneas derivadas de roedores (FaO y 3T3).

La comparación de los resultados obtenidos con hepatocitos en cultivo y los obtenidos con las líneas celulares sí que presenta diferencias significativas:

- La citotoxicidad de la morfina en hepatocitos en cultivo (IC_{50} promedio 1,67 mM; IC_{10} promedio 0,62 mM) es superior que en las cuatro líneas celulares (IC_{50} promedio 4,27 mM; IC_{10} promedio 1,60 mM).

- La meperidina y la metadona tienen, en cultivo de hepatocitos, valores IC_{50} e IC_{10} más de 2 veces superiores que los respectivos IC_{50} e IC_{10} obtenidos en líneas celulares. Por lo tanto, estos dos opiáceos parecen ser más citotóxicos para las líneas celulares que para los hepatocitos diferenciados

- La buprenorfina también mostró una citotoxicidad ligeramente superior en líneas celulares, pero esta diferencia fue, en términos absolutos, inferior a la encontrado con meperidina y metadona.

Por lo tanto, se puede concluir que la morfina fue el único de los cuatro opiáceos cuya citotoxicidad fue específica para hepatocitos diferenciados y por lo tanto es el único opiáceo que podemos clasificar de hepatotóxico. Los resultados obtenidos con los otros tres opiáceos parecen indicar que las líneas celulares son más sensibles a su citotoxicidad que los hepatocitos diferenciados.

No hay que olvidar que la función detoxificadora del hígado, aunque en ocasiones potencie la hepatotoxicidad de algunos xenobióticos, por lo general tiene como objetivo biotransformar compuestos perjudiciales en otros menos dañinos (14, 83, 84, 114).

La metabolización de la meperidina, la metadona y la buprenorfina se realiza principalmente en el tejido hepático (80, 125, 160, 161, 216); las líneas celulares debido a su mayor o menor grado de desdiferenciación no poseen estos mecanismos biotransformadores, excepto en alguna línea (HepG2) en la que se han descrito niveles de actividad muy bajos (58, 200); la escasa o nula metabolización de la meperidina y la metadona en las líneas celulares puede ser la causa de su mayor citotoxicidad.

Hay evidencias que sugieren que la inhibición de la metabolización de la metadona (32, 159) y de la meperidina (26, 53, 154) es la causa del incremento de la mortalidad observado en animales y hombres tratados con fármacos que inhiben dicha metabolización. Es probable por lo tanto, que la metabolización de estos opiáceos origine metabolitos inactivos, menos tóxicos que sus compuestos originarios; en las líneas celulares debido a la carencia de mecanismos biotransformadores la acción de estos opiáceos *per se* sería más perjudicial que en los hepatocitos diferenciados.

Por otra parte, estos resultados parecen sugerir que la meperidina, la metadona y la buprenorfina no poseen un efecto citotóxico específico en los hepatocitos. Sin embargo, hay que recordar que estos compuestos sí que son capaces de alterar procesos específicos del metabolismo hepático a concentraciones subletales; lo que puede a su vez afectar la homeostasis general del organismo. Además, algunas características de estos tres opiáceos como su elevada acumulación hepática, y su intensa circulación enterohepática (80, 125, 160, 161, 216) pueden favorecer la aparición de una lesión en el hígado antes de causar daños en otros tejidos del organismo.

3.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA METABOLIZACION DE LA MORFINA EN LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES

Los resultados descritos en los apartados anterior sugieren que la citotoxicidad de la morfina en los distintos sistemas celulares puede estar directamente relacionada con su mayor o menor capacidad metabolizadora. Además, se ha demostrado que este opiáceo es más lesivo en las etapas tempranas del cultivo de hepatocitos, cuando también hay una mayor capacidad biotransformadora.

Para confirmar esta relación entre hepatotoxicidad y biotransformación de la morfina se estudió su metabolización en los distintos sistemas celulares mediante HPLC: se evaluó el descenso de la concentración de morfina en el medio de cultivo a lo largo del tiempo de incubación; y las variaciones de concentración encontradas se tomaron como velocidades de metabolización.

Según este criterio, la velocidad de metabolización estimada en cultivo de hepatocitos de rata durante el periodo 1-3 h, se situó alrededor de 0,3-0,6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$; valor muy superior al valor de captación descrito en la literatura (123).

Así mismo, los resultados obtenidos indican que en hepatocitos de rata, la metabolización de la morfina fue mayor en el periodo 1-3 h del cultivo en comparación con el periodo 24-27 h. En hepatocitos humanos no hubo velocidades de metabolización significativamente distintas en los dos periodos estudiados (1-3 h y 24-27 h). En el caso de las líneas celulares continuas no se detectó metabolización de morfina en el periodo de tiempo estudiado (24-27 h).

Por otra parte, los resultados obtenidos con hepatocitos humanos y de rata parecen indicar que, paralelamente a la desaparición de la morfina del medio de cultivo, se observa la aparición de nuevos picos correspondientes a los metabolitos originados durante su biotransformación. Los perfiles cromatográficos registrados son muy similares a los encontrados por Nagamatsu y col. (177) utilizando un sistema experimental similar al nuestro (hepatocitos de rata en suspensión); estos autores encuentran tres nuevos picos correspondientes a tres compuestos más polares derivados de la metabolización de la morfina e identificados como conjugado de morfina y ácido glucurónico, conjugado de morfina y glutatión y, en menor proporción, normorfina. En nuestro caso también se detectan en hepatocitos de rata tres nuevos picos correspondientes a compuestos con menor tiempo de retención (más polares) y que seguramente se corresponden con los metabolitos de la morfina encontrados e identificados por Nagamatsu y col. (177).

La clasificación de los distintos sistemas conforme a su capacidad metabolizadora coincide en líneas generales con la clasificación según su sensibilidad a la citotoxicidad de la morfina:

1) La máxima metabolización de la morfina se encontró en hepatocitos de rata en el periodo 1-3 h. La citotoxicidad de la morfina en el periodo equivalente (1-24 h) fue la mayor encontrada entre los distintos sistemas estudiados $IC_{50}=0,28$; $IC_{10}=0,16$ mM.

2) La metabolización de morfina fue claramente inferior tanto en hepatocitos de rata durante el periodo 24-27 h, como en hepatocitos humanos en los dos periodos estudiados. La citotoxicidad de la morfina correspondiente a esos periodos y a esos sistemas fue también inferior (1-4 mM (IC_{50}) y 0,4-1,5 mM (IC_{10})).

3) En líneas celulares no se detectó metabolización de este opiáceo y esto se correspondió con la menor citotoxicidad de la morfina encontrada (3-6 mM (IC_{50}) y 0,7-2,8 mM (IC_{10})).

Por lo tanto todos estos experimentos parecen demostrar que el efecto hepatotóxico de la morfina está en relación directa con su mayor o menor grado de metabolización.

CONCLUSIONES

Conforme a las evidencias experimentales presentadas en esta Tesis Doctoral, las conclusiones más importantes que se derivan son las siguientes:

1.- Los opiáceos morfina, meperidina, metadona y buprenorfina son citotóxicos para los hepatocitos humanos en cultivo primario, a concentraciones incluidas en el rango 0,01-4 mM. El efecto es más acusado en las primeras etapas del cultivo y, en los tratamientos prolongados, aumenta el potencial citotóxico de estos fármacos entre 3 y 11 veces.

2.- Los opiáceos alteran el metabolismo del hepatocito humano a concentraciones subcitotóxicas. Las funciones metabólicas más sensiblemente afectadas fueron la síntesis de glucógeno, de albúmina y de urea.

3.- Los datos *in vitro* sugieren que la hepatotoxicidad relativa de los cuatro opiáceos es:

Buprenorfina > Metadona > Meperidina ≥ Morfina

4.- Los opiáceos, a las dosis terapéuticas habituales, es poco probable que causen un efecto hepatotóxico grave o alteren substancialmente el metabolismo hepático *in vivo*. Sin embargo, durante los tratamientos crónicos con dosis elevadas y en situaciones de abuso, sí pueden alterar el metabolismo de los hepatocitos y, de modo indirecto, la homeostasis general del organismo; siendo la metadona el opiáceo con mayor potencial hepatotóxico para el hombre.

5.- Los estudios comparativos con hepatocitos de rata y líneas celulares mostraron que la morfina fue el único de los cuatro opiáceos que mostró una citotoxicidad específica para hepatocitos diferenciados, con distinta sensibilidad entre especies (hombre y rata). La meperidina, la metadona y la buprenorfina causaron una citotoxicidad mayor en los sistemas celulares más desdiferenciados (líneas celulares continuas) con escasa o nula capacidad biotransformadora.

6.- Los estudios de metabolización por HPLC, las cinéticas de depleción de GSH y los análisis comparativos de la citotoxicidad de la morfina en distintos periodos y sistemas celulares, indican que el efecto hepatotóxico de este opiáceo está directamente relacionado con su mayor o menor grado de metabolización.

BIBLIOGRAFIA

1. ACOSTA, D.; SORENSEN, E. M. B.; ANUFORO, D. C.; MITCHELL, D. B.; RAMOS, K.; SANTONE, K. S. y SMITH, M. An in vitro approach to the study of target organ toxicity of drugs and chemicals. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 495-504 (1985).
2. AGUILAR, E.; GUIX, J.; ALBEROLA, V. y GARCIA-CONDE, J. Complicaciones hepáticas. En "*Problemas Médicos en Adictos a Drogas por Vía Parenteral*". (Editado por E. Aguilar, J. Guix, V. Alberola y J. García-Conde). Conselleria de Sanitat i Consum; Valencia. pp. 38-45 (1988).
3. AKIL, H.; WATSON, S. J.; YOUNG, E.; LEWIS, M. E.; KHACHATURIAN, H. y WALKER, J. M. Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 223-255 (1984).
4. ALVARES, A. P. Oxidative biotransformation of drugs. En "*The Liver, Biology and Pathobiology*". (Editado por I. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. pp. 265-280 (1982).
5. AMZEL, V. y VAN DER HOEVEN, T. A. Morphine-induced depression of the hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme: Effect on the lipid component. *Biochem. Pharmacol.* 29: 658-661 (1980).
6. ARTHURS, Y.; DOYLE, G. D. y DIELDING, J. F. The diagnostic necessity of liver biopsy in drug abusers with normal liver function tests. *Hepato-gastroenterology* 29: 175-177 (1982).
7. BALLEET, F.; BOUMA, M. E. y WANG, S. R. Isolation, culture and characterization of adult human hepatocytes from surgical liver biopsies. *Hepatology* 4: 849-854 (1984).
8. BASELT, R. C. y CRAVEY, R. H. A Compendium of therapeutic and toxic concentrations of toxicologically significant drugs in human biofluids. *J. Anal. Toxicol.* 1: 81-103 (1977).
9. BASSAN, H.; KENDLER, J. y ZIMMERMAN, H. J. Effect of ethionine and ethanol on the function of the perfused rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 852-859 (1971).
10. BELL, J.; FERNANDES, D. y BATEY, R. Heroin users seeking methadone treatment. *Med. J. Aust.* 152: 361-364 (1990).
11. BELLOMO, G.; JEWELL, S. A.; SIMITH, M. T.; THOR, H. y ORRENIUS, S. Perturbation of calcium homeostasis during hepatocyte injury. En "*Mechanism of Hepatocyte Injury and Death*". (Editado por D. Keppler, H. Popper, L. Bianchi y W. Reutter). MTP Press Ltd.; Lancaster. pp. 119-128 (1985).
12. BENET, L. Z. y SHEINER, L. B. Design and optimization of dosage regimens; pharmacokinetic data. En "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*". (Editado por A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad). McMillan Publishing Co.; New York. pp. 1663-1733 (1985).

13. BENET, L. Z. y SHEINER, L. B. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. En "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*". 7 edición, (Editado por A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad). MacMillan Publishing Co.; New York. pp. 3-34 (1985).
14. BENTLEY, P. y OESCH, F. Foreign compounds metabolism in the liver. En "*Progress in Liver Diseases*". Volumen 7. (Editado por H. Popper y F. Schaffner). Grune and Stratton; New York. pp. 157-178 (1982).
15. BERRY, M. N. y FRIEND, D. S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43: 506-520 (1969).
16. BEVERLEY, C. L.; HIGGINS, P. J. y BORENFREUND, E. H. The effect of methadone and naloxone on culture rat liver cells. *Exp. Cell. Biol.* 52: 170-175 (1984).
17. BEWLEY, T. H. y GHODSE, A. H. Opioid analgesics and narcotic antagonists. En "*Meyler's Side Effects of Drugs*". 10 edición, (Editado por M.N.G. Duker). Elsevier Science Publishers B.V.; pp. 122-134 (1984).
18. BHUYAN, B. K.; LOUGHMAN, B. E. y FRASER, T. J. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp. Cell Res.* 97: 275-280 (1976).
19. BICKEL, W. K.; STITZER, M. L.; BIGELOW, G. E.; LIEBSON, I. A.; JASINSKI, D. R. y JOHNSON, R. E. A clinical trial of buprenorphine: comparison with methadone in the detoxification of heroin addicts. *Clin. Pharmacol. Ther.* 43: 72-78 (1988).
20. BIGLER, D.; BROEN CHRISTENSEN, D.; ERIKSEN, J. y JENSEN, N.-H. Morphine, morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide concentrations in plasma and cerebrospinal fluid during long term high-dose intrathecal morphine administration. *Pain* 41: 15-18 (1990).
21. BILLINGS, R. E.; MCMAHON, R. E.; ASHMORE, J. y WAGLE, S. R. The metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes: a comparison with in vitro drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. *Drug. Metab. Dispos.* 5: 518-526 (1977).
22. BIOUR, M.; POUPON, R.; CALMUS, Y.; GRANGE, J. D.; HAMEL, J. D.; LEVY, V. G.; BODIN, F. y CHEYMOL, G. Hépatotoxicité des médicaments. Mise a jour du fichier bibliographique del atteintes hépatiques et des médicaments responsables. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 12: 48-60 (1988).
23. BISSEL, M. D. Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Ann. NY Acad. Sci.* 349: 85-98 (1980).
24. BLACK, M. M. y ARIAS, I. M. Pharmacological considerations in liver disease. En "*Diseases of the Liver*". 4 edición, (Editado por L. Schiff). J.B. Lippincott Co.; Philadelphia. pp. 755-773 (1975).
25. BOCK, K. W. y BOCK-HENNIG, B. S. Differential induction of human liver UDP-glucuronosyltransferase activities by phenobarbital-type inducers. *Biochem. Pharmacol.* 36: 4137-4143 (1987).

26. BODEN, R.; BOTTING, R.; COULSON, P. y SPANSWICK, G. Effect of nonselective and selective inhibitors of monoamine oxidases A and B on pethidine toxicity in mice. *Brit. J. Pharmacol.* 82: 151-154 (1984).
27. BODO, R. C.; COTUI, F. W. y BENAGLIA, A. E. Studies on the mechanism of morphine hyperglycemia. The role of the adrenal glands. *J. Phamacol. Exp. Ther.* 61: 48-57 (1937).
28. BONDESSON, I.; EKWALL, B.; HELLBERG, S.; ROMERT, L.; STENBERG, K. y WALUM, E. MEIC-Anew international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of in vitro cytotoxicity tests. *Cell Biol. Toxicol.* 5: 331-348 (1989).
29. BORENFREUND, E.; BABICH, H. y MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxic. in Vitro* 2: 1-6 (1988).
30. BORGIA, G.; CROWELL, J.; COCCHIARARO, M.; ABRESCIA, N.; LAMBIASE, A.; D'ALFONSO, G.; SCHREIL, W. y PIAZZA, M. Ultrastructural changes in mouse liver cells: A morphometric study on the influence of morphine, heroin, and cardiostenol. *J. Ultrastruct. Res.* 80: 123-132 (1982).
31. BORISON, H. L.; FISHBURN, B. R.; BHIDE, N. K. y MCCARTHY, L. E. Morphine-induced hyperglycemia in the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 138: 229-235 (1962).
32. BOROWSKY, S. A. y LIEBER, C. S. Interaction of methadone and ethanol metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 123-129 (1978).
33. BRONET, J. R. y RAMON, M. A. Tratamientos con metadona. Dirección General de Acción Social, Asamblea de Madrid de Cruz Roja Española. pp. 1-67 (1984).
34. BUTI, M.; ESTEBAN, R.; JARDI, R.; GENESCA, J. y GUARDIA, J. Etiología de 122 hepatitis agudas en toxicómanos. *Gastroenterol. Hepatol.* 8: 196 (1985).
35. CADAFALCH, J. y BRUGUERA, M. Hepatitis en drogadictos. *JANO* 648: 23-31 (1985).
36. CALDARA, R.; TESTORI, G. P.; FERRARI, C.; ROMUSSI, M.; RAMPINI, P.; BORZIO, M. y BARBIERI, C. Effect of loperamide, a peripheral opiate agonist, on circulating glucose, free fatty acids, insulin, C-peptide and pituitary hormones in healthy man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 21: 185-188 (1981).
37. CALDWELL, J. Conjugation reactions in the metabolism of xenobiotics. En "*The Liver, Biology and Pathobiology*". (Editado por I. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. pp. 281-295 (1982).
38. CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. y MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987).

39. CASCALES, M.; FEIJOO, B.; CEREDAN, S.; CASCALES, C. y SANTOS-RUIZ, A. The effect of thioacetamide on urea cycle enzymes of rat liver. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17: 129-132 (1979).
40. CASTELL, J. V.; DONATO, T.; LARRAURI, A.; FABRA, R.; TRULLENQUE, R. y GOMEZ-LECHON, M. J. Uso de hepatocitos humanos en cultivo para la predicción del riesgo potencial de hepatotoxicidad de medicamentes. *Gastroenterol. Hepatol.* 12: 483-495 (1989).
41. CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; MIRANDA, M. A. y MORERA, M. I. Photolytic degradation of benorylate: effects of photoproducts on cultured hepatocytes. *J. Pharm. Sci.* 76: 474-478 (1987).
42. CASTELL, J. V. y GOMEZ-LECHON, M. J. The use of cultured hepatocytes to assess the hepatotoxicity of xenobiotics. En "*Interactions between Drugs and Chemicals in Industrial Societies*". (Editado por G.L. Plaa, P. du Souich y S. Erill). Elsevier Science; New York. pp. 135-149 (1987).
43. CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; MIRANDA, M. A. y MORERA, I. M. Toxic effects of the photoproducts of chlorpromazine on cultured hepatocytes. *Hepatology* 7: 349-354 (1987).
44. CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J.; COLOMA, J. y LOPEZ, P. Preservation of the adult functionality of hepatocytes in serum free cultures. En "*Hormonally Defined Media: A Tool in Cell Biology*". (Editado por R.J. Wieser y G. Fischer). Elsevier; Berlin. pp. 333-336 (1982).
45. CASTELL, J. V.; LARRAURI, A. y GOMEZ-LECHON, M. J. A study of the relative hepatotoxicity in vitro of the non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen and butibufen. *Xenobiotica* 18: 737-745 (1988).
46. CASTELL, J. V.; MONTOYA, A.; LARRAURI, A.; LOPEZ, P. y GOMEZ-LECHON, M. J. Effects of benorylate and impacina on the metabolism of cultured hepatocytes. *Xenobiotica* 15: 743-749 (1985).
47. CHANG, K. J. y CUATRECASAS, P. Heterogeneity and properties of opiate receptors. *Fed. Proc.* 40: 2729-2734 (1981).
48. CHANG, Y. Y. H. y HO, I. K. Effects of acute and continuous morphine administration on serum glutamate oxalacetate transaminase and glutamate pyruvate transaminase activities in the mouse. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1373-1377 (1979).
49. CHAO, E. S.; DUNBAR, D. y KAMINSKY, L. S. Intracellular lactate dehydrogenase concentration as an index of cytotoxicity in rat hepatocyte primary culture. *Cell Biol. Toxicol.* 4: 1-11 (1988).
50. CHERUBIN, C. E.; HARGROVE, R. L. y PRINCE, A. M. The serum hepatitis related antigen (SH) in illicit drug users. *Am. J. Epidemiol.* 91: 510-512 (1970).
51. CHERUBIN, C. E.; KANE, S.; WEINSBERGER, D. R.; WOLFE, E. y MCGINN, T. Persistence of transaminase abnormalities in former drug addicts. *Ann. Intern. Med.* 76: 385-389 (1972).

52. CHERUBIN, C.; ROSENTHAL, W. S. y STENGER, R. Chronic liver disease in asymptomatic narcotic addicts. *Ann. Intern. Med.* 76: 391-395 (1972).
53. CLARK, B. y THOMPSON, J. W. Analysis of the inhibition of pethidine N-demethylation by monoamine oxidase inhibitors and some other drugs with special reference to drug interactions in man. *Brit. J. Pharmacol.* 44: 89-99 (1972).
54. COLES, L. S.; FRIES, J. F. y KRAINES, R. G. From experiments to experience; side-effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 74: 820-828 (1983).
55. COLLIER, H. O. J. Cellular aspects of opioid tolerance and dependence. En "*Opioids. Past, Present and Future*". (Editado por J. Hughes, H.O.J. Collier, M.J. Rance y M.B. Tyers). Taylor & Francis Ltd.; London. pp. 109-125 (1984).
56. COWAN, A.; LEWIS, J. W. y MACFARLANE, I. R. Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Brit. J. Pharmacol.* 60: 537-545 (1977).
57. DAVIS, D. C.; HASHIMOTO, M. y GILLETTE, J. R. Effects of bromobenzene and carbon tetrachloride on the synthesis and releases of proteins by perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 22: 1989-1995 (1971).
58. DAWSON, J. R.; ADAMS, D. J. y WOLF, C. R. Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2. *FEBS Lett.* 183: 219-222 (1985).
59. DECAD, G. M.; HSIEH, P. H. y BYARD, J. L. Maintenance of cytochrome P-450 and metabolism of aflatoxin B1 in primary hepatocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 279-287 (1977).
60. DEL OLMO, J. A.; RODRIGO, J. M. y GIMENO, V. Enfermedad hepática en drogadictos del área de Valencia. *Gastroenterol. Hepatol.* 7: 405-410 (1984).
61. DENEKE, U. Lactate dehydrogenase, colorimetric method. En "*Methods of Enzymatic Analysis*". 3 edición, Volumen 3. (Editado por H.U. Bergmeyer; J. Bergmeyer y M. Graßl). Verlag Chemie; Weinheim (F.R.G.). pp. 133-138 (1983).
62. DENIZOT, F. y LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277 (1986).
63. DESCHATRETTE, J. y WEISS, M. C. Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie* 56: 1603-1611 (1974).
64. DONATO, T.; GOMEZ-LECHON, M. J. y CASTELL, J. V. Effect of xenobiotics on monooxygenase activities in cultured human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1321-1326 (1990).

65. DOWNING, J. W.; LEARY, W. P. y WHITE, E. S. Buprenorphine: A new potent long-acting synthetic analgesic. Comparison with morphine. *Brit. J. Anaesth.* 49: 251-255 (1977).
66. DUGGAN, A. W. y NORTH, R. A. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol. Rev.* 35: 219-282 (1983).
67. DUTHIE, D. J. R. y NIMMO, W. S. Adverse effects of opioid analgesic drugs. *Brit. J. Anaesth.* 59: 61-77 (1987).
68. DUTHIE, S. J.; COLEMAN, C. S. y GRANT, M. H. Status of reduced glutathione in the human hepatoma cell line, Hep G2. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3365-3368 (1988).
69. EDMONSON, J. M.; ARMSTRONG, L. S. y MARTINEZ, A. O. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult. Methods* 11: 15-17 (1988).
70. EDWARDS, D. J.; SVENSSON, C. K.; VISCO, J. P. y LALKA, D. Clinical pharmacokinetics of pethidine. *Clin. Pharmacokinetics* 7: 421-433 (1982).
71. EKLOW-LASTBOM, L.; MOLDEUS, P. y ORRENIUS, S. On the mechanisms of glutathione depletion in hepatocytes exposed to morphine and ethylmorphine. *Toxicology* 42: 13-21 (1986).
72. EKWALL, B. Correlation between cytotoxicity in vitro and LD50-values. *Act. Pharmacol. Toxicol.* 52: 80-99 (1983).
73. EKWALL, B.; BONDESSON, I.; CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, J. V.; HELLBERG, S.; HOGBERG, J.; JOVER, R.; PONSODA, X.; ROMERT, L.; STENBERG, K. y WALUM, E. Cytotoxicity evaluation of the first ten MEIC chemicals: Acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in five cellular assays and by oral LD50 tests in rodents. *ATLA* 17: 83-100 (1989).
74. EKWALL, B. y EKWALL, K. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA* 15: 193-201 (1988).
75. EKWALL, B.; GOMEZ-LECHON, M. J.; HELLBERG, S.; BONDESSON, I.; CASTELL, J. V.; JOVER, R.; HOGBERG, J.; PONSODA, X.; ROMERT, L.; STENBERG, K. y WALUM, E. Preliminary results from the scandinavian multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity (MEIC). *Toxic. in Vitro* 4: 688-691 (1990).
76. ERIKSEN, J.; JENSEN, N. H.; KAMPJENSEN, M.; BJARNO, H.; FRIIS, P. y BREWSTER, D. The Systemic Availability of Buprenorphine Administered by Nasal Spray. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 803-805 (1989).
77. FELDBERG, W. y SHALIGRAM, S. V. The hyperglycaemic effect of morphine. *Brit. J. Pharmacol.* 46: 602-607 (1972).
78. FERRO, M.; BASSI, A. M. y NANNI, G. Hepatoma cell cultures as in vitro models for the hepatotoxicity of xenobiotics. *ATLA* 16: 32-37 (1988).

79. FERRO, M.; BASSI, A. M.; MARINARI, U. M. y NANNI, G. Use of cultured hepatoma cells displaying differentiation markers as an in vitro model suitable for hepatotoxicity. *Biol. Cell* 45: 74 (1982).
80. FLOREZ, J. Fármacos analgésicos opiáceos. En "*Farmacología Humana*". (Editado por J. Flórez). EUNSA; Pamplona. pp. 288-299 (1987).
81. FRESHNEY, R. I. The culture environment: substrate, gas phase, medium, and temperature. En "*Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*". 2 edición, (Editado por R.I. Freshney). Alan R. Liss, Inc.; New York. pp. 57-84 (1987).
82. GELB, A. M.; MILDVAN, D. y STENGER, R. J. The spectrum and causes of liver disease in narcotic addicts. *Am. J. Gastroenterol.* 67: 314-318 (1977).
83. GIBSON G.G. y SKETT, P. Pharmacological and toxicological aspects of drug metabolism. En "*Introduction to Drug Metabolism*". (Editado por G.G. Gibson y P. Skett). Chapman and Hall Ltd.; London. pp. 175-198 (1986).
84. GIBSON, G. G. y SKETT, P. Pathways of drug metabolism. En "*Introduction to Drug Metabolism*". (Editado por G.G. Gibson y P. Skett). Chapman and Hall Ltd.; London. pp. 1-38 (1986).
85. GIRARD, M. Los efectos indeseables de los medicamentos. *Mundo Científico* 7: 441-447 (1987).
86. GLASGOW, A. M. y CHASE, H. P. Effect of salicylate on ureagenesis in rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 155: 48-50 (1977).
87. GOETHALS, F.; DEBOYSER, D.; LEFEBVRE, V.; DE COSTER, I. y ROBERFROID, M. Adult rat liver slices as a model for studying the hepatotoxicity of vincaalkaloids. *Toxic. in Vitro* 4: 435-438 (1990).
88. GOLDSTEIN, A.; ARONOW, L. y KALMAN, S. Drug tolerance and physical dependence. En "*Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*". (Editado por A. Goldstein, L. Aronow y S. Kalman). Wiley & Sons; New York. pp. 569-586 (1974).
89. GOMEZ-LECHON, M. J. y CASTELL, J. V. Efficiency of phylogenetically unrelated plasma fibronectins on hepatocyte attachment to substrate. *Cien. Biol.* 8: 49-56 (1983).
90. GOMEZ-LECHON, M. J.; CASTELL, J. V.; DONATO, T.; GIMENEZ, P.; LARRAURI, A.; LOPEZ, P.; MONTOYA, A.; BAGUENA, J.; FABRA, R.; TRULLENQUE, R. y CANO, J. Hepatocitos humanos en cultivo: un modelo experimental para el estudio de la fisiopatología hepática humana. *Gastroenterol. Hepatol.* 10: 463-474 (1987).
91. GOMEZ-LECHON, M. J.; DONATO, T.; LARRAURI, A.; LOPEZ, P.; MONTOYA, A.; GIMENEZ, P. y CASTELL, J. V. Human hepatocytes cultured in serum-free media: functional characterization. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 32A (1988).

92. GOMEZ-LECHON, M. J.; LARRARURI, A.; DONATO, T.; LOPEZ, P.; MONTOYA, A. y CASTELL, J. V. Predictive value of the in vitro test for hepatotoxicity of xenobiotics. En "*Liver Cells and Drugs*". (Editado por A. Guillouzo). Colloque Inserm/John Libbey Eurotext Ltd.; London. pp. 133-138 (1988).
93. GOMEZ-LECHON, M. J.; LOPEZ, M. P. y CASTELL, J. V. Cultivo primario de hepatocitos adultos: un modelo experimental para el estudio de la funcionalidad y el metabolismo hepático. *Gastroenterol. Hepatol.* 7: 507-522 (1984).
94. GOMEZ-LECHON, M. J.; LOPEZ, P.; DONATO, T.; MONTOYA, A.; LARRAURI, A.; GIMENEZ, P.; TRULLENQUE, R.; FABRA, R. y CASTELL, J. V. Culture of human hepatocytes from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with in vivo. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 67-74 (1990).
95. GOMEZ-LECHON, M. J.; MONTOYA, A.; LOPEZ, P.; DONATO, T.; LARRAURI, A. y CASTELL, J. V. The potential use of cultured hepatocytes in predicting the hepatotoxicity of xenobiotics. *Xenobiotica* 18: 725-735 (1988).
96. GOOD, C. A.; KRAMER, H. y SOMOGYI, M. The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* 100: 485-491 (1933).
97. GORODETZKY, C. W.; SAPIRA, J. D. y MARTIN, W. R. Liver diseases in narcotics addicts: I. The role of the drug. *Clin. Pharmacol. Ther.* 9: 720-739 (1968).
98. GOURLEY, D. R. H. Effects of opioid narcotic drugs on energy reserves of skeletal muscle: I. Glycogen. *Biochem. Pharmacol.* 23: 489-501 (1974).
99. GOURLEY, D. R. H. Effects of opioid narcotic drugs on energy reserves of skeletal muscle: II. Further studies of the glycogenolytic action of methadone. *Biochem. Pharmacol.* 23: 1559-1568 (1974).
100. GRANT, M. H.; BURKE, M. D.; HAWKSWORTH, G. M.; DUTHIE, S. J.; ENGESET, J. y PETRIE, J. C. Human adult hepatocytes in primary monolayer culture. Maintenance of mixed function oxidase and conjugation pathways of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2311-2316 (1987).
101. GRANT, M. H.; DUTHIE, S. J.; GRAY, A. G. y BURKE, M. D. Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4111-4116 (1988).
102. GREIM, H.; ANDRAE, U.; FORSTER, U. y SCHWARZ, L. Application, limitations and research requirements of in vitro test systems in toxicology. *Arch. Toxicol. Suppl.* 9: 225-236 (1986).
103. GUGEN-GUILLOUZO, G.; BOUREL, M. y GUILLOUZO, A. Human hepatocyte cultures. En "*Progress in Liver Diseases*". Volumen 8. (Editado por H. Popper y F. Schaffner). Grune & Stratton Inc.; Orlando. pp. 33-50 (1988).
104. GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CAMPION, J. P. y BRISSOT, D. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol. Int. Rep.* 6: 625-628 (1982).

105. GUILLOUZO, A. Use of isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism and cytotoxicity studies. En "*Research in Isolated and Cultured Hepatocytes*". (Editado por A. Guillouzo y C. Guguen-Guillouzo). John Libbey Eurotext Ltd./INSERM; Montrouge/Paris. pp. 313-332 (1986).
106. GUILLOUZO, A.; BEGUE, J. M.; CAMPION, J. P.; GASCONI, M. N. y GUGEN-GILLOUZO, C. Human hepatocyte cultures: A model of pharmacotoxicological studies. *Xenobiotica* 15: 635-641 (1985).
107. GUILLOUZO, A.; RATANASAVAHN, D. y GUGUEN-GUILLOUZO, C. Hepatocytes en culture: un modele pour l'etude de l'hepatotoxicité. En "*Hepatotoxicity of Drugs*". (Editado por J.P. Fillastre). Editions Inserm; Paris. pp. 209-217 (1985).
108. GURANTZ, D. y CORREIA, M. A. Morphine-mediated effects on rat hepatic heme and cytochrome P-450 in vivo: Antagonism by naloxone in the liver. *Biochem. Pharmacol.* 30: 1529-1536 (1981).
109. GURUMURTHY, P.; KRISHNAMURTHY, M. S. y NAZARETH, O. Lack of relationship between hepatic toxicity and acetylator phenotype in three thousand South Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 58-61 (1984).
110. HASSID, W. Z. y ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. En "*Methods in Enzymology*". Volumen 3. (Editado por S.P. Colowick y N.O. Kaplan). Academic Press; New York. pp. 37-54 (1957).
111. HEEL, R. C.; BRODGEN, R. N.; SPEIGHT, T. N. y AVERY, G. S. Buprenorphine: a review on its pharmacologic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 17: 81-110 (1979).
112. HIRSCHAUER, C.; GUILLEMOT, F.; HERAUD, M.; MATHIEUCHANDELIER, C.; CORTOT, A. y PARIS, J. C. Is Buprenorphine Hepatotoxic?. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13: 636 (1989).
113. HISSIN, P. J. y HILF, R. A. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226 (1976).
114. HODGSON, E. Metabolism of toxicants. En "*Modern Toxicology*". (Editado por E. Hogson y P.E. Levi). Elsevier Science Publishing Co.; New York. pp. 51-84 (1987).
115. HORN, S. W. H.; RADD, M. y GOLDSTEIN, A. Plasma levels and symptom complints in patiens maintained on daily dosage of methadone hydrochloride. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17: 636-649 (1975).
116. HOVELL, B. C. Comparison of buprenorphine, pethidine and pentazocine for the relief of pain after operation. *Brit. J. Anaesth.* 49: 913-916 (1977)
117. HUI, F. W.; KRIKUN, E. y SMITH, A. A. Inhibition by d,l-methadone of RNA and protein synthesis in neonatal mice. *Eur. J. Phamacol.* 49: 87-93 (1978).

118. I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz. En "*The Liver. Biology and Pathobiology*". (Editado por I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. (1982).
119. ICHIARA, A.; NAKAMURA, T. y TANAKA, K. Use of hepatocytes in primary cultures for biochemical studies on liver function. *Mol. Cell. Biochem.* 43: 143-160 (1982).
120. INTURRISI, C. E.; COLBURN, W. A.; KAIKO, R. F.; HOUDE, R. W. y FOLEY, K. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41: 392-401 (1987).
121. IPP, E.; DOBBS, R. y UNGER, R. H. Morphine and B-endorphin influence the secretion of the endocrine pancreas. *Nature* 276: 190-195 (1978).
122. IPP, E.; SCHUSDZIARRA, V.; HARRIS, V. y UNGER, R. H. Morphine-induced hyperglycemia: Role of insulin and glucagon. *Endocrinology* 107: 461-463 (1980).
123. IWAMOTO, K.; EATON, D. L. y KLAASSEN, C. D. Uptake of mophine and nalorphine by isolated rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 181-189 (1978).
124. JAFFE, J. H. Drug addiction and drug abuse. En "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*". 7 edición, (Editado por A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad). McMillan Publishing Co.; New York. pp. 532-581 (1985).
125. JAFFE, J. A. y MARTIN, W. R. Opioid analgesics and antagonists. En "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*". 7 edición, (Editado por A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall y F. Murad). MacMillan Publishing Co.; New York. pp. 491-531 (1985).
126. JAMES, R. C.; GOODMAN, R. D. y HARBISON, R. D. Hepatic glutathione and hepatotoxicity: changes induced by selected narcotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 708-714 (1982).
127. JAMES, R. C. y HARBISON, R. D. Hepatic glutathione and hepatotoxicity: Effects of cytochrome P-450 complexing compounds SKF 525-A, L- α acetylmethadol (LAAM), norLAAM, and piperonyl butoxide. *Biochem. Pharmacol.* 31: 1829-1835 (1982).
128. JASINSKI, D. R.; FUDALA, P. J. y JOHNSON, R. E. Sublingual versus subcutaneous buprenorphine in opiate abusers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 45: 513-519 (1989).
129. JASINSKI, D. R.; PEVNICK, J. S. y GRIFFITH, J. D. Human pharmacolgy and abuse potential of the analgesic buprenorphine. *Arch. Gen. Psychiatry* 35: 501-516 (1978).
130. JEWELL, S. A.; BELLOMO, G.; THOR, H.; ORRENIUS, S. y SMITH, M. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217: 1257-1259 (1982).

131. KALSO, E. y VAINIO, A. Morphine and oxycodone hydrochloride in the management of cancer pain. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47: 639-646 (1990).
132. KAMEL, M. M. y GEDDES, I. C. A comparison of buprenorphine and pethidine for immediate postoperative pain relief by the i.v. route. *Brit. J. Anaesth.* 50: 599-603 (1978).
133. KAPLOWITZ, N.; YEE, T.; SIMON, F. R. y STOLZ, A. Drug-induced hepatotoxicity. *Ann. Int. Med.* 104: 826-839 (1986).
134. KINTZ, P.; MANGIN, P.; LUGNIER, A. A. y CHAUMONT, A. J. Toxicological Data After Heroin Overdose. *Hum. Toxicol.* 8: 487-489 (1989).
135. KLAASSEN, C. D. Biliary excretion of xenobiotics. *Crit. Rev. Toxicol.* 4: 1-25 (1975).
136. KLAASSEN, C. D. y STACEY, N. H. Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. En "*Toxicology of the Liver*". (Editado por G. Plaa y W.R. Hewitt). Raven Press; New York. pp. 147-179 (1982).
137. KLAASSEN, C. D. y WATKINS, J. B. Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36: 1-65 (1984).
138. KLATSKIN, G. Toxic and drug-induced hepatitis. En "*Diseases of the Liver*". 4 edición, (Editado por L. Schiff). J.B. Lippincott Co.; Philadelphia. pp. 604-710 (1975).
139. KNOX, P.; UPHILL, P. F.; FRY, J. R.; BENFORD, J. y BALLS, M. The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology. *Fd. Chem. Toxic.* 24: 457-463 (1986).
140. KRAYBILL, H. R. The toxicology and epidemiology of natural hepatotoxin exposure. *Isr. J. Med. Sci.* 10: 416-425 (1974).
141. KREEK, M. J. Multiple drug abuse patterns and medical consequences. En "*Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*". (Editado por H. Meltzer). Raven Press; New York. pp. 1597-1604 (1988).
142. KREEK, M. J.; DODES, L.; KANE, S.; KNOBLER, J. y MARTIN, R. Long-term methadone maintenance therapy: effects on liver function. *Ann. Intern. Med.* 77: 598-602 (1972).
143. KRETZSCHMAR, M. y KLINGER, W. The hepatic glutathione system - influences of xenobiotics. *Exp. Pathol.* 38: 145-164 (1990).
144. LAQUEUR, G. L. y SPATZ, M. Toxicology of cycasin. *Cancer Res.* 28: 2262-2270 (1968).
145. LARRAURI, A.; FABRA, R.; GOMEZ-LECHON, M. J.; TRULLENQUE, R. y CASTELL, J. V. Toxicity of paracetamol in human hepatocytes. Comparison of the protective effects of sulfhydryl compounds acting as glutathione precursors. *Mol. Toxicol.* 1: 301-311 (1987).
146. LARREY, D. Mécanismes de protection vis-à-vis de l'hépatotoxicité des médicaments. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13: 572-576 (1989).

147. LEVI, P. E. Toxic action. En "*Modern Toxicology*". (Editado por E. Hodgson y P.E. Levi). Elsevier Science Publishing Co.; New York. pp. 133-184 (1987).
148. LEWIS, J. H. Hepatic toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacol.* 3: 128-138 (1984).
149. LORA-TAMAYO, C.; TENA, T. y TENA, G. Concentrations of free and conjugated morphine in blood in twenty cases of heroin-related deaths. *J. Chromatogr.* 422: 267-273 (1987).
150. LORENZO, P. y LEZA, J. C. Buprenofina: Aspectos farmacológicos y clínicos. *Revista Clínica Española* 182: 230-233 (1988).
151. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
152. LUDWIG, J. M. D. Efectos medicamentosos sobre el hígado. *Digest. Dis. Sci.* 10: 785-796 (1979).
153. LUX, F.; BRASE, D. A. y DEWEY, W. L. Differential effects of subcutaneous and intrathecal morphine administration on blood glucose in mice: Comparison with intracerebroventricular administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 187-194 (1988).
154. MACKENZIE, J. E. y FRANK, L. W. Influence of pretreatment with a monoamine oxidase inhibitor (phenelzine) on the effects of buprenorphine and pethidine in the conscious rabbit. *Brit. J. Anaesth.* 60: 216-221 (1988).
155. MARINOVICH, M.; LORENZO, J. L.; FLAMINIO, L. M.; GRANATA, A. y GALLI, C. L. The Hep G2 cell line as a possible alternative to isolated hepatocytes in cytotoxicity studies. *ATLA* 16: 16-22 (1988).
156. MARKS, V. y CHAPPPLE, P. A. L. Hepatic dysfunction in heroin and cocaine users. *Br. J. Addict.* 62: 189-195 (1967).
157. MASANET, J.; GOMEZ-LECHON, M. J. y CASTELL, J. V. Hepatic toxicity of paraquat in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxic. in Vitro* 2: 275-282 (1988).
158. MASLANSKY, C. J. y WILLIAMS, G. M. Primary cultures and the levels of cytochrome P450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster, and rabbit liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 18: 683-693 (1982).
159. MASTEN, L. W.; PETERSON, G. R.; BURKHALTER, A. y WAY, E. L. Microsomal enzyme induction by methadone and its implications on tolerance to methadone lethality. *Nature* 253: 200-202 (1975).
160. MCEVOY, G. Opiate agonists. En "*AFHS Drug Information 90*". (Editado por G. McEvoy). American Society of Hospital Pharmacists, Inc.; Bethesda. pp. 1066-1091 (1990).

161. MCEVOY, G. Opiate partial agonists. En "*AHFS Drug Information 90*". (Editado por G. McEvoy). American Society of Hospital Pharmacists, Inc.; Bethesda. pp. 1091-1104 (1990).
162. MCLEAN, A. E. M. Determinants of toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1019-1034 (1971).
163. MEERMAN, J. H. N. Experimental modifications of biotransformation of xenobiotics. Consequences for hepatotoxicity. En "*Hepatotoxicity of Drugs*". (Editado por J.P. Fillastre). Editions Inserm; Paris. pp. 269-286 (1986).
164. MEISTER, A. y ANDERSON, M. E. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760 (1983).
165. MELLO, N. K. y MENDELSON, J. H. Buprenorphine suppresses heroin use by heroin addicts. *Science* 207: 657-659 (1980).
166. MELLO, N. K.; MENDELSON, J. H. y KUEHNLE, J. C. Buprenorphine effects on human heroin self-administration: An operant analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 30-39 (1982).
167. MIN, K. W.; GYORKEY, F. y CAIN, D. Talc granulomata in liver disease in narcotic addicts. *Arch. Pathol.* 98: 331-335 (1974).
168. MITCHELL, D. B.; SANTONE, K. S. y ACOSTA, D. Evaluation of citotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. *J. Tissue Cult. Methods* 6: 113-116 (1980).
169. MITCHELL, J. R.; JOLLOW, D. J.; GILLETTE, J. R. y BRODIE, B. B. Drug metabolism as a cause of drug toxicity. *Drug Met. Disp.* 1: 418-427 (1973).
170. MITCHELL, J. R. y JOLLOW, D. J. Metabolic activation of drugs to toxic substances. *Gastroenterology* 68: 392-410 (1975).
171. MITCHELL, J. R.; THORGEIRSON, U. P. y BLACK, M. Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: Possible relation to indrazine metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18: 70-79 (1975).
172. MOLDEUS, P.; GRUNDIN, R.; VADI, H. y ORRENIUS, S. A study of drug metabolism linked to cytochrome P-450 in isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* 46: 351-360 (1974).
173. MOORE, A.; BULLINGHAM, R.; MCQUAY, H.; ALLEN, M.; BALDWIN, D. y COLE, A. Spinal fluid kinetics of morphine and heroin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35: 40-45 (1984).
174. MOORE, A.; SEAR, J.; BALDWIN, D.; ALLEN, M.; HUNNISET, A.; BULLINGHAM, R. y MCQUAY, H. Morphine kinetics during and after renal transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35: 641-645 (1984).

175. MOORE, M.; THOR, H.; MOLDEUS, P. y ORRENIUS, S. Cytotoxic effects of reactive drug metabolites studied in isolated hepatocytes. En "*Hepatotoxicity of Drugs*". (Editado por J.P. Fillastre). Editions Inserm; Paris. pp. 111-125 (1983).
176. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65: 55-63 (1983).
177. NAGAMATSU, K.; OHNO, Y.; IKEBUCHI, H.; TAKAHASHI, A.; TERAQ, T. y TAKANAKA, A. Morphine metabolism in isolated rat hepatocytes and its implications for hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3543-3548 (1986).
178. NAKAMURA, T.; FUJII, T. y ICHIHARA, A. Enzyme leakage due to change of membrane permeability of primary cultured rat hepatocytes treated with various hepatotoxins and its prevention by glycyrrhizin. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 285-295 (1985).
179. NEUBERGER, J. y KENNA, J. G. Halothane hepatitis: a model of immunoallergic disease. En "*Liver Cells and Drugs*". (Editado por Guillouzo, A.). Colloque Inserm/John Libbey Eurotext Ltd.; London. pp. 161-173 (1988).
180. NEUBERGER, J. y KENNA, J. G. Halothane hepatitis. *Clin. Sci.* 72: 263-270 (1987).
181. NICHOLI, A. M. The nontherapeutic use of psychoactive drugs: a modern epidemic. *New Engl. J. Med.* 308: 925-933 (1983).
182. NICHOLS, J. J. Methadone Maintenance Therapy. *Med. J. Aust.* 152: 389-390 (1990).
183. NORTH, R. A. Opiates and nerve cell membranes. En "*Opioids. Past, Present and Future*". (Editado por J. Hughes, H.O.J. Collier, M.J. Rance y M.B. Tyers). Taylor & Francis Ltd.; London. pp. 53-60 (1984).
184. NUZUM, C. T. y SNODGRASS, P. Multiple assays of the five urea cycle enzymes in human liver homogenates. En "*The Urea Cycle*". (Editado por S. Grisolia, R. Baguena y F. Mayor). John Willey; New York. pp. 325-355 (1976).
185. O'BRIEN, W. M. y BAGBY, G. F. Rare adverse reaction to non-steroidal anti-inflammatory drugs. Part 1. *J. Reumathol.* 12: 13-20 (1985).
186. O'CONNOR, J. E.; CASTELL, M. y GRISOLIA, S. The potentiation of ammonio toxicity by sodium benzoate is prevented by L-carnitina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 817-824 (1987).
187. OHNO, Y.; NAGAMATSU, K.; KAWANISHI, T.; IKEBUCHI, H.; TERAQ, T. y TAKANAKA, A. Comparative evaluation of different pathways for the liver toxicity of morphine using freshly isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2862-2863 (1988).

188. OLLEY, J. E. y TIONG, G. K. L. Plasma levels of opioid material in man following sublingual and intravenous administration of buprenorphine: Exogenous/endogenous opioid interaction? *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 666-667 (1988).
189. ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. En "*Cytochrome P-450. Structure Mechanism and Biochemistry*". (Editado por P. R. Ortiz de Montellano). Plenum Press; New York. (1986).
190. PETERSON, G. M.; RANDALL, C. T. C. y PATERSON, J. Plasma levels of morphine and morphine glucuronides in the treatment of cancer pain - relationship to renal function and route of administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 121-124 (1990).
191. PLA, A.; HERNANDEZ, A. F. y VILLANUEVA, E. Mecanismos de hepatotoxicidad. *Med. Clin. (Barc.)* 91: 710-715 (1988).
192. PONSODA, X.; JOVER, R.; CASTELL, J. V. y GOMEZ-LECHON, M. J. Measurement of intracellular LDH activity in 96-well cultures: A rapid and automated assay for cytotoxicity studies. *J. Tissue Cult. Methods* (En prensa): (1990).
193. POWERS, S. G. y MEISTER, A. Urea synthesis and ammonia metabolism. En "*The Liver. Biology and Pathobiology*". (Editado por I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. pp. 251-264 (1982).
194. PRIETO, M. y BERENGUER, J. Pruebas de función hepática. En "*Gastroenterología y Hepatología*". (Editado por J. Berenguer). Ediciones Doyma; Barcelona. pp. 645-655 (1986).
195. REID, R. L. y YEN, S. S. C. β -Endorphin stimulates the secretion of insulin and glucagon in humans. *J. Clin. Endocrinol.* 52: 592-594 (1981).
196. REYNOLDS, J. E. F. Opioid analgesics. En "*Martindale. The Extra Pharmacopoeia*". 29 edición, (Editado por J.E.F. Reynolds). The Pharmaceutical Press; London. pp. 1294-1321 (1989).
197. ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.* 37: 231-249 (1988).
198. ROSS, D. Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 505-511 (1989).
199. SAPIRA J.D.; JASINSKI, D. R. y GORODETZKY, C. W. Liver disease in narcotic addicts. II. The role of the needle. *Clin. Pharmacol. Ther.* 9: 725-739 (1968).
200. SASSA, S.; SUGITA, O.; GALBRAITH, R. A. y KAPPAS, A. Drug metabolism by the human hepatoma cell Hep G2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 52-57 (1987).

201. SATOH, H.; FUKUDA, Y.; ANDERSON, D. K.; FERRANS, U. J.; GILLETE, J. R. y PHOL, L. R. Immunological studies on the mechanism of halothane-induced hepatotoxicity: immuno-histochemical evidence of trifluoro-acetylated hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 857-862 (1983).
202. SAWE, J. High-dose morphine and methadone in cancer patients: Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin. Pharmacokinetics* 11: 87-106 (1986).
203. SCHOENTAL, R. Liver disease and "natural" hepatotoxins. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 29: 823-836 (1963).
204. SEEF, L. B. Hepatitis in the drug abuser. *Med. Clin. North Am.* 59: 843-848 (1975).
205. SEIFTER, S. y ENGLARD, S. Energy metabolism. En "*The Liver. Biology and Pathobiology*". (Editado por I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. pp. 219-250 (1982).
206. SHERLOCK, S. Hepatotoxicity caused by drugs. *Ration. Drug Ther.* 22: 1-8 (1988).
207. SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Ang. Chemie.* 25: 1058-1071 (1986).
208. SIMON, E. J. y HILLER, J. M. The opiate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 371-394 (1978).
209. STEIGMAN, F.; HYMAN, S. y GOLDBLOOM, R. Infections hepatitis (homologous serum type) in drug addicts. *Gastroenterology* 15: 642-646 (1950).
210. STRANG, J. Abuse of buprenorphine. *Lancet* 2: 725 (1985).
211. STRICKER, B. H. Hepatic injury by drugs and environmental agents. En "*The Liver Annual*". Volumen 5. (Editado por I.M. Arias, M. Frenkel y J.H.P. Wilson). Elsevier Publishers B.V.; Amsterdam. pp. 419-482 (1986).
212. STROM, S. C.; JIRTLE, R. L.; JONES, R. S.; NOVICKI, D. L.; ROSEMBERG, M. R.; NOVOTHY, A.; IRONS, G.; MCKAIN, J. R. y MICHALOPOULOS, G. Isolation, culture, and transplation of human hepatocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 771-778 (1982).
213. SUOLINNA, E. M. Isolation and culture of liver cells and their use in the biochemical research of xenobiotics. *Med. Biol.* 60: 237-254 (1982).
214. TALLARIDA, R. J. y MURRAY, R. B. Analysis of variance II: two way, single observation. En "*Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*". 2 edición, (Editado por R.J. Tallarida y R.B. Murray). Springer-Verlag; New York. pp. 113-117 (1987).
215. TALLARIDA, R. J. y MURRAY, R. B. Newman-Keuls test. En "*Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*". 2 edición, (Editado por R.J. Tallarida y R.B. Murray). Springer-Verlag; New York. pp. 121-125 (1987).

216. THOMAS, W. G. Opioid analgesics. En "*Martindale: The extra pharmacopoeia*". 29 edición, (Editado por Reynolds, J.E.F.). The Pharmaceutical Press; London. pp. 1294-1321 (1989).
217. THURESON-KLEIN, A.; WANG-YANG, J. y HO, I. K. Lipid accumulation in mouse hepatocytes after morphine exposure. *Experientia* 34: 773-774 (1978).
218. TRAN-THI, T. A.; PHILLIPS, J.; FALK, H. y DECKER, K. Toxicity of D-galactosamine for rat hepatocytes in monolayer cultures. *Exp. Mol. Pathol.* 42: 96-116 (1985).
219. TYSON, C. A. Correspondence of results from hepatocyte studies with in vivo response. *Toxic. Indust. Health* 3: 459-478 (1987).
220. TYSON, C. A.; GEE, S. J.; HAWK-PRATHER, K. y STORY, D. L. Correlation between in vivo and in vitro toxicity of some chlorinated aliphatics. *Toxic. in Vitro* 3: 145-150 (1989).
221. VIND, C.; DICH, J. y GRUNNET, N. The content and activity of cytochrome P-450 in long-term culture of hepatocytes from male and female rats. *Biochem. Pharmacol.* 37: 1371-1375 (1988).
222. WALTER, A. J. Possible hepatotoxic effects of methadone. *Can. Med. Assoc. J.* 100: 265-226 (1969).
223. WILLIAMS, E. G. y OBERST, F. W. A cycle of morphine addiction. Biological and psychological studies. I Biological investigations. *Public Health Rep.* 61: 1 (1946).
224. WILLIAMS, R. T.; MILBURN, P. y SMITH, R. L. The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs. *Ann. NY Acad. Sci.* 123: 110-122 (1965).
225. WINEK, C. L. Tabulation of therapeutic, toxic, and lethal concentrations of drugs and chemicals in blood. *Clin. Chem.* 22: 832-836 (1976).
226. WORMSER, U. y BEN-ZAKINE, S. The liver slice system: an in vitro acute toxicity test for assessment of hepatotoxins and their antidotes. *Toxic. in Vitro* 4: 449-451 (1990).
227. YAMANO, S.; NISHIDA, F. y TOKI, S. Guinea-pig liver morphine 6-dehydrogenase as a naloxone reductase. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4321-4326 (1986).
228. ZERN, M. A.; SHAFRITZ, D. A. y SHIELDS, D. Hepatic protein synthesis and its regulation. En "*The Liver. Biology and Pathobiology*". (Editado por I.M. Arias, H. Popper, D. Schachter y D.A. Shafritz). Raven Press; New York. pp. 103-122 (1982).
229. ZIMMERMAN, H. J. Chemical hepatic injury and its detection. En "*Toxicology of the Liver*". (Editado por G.L. Plaa). Raven Press; New York. pp. 1-45 (1983).

230. ZIMMERMAN, H. J. Hepatic metabolism of foreign compounds. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 11-31 (1978).
231. ZIMMERMAN, H. J. Vulnerability of the liver to toxic injury. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 32-46 (1978).
232. ZIMMERMAN, H. J. The expressions of hepatotoxicity. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 47-90 (1978).
233. ZIMMERMAN, H. J. Classifications of hepatotoxins and mechanisms of toxicity. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 91-121 (1978).
234. ZIMMERMAN, H. J. Experimental hepatotoxicity. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 167-197 (1978).
235. ZIMMERMAN, H. J. Direct (toxipathic) hepatotoxins: haloalkanes and elemental phosphorus. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 198-219 (1978).
236. ZIMMERMAN, H. J. The hepatotoxic potential of a polluted environment. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 333-345 (1978).
237. ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 349-369 (1978).
238. ZIMMERMAN, H. J. Chemical hepatocarcinogenesis. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 145-164 (1978).
239. ZIMMERMAN, H. J. Indirect hepatotoxins. En "*Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*". (Editado por H.J. Zimmerman). Appleton-Century-Crofts; New York. pp. 220-276 (1978).
240. ZIMMERMAN, H. J. Pruebas de función hepática. En "*Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*". (Editado por I. Davidson y J.B. Henry). Salvat; Barcelona. pp. 825-857 (1979).



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. RAMIRO JOVER ATENZA

la calificación de APTO "cum LAUDE"

Valencia, a 15 de Marzo de 1991

El Secretario,

El Presidente

