

CITOTOXICIDAD DE LA COCAÍNA: ESPÈCIES REACTIVAS DE OXIGENO Y APOPTOSIS

ASUNCIÓN ZARAGOZA, CARMEN DíEZ-FERNÁNDEZ,
DAVID ANDRÉS, ALBERTO ALVAREZ y MARÍA CASCALES *

1. INTRODUCCION

1.1. Farmacología y toxicidad de la cocaína

La cocaína (2-β-carbometoxi-3β-benzoiloxi-tropano) (Figura 1) es un alcaloide obtenido a partir de las hojas del árbol de la coca o *Erythroxylon coca* (*E. coca bolivianum*) que fue introducido en terapéutica por sus propiedades como anestésico local. Sin embargo, este alcaloide es más conocido por su consumo ilícito debido a sus efectos estimulantes y euforizantes.

La cocaína actúa como anestésico local por bloqueo de la iniciación y conducción del impulso nervioso, inhibiendo el rápido incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio durante la despolarización. A dosis elevadas, también puede bloquear los canales de K⁺ [76]. Además de su acción local, la cocaína puede actuar a nivel sistémico sobre el sistema nervioso central, la función neuromuscular y ganglios autónomos, ya que inhibe la recaptación presináptica del neurotransmisor noradrenalina, así como la de la serotonina y la dopamina, produciendo un efecto complejo sobre el sistema dopaminérgico [28].

Los efectos de la cocaína tras una dosis de 25 a 150 mg (una línea de coca contiene 20-30 mg) son: euforia, rara vez disforia, incremento de la energía, de la agudeza

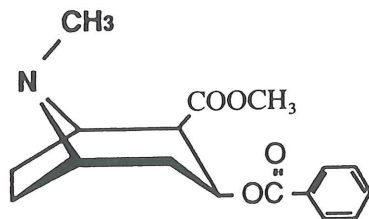


FIGURA 1. Estructura de la cocaína

* Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

mental y estado de alerta, incremento sensorial, anorexia, pérdida del sueño, disminución de la sensación de fatiga, incremento de la autoconfianza y egocentrismo. En general se admite una dependencia psíquica [34] pero no física para la cocaína, si bien se presentan síntomas debidos a una descarga simpática generalizada.

Muchos de los efectos tóxicos directos de la cocaína resultan de la intensa estimulación simpática central y/o periférica. Los efectos neuromusculares y autónomos incluyen taquicardia, hipertensión, hipertemia, midriasis, parada respiratoria y colapso cardiovascular. La estimulación del sistema nervioso central puede dar lugar a problemas neuropsiquiátricos como hiperactividad, irritabilidad, insomnio, agitación, psicosis (a menudo paranoide), delirio y coma. Otro tipo de toxicidad por cocaína de considerable interés es la observada en mujeres embarazadas que abusan de esta droga. Además de afectar el embarazo, su uso puede dañar al feto y producir anormalidades tanto en el comportamiento como en el desarrollo del neonato.

1.2. Metabolismo y hepatotoxicidad de la cocaína

La administración de la cocaína por cualquier vía sistémica provoca, además de las numerosas complicaciones descritas y las alteraciones específicas relacionadas con algunas vías de administración (necrosis del tabique nasal, edema pulmonar, etc), efectos hepatotóxicos, puestos de manifiesto tanto en animales de experimentación como en el hombre [10, 64, 84]. Observaciones previas [23, 24, 72] permitieron clasificar la droga como una hepatotóxina potente tras su administración intraperitoneal, tanto aguda como crónica. La administración de cocaína a ratones da lugar a un daño hepático severo en forma de infiltración grasa, necrosis mediozonal y periportal, y marcada elevación en los niveles de transaminasas, manifestaciones similares a las que se observan con la administración de tetracloruro de carbono. La susceptibilidad de los animales y la localización de la lesión varía según raza, especie y el uso previo de agentes moduladores del citocromo P-450, de modo que la inducción del citocromo P-450 incrementa la toxicidad y hace que la lesión hepática se aproxime hacia la zona periportal [13, 64, 69]. Según esto, la hepatotoxicidad de la cocaína no se debe a la droga como tal, sino a los productos de su metabolismo oxidativo.

El metabolismo de la cocaína transcurre principalmente por hidrólisis. El 90 % de la cocaína se transforma rápidamente, mediante la acción de pseudocolinesterasas plasmáticas y esterasas hepáticas, en benzoilecgonina, ecgonina metil éster y ecgonina [75]. Todos estos metabolitos se eliminan por orina y ninguno de ellos presenta hepatotoxicidad cuando se administran a ratones en dosis elevadas [23, 78]. Aunque las rutas hidrolíticas inactivan farmacológicamente la cocaína, la vía secundaria de su metabolismo, la oxidativa, parece ser la responsable de su hepatotoxicidad. Este proceso gira en torno al nitrógeno del anillo del tropano y los enzimas responsables de llevarlo a cabo son el sistema citocromo P-450 y la FAD-monooxigenasa, ambas monooxigenasas microsómicas de función mixta. Diversos estudios *in vivo* han demostrado que la hepatotoxicidad de la cocaína se potencia con inductores del citocromo P-450 como el fenobarbital [13] o el etanol [9], así como que el tratamiento previo con inhibidores del citocromo P-450 como la cimetidina [63] protegen frente al efecto hepatotóxico de la droga.

La superfamilia del citocromo P-450 consiste en un gran grupo de proteínas distintas con grupo hemo, implicadas en el metabolismo de numerosos xenobióticos y

compuestos endógenos [39, 58]. Las diferentes isoformas presentan el mismo centro catalítico (el hierro del grupo hemo), pero distinta apoproteína, para catalizar la oxidación de los diferentes compuestos, dando lugar a metabolitos estables o metabolitos reactivos (Figura 2); éstos últimos pueden atacar al mismo P-450 e inactivarlo, limitando la formación del intermediario y con ello su toxicidad [62]. Se ha sugerido que las familias génicas 1,2 y 3 del citocromo P-450 son las principales responsables del metabolismo hepático de los xenobióticos [37, 89], aunque existen trabajos contradictorios acerca de las formas individuales del citocromo que llevan a cabo el metabolismo N-oxidativo de la cocaína. En el hígado de rata, el CYP 2B1, inducible por fenobarbital, cataliza la N-desmetilación de la cocaína [6], mientras que en el ratón y en el hombre son las isoformas del CYP de la subfamilia 3A las principales responsables de este primer paso en la cascada de bioactivación de la cocaína [49, 61].

Así pues, una pequeña fracción de la cocaína administrada (10 %) es desmetilada por las citocromo P-450 monooxigenasas o por las FAD-monooxigenasas (Figura 3). La cocaína desmetilada, la norcocaína, se oxida rápidamente a N-hidroxinorcocaína [46], que puede dar lugar por último norcocaína nitróxido, pudiendo ser estos metabolitos los responsables de la hepatotoxicidad de la droga [36, 45]. Así mismo, el radical norcocaína nitróxido puede ser reducido nuevamente a la forma N-hidroxilada que lo originó, mediante la acción de una flavoproteína en presencia de NADPH [67]. De esta forma, el metabolismo de la cocaína desencadena un ciclo redox fútil que consume NADPH en los dos sentidos, y que además genera H_2O_2 en la oxidación de la N-hidroxinorcocaína, y O_2^- en la reducción de la norcocaína nitróxido [46]. Estos procesos tienen dos consecuencias: por un lado, la reacción de las especies reactivas de oxígeno y otros radicales formados a partir de la cocaína con cualquiera de las macromoléculas celulares, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, proteínas, nucleótidos o ácidos orgánicos, causando grandes daños en la célula, a través de la peroxidación lipídica de las membranas, lesiones al DNA u oxidación de proteínas. Por otro lado, la producción del ciclo fútil entre los dos metabolitos oxidados de la cocaína, la N-hidroxinorcocaína y la norcocaína nitróxido, disminuye los niveles de NADPH, y con ello la actividad de la glutatión reductasa dependiente de este coenzima. Este enzima se encarga de mantener los niveles de GSH que la célula necesita

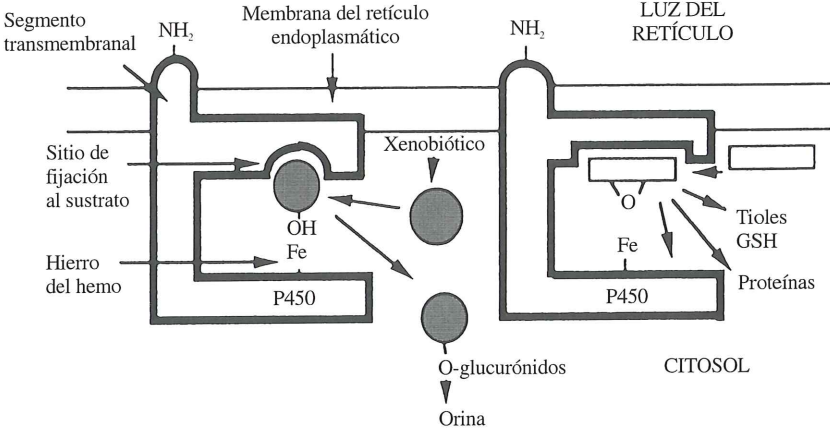


FIGURA 2. Estructura y actividad del citocromo P-450 [62]

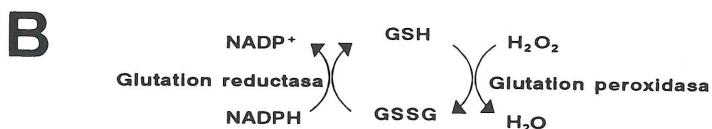
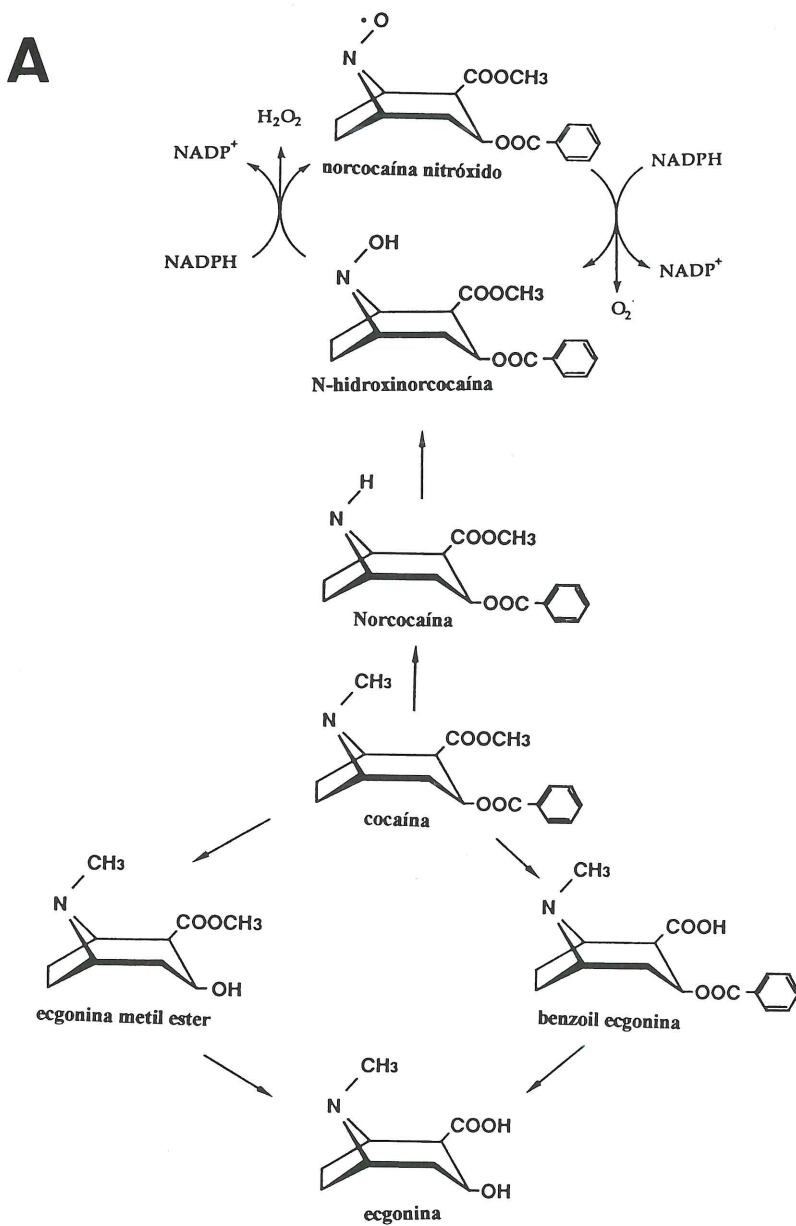


FIGURA 3. *Metabolismo de la cocaína. (A) Metabolismo hidrolítico y oxidativo de la cocaína, ciclo redox propuesto entre sus metabolitos y formación de especies reactivas de oxígeno. En (B) se representa el ciclo del glutatión*

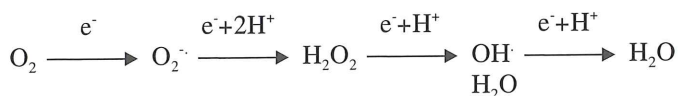
para reducir, a través de la glutatión peroxidasa, los peróxidos producidos (tanto H_2O_2 como peróxidos orgánicos) y anular sus acciones. Si el glutatión no puede ser regenerado, la defensa que ofrece su ciclo frente a agentes oxidantes queda comprometida.

Como las esterasas comparten con los enzimas oxidativos el proceso de biotransformación de la cocaína, la inhibición de las esterasas da lugar a concentraciones más elevadas de metabolitos oxidados [4]. Así, se ha visto que la acción hepatotóxica de la cocaína en el hombre depende de la idiosincrasia del individuo, siendo mayor cuando el nivel de colinesterasas es bajo [73, 84]. De igual forma, los diferentes grados de hepatotoxicidad que presenta la cocaína según la especie animal depende del porcentaje en que esta droga sea metabolizada por vía oxidativa [16]. En hepatocitos aislados de rata, la cocaína se manifiesta como hepatotóxica, lo cual no ocurre *in vivo*, debido a que el contenido en esterasas de los microsomas hepáticos es mucho menor que la actividad esterásica en plasma [68].

1.3. Radicales libres de oxígeno

El oxígeno es un elemento esencial para la vida en su papel de aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, principal fuente de energía en los organismos aerobios. Sin embargo, la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que en esta utilización del oxígeno por las células se generan radicales libres, moléculas o átomos con un electrón desapareado en su orbital más externo.

La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas «incompletamente reducidas» del oxígeno entre éste y el agua: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}):



Tanto el anión superóxido como el H_2O_2 tienen una reactividad baja, pero es de extrema importancia eliminarlos rápidamente de la célula, ya que su combinación, en presencia de metales de transición, como Fe y Cu, produce un derivado mucho más tóxico, el radical OH^{\cdot} , que sí posee una elevada reactividad, y frente al cual no existe protección enzimática [22].



La generación de radicales libres de oxígeno forma parte del metabolismo normal de las células (Figura 4). Su presencia puede ser beneficiosa para las células y, de hecho, se están produciendo continuamente en el organismo, siendo necesarios muchos de ellos para llevar a cabo ciertas reacciones biológicas. Sin embargo, puede originarse una superproducción de estas especies, como consecuencia, por ejemplo, del metabolismo de un xenobiótico, o bien una disminución de los sistemas antioxidantes de defensa, dando lugar a una situación que se conoce con el nombre de estrés oxidativo [41].

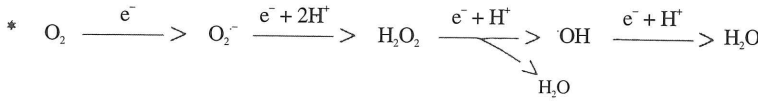
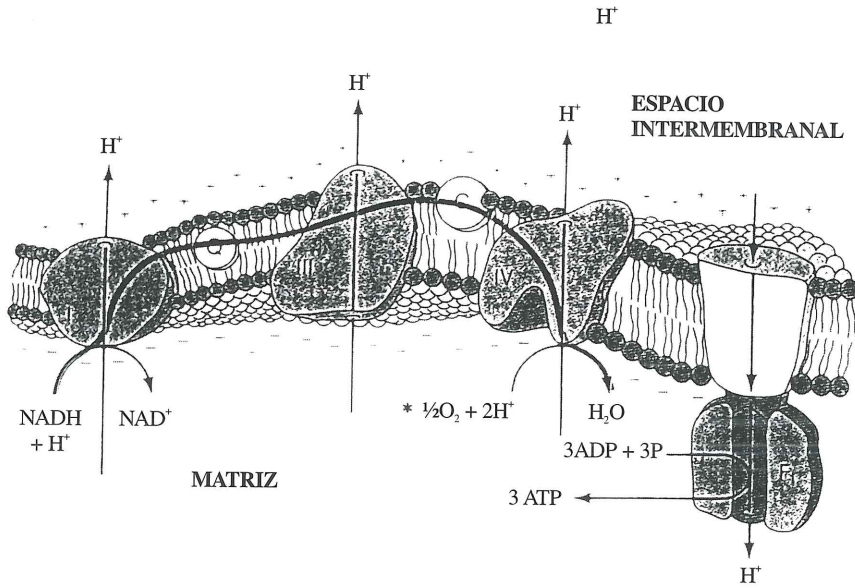
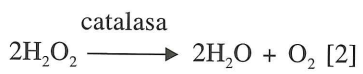
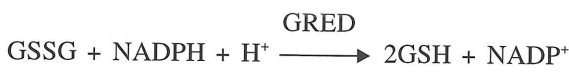


FIGURA 4. Producción de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria

Los enzimas encargados de eliminar el O_2^- y H_2O_2 son la superóxido dismutasa, que acelera la dismutación espontánea de este radical, produciendo H_2O_2 y O_2 (reacción 1); la catalasa, que transforma el H_2O_2 produciendo oxígeno y agua (reacción 2); y la glutatión peroxidasa, que reduce tanto el H_2O_2 como otros peróxidos, a la vez que oxida la forma reducida del glutatión (GSH) a su forma oxidada (GSSG) (reacción 3):



A su vez, el GSH consumido por la glutatión peroxidasa puede regenerarse a través de la glutatión reductasa (GRED). Este enzima citosólico reduce el GSSG utilizando el NADPH, equivalente reductor que puede ser generado por varios sistemas de óxido-reducción dependientes del NADPH [17].



Entre los componentes celulares hay además moléculas que presentan una particular tendencia a reaccionar con cualquiera de las especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas, que captan los radicales y frenan sus reacciones en cadena, se denominan antioxidantes. Podemos clasificar estos antioxidantes no enzimáticos en dos grupos: hidrosolubles, cuyos principales representantes son el ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión, y liposolubles, entre los que se incluyen la vitamina E y los carotenoides.

Ninguno de los sistemas antioxidantes descritos desempeña una función central en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno. Al contrario, una protección eficiente habrá de ser proporcionada por la coordinación adecuada entre todos los enzimas y demás antioxidantes de la célula (Figura 5). Cuando los radicales libres de oxígeno sobrepasan la capacidad protectora de las defensas antioxidantes, puede producirse, mediante diversos mecanismos, la lesión celular [91].

1.4. Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

La muerte celular es la consecuencia final del daño producido por un estímulo patológico, pero también es un fenómeno natural en la regulación y mantenimiento de la homeostasis en las células y tejidos del organismo. Así, es posible diferenciar dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis [42, 51]: la apoptosis tiene lugar principalmente en condiciones fisiológicas o como resultado de un estímulo patológico suave, mientras que la necrosis ocurre siempre en condiciones patológicas [50, 52].

Apoptosis y necrosis pueden caracterizarse atendiendo a los cambios morfológicos que se producen dentro de las células, pero también es posible diferenciar ambos procesos cuando se observan *in vivo*, tanto por su distribución como por las reacciones

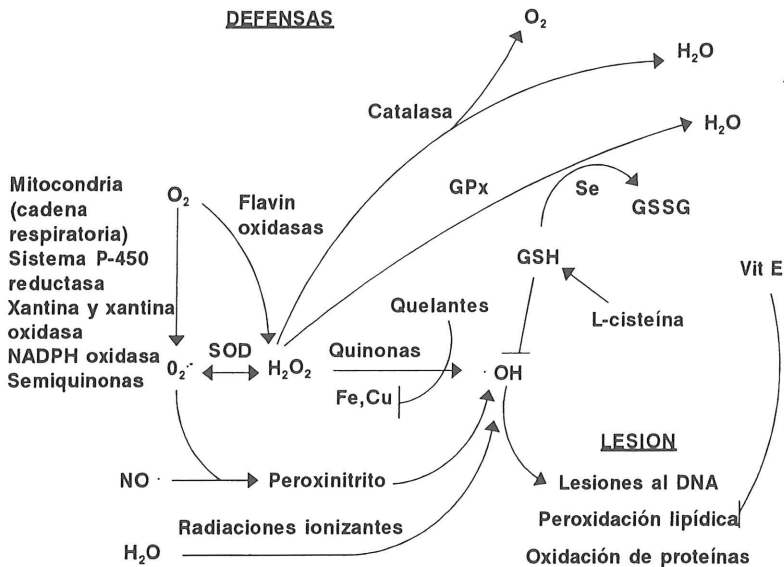


FIGURA 5. Principales rutas de formación de especies reactivas de oxígeno y defensas antioxidantes. Las reacciones no están ajustadas estequiométricamente, y solamente se recogen las más importantes [43].

tisulares que los acompañan. Así, mientras que la necrosis sucede en grupos de células contiguas y suele inducir una respuesta inflamatoria aguda, la apoptosis tiene lugar generalmente en células dispersas del tejido y no suele ir acompañada de infiltración de leucocitos. Estas y otras características de la muerte celular por apoptosis y necrosis, se resumen en la tabla 1, comparando ambos procesos [40].

La muerte celular por apoptosis es esencial para el desarrollo de los seres vivos [14, 21]. Ocurre en todos los estados de la organogénesis durante el desarrollo embrionario; se alterna con la mitosis durante el recambio normal de los tejidos, representando el balance entre la proliferación y la eliminación celular. Hoy se reconoce que la pérdida del control de la apoptosis juega un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, y quizás también incluso en el proceso de envejecimiento [11, 77].

1.4.1. Acontecimientos bioquímicos y moleculares en las células que mueren por apoptosis

Los genes y proteínas en la destrucción activa de las células representan un foco de intensa investigación en años recientes. Estos estudios, sin embargo, han revelado

Características	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Fisiológico o patológico	Patológico
Origen	Pérdida de un factor de crecimiento, influencia hormonal, estímulo tóxico suave	Anoxia, daño químico, daño físico
Propiedades de adhesión	Inmediatamente perdidas	Inicialmente intactas
Primera manifestación	Reducción celular, ecogimiento	Hinchamiento celular
Cambios nucleares	Condensación, cariorrexis	Cariolisis
Cromatina nuclear	Marginación, segmentación	Plegamiento nuclear
Cambios nucleolares	Intacto, degradado al final	Granulado
Integridad de membrana	Persiste durante un tiempo	Fallo temprano
Morfología superficie	Alisamiento, blebbing	Lisis
Cambios en superficie	Expresión de vitronectina y trombospondina	Ninguno
Cambios citoesqueleto	Protrusión en superficie, budding citoplasmático, formación cuerpos apoptóticos	Fragmentación, liberación de contenidos celulares
Mitocondria	Inicialmente no afectada	Hinchamiento, entrada de Ca^{2+}
RE/Aparato de Golgi	Inicialmente no afectados	Dilatados
Vacuolas	Estructuralmente intactas	Hinchadas (leaky)
Síntesis de proteínas	Puede bloquearse por actinomicina D y cicloheximida	No afectada por antibióticos
Cambios citoplasmáticos	$Ca^{2+} \uparrow$, endonucleasa \uparrow , transglutaminasa \uparrow $p-53 \uparrow$, $bcl-2 \downarrow$, $c-myc \uparrow$	Ruptura de lisosomas, liberación del contenido
Cambios nucleares	Ruptura internucleosomal, escalera de DNA	Degradación difusa, smear DNA
Células afectadas	Células individuales, células dispersas	Grupos de células contiguas, áreas tisulares
Eliminación	Englobamiento por macrófagos y células endoteliales	Inflamación en tejidos adyacentes
Formación de cicatrices	Ausente	Presente

TABLA 1. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis [40].

poca o ninguna evidencia para poder afirmar la existencia de genes o proteínas específicos de muerte celular. La cascada de señales intracelulares que conducen a la apoptosis parece estar estrechamente conectada con las vías que conducen a la replicación, diferenciación y reparación, pudiendo frecuentemente usar las mismas moléculas.

El programa para llevar a cabo la muerte por apoptosis está presente en la práctica totalidad de las células de los mamíferos, y puede ser activado por numerosas señales extra e intracelulares. Aunque los diferentes pasos y mecanismos bioquímicos que intervienen en la apoptosis no están completamente esclarecidos, parece claro que la apoptosis transcurre generalmente en cuatro etapas: la decisión de morir, la ejecución de la muerte, la fagocitosis de los fragmentos resultantes y, por último la degradación [74].

1.4.1.1. PREPARACIÓN PARA LA MUERTE CELULAR: DECISIÓN DE MORIR

La mayoría de los inductores o mediadores de la apoptosis pueden incluirse en una de las cinco categorías siguientes, dependiendo del lugar inicial de perturbación dentro de la célula [87]: a) agentes que actúan en la superficie celular, b) agentes que alteran el citosol y orgánulos, c) perturbadores del citoesqueleto, d) alteración del núcleo, y e) agentes que alteran la señalización intracelular. Todos ellos se resumen en la tabla 2.

<i>Sitio de acción</i>	<i>Posible mecanismo</i>	<i>Ejemplo</i>
Superficie celular	Activación receptores de membrana Alteración permeabilidad de la membrana	Glutamato, NMDA, Kainato Ionóforos: A23187, ionomicina Inhibidores del transporte de iones: amiloride, ouabaína Detergentes: triton X-100
Citosol y orgánulos	Oxidantes intracelulares Quelantes Alteración de síntesis proteica Alteración de gradientes iónicos	Menadiona TPEN, deferoxamina Inhibidores transcripción: actinomicina D Inhibidores traducción: cicloheximida R.Endoplásmico: tapsigargina Vacuolas: bafilomicina, concanamicina A Mitocondria: MPTP
Citoesqueleto	Alteración estructura Alteración filamentos actina	Taxol, colchicina, vincristina Citochalcinas
Núcleo	Ruptura integridad del DNA	Alteración estructura: adriamicina Inhibición síntesis: metotrexato, pirimidinas fluoradas
Señales intracelulares	Alteración expresión génica Alteración fosforilación proteica Alteración transducción señal Segundo mensajero erróneo en TNF, Fas, radiaciones	Hormonas nucleares: vit D, glucocorticoides Aumento: ácido okadaico, PMA Inhibición: estaurosporina Aumento: análogos AMPc Inhibición: flutamida, tamoxifeno Ceramida

TABLA 2. Agentes que inducen la apoptosis. Abreviaturas utilizadas: MPTP, *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NMDA, *N*-metil-*D*-aspartato; PMA, 12-miristato-13-acetato de forbol; TNF, factor de necrosis tumoral; TPEN, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenodiamina [87].

1.4.1.2. EJECUCIÓN DE LA MUERTE CELULAR, FAGOCITOSIS Y DEGRADACIÓN

La apoptosis muestra un patrón de muerte celular característico [79, 90]. Los primeros cambios afectan a las uniones con células vecinas, ya que se produce la pérdida de las regiones de contacto y otras estructuras especializadas de la membrana. A continuación, el citoplasma se encoge, el núcleo se agrupa en forma de masas condensadas, que después se fragmentarán, y la célula pierde su forma inicial. Al investigar la causa de las alteraciones del tamaño celular durante la apoptosis, se observa un incremento en la densidad, lo que sugiere la pérdida selectiva de agua y electrolitos conservándose las estructuras más densas. La rápida salida de agua de la célula ocurre por la dilatación del retículo endoplásmico y su posterior fusión con la membrana citoplasmática. Se ha atribuido esta pérdida selectiva de fluidos a la inhibición de un sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ [88]. También durante este período se ha detectado actividad transglutaminasa en las células afectadas [25, 26]. Estos enzimas forman puentes cruzados entre proteínas, haciéndolas insolubles incluso frente a los agentes desnaturizantes más fuertes. La presencia de un armazón rígido de proteínas entrecruzadas bajo la membrana de las células apoptóticas podría ser la causa de la alteración de la forma y también de la disminución del volumen celular.

La condensación de la cromatina nuclear es la alteración más significativa que tiene lugar durante la apoptosis [1], debida a la desorganización de su estructura al producirse la ruptura de la doble cadena del DNA a nivel de las regiones que unen los nucleosomas, conduciendo a la fragmentación del DNA en oligonucleosomas de ± 200 kDa o algún múltiplo de este número (Figura 6). Como responsable de la fragmentación, se ha identificado una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, activa a pH neutro, que es inhibida por zinc [35].

Tras la fragmentación de la cromatina nuclear, la célula se divide en los denominados cuerpos apoptóticos, cada uno rodeado de membrana conteniendo sus orgánulos

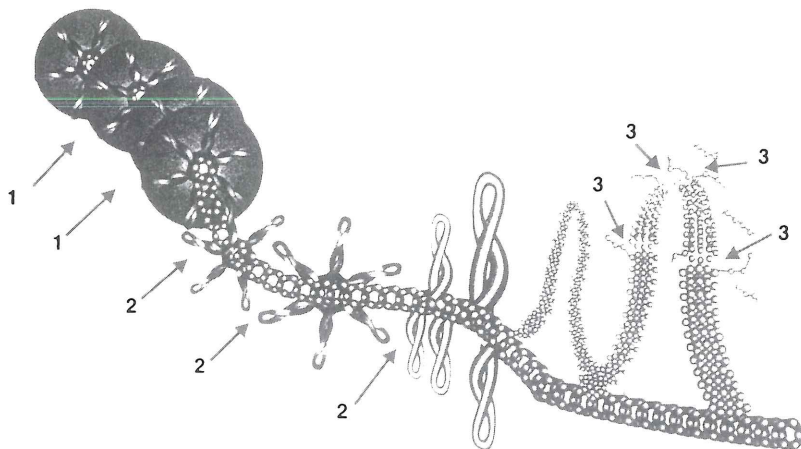


FIGURA 6. Sitios de fragmentación de la cromatina. El modelo de la estructura de la cromatina está tomado de Filipski et al. [27]. Las flechas muestran los tres niveles a los que actúan las endonucleasas sobre el DNA, que representan tres niveles de organización de la cromatina nuclear [83].

y fragmentos de DNA, que son englobados por células parenquimales vecinas o células fagocitarias especializadas. Las propias células apoptóticas inducen su fagocitosis mediante cambios en su membrana citoplasmática, observándose recientemente que los macrófagos humanos se unen a neutrófilos apoptóticos a través de su receptor vitronectina, un miembro de la familia de las integrinas que se había considerado únicamente como una molécula de adhesión celular [70].

Una vez incluidos en el interior del fagosoma, los cuerpos apoptóticos se degradan rápidamente, hasta que desaparecen membranas, orgánulos y demás estructuras celulares. Al contrario que en la necrosis, no hay liberación del contenido celular al medio extracelular.

1.4.2. *Acontecimientos bioquímicos y moleculares en las células que mueren por necrosis*

Los primeros cambios morfológicos que ocurren durante la necrosis resultan de la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana. El citoplasma y los orgánulos celulares van aumentando progresivamente de volumen, la célula adquiere una apariencia homogénea, opaca, y se incrementa la eosinofilia del citoplasma. Todos estos cambios terminan con la destrucción de los orgánulos, la liberación del contenido celular al medio extracelular y, finalmente, la desintegración de las membranas celulares. Es muy fácil reconocer todas estas modificaciones, pero resulta más difícil definir tanto las causas como las vías y mecanismos bioquímicos a través de los cuales se produce. Entre estos mecanismos merecen destacarse cinco clases de acontecimientos: a) ubiquitinación de las proteínas celulares, b) depleción del ATP, c) formación de especies reactivas de oxígeno, d) alteración de la homeostasis del calcio, y e) pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana.

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, abundante en todas las células eucariotas y con una estructura muy conservada entre las diferentes especies. En presencia de ATP, forma enlaces covalentes con residuos de lisina de otras proteínas y su síntesis se induce, junto con la de las proteínas del choque térmico (hsp), durante la lesión celular. Su principal función parece ser el marcaje de las proteínas que han resultado dañadas para su degradación. Las proteínas modificadas pueden acumularse en el citoplasma en forma de inclusiones, mostrando con ello la incapacidad de las células dañadas de hacer frente a la incrementada concentración de proteínas marcadas para la degradación [44].

En las células que mueren por necrosis se detecta una depleción del ATP, observándose que el aumento de volumen del citoplasma y la pérdida de la homeostasis celular solamente aparecen cuando los niveles de ATP disminuyen por debajo de ciertos valores críticos. Esto se ha demostrado durante el daño celular que sigue a situaciones de hipoxia [31], puesto que el suministro de oxígeno es necesario para que las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial sinteticen ATP. Sin embargo, la disminución de los niveles de ATP no parece ser causa suficiente para producir la necrosis, aunque limita el desarrollo de las funciones celulares que dependen de él.

Las especies reactivas de oxígeno, generadas por adición de electrones al oxígeno molecular, si llegan a sobrepasar la capacidad protectora de los sistemas antioxidan-

tes de la célula, pueden provocar la muerte celular mediante diversos mecanismos, por reacción con las macromoléculas celulares. Al reaccionar con los lípidos, se desencadena la peroxidación lipídica de las membranas celulares, alterando su permeabilidad, siendo las de la mitocondria las más vulnerables, quizá porque a la elevada producción de estas especies reactivas (por la presencia de grandes cantidades de oxígeno y metaloproteínas) se suma su elevado contenido en dobles enlaces C-C. La reacción de los derivados de oxígeno con las proteínas, principalmente a nivel de sus grupos tiólicos, tiene especial relevancia en el equilibrio iónico celular, ya que la Ca-ATPasa y la Na/K-ATPasa de las membranas contienen numerosos grupos SH. La acción de las especies de oxígeno sobre el DNA incluye, además de la ruptura de las cadenas de la molécula, otro efecto secundario: la inducción del enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa, con la consiguiente pérdida del ADP celular, que conduce a la reducción de los nucleótidos de adenina (incluyendo el ATP) a niveles críticos. Además de provocar estas reacciones, la producción de especies reactivas de oxígeno altera el equilibrio redox de la célula. Por ejemplo, se genera NADP⁺ en la mitocondria sujeta a estrés oxidativo a expensas de la disminución de los niveles de NADPH, lo que conduce a la salida de calcio al citoplasma. Así, en resumen, las especies reactivas de oxígeno provocan el aumento de la permeabilidad de la membrana, la inhibición de las bombas iónicas, la depleción del ATP y el aumento del calcio citosólico [56].

El aumento incontrolado del calcio citosólico se considera tanto una causa como un resultado de la muerte celular [59]. El aumento del calcio intracelular induce una serie de mecanismos que van a desencadenar un ciclo continuo de reacciones que conducirán a la lesión celular: así, las proteasas dependientes de calcio, una vez activadas, serían las responsables de la destrucción de las Ca-ATPasas de las membranas celulares, impidiendo que la célula recupere sus niveles normales de calcio citosólico. Así mismo, las alteraciones en la morfología de la célula necrótica podrían deberse a la interacción de estas proteasas con elementos del citoesqueleto [60]. Las fosfolipasas sensibles al calcio también se activarían originando la alteración de los fosfolípidos de las membranas que así aumentarían su permeabilidad a muchos solutos.

La pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana es una de las principales características que permite identificar la necrosis. Se produce como resultado de todos los procesos anteriormente descritos, y es la desencadenante de las alteraciones morfológicas que determinan la destrucción de la célula.

1.5. Objetivos

Los cultivos primarios de hepatocitos se utilizan cada vez con mayor frecuencia para estudiar los mecanismos de acción de compuestos hepatotóxicos. Sin embargo, debido al proceso de desdiferenciación sufrido por las células hepáticas en este tipo de cultivos, es frecuente observar un descenso de los niveles de enzimas citosólicos y de otros enzimas específicos del hígado, entre los que se encuentran las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450, a través del cual se lleva a cabo fundamentalmente el metabolismo oxidativo de la cocaína. Por esta razón, los hepatocitos se aíslan de ratas pretratadas con inductores enzimáticos, con objeto de elevar la expresión de los sistemas microsómicos dependientes del citocromo P-450 y mantener su actividad a lo largo de todas las horas de cultivo.

Mediante el uso de este modelo experimental nos propusimos los objetivos siguientes:

- A. Examinar la toxicidad de la cocaína sobre cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital frente a variables de tiempo y concentración.
- B. Evaluar cuantitativamente en función de la concentración y mediante técnicas de imagen la generación de radicales libres de oxígeno.
- C. Establecer la relación entre niveles de radicales libres y muerte celular.
- D. Detectar la capacidad apoptogénica de la cocaína sobre los hepatocitos en cultivo mediante técnicas de imagen, gel de agarosa y citometría de flujo.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Productos

Los medios de cultivo fueron suministrados por BioWhittaker. Los ácidos, bases y sales minerales utilizados fueron de las casas comerciales Merck y Panreac, en su grado analítico. La colagenasa fue de Boehringer, la heparina sódica de Leo y la agarosa de Hispanagar. El diacetato de fluorescina y Hoechst 33258 fueron de Molecular Probes, mientras que el yoduro de propidio fue de Sigma. El clorhidrato de cocaína fue suministrado por el Servicio de Restricción de Estupefacientes del Ministerio de Sanidad y Consumo.

2.2. Animales

Se utilizaron ratas macho de 2 meses (200-250 g) de la raza Wistar. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y control de temperatura, con libre acceso a pienso de la casa comercial Sanders S.A. y agua.

Con el fin de inducir el sistema monooxigenasa microsómico, encargado del metabolismo oxidativo de la cocaína, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis diaria de 80 mg/Kg de fenobarbital sódico durante los cinco días anteriores al experimento.

2.3. Obtención de hepatocitos y cultivos celulares

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo por perfusión del hígado *in situ* con medio Hepes (Hepes 20 mM, KCl 5 mM, SO_4Mg 1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5 mM, ClNa 150 mM y Glucosa 10 mM) con colagenasa, de acuerdo con el método clásico de Krebs *et al* [47] y descrito por Díez-Fernández *et al* [20] que permite obtener hepatocitos con un elevado porcentaje de viabilidad.

La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante tinción de exclusión con una solución de Azul de Tripán (preparada al 0,2% en suero salino). Las células

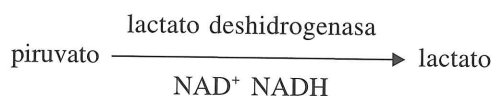
muertas o con la membrana plasmática dañada aparecen teñidas al observarlas al microscopio óptico, mientras que las que permanecen vivas y mantienen su membrana íntegra no incorporan el colorante al interior de la célula y aparecen sin teñir. El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se consideró óptima cuando dió valores superiores al 90%.

Las células obtenidas se cultivaron en placas de 60-mm a una densidad de 7.1×10^4 células/cm² en 3 ml de medio DMEM suplementado con penicilina, estreptomycin y gentamicina a una concentración de 50 µg/ml (DMEM completo) y 10% FCS (suero fetal de ternero). Tras un período de tres horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/ 95% aire, el medio fue reemplazado por DMEM completo en el que se substituyó el FCS por albúmina de suero bovina (BSA) al 0.1%.

2.4. Tratamiento con cocaína y determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

Después de una incubación de 24 horas se procedió a la adición a los cultivos de medio fresco con las diferentes concentraciones de cocaína (0, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000 mM) durante un período de 24 horas.

La actividad de la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27.), como parámetro de daño irreversible de la membrana y muerte celular [86], se determinó espectrofotométricamente en el medio de cultivo y en el interior celular midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD⁺ en la reacción de reducción del piruvato a lactato [81], según el siguiente proceso:



empleándose en los cálculos un coeficiente de extinción para el NADH = $6,2 \times 10^6$ M⁻¹ Cm⁻¹ (extinción de 1 mmol de NADH en 1,00 ml de solución).

La concentración que los diferentes reactivos alcanzaron en la cubeta fue la siguiente: tampón Tris-HCl 67,5 mM a pH 7,4; NADH 0,3 mM; y piruvato 4 mM a pH 7.

2.5. Análisis por citometría de flujo y microscopía confocal de la producción de radicales libres de oxígeno

La producción intracelular de radicales libres de oxígeno se determinó usando el compuesto 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), siguiendo el método descrito previamente [3]. El compuesto tiene la particularidad de atravesar la membrana celular, dado su carácter no polar. Las células viables son capaces de desacetilar el compuesto dando lugar a la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente, estable algunas horas y que al ser polar queda atrapado en el interior de la célula. Este intermediario reacciona cuantitativamente con las especies reactivas de oxígeno intracelulares produciendo el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina, que puede medirse como un índice de la capacidad oxidativa intracelular.

2×10^6 hepatocitos tratados con las diferentes concentraciones de cocaína se tripsinizaron con tripsina-EDTA e incubaron a 37°C durante 30 minutos con 3 ml de PBS conteniendo DCFH-DA 5 μ M y yoduro de propidio 10 μ g/ml, preservando las muestras de la luz. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, cuantificándose la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, analizándose 10.000 células por muestra.

Para la determinación de la producción de radicales libres de oxígeno por microscopía confocal, los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂/ 95% aire con DCFH-DA (5 μ M en PBS) y yoduro de propidio (10 μ g/ml) durante 30 minutos, procediéndose seguidamente al lavado de las placas dos veces con PBS. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su observación en el microscopio confocal.

2.6. Ensayos morfológicos

Las características morfológicas típicas de la apoptosis, tales como el cambio de forma de la membrana, la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, así como la formación de los cuerpos apoptóticos, pueden reconocerse por tinción de las células con fluorocromos y posterior observación al microscopio de fluorescencia. El compuesto utilizado fue el Hoechst 33258, un fluorocromo derivado del benzimidazol que emite fluorescencia azul cuando se excita por la luz ultravioleta a 360 nm. Presenta una alta afinidad por el DNA, preferentemente por las regiones ricas en el par adenina-timina.

Tras el tratamiento de las células con las diversas dosis de cocaína, éstas se fijaron durante 5 minutos en frío con una mezcla de metanol/acético 3:1. Después, se adicionó a las placas el Hoechst (5 μ g/ml), manteniéndose durante 10 minutos, tras los cuales se lavaron las placas con agua destilada. Finalmente, las células se mantuvieron en una solución de ácido cítrico 20 mM, orto-fosfato disódico 50 mM y glicerol al 50% (pH 5,5) hasta su examen al microscopio.

2.7. Análisis de la fragmentación del DNA

La fragmentación del DNA se detectó por electroforesis en geles de agarosa [55]. Este procedimiento está basado en la observación de que el DNA aislado de células apoptóticas se encuentra dividido a nivel de los segmentos que unen los nucleosomas por la activación de una endonucleasa endógena. Los fragmentos de DNA resultantes, de 200 pares de bases o múltiplo de este número, se desplazan a través del gel y aparecen en forma de bandas escalonadas.

Las células, junto con el medio de cultivo, se recogieron en PBS y, tras centrifugar a 50 g durante 2 minutos, se trataron con 0,5 ml de buffer de lisis de pH 7,8 que contenía N-laurilsarcosin al 0,5% en Tris-HCl 0,1 M y EDTA 10 mM. Tras mantener durante 30 minutos en baño de hielo y centrifugar durante 30 minutos a 13.000 rpm, se recogió el sobrenadante, que se incubó, primero, con RNAsa A a una concentración final de 10 μ g/ml a 37°C durante 30 minutos, y en segundo lugar con proteinasa K a una concentración final de 250 μ g/ml a 50 °C durante 45 minutos. Después, se realizó la extracción del DNA con fenol-cloroformo, y se precipitó el DNA extraído con 2

volúmenes de etanol absoluto y ClNa 0,5 M durante 2 días a -20°C. Tras lavar el precipitado obtenido con etanol al 75%, el DNA se resuspendió en 20 µl de una solución formada por Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 30 V durante 8 horas a través de un gel de agarosa al 1,8% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, visualizándose y fotografiándose el DNA usando luz UV.

2.8. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en poblaciones de hepatocitos

Mediante la utilización del citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca), equipado con un laser de argón de 15 mW, se llevó a cabo el estudio a nivel celular del contenido y distribución del DNA. Este parámetro se considera de gran utilidad para determinar la cito y genotoxicidad de los xenobióticos [18]. Las células se analizaron utilizando un test suministrado por Bio-Rad basado en el método de Vindelev *et al* [82]. 2×10^6 hepatocitos se tripsinizaron con tripsina-EDTA, se lavaron con una solución tampón de sacarosa 130 mM, citrato trisódico 40 mM y DMSO, y se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis por citometría de flujo, en el cual se añadió yoduro de propidio, siguiendo las indicaciones del test, manteniéndose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron 10.000 células por muestra. La señal procedente del yoduro de propidio se recogió por un DM 610 nm y se seleccionó mediante un BP 630/30. Los datos se adquirieron utilizando un módulo discriminador de dobletes (DDM) para recoger las señales fluorescentes provenientes de células únicas.

2.9. Métodos estadísticos

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o cuadruplicado de un número variable de experimentos que se especifican en cada caso. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la t de Student. El nivel de significación estadística se definió como $p < 0,01$.

3. RESULTADOS

3.1. Efectos citotóxicos de la cocaína en cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas inducidas con fenobarbital

Durante el desarrollo de modelos experimentales para la evaluación de los efectos tóxicos de xenobióticos, la utilización de métodos rápidos, reproducibles y baratos ha sido un requerimiento esencial. La liberación de enzimas citoplasmáticos por parte de las células dañadas al medio de cultivo ha demostrado ser un método muy útil para la evaluación de la toxicidad en cultivos primarios obtenidos de una gran variedad de órganos, incluyendo corazón, hígado y riñón. Específicamente, este método evalúa la capacidad de la membrana plasmática de retener los enzimas celulares. La lactato deshidrogenasa (LDH) es un enzima exclusivamente citosólico y su liberación al medio de cultivo tras la exposición a xenobióticos se relaciona con la ruptura de la permeabilidad de la barrera celular, la membrana plasmática [86].

Los cultivos de hepatocitos, aislados de ratas tratadas con fenobarbital durante cinco días, fueron expuestos a concentraciones crecientes de cocaína (1-2.000 μM) durante 24 horas midiéndose la liberación de LDH al medio de cultivo como un índice de muerte celular (Figura 7).

Los resultados obtenidos indican que el efecto citotóxico es dependiente de la concentración. Así, la actividad de la LDH en el medio fue aumentando progresivamente, siendo significativo este aumento a partir de dosis de cocaína de 250 μM . A concentraciones intermedias de cocaína (50-100 μM) el porcentaje de liberación de LDH al medio de cultivo ya sufre incrementos con respecto al control, siendo los valores de un 17% para el control, y de un 31% y 32% para concentraciones de cocaína de 50 y 100 μM respectivamente.

Paralelamente, tras la adición de la cocaína a los cultivos, se midieron las variaciones experimentadas en la actividad de la LDH en el medio a lo largo de la duración del cultivo. Las muestras se tomaron al cabo de 2, 10 y 24 horas de incubación, y los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 3. Como puede observarse, a medida que transcurre el tiempo de incubación se va produciendo un incremento de la liberación del enzima al medio, como consecuencia de la pérdida de la viabilidad celular, de modo que el efecto citotóxico resultó ser también tiempo dependiente.

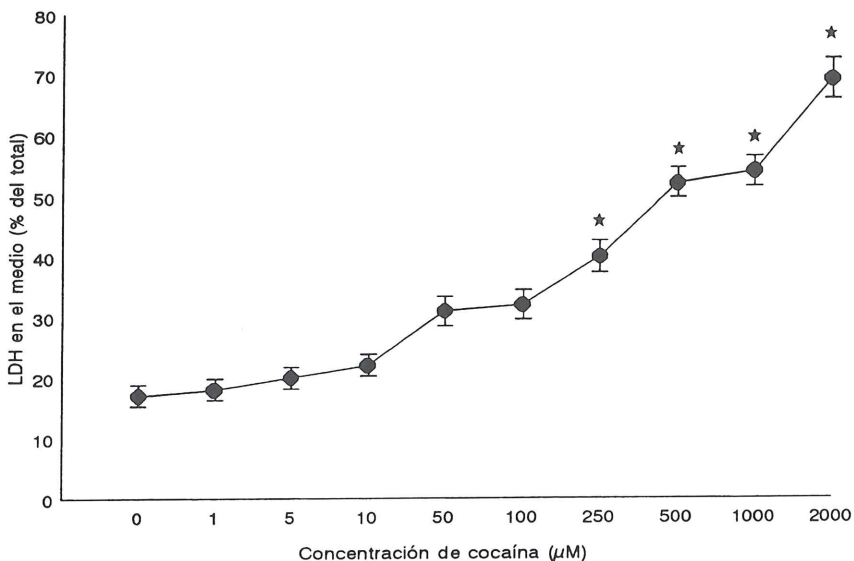


FIGURA 7. Efectos citotóxicos de la cocaína en hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital. Los hepatocitos en cultivo primario se incubaron con concentraciones crecientes de cocaína durante 24 horas. Después del tratamiento, la citotoxicidad se evaluó midiendo el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Los resultados son media de tres placas procedentes de dos animales distintos. La t de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (* $p < 0,01$).

Concentración de cocaína (μM)	Tiempo		
	2 horas	10 horas	24 horas
0	6,9 \pm 0,7	5,9 \pm 0,6	17,1 \pm 0,9
1	7,1 \pm 0,7	6,0 \pm 0,8	18,0 \pm 1,3
5	7,5 \pm 1,0	6,3 \pm 0,8	20,2 \pm 1,9
10	7,5 \pm 0,9	6,9 \pm 0,3	22,3 \pm 1,2
50	7,0 \pm 0,6	8,2 \pm 0,5	31,0 \pm 2,9
100	6,8 \pm 0,6	9,1 \pm 0,9	31,9 \pm 3,4
250	7,8 \pm 1,3	10,1 \pm 1,3	40,6 \pm 4,9*
500	8,4 \pm 1,1	10,4 \pm 1,2	52,3 \pm 4,9*
1.000	9,0 \pm 1,4	12,6 \pm 1,4*	54,0 \pm 5,3*
2.000	10,2 \pm 1,3	22,4 \pm 1,7*	68,8 \pm 6,2*

TABLA 3. Liberación de LDH al medio de cultivo. La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó en el medio de cultivo, tomando muestras a las 2, 10 y 24 horas de incubación. Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de actividad del enzima liberado al medio. Los resultados son media de tres placas procedentes de dos experimentos representativos. La *t* de Student fue calculada por comparación de los resultados frente al control (* $p < 0,01$).

3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno determinada por citometría de flujo

Para investigar la causa de los efectos citotóxicos de la cocaína, puestos de manifiesto al medir la liberación de enzimas citosólicos al medio, se procedió a medir por citometría de flujo la producción de radicales libres de oxígeno por las células como un posible mecanismo desencadenante de la hepatotoxicidad de la droga [7, 45]. Las especies reactivas de oxígeno, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, pueden ser generadas por diversas vías durante el metabolismo de numerosos xenobióticos. Tanto el O_2^- como el H_2O_2 presentan una reactividad muy limitada, de modo que su importancia reside en la posibilidad de producir el OH^\cdot , altamente reactivo, con la participación de metales de transición.

La producción de estas especies reactivas de oxígeno se valoró en los hepatocitos tratados con cocaína durante 24 horas, utilizando el fluorocromo 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), altamente sensible en la detección del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos. Este compuesto, una vez incorporado a las células, es desacetilado y posteriormente oxidado por los peróxidos celulares para generar el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo se muestran en la Figura 8, donde se pueden observar los histogramas de un experimento representativo en los que se representan en abscisas la intensidad relativa de fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína frente al número de células en ordenadas. La Tabla 4 recoge el correspondiente análisis cuantitativo. Por una parte, se observa la elevada producción de peróxidos a concentraciones bajas de cocaína (entre 5 y 100 μM , alcanzando valores máximos a dosis de 10 μM). Por otra, la producción relativa de peróxidos se encuentra disminuida en las células tratadas con las dosis más altas de cocaína, a partir de 250 μM , concentraciones que ya resultan bastante tóxicas según los ensayos de liberación de LDH al medio, expuestos anteriormente.

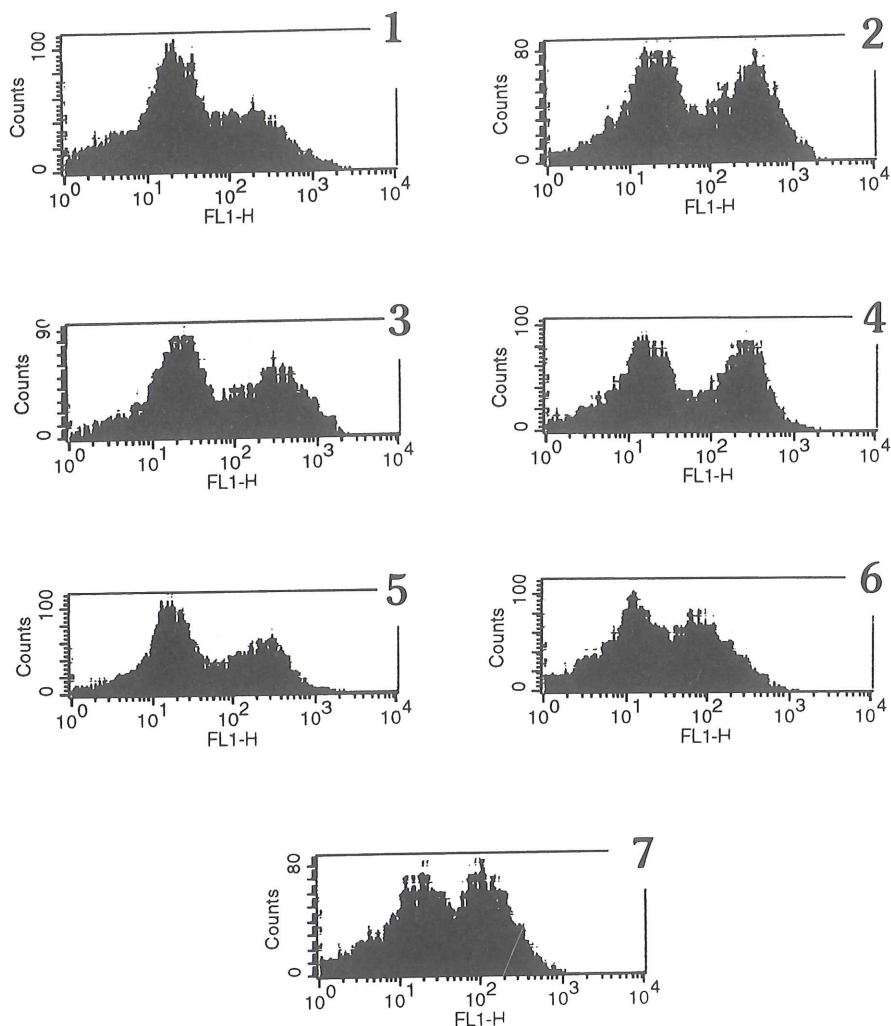


FIGURA 8. Análisis citométrico de la producción de peróxidos. Los hepatocitos tratados con cocaína durante 24 horas se incubaron con IP y DCFH-DA durante 30 min, analizándose las diferentes muestras por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo de las células tratadas con (1) 0, (2) 10, (3) 50, (4) 100, (5) 250, (6) 500 y (7) 1.000 mM de cocaína.

3.3. Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal

Para comprobar los resultados registrados citométricamente, se procedió a analizar la producción de peróxidos utilizando la microscopía confocal. Las aplicaciones de la microscopía confocal son las mismas que las de la microscopía de fluorescencia, la de campo claro o la de contraste de fases, con las ventajas del aumento de resolución y la capacidad de incrementar los contrastes sin disminuir dicha resolución. Se siguió el procedimiento que se detalla en el capítulo de Material y Métodos, escaneando las células una sola vez con el laser, ya que la DCF es tan sensible a la oxidación que la

<i>Concentración de cocaína (μM)</i>	<i>Intensidad media de fluorescencia (unidades arbitrarias)</i>
0	268 \pm 28
1	272 \pm 26
5	309 \pm 33*
10	371 \pm 35*
50	330 \pm 28*
100	285 \pm 32
250	207 \pm 18*
500	142 \pm 16*
1.000	162 \pm 14*
2.000	135 \pm 14*

TABLA 4. *Análisis citométrico de la producción de próxidos. Intensidad relativa de fluorescencia de la DCFH como medida de la producción de peróxidos por las células tratadas con las diferentes dosis de cocaína. Los resultados son media de tres placas tomadas de dos experimentos representativos (* $p < 0.01$).*

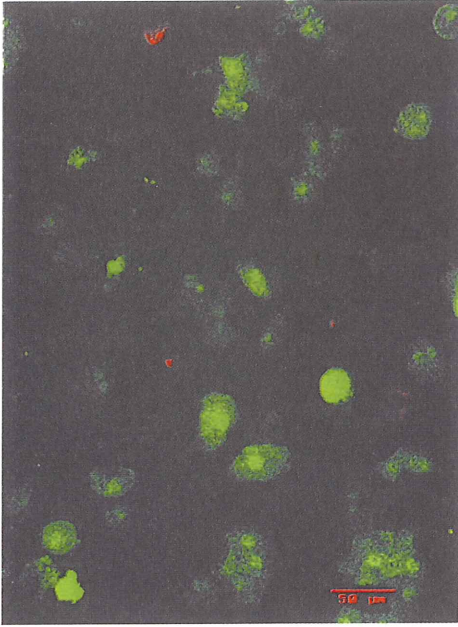
exposición a la luz laser puede inducir foto-oxidación, resultando en una fluorescencia incrementada [54]. Las fotografías (figura 9) muestran las imágenes obtenidas al incubar las células durante 30 minutos con DCFH-DA y yoduro de propidio. Las fotografías A, B, C, D, E y F corresponden a las concentraciones de cocaína de 0, 50, 100, 250, 500 y 2.000 μM , respectivamente.

En principio podemos apreciar, por la señal correspondiente al yoduro de propidio, que los cultivos tratados con las concentraciones más altas de cocaína ensayadas, principalmente 500 y 2.000 μM , aparecen mucho más teñidos (fluorescencia roja), indicando por tanto una mayor proporción de células muertas que los controles y las células tratadas con las dosis bajas de la droga. Por otra parte, la señal correspondiente a la diclorofluoresceína (fluorescencia verde) nos indica la presencia de peróxidos en las células, más abundante a medida que vamos incrementando la concentración de cocaína pero que parece disminuir al aumentar la señal del IP (concentraciones tóxicas de la droga). En estas últimas, la mayoría de los hepatocitos muestran una intensidad de fluorescencia baja, indicando que la producción de peróxidos está disminuida; sin embargo, algunas células aisladas aparecen fuertemente teñidas con el fluorocromo.

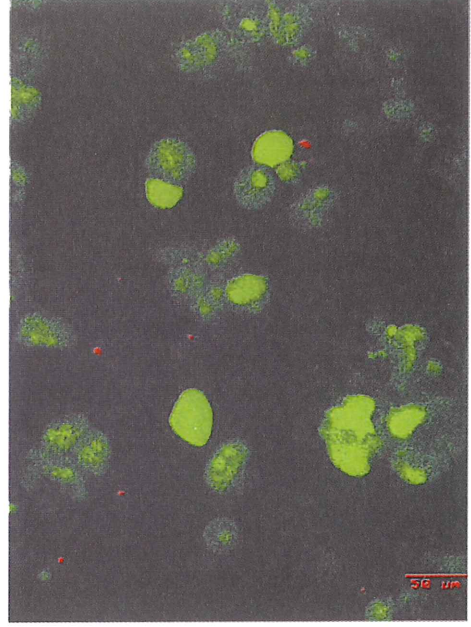
3.4. Identificación morfológica de la muerte celular

El análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular por microscopía confocal, reveló la existencia de células apoptóticas en los diferentes cultivos ensayados. Esta observación, nos llevó a intentar corroborar la presencia de apoptosis con otros experimentos.

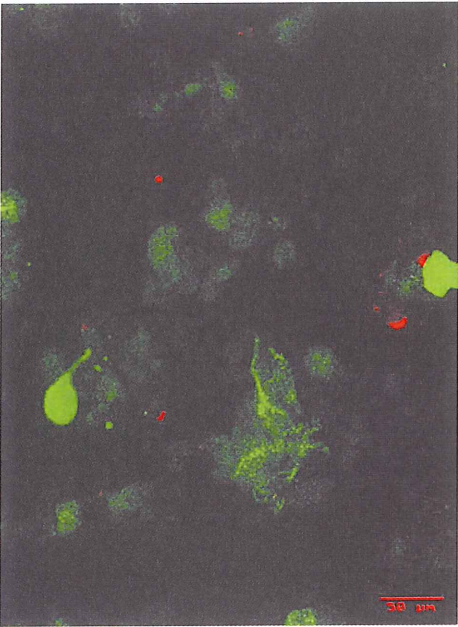
La identificación de la muerte celular por apoptosis por microscopía óptica se basa principalmente en la observación de los cuerpos apoptóticos resultantes de la fragmentación de las células. En cultivos celulares, las células apoptóticas son fáciles de reconocer hasta fases tardías de su degradación, si se utiliza algún compuesto fluorescente capaz de formar complejos con el DNA celular. En estas células puede observarse la



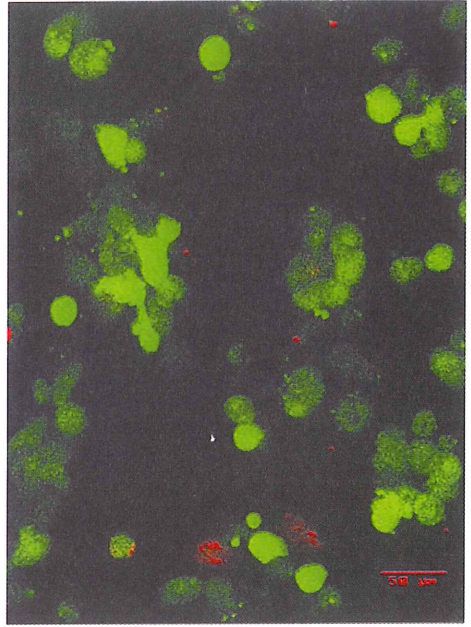
A



B

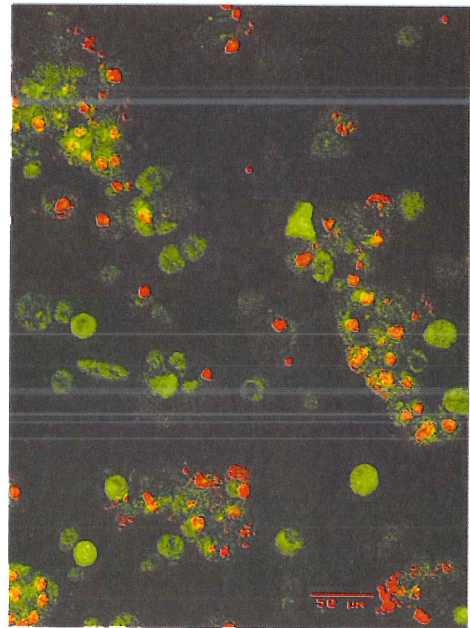
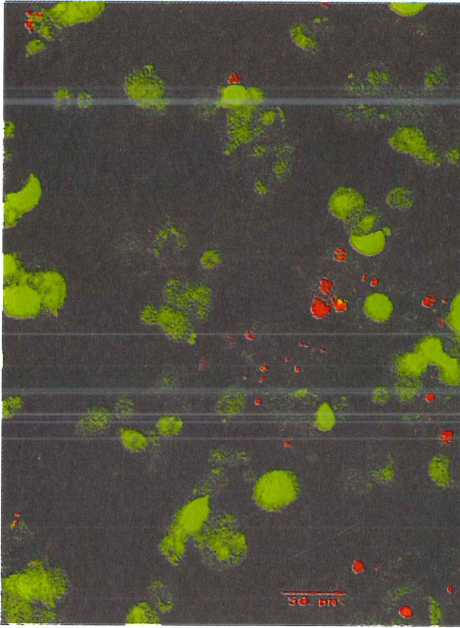


C



D

FIGURA 9. Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 50, (C) 100, (D) 250, (E) 500 y (F) 2.000 μM de cocaína.



E

F

FIGURA 9 (cont.). Producción de especies reactivas de oxígeno analizada por microscopía confocal. Imágenes obtenidas al incubar las células con IP y DCFH-DA durante 30 min, tratadas con (A) 0, (B) 50, (C) 100, (D) 250, (E) 500 y (F) 2.000 μM de cocaína.

cromatina nuclear condensada, dividida en fragmentos rodeados de membrana y que aparecen agrupados, resultando muy fácil distinguirlas del resto de las células.

Las fotografías muestran la morfología de los cultivos de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, no tratados con cocaína (Fotografías 1 y 2) y tratados con cocaína en dosis de 10 μM (Fotografías 3 y 4), 50 μM (Fotografías 5 y 6) y 1.000 μM (Fotografías 7 y 8), tras proceder a la tinción de las células con el compuesto Hoechst 33258. En cada caso se muestra la imagen obtenida al hacer incidir sobre las células luz ultravioleta, así como la correspondiente al contraste de fases. En los hepatocitos control vemos las células agrupadas con los núcleos teñidos intactos, detectándose pocas células apoptóticas. Los cultivos tratados con la droga están más deteriorados, más cuanto mayor es la concentración de cocaína, y en ellos aparecen las células apoptóticas con su morfología característica, aisladas de los grupos de células vivas.

3.5. Análisis de la fragmentación del DNA

Tras la observación microscópica de la morfología celular, se procedió a valorar los cambios estructurales que sufre la cromatina nuclear con el objeto de verificar la muerte celular por apoptosis. La presencia y distribución del DNA fragmentado se visualizó y fotografió según se indica en el apartado 2.7. de Material y Métodos, aislando el DNA para después analizarlo por electroforesis en gel de agarosa. Se

procesó el DNA de los hepatocitos en cultivo, aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, no tratados y tratados con concentraciones crecientes de cocaína. La fotografía obtenida se muestra en la Figura 10, observándose que las bandas resultantes del desplazamiento del DNA fragmentado a través del gel presentan una intensidad máxima a concentraciones de cocaína d 100 μM .

3.6. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo

El estudio de las variaciones en el DNA celular en poblaciones hepatocelulares se considera un análisis de gran precisión en determinaciones sobre la citotoxicidad y la genotoxicidad de xenobióticos. El citómetro de flujo puede cuantificar la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, así como los cambios producidos por agentes químicos sobre la ploidía de las células, cuando se marca el DNA celular con diversos compuestos fluorescentes, tales como el yoduro de propidio. Así podemos distinguir, según la intensidad de fluorescencia emitida, células con contenido normal de DNA (correspondiente a la fase G_0/G_1), células con el doble del contenido normal de DNA (fase G_2/M), y valores intermedios asignados a la fase S del ciclo celular. Los núcleos apoptóticos pueden reconocerse por la aparición de un pico en la región hipodiploide, que puede observarse a la izquierda de la fase G_0/G_1 en el histograma.

Una vez comprobada la existencia de muerte celular por apoptosis, observando las características morfológicas del cultivo y analizando la fragmentación del DNA nuclear, se procedió a evaluar, en las muestras obtenidas a partir de cultivos de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital, la proporción de hipodiploidía consecuencia del tratamiento con concentraciones crecientes de cocaína, de 1 a 2.000 μM , durante 24 horas. Con este fin, se procesaron dichas muestras analizando las distintas poblaciones en base a su contenido en DNA. En la Figura 11 se representa

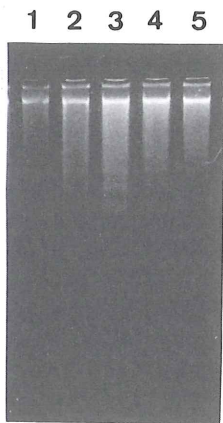


FIGURA 10. Análisis de la fragmentación del DNA por electroforesis en gel de agarosa en hepatocitos de rata tratados con cocaína. El DNA se aisló de células tratadas con cocaína (1) 5 μM , (2) 100 μM , (3) 500 μM , (4) 1.000 μM y (5) 2.000 μM . Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% visualizándose con EtBr. El gel es representativo de dos experimentos realizados en cultivos procedentes de dos animales diferentes.

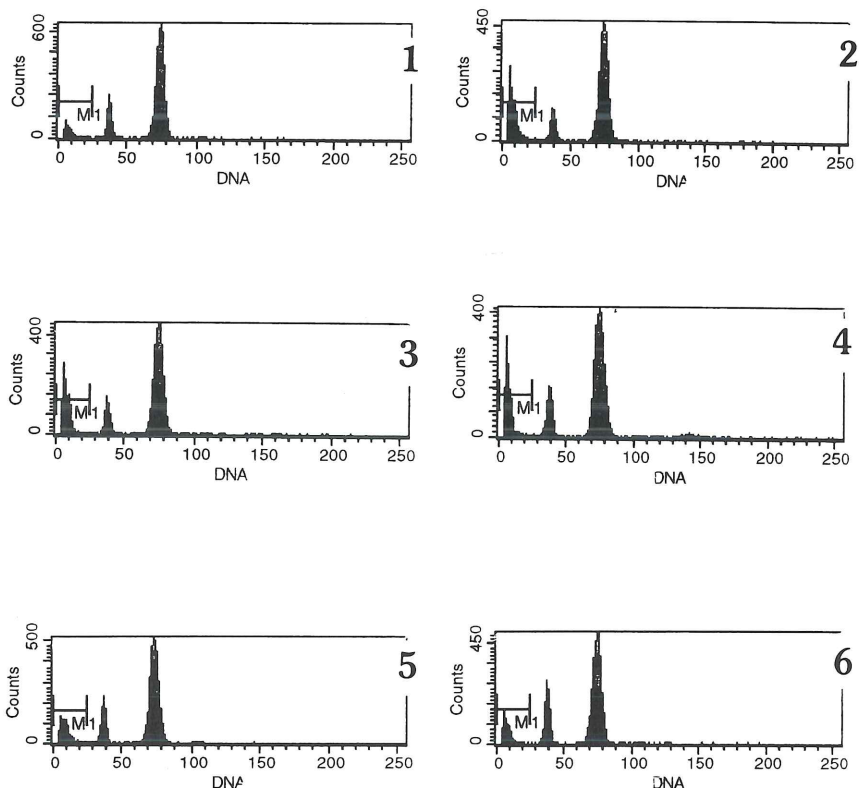


FIGURA 11. Análisis del contenido del DNA por citometría de flujo. Las células tratadas con cocaína se tripsinizaron y trataron según las indicaciones del kit kinesis 50 para determinación del ciclo celular. Se muestran los histogramas de un experimento representativo correspondientes a las células tratadas con (1) 0, (2) 50, (3) 100, (4) 250, (5) 1.000 y (6) 2.000 μM de cocaína.

en los distintos histogramas el contenido de DNA en abcisas, evaluado por la fluorescencia emitida a 623 nm por el complejo formado por el DNA y el yoduro de propidio, frente al número de células en ordenadas. El análisis cuantitativo de los picos hipodiploides de cada histograma se muestra en la Tabla 5. Los resultados coinciden con los obtenidos al analizar la fragmentación del DNA, ya que, como puede observarse, el porcentaje de hipodiploidía va incrementándose con la dosis de cocaína, hasta llegar a un máximo a concentraciones de 50-100 μM , en que se alcanza un 20% de células apoptóticas, valor a partir del cual disminuye dicha proporción. La disminución de la hipodiploidía comienza a dosis de 250 μM , concentración en la que, según nuestras observaciones anteriores, se acentuaba el efecto necrótico de la cocaína y comenzaba a decrecer la producción de peróxidos.

4. DISCUSION

La cocaína es un alcaloide que puede utilizarse en terapéutica debido a su potente efecto anestésico local y vasoconstrictor. Sin embargo, su consumo en la actualidad

Concentración de cocaína (mM)	Porcentaje de hipodiplodía
0	7,99 ± 0,9
1	12,95 ± 1,3
5	16,62 ± 2,1
10	19,73 ± 3,1*
50	20,98 ± 2,9*
100	20,32 ± 2,6*
250	18,73 ± 2,5*
500	17,70 ± 2,6
1.000	16,44 ± 2,8
2.000	13,83 ± 3,1

TABLA 5. Porcentaje de hipodiplodía analizado por citometría de flujo. Cuantificación de los histogramas mostrados en la Figura 3. Los resultados son media de tres placas tomadas de dos experimentos representativos (* $p < 0.01$).

como droga de abuso, junto con el conocimiento de sus efectos tóxicos y complicaciones a distintos niveles, ampliamente descritos en páginas anteriores, ha llevado a los investigadores a profundizar en los mecanismos por los que la cocaína provoca tan graves efectos [2, 5, 71]. En estudios anteriores de nuestro grupo referentes a la hepatotoxicidad de la cocaína [32, 33] se demostró que su toxicidad *in vivo* se eleva en animales pretratados con fenobarbital, lo cual indica que la capacidad necrogénica de esta droga se debe a su biotransformación oxidativa a través del sistema monooxigenasa de función mixta dependiente del citocromo P-450. En otros trabajos [13] se describió por primera vez que esta droga administrada *in vivo* era capaz de originar cambios específicos en la distribución del DNA e inducía la apoptosis en ratones pretratados o no con fenobarbital.

En el presente trabajo, se han investigado los efectos hepatotóxicos de la cocaína utilizando un modelo *in vitro*: cultivos primarios de hepatocitos aislados de ratas pretratadas con fenobarbital. La capacidad del fenobarbital de potenciar la hepatotoxicidad de la cocaína es un hecho comprobado [13, 32, 33]. Cuando el sistema microsómico oxidativo elevó su actividad mediante un tratamiento previo con fenobarbital, la severidad de la lesión hepática se elevó notablemente y su ubicación intraacinar experimentó un espectacular cambio desde la región perivenosa (en hígado no tratado con fenobarbital) a la región periportal. Esto demuestra que los sistemas oxidantes responsables de la biotransformación de la cocaína se encuentran irregularmente distribuidos en el acino hepático y son inducibles por fenobarbital.

Numerosos experimentos han mostrado que los enzimas oxidativos microsomales desempeñan un papel importante en la hepatotoxicidad inducida por cocaína [6, 46, 61, 78], y debido a la ausencia de efectos tóxicos de la droga en cultivos de hepatocitos de ratas no pretratadas con fenobarbital [36], todos los experimentos se realizaron con hepatocitos aislados tras la inducción previa del sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450.

Con el fin de evaluar el efecto tóxico de la cocaína sobre los hepatocitos en cultivo, se procedió a medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio [86], método por el cual podemos detectar la pérdida de la integridad de la membrana

plasmática y que, como se indicó en la introducción, es la principal característica que permite evaluar *in vitro* la muerte celular por necrosis.

En estas condiciones experimentales, hemos podido comprobar que la cocaína ocasiona un daño letal cuando se adiciona a hepatocitos en cultivo obtenidos de ratas pretratadas con fenobarbital y que el grado de toxicidad depende tanto de la concentración de la droga como de la duración del tratamiento. Esto nos ha permitido establecer las condiciones idóneas, respecto a la concentración y al tiempo de incubación, a ser utilizadas durante el presente trabajo. Por una parte, hemos observado que a tiempos muy cortos (2 horas) las variaciones en la liberación de LDH al medio no eran prácticamente detectables, y que a las 10 horas de cultivo comenzaban a detectarse cambios significativos en presencia de concentraciones elevadas del tóxico. Por tanto, decidimos mantener las células en incubación durante 24 horas, período en el que se detectaron aumentos progresivos y significativos en la actividad de LDH liberada al medio frente a incrementos progresivos en la concentración de droga. En estas condiciones de incubación, se obtuvo una curva en la que un 70 % de las células resultaron destruidas al ser expuestas a la máxima concentración de cocaína ensayada (2 mM). De acuerdo con estos resultados, está claro que en nuestros cultivos de hepatocitos la funcionalidad del sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 permanece intacta y es operativa.

Una vez establecida la capacidad citotóxica de la cocaína sobre cultivos primarios de hepatocitos, el siguiente paso fue abordar el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad de la droga y entre ellos, la participación de las especies reactivas de oxígeno en dicha hepatotoxicidad. El demostrar esta participación reforzaría la observación de que la cocaína, al metabolizarse por vía oxidativa, genera metabolitos que, al sufrir un ciclo redox, consumidor de NADPH en ambos sentidos, da como resultado la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno [46]. Hasta la fecha, no existe una evidencia directa de la generación de estas especies reactivas de oxígeno por efecto de la oxidación de la cocaína en las células hepáticas. Existen observaciones indirectas que relacionan la hepatotoxicidad de la cocaína con el daño oxidativo en los hepatocitos, involucrando posiblemente un daño mitocondrial [7, 10, 36, 53]. Por ejemplo, se ha observado la protección que proporciona el quelante de hierro, la desferrioxamina, pero no el antioxidante α -tocoferol, frente al daño celular inducido por cocaína, lo cual es indicativo de la existencia de mecanismos oxidativos dependientes de hierro e independientes de la peroxidación lipídica [36]. Además, existen evidencias sobre el descenso de glutatión reducido y el incremento de los niveles de malondialdehído en hígado de ratón tratado con cocaína [13, 32], y la formación de glutatión oxidado en hepatocitos de rata cultivados en presencia de esta droga [7], que sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de la cocaína.

Como la respuesta de cada célula al tóxico es heterogénea, es difícil en experimentos *in vivo* y por métodos convencionales encontrar la verdadera causa/efecto. Por ello se requiere investigar la progresión de la lesión inducida por agentes tóxicos sobre células aisladas, para observar en espacio y tiempo la secuencia de eventos que preceden y conducen a la muerte celular.

Por todo ello, y mediante el análisis por citometría de flujo, hemos determinado los niveles relativos de especies reactivas de oxígeno en los hepatocitos utilizando el compuesto 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA), que posee la capaci-

dad de atravesar las membranas celulares, y una vez en el interior de la célula se hidroliza a 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH). Por oxidación, la 2',7'-diclorodihidrofluorescina se convierte en 2',7'-diclorofluorescina (DCF), cuya fluorescencia es específica en la detección de peróxidos [19, 29]. Así, hemos podido observar que en las células tratadas durante 24 horas con dosis bajas de cocaína el contenido en peróxidos se incrementaba marcadamente, mientras que, en los cultivos de hepatocitos tratados con dosis más elevadas de la droga, se encontraba disminuida la capacidad de las células de oxidar la diclorofluorescina. Por este método se han podido detectar las variaciones en el contenido de peróxidos de los hepatocitos dependientes de la concentración de cocaína adicionada al medio.

Resultados similares se obtuvieron examinando la morfología de las células por microscopía confocal, técnica que permite visualizar *in situ* en células individuales la muerte celular (apoptosis o necrosis) mediante la fluorescencia del yoduro de propidio y la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la fluorescencia de la DCF.

De acuerdo con los datos obtenidos, la generación de especies reactivas de oxígeno está involucrada en la secuencia de acontecimientos que conduce a la muerte celular, sugiriéndose que en esta secuencia el incremento en la generación de estas especies reactivas ha de preceder a la manifestación de la toxicidad. Las evidencias obtenidas anteriormente por nuestro grupo sobre la inducción de la muerte celular por apoptosis en hígado de ratón tratado con cocaína [13], nos han llevado a investigar sobre el papel apoptogénico de esta droga [57] y la posible relación entre los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis en hepatocitos en cultivo [48].

La muerte celular por apoptosis puede ocurrir después del tratamiento con una gran variedad de compuestos tóxicos, unas veces precediendo a la aparición de la necrosis y otras coexistiendo con ella. Dependiendo de las células, la dosis y/o los estímulos desencadenados puede observarse apoptosis, necrosis o ambos fenómenos [8].

Para verificar la existencia de muerte celular por apoptosis, hemos realizado diversos ensayos, comprobando por una parte la presencia de células apoptóticas y necróticas en nuestros cultivos por observación directa al microscopio de fluorescencia de las placas del cultivo de los hepatocitos tratadas con el fluorocromo Hoechst 33258, y por otro lado la existencia de fragmentación del DNA por electroforesis en geles de agarosa. Aunque durante la necrosis se ha observado que también se produce fragmentación del DNA, ésta es aleatoria, ya que no aparece en los geles la gradación escalonada de las bandas típica de la apoptosis.

El análisis por microscopía confocal reveló la existencia de células apoptóticas cuya aparición parecía relacionarse con la producción de radicales libres de oxígeno. Esta observación es consistente con el hecho de que el estrés oxidativo da lugar a la inducción de actividad endonucleasa aportando evidencias de una relación estrecha entre los radicales libres y la iniciación de la apoptosis [30, 66, 80].

La apoptosis se puede demostrar claramente si además de mostrar la típica escalera del DNA en el gel de agarosa, analizamos las imágenes obtenidas al fotografiar las células después de teñir su DNA con un fluorocromo, ya que coincidiendo con la opinión de otros autores, las características universales que siempre se pueden observar durante la apoptosis son los cambios morfológicos sufridos por las células, tales como

la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo [15, 38]. Tales cambios son difíciles de reconocer a nivel histológico, pero en células procedentes de los cultivos que nosotros hemos utilizado, pueden apreciarse con facilidad los cambios descritos. Las imágenes de las células al microscopio de fluorescencia muestran la presencia de células apoptóticas en todos los cultivos tratados con el tóxico, y el aumento de células necróticas al elevar la concentración de cocaína. Por otra parte, la electroforesis en gel de agarosa del DNA muestra una fragmentación máxima frente a concentraciones 100 μM de la droga.

Estos resultados, que evidencian la capacidad apoptogénica de la cocaína sobre cultivos de hepatocitos de rata, se vieron reforzados con los obtenidos por citometría de flujo, por cuantificación del pico hipodiploide (<2C) obtenido cuando los hepatocitos incubados con cocaína se analizaron por su contenido en DNA y su ploidía después de ser tratados con yoduro de propidio. De esta manera pudimos obtener otro parámetro que nos permitió evaluar las variaciones en la proporción de células con un contenido hipodiploide de DNA en cultivos de hepatocitos como consecuencia de la exposición a las diferentes concentraciones de cocaína del presente trabajo. Aunque la hipodiploidía puede acompañar o no a la apoptosis, todos los ensayos coincidieron. Por análisis de la fragmentación del DNA en gel de agarosa, por observación directa de las células teñidas con Hoechst 33258, y por cuantificación de la población hipodiploide se ha llegado a la conclusión de que la máxima apoptosis inducida por cocaína se consiguió a concentraciones de 100 μM .

Los histogramas de DNA de los hepatocitos expuestos a las concentraciones más elevadas de cocaína no indican una degeneración de las células en el ciclo celular, puesto que todavía es aparente la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo, en respuesta a la exposición a cocaína 2 mM. De los resultados citométricos obtenidos se desprende también la existencia de un porcentaje considerable de células apoptóticas en los controles. Esto puede reflejar el hecho de que los cultivos no contengan todas las citoquinas y los factores de crecimiento apropiados. Sin embargo, coincide con otros estudios que demuestran que los hepatocitos en cultivo sufren un proceso de ruptura del DNA muy lento, pero que se incrementa con la duración del cultivo [12]. Otro aspecto a tener en cuenta para explicar el destacado porcentaje de células apoptóticas en los controles es el pretratamiento con fenobarbital. El fenobarbital, al igual que otros promotores tumorales, cuando se administra a animales en las condiciones del presente trabajo, da lugar a una hiperplasia en hígado. Esta hiperplasia desaparece al cesar el tratamiento con fenobarbital, debido a que las células mueren por apoptosis [13]. Quizás los hepatocitos en cultivo sufren la apoptosis al carecer de fenobarbital en el medio. Experimentos con hepatocitos de ratas no pretratadas con fenobarbital nos aclararán estas dudas.

Relacionamos los resultados de la actividad de LDH en el medio con los obtenidos al analizar por citometría de flujo la población con un contenido hipodiploide de DNA, teniendo en cuenta que la muerte celular por apoptosis se caracteriza por el mantenimiento de las propiedades de la membrana, mientras que la liberación de enzimas citosólicas al medio es característica de la necrosis. De esta forma, el aumento brusco de la actividad de LDH en el medio de cultivo que se registra a partir de concentraciones de 250 μM de cocaína ha de ser debido al aumento de la muerte celular por necrosis, mientras que en puntos inferiores a esta concentración la muerte de las células se produciría fundamentalmente por apoptosis. Efectivamente, el porcentaje de células

mueras por apoptosis detectado por citometría de flujo fue incrementándose progresivamente hasta alcanzar el máximo a concentraciones de cocaína de 50-100 μM , a partir de las cuales la proporción de células apoptóticas fue disminuyendo. Podríamos concluir que como resultado de la administración de dosis bajas de cocaína se induce la apoptosis, mientras que el resultado del tratamiento con el mismo tóxico pero a dosis más altas es la necrosis. Refiriéndonos concretamente a las concentraciones de cocaína utilizadas en este trabajo, la apoptosis tiene lugar predominantemente en cultivos tratados con dosis de cocaína hasta 100 μM , mientras que la necrosis se produce en presencia de concentraciones superiores a 250 μM . Esta concentración de cocaína coincide con una disminución de la población de hepatocitos hipodiploides, y con un incremento considerable de la liberación de LDH al medio.

Estas observaciones refuerzan la noción de que el nivel y la duración del estímulo lesivo, más que su naturaleza, determinan el modo de muerte [52]. El daño celular por peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones permite que la célula active los mecanismos que conducen a la muerte celular por apoptosis, mientras que a altas concentraciones se induce la muerte por necrosis en el mismo tipo celular [50].

Con el objeto de profundizar sobre los mecanismos responsables de la respuesta celular frente a la generación de especies reactivas de oxígeno, se está llevando a cabo en el momento presente el análisis de las variaciones en la expresión génica y la actividad de diversos sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Estas investigaciones, unidas a la acción de diferentes antioxidantes exógenos nos ayudarán a conocer más sobre el papel de las especies reactivas de oxígeno en la hepatotoxicidad de la cocaína.

5. CONCLUSIONES

1. Los hepatocitos de rata, inducidos con fenobarbital y precultivados durante 24 horas, representan un modelo óptimo para estudiar *in vitro* los mecanismos celulares responsables de la hepatotoxicidad de la cocaína. El efecto citotóxico de la droga, evaluado por la liberación de lactato deshidrogenasa al medio, es dependiente tanto de la concentración de cocaína (0-2 mM) como de la duración del tratamiento (2, 10 y 24 horas).

2. Como resultado de la exposición de las células a diferentes concentraciones de cocaína y durante 24 horas de incubación se generan especies reactivas de oxígeno, cuya producción, evaluada por citometría de flujo, muestra los valores máximos a concentraciones de cocaína entre 5 y 50 μM . Por microscopía confocal pudo detectarse la aparición de especies reactivas de oxígeno en células tratadas con diclorofluorescina.

3. La exposición a cocaína *in vitro* conduce a la muerte celular (apoptosis y/o necrosis). La capacidad apoptogénica de la cocaína presentó un máximo a concentraciones de cocaína de 50-100 μM . La apoptosis fue detectada por evaluación de la fragmentación del DNA, por visualización por microscopía de fluorescencia de la condensación de la cromatina y por cuantificación de la población hipodiploide.

4. De estos resultados se sugiere que existe una relación estrecha entre los niveles intracelulares radicales de oxígeno generados en la biotransformación de la cocaína y la apoptosis.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Arends MJ, Morris RG y Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* **136**, 593-608 (1990).
2. Barroso-Moguel R, Mendez-Armenta M y Villeda-Hernández J. Experimental nephropathy by chronic administration of cocaine in rats. *Toxicology* **98**, 41-46 (1995).
3. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC y Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**, 190-1917 (1983).
4. Benuck M, Reith MEA, Sershen H, Wiener HL y Lajtha A. Oxidative metabolism of cocaine. Comparison of brain and liver (42822). *Proc Soc Exp Biol Med* **190**, 7-13 (1989).
5. Billman GE. Cocaine: A review of its toxic actions on cardiac function. *Critical Reviews in Toxicology* **25**, 113-132 (1995).
6. Boelsterli UA, Lanzotti A, Göldlin C y Oertle M. Identification of cytochrome P-450 IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **20**, 96-101 (1992).
7. Boelsterli UA, Wolf A y Goldling C. Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. *Hepatology* **18**, 1154-1161 (1993).
8. Bortner CD, Oldenburg NBE y Cidlowski JA. *Trends Cell Biol* **5**, 21-26 (1995).
9. Boyer CS y Peterson DR. Potentiation of cocaine-mediated hepatotoxicity by acute and chronic ethanol. *Alcohol Exp Res* **14**, 28-31 (1990).
10. Boyer CS y Peterson DR. Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse. *Hepatology* **14**, 1209-1216 (1991).
11. Bursch W, Oberhammer F y Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *TIPS* **13**, 245-251 (1992).
12. Cain K, Salmaan H, Hussain I, Covet C, Qin H y Oberhammer F. A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time depended increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF-B1 treatment. *Cytometry* **23**, 312-321 (1996).
13. Cascales M, Alvarez A, Gascó P, Fernández-Simón L, Sanz N y Boscá L. Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001 (1994).
14. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* **14**, 126-130 (1993).
15. Collins R, Harmon B, Gobe G y Kerr J. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criteria for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* **61**, 451-453 (1992).
16. Connors S, Rankin DR, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Koep LJ y Brendel K. Cocaine hepatotoxicity in cultured liver slices: a species comparison. *Toxicology* **61**, 171-183 (1990).
17. Cotgreave IA, Moldeus P y Orrenius S. Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **28**, 189-212 (1988).
18. Dallas CE y Evans DL. Flow cytometry in toxicity analysis. *Nature* **345**, 557-558 (1990).
19. Dawson T, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B y Lemasters JJ. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* **264**, C961-C967 (1993).

20. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A y Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* **18**, 912-918 (1993).
21. Ellis RE, Yuan J y Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* **7**, 663-689 (1991).
22. Elstner EF. Oxygen radicals - biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* **69**, 949-956 (1991).
23. Evans MA. Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **224**, 73-79 (1983).
24. Evans MA y Harbison RD. Cocaine induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **45**, 739-745 (1978).
25. Fesus L, Thomazy V y Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* **224**, 104-108 (1987).
26. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E y Piacentini M. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* **245**, 150-154 (1989).
27. Filipinski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M y Walker PR. Periodicity of DNA folding in higher order chromatine. *EMBO J* **9**, 1319-1327 (1990).
28. Galoway MP. Neurochemical interactions of cocaine with dopaminergic system. *TIPS* **9**, 451-454 (1988).
29. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N y Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcriptional nuclear factor-kB: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Molecular Pharmacology* **48**, 825-834 (1995).
30. Gardner AM, Xu F-H, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y y Lichtenstein A. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **22**, 73-83 (1997).
31. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A y Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **267**, 6654-6663 (1992).
32. Gascó P. Hepatotoxicidad inducida por cocaína en ratón. Alteraciones funcionales, bioquímicas y morfológicas durante la necrosis y regeneración hepática. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense. Madrid. pp. 1-227 (1993).
33. Gascó P, Fernández-Simón L, Martín-Sanz P, Díez-Fernández C, Sancho M, Sanz N y Cascales M. Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de la lesión celular en ratón. *Rev Toxicol* **11**, 105-111 (1994).
34. Gawin FH y Kleber HD. Cocaine abuse treatment. *Arch Gen Psychiatry* **41**, 903-909 (1984).
35. Giannakis C, Forbes IJ y Zalewski PD. Ca²⁺/Mg²⁺-dependent nuclease: tissue distribution, relationship to internucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* **52**, 504-510 (1991).
36. Göldlin C y Boelsterli UA. Reactive oxygen species and non-peroxidative mechanisms of cocaine-induced cytotoxicity in rat hepatocyte cultures. *Toxicology* **69**, 79-91 (1991).
37. González FJ. The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacol Rev* **40**, 243-288 (1989).
38. Green D, Bissonnette R y Cotter T. Apoptosis and cancer. En: *Important advances in oncology 1994* (eds V DeVita, S Hellman y S. Rosenberg) pp 37-52, Philadelphia, Lippincott (1994).
39. Guengerich FP y Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by

- human cytochrome p-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* **4**, 391-401 (1991).
40. Haanen C y Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflammation* **4**, 5-15 (1995).
 41. Halliwell B, Gutteridge JMC y Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now. *Clin Med* **119**, 598-620 (1992).
 42. Hockenbury D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* **146**, 16-19 (1995).
 43. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83-86 (1996).
 44. Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur J Biochem* **231**, 1-30 (1995).
 45. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ y Castell JV. Cocaine hepatotoxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-induced rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **46**, 1967-1974 (1993).
 46. Kloss MW, Rosen GM y Rauckman EJ. Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review. *Biochem Pharmacol* **33**, 169-173 (1984).
 47. Krebs HA, Cornell NE, Lund P y Hems R. Isolated liver cells as experimental material. En: *Regulation of hepatic metabolism* (eds F Lundsquist y N Tygstrup) pp 726-750, Copenhagen, Munksgaard (1974).
 48. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebina H, Kato S y Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* **25**, 368-378 (1997).
 49. LeDuc BW, Sinclair PR, Shuster L, Sinclair JF, Evans JE y Greenblatt DJ. Norcocaine and N-hydroxynorcocaine formation in human liver microsomes: role of cytochrome P-450 3A4. *Pharmacology* **46**, 294-300 (1993).
 50. Lennon SV, Martin SJ y Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* **24**, 203-214 (1991).
 51. Majno G y Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
 52. Martin SJ y Cotter TG. Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis. *Int J Radiat Biol* **59**, 1001-1016 (1991).
 53. Masini A, Gallesi D, Giovannini F, Trenti T y Ceccarelli D. Membrane potential of hepatic mitochondria after acute cocaine administration in rats. The role of mitochondrial reduced glutathione. *Hepatology* **25**, 385-390 (1997).
 54. Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. En: *Cell death, methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **Vol 46**, pp 187-216, Academic Press (1995).
 55. McGahon AS, Matin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK y Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. En: *Methods in Cell Biology* (eds LM Schwartz y BA Osborne) **Vol 46**, pp 153-185. Academic Press (1995).
 56. Murata M, Monden M, Umeshita K, Nakano H, Kanai T, Gotoh M y Mori T. Role of intracellular calcium in superoxide-induced hepatocyte injury. *Hepatology* **19**, 1223-1228 (1994).
 57. Nassogne MC, Louahed J, Evrard P y Courtoy PJ. Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice. *J Neurochemistry* **68**, 2442-2450 (1997).
 58. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyerherzen R, González FJ, Coon MJ, Gunsalus

- IC, Gotoh O, Okuda K y Nebert DW. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA* **12**, 1-51 (1993).
59. Nicotera P, Bellomo G y Orrenius S. The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chem Res Toxicol* **3**, 484-494 (1990).
60. Nicotera P, Hartzell P, Davis G y Orrenius S. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett* **209**, 139-144 (1986).
61. Pellinen P, Honkakoski P, Stenbäck F, Niemitz M, Alhava E, Pelkonen O, Lang M y Pasanen M. Cocaine N-demethylation and the metabolism-related hepatotoxicity can be prevented by cytochrome P-450 3A inhibitors. *Eur J Pharmacol Env Toxicol Pharmacol* **270**, 35-43 (1994).
62. Pessayre D. Mecanisme des hepatites medicamenteuses. *Gastroenterol Clin Biol* **19**, B47-B56 (1995).
63. Peterson FJ, Knodell RG, Lindemann NJ y Steele NM. Prevention of acetaminophen and cocaine hepatotoxicity in mice by cimetidine treatment. *Gastroenterology* **85**, 122-129 (1983).
64. Powell CJ, Connolly AK y Charles SJ. Shifting necrosis: butylated hydroxytoluene (BHT) and phenobarbital move cocaine-induced hepatic necrosis across the lobule. *Toxicol Letters* **55**, 171-178 (1991).
65. Powell CJ, Charles SJ y Mullervy J. Cocaine hepatotoxicity: a study on the pathogenesis of periportal necrosis. *Int J Exp Pathol* **75**, 415-424 (1994).
66. Powis G, Briehl M y Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther* **68**, 149-173 (1995).
67. Rauckman EJ, Rosen GM y Cavagnaro J. Norcocaine Nitroxide. A potential hepatotoxic metabolite of cocaine. *Mol Pharmacol* **21**, 458-463 (1982).
68. Roberts SM, Pounds JG y James RC. Cocaine toxicity in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Letter* **50**, 283-288 (1990).
69. Roth L, Harbison RD, James RC, Tobin T y Roberts SM. Cocaine hepatotoxicity: Influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* **15**, 934-940 (1992).
70. Savill JS, Dransfield I, Hogg N y Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**, 170-173 (1990).
71. Schechter MD y Mehan SM. The lethal effects of ethanol and cocaine and their combination in mice: implications for cocaethylene formation. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 245-248 (1995).
72. Shuster L, Quimby F, Bates A y Thompson ML. Liver damage from cocaine in mice. *Life Sci* **20**, 1035-1042 (1977).
73. Silva MO, Roth D, Reddy KR, Fernandez JA, Albores-Saavedra J y Schiff ER. Hepatic dysfunction accompanying acute cocaine intoxication. *J Hepatol* **12**, 312-315 (1991).
74. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).
75. Stewart DJ, Inaba T, Lucassen M y Kallow W. Cocaine metabolism: Cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharmacol Ther* **25**, 464-468 (1979).
76. Strichartz GR y Ritchie JM. The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. En: *Handbook of experimental pharmacology* (ed GR Strichartz) pp 21-53. Berlin. Springer Verlag (1987).
77. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).

78. Thompson ML, Shuster L y Shaw K. Cocaine induced hepatic-necrosis in mice. *Biochem Pharmacol* **28**, 2389-2395 (1979).
79. Trump BF, Berezsky IK y Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. En: *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia* (eds RA Cowley y BF Trump) pp 6-46. Baltimore, MD. Williams & Wilkins (1982).
80. Ueda N y Shah SV. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* **90**, 2593-2597 (1992).
81. Vasault A. Lactate dehydrogenase. UV methods with pyruvate and NADH. En: Bergmeyer, H.U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol III. Verlag Chemie, Weinheim, pp 118-133 (1987).
82. Vindelov LL, Christensen IJ y Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327 (1983).
83. Walker PR y Sikorska M. Endonuclease activities, cromatine structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* **72**, 615-623 (1994).
84. Wanless IR. Histopathology of cocaine hepatotoxicity: report of four patients. *Gastroenterology* **98**, 497 (1990).
85. Wanless IR, Dore S, Gopinath N, Tan J, Cameron R, Heathcote EJ, Blendis LM y Levy G. Histopathology of cocaine hepatotoxicity. *Gastroenterology* **98**, 497-501 (1990).
86. Welder AA y Acosta D. Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in cultured cells. En: Tyson, C.A.; Frazier, J.M., eds. *In vitro toxicity indicators. Methods in Toxicology*. Academic Press, pp 46-49 (1994).
87. Wertz IE and Hanley MR. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS* **21**, 359-364 (1996).
88. Wilcock C, Chahwala SB y Hickman JA. Selective inhibition by bis(2-chloroethyl) methylamine (nitrogen mustard) of the Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter of murine L1210 leukemia cells. *Biochem Biophys Acta* **946**, 368-378 (1988).
89. Wrighton SA y Stevens JC. The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* **22**, 1-22 (1992).
90. Wyllie AH, Kerr JFR y Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-300 (1980).
91. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162 (1994).