

Excelentísimo Señor Presidente
Excelentísimos Señores Académicos
Señoras y Señores

Sean, mis primeras y emocionadas palabras, en este acto solemne de mi toma de posesión como Académica Numeraria de la Real Academia de Farmacia, para agradecer en primer lugar a los tres académicos y grandes amigos que presentaron y avalaron mi candidatura: Federico Mayor Zaragoza, Antonio Doadrio López y Octavio Carpena Artés; reconocimiento que hago extensivo a todos los académicos que al elegirme me han demostrado su confianza, y proporcionado el mayor honor en toda mi vida profesional. Ya sé, que esta distinción lleva consigo una gran responsabilidad y que me exige corresponder con todo entusiasmo. Desde hace más de nueve años he venido colaborando con esta Real Corporación como Académica Correspondiente y me resulta profundamente satisfactorio comprobar que mi labor realizada en esta casa haya merecido su aprobación.

En este capítulo de agradecimientos quiero dirigir un recuerdo especial a aquellas personas que más directamente fueron los responsables de mi formación científica: mis maestros.

El Profesor Angel Santos Ruiz, propulsor de los estudios universitarios de Bioquímica en España y Presidente de esta Real Academia, bajo cuya magistral dirección y acertada supervisión ha transcurrido la casi totalidad de mi carrera. El Profesor Santos Ruiz ha sabido estimular

nuestra iniciativa y sacar de nosotros, sus discípulos, lo mejor. Mi gratitud hacia D. Angel es tan grande como grande es también el reconocimiento a tantas enseñanzas que de él recibí, tanto en el plano científico y profesional como también en el personal y humano. Los que como yo hemos tenido la suerte de contarnos entre sus discípulos sabemos que no exagero al decir que Angel Santos Ruiz puede ser considerado como un ejemplo de maestros.

Federico Mayor Zaragoza, este gran amigo cuya cualidad principal es la de saber transmitir a todos los que hemos trabajado con él, un especial optimismo que le caracteriza. El dirigió mi tesis doctoral sobre «el metabolismo de aminoácidos en cultivos vegetales normales y tumorales», y a pesar de tantos años transcurridos desde entonces, no he abandonado esos temas. He continuado sobre estos cimientos mi actividad científica: los aminoácidos y el crecimiento tumoral.

A nivel internacional, quiero citar a dos personas que han tomado parte muy activa en el desarrollo científico de mi personalidad y han influido notablemente en mi vida profesional posterior.

Santiago Grisolia, entonces Chairman del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Kansas, quien me introdujo en el tema del ciclo de los fosfogliceratos con el estudio del mecanismo de acción de la fosfoglicerato mutasa, cuyo cofactor, el 2,3-difosfoglicerato, es una sustancia de gran interés en el mecanismo de oxigenación de la hemoglobina y que ha convertido al Profesor Grisolia en una de las autoridades a nivel internacional, en este tema.

También entre mis maestros en el extranjero no puedo olvidar a Patricia McLean, mujer de exquisita sensibilidad con quien trabajé en el Courtauld Institute of Biochemistry de Londres y con quien me inicié en el interesante campo de la Bioquímica Patológica Experimental. La influencia de los conocimientos que adquirí, al lado de la Profesora McLean, ha sido decisiva y muy directa en el tema que hoy les voy a exponer sobre Hepatotoxicidad Experimental.

Me cabe, también en este momento, la satisfacción de extender mi agradecimiento hacia la inestimable ayuda de aquellas personas, de generaciones posteriores, mis colaboradores, que trabajando a mi lado me transmitieron una buena parte de su juventud e inquietudes. Ellos han sido el estímulo permanente de mi vocación investigadora. Muchos son hoy profesionales y científicos de primera línea y permitidme la vanidad de sentirme profundamente orgullosa de ellos. Citaré solamente a aquellos cuya continuidad fué mayor y consiguieron finalizar conmigo sus tesis doctorales: M^a Jesús Sendino Cubillo, José Miguel Ortíz Melón, Salvador González Carcedo, Blanca Feijóo Salgado, Sebastián Cer-

dán García-Esteller, Carmen Cascales Angosto, M^a Rosario Santos-Ruiz Díaz, Paloma Martín Sanz y Miguel Angel Santos-Ruiz Díaz.

Por último no quiero, ni debo soslayar, el manifestar ante todos que esto no hubiera sido posible sin la permanente ayuda y el entrañable respaldo a lo largo de toda mi vida, de quien ahora recuerdo emocionadamente: mis padres.

El sillón de esta Academia que tengo hoy la honra de venir a ocupar, perteneció al Profesor D. César González Gómez, y corresponde a la medalla n° 25. Es para mí una grata obligación el glosar su vida profesional y académica. Yo tuve la suerte de ser su alumna y guardo un recuerdo imborrable de su amplia cultura, de su afabilidad y de su gran generosidad. Su espléndida vocación docente y su afán de enseñar le llevó a ser maestro de generaciones de farmacéuticos y orientador de numerosos profesores que desarrollaron posteriormente su labor en las Facultades de Farmacia, Medicina, Veterinaria y Ciencias.

Fué doctor en Farmacia, Medicina y Veterinaria. El tema de una de sus tesis doctorales premiada con la calificación máxima, sobre «Estructura histológica y composición química de algunas especies del género *Digitalis*», revelaba cumplidamente sus profundos concimientos sobre esta especialidad, de los que dió pruebas en las numerosas y eruditas intervenciones en esta misma Academia, al suscitarse temas de esta naturaleza. Como catedrático de Materia Farmacéutica Vegetal en el año 1930, sucediendo a D. Manuel Rodríguez López-Neira, su labor fué extraordinariamente fructífera. Modificó los antiguos conceptos de la Materia Farmacéutica Vegetal por los más modernos de la Farmacognosia, en los estudios de la Facultad de Farmacia. Su verdadera pasión fué la farmacología y los fundamentos de la acción biológica de los principios activos, imprescindibles para un conocimiento actual del medicamento. Vivió la época del desarrollo fundamental de esta ciencia y luchó por su introducción en la licenciatura de Farmacia. Desde la fecha de su ingreso por unanimidad como académico numerario en junio de 1936, su participación en las tareas científicas de esta Corporación fué constante aportando siempre su palabra precisa, su conocimiento riguroso y su notable erudición. Colaboró contestando a discursos de recepción de otros académicos, pronunciando conferencias y realizando notas críticas de obras científicas. Fué Vicepresidente de esta Real Academia durante cinco años, miembro de los tribunales de concursos científicos y representó a ésta en los Jurados de los Premios de la Fundación Juan March. Por sus méritos científicos le fué concedida la Gran Cruz de Alfonso X El Sabio a petición de esta Corporación.

Era D. César miembro numerario de la Real Academia de Medicina, Director del Instituto Mutis del Consejo Superior de Investigaciones

Científicas, Profesor Químico del Laboratorio Municipal de Madrid y Vocal del Comité Nacional de Plantas Medicinales. Miembro de Honor de la Academia Nacional de Rio de Janeiro, colaboró en numerosas revistas científicas nacionales y extranjeras en las que ha publicado numerosos trabajos, siendo conocido como uno de los más ilustres Académicos, cuyo prestigio se ha difundido en el extranjero, especialmente en América.

Con esos datos, que sólo pueden esbozar una vida ejemplar, por su dedicación a la docencia y a la investigación, quiero dedicar mi homenaje de admiración y respetuoso recuerdo a quien en este momento tengo que suceder, y a Dios pido ser digna de ello.

He pensado mucho sobre la elección del tema de este discurso y he considerado el más apropiado el de «Aspectos bioquímicos de la hepatotoxicidad experimental» cuestiones sobre las que he venido trabajando durante los últimos diez años. Creo, además, que nada por interesante que sea, puede expresarse con más énfasis que el propio trabajo.

INTRODUCCION

Como hepatotoxicidad experimental se define la inducción de lesiones hepáticas en animales de laboratorio, mediante la administración de agentes hepatóxicos. El daño hepático, producido por efecto de sustancias químicas, incluye una serie de fenómenos de muy diversa índole. Un número amplio y variado de compuestos han sido identificados como hepatotoxinas de relevancia clínica y experimental. Muchos de ellos se encuentran en la naturaleza, como las micotoxinas y distintos tóxicos de origen vegetal o mineral, algunos son productos del incesante desarrollo industrial, entre los que se encuentran numerosos fármacos, y otros como las nitrosaminas, pueden producirse en el interior del organismo.

La hepatotoxicidad puede ser originada por agentes tan simples como los compuestos inorgánicos o tan complejos como los esteroides heterocíclicos y los péptidos. Los modelos mejor estudiados tienden a emplear compuestos de estructura sencilla. Así, el tetracloruro de carbono o la tiacetamida, lesionan el hígado de manera consistente y fácilmente reproducible, y han sido empleados como marco de referencia para establecer comparaciones con otros hepatotóxicos de estructura más compleja (78, 182).

El espectro de susceptibilidad de las hepatotoxinas es vario, puede extenderse desde las sustancias que lesionan el hígado de casi todos los individuos –dentro de una variedad de especies– a aquellos que producen alteraciones hepáticas solamente en casos específicos. En la lesión hepática pueden estar involucradas las diferentes variedades de células que forman este órgano. La alteración hepática aguda puede transformarse en enfermedad crónica expresada como cirrosis y hepatocarcinomas (254).

Determinadas toxinas naturales, como los péptidos de la *Amanita phalloides*, los alcaloides pirrolidizínicos (139) y la toxina de nuez de *Cycad*, pueden clasificarse como peligros ambientales, ya que se ingieren ignorando su toxicidad o incluso como consecuencia del recetario de la medicina popular. Ciertas micotoxinas son debidas a las condiciones climatológicas en algunas partes del mundo, que favorecen su presencia como insospechados contaminantes de alimentos (18).

Las hepatotoxinas domésticas incluyen las de procedencia botánica, las micotoxinas citadas anteriormente, las aflatoxinas y también diversos agentes químicos cuya exposición tiene lugar por inhalación o ingestión, como resultado del descuido, intentos suicidas, o contaminación accidental de alimentos. La presencia en una harina en Epping (Inglaterra), de 4', 4-diaminofenil metano, produjo una curiosa epidemia

de ictericia; y la del fungicida hexaclorobenceno en trigo originó una severa epidemia de porfiria hepática en Turquía hace unas décadas (254).

La demostración de que ciertos pescados en conserva contienen nitrosaminas, y que éstas pueden formarse por acción de bacterias intestinales en animales que ingieren alimentos preservados con nitritos, ha llevado a la preocupación de la existencia en seres humanos de cuadros de hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad a través de la dimetilnitrosoamina. Experimentalmente son muchos los trabajos que se ocupan de la patogénesis de las dimetil (217) y dietil nitrosoaminas referentes a su capacidad para inducir carcinoma hepatocelular y sus interrelaciones con otros hepatotóxicos (172).

Los agentes hepatotóxicos derivados del desarrollo industrial son causantes de importantes cuadros patológicos hepáticos en el hombre. Entre los más dignos de mención figuran los derivados clorados de los hidrocarburos, ampliamente utilizados como disolventes y cuya toxicidad se conoce desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, el cloruro de vinilo, es un compuesto al que han dedicado su atención diversos grupos de hepatotoxicólogos clínicos y experimentales, por su capacidad para producir angiosarcoma hepático, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica; por supuesto, representan un riesgo para trabajadores a él expuestos (253).

La hepatotoxicidad ha sido objeto de estudios experimentales desde hace más de un siglo. En 1866 Nothnagel (157) produjo por primera vez lesiones hepáticas en perros mediante la administración de cloroformo, dieciocho años después que tuvieron lugar las primeras muertes de pacientes anestesiados con este compuesto y cerca de dos décadas antes de demostrarse que el envenenamiento con cloroformo incluía una severa y aguda enfermedad hepática. Los experimentos de Rosenbäum en 1882 sobre los efectos del fósforo inorgánico y del arsénico sobre el glucógeno hepático (185), y los de Ziegler y Obolonsky en 1888, al experimentar con arsénico (251), marcan las contribuciones más notables sobre hepatotoxicidad experimental en el pasado siglo (254).

A principios de este siglo, la hepatotoxicidad experimental empezó a emplearse como un medio para estudiar problemas relacionados con la medicina y la veterinaria. El interés hacia la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono tuvo lugar hacia el primer tercio de esta centuria cuando su uso como vermífugo en humanos, produjo enfermedades hepáticas y muertes. A partir de aquí el tetracloruro de carbono ha sido considerado como un modelo para estudiar las enfermedades hepáticas (187).

La mayor atención, que se ha dedicado en los últimos cincuenta años, a las alteraciones hepáticas producidas por agentes químicos, se han enfocado principalmente hacia las provocadas por fármacos. Fué en 1923 (247) cuando se registró el primer caso reconocido de lesión hepática inducida por un fármaco, el cincofeno, aparentemente inocuo para la mayor parte de los individuos. Diez años más tarde ya se habían descrito cientos de casos y fué entonces cuando se reconoció como posible el fenómeno de desarrollo de enfermedad hepática debida a una diferente susceptibilidad individual a determinados fármacos o tóxicos. El conocimiento del mecanismo de lesión en estos individuos susceptibles ha sido un tema de especulación e hipótesis, que aún ahora, es difícil de explicar en su totalidad. Algunos de estos compuestos son nocivos también para animales de experimentación, aunque mejor sería decir que éstos poseen esa especial labilidad frente a agentes extraños a su organismo (254).

INTERES DE LAS HEPATOPATIAS EXPERIMENTALES

La densa literatura científica acerca de la hepatotoxicidad experimental incluye facetas relevantes de la medicina clínica. Los numerosos estudios en este aspecto han sido de gran utilidad para un mejor entendimiento del carácter y mecanismo de producción de los estadíos agudos de hepatotoxicidad en humanos; asimismo han proporcionado un incremento en el interés acerca de las enfermedades crónicas debidas a hepatotóxicos, como la cirrosis o el hepatocarcinoma. Los estadíos de hepatopatía provocada experimentalmente proporcionan modelos útiles para el estudio de la génesis de la alteración hepática, tanto desde el punto de vista de su aplicación clínica como del estudio de las características bioquímicas y morfológicas de las manifestaciones de la enfermedad hepática espontánea o adquirida.

La necrosis hepática, conseguida por agentes químicos, ha permitido el estudio de los procesos bioquímicos que originan la muerte de las células. Las lesiones experimentales representan un medio fundamental para el desarrollo de métodos de diagnóstico y han supuesto una ayuda racional para el análisis de la función hepática mediante la evaluación de enzimas en suero sanguíneo, incluso antes de que este tipo de análisis se incorporara a la clínica.

También las alteraciones del hígado producidas experimentalmente se han utilizado para los estudios patofisiológicos del órgano, aplicando el, a menudo citado, principio enunciado por Claude Bernard: «Los venenos son medios útiles para el estudio de los procesos fisiológicos» (16). El descubrimiento de la misión de los hepatocitos en la síntesis de proteínas y de factores de coagulación plasmáticos, en el metabolismo de glúcidos y lípidos, en el almacenamiento de vitaminas, en la respuesta hormonal, en el equilibrio del agua y electrolitos, en la formación de bilis y en el transporte y metabolismo de fármacos, ha sido en gran parte desarrollado mediante la inducción de lesiones hepáticas con hepatotoxinas. Las interrelaciones de la fisiología de este órgano con los mecanismos homeostáticos se han puesto de manifiesto gracias a lesiones hepáticas producidas experimentalmente.

Diferentes modelos de hepatotoxicidad han contribuido a conocer el papel de los orgánulos subcelulares en la necrosis hepática. Lesiones, provocadas por agentes tóxicos, del retículo endoplásmico liso y rugo-

so, cambios en el núcleo y nucleolos, en lisosomas y mitocondrias, han permitido identificar a estos orgánulos en los cuadros de la patología hepática. El conocimiento de los mecanismos responsables de la esteatosis hepática, por efecto de la administración de hepatotoxinas, ha colaborado a una mejor comprensión de la etiología de la metamorfosis grasa. Por último, también con modelos de hepatotoxicidad se ha podido vislumbrar la intervención del aparato de Golgi en la función del complejo lípido-proteína para el transporte de lípidos hepáticos (126).

Los experimentos con hepatotóxicos han aportado valiosos conocimientos sobre la histopatología hepática. Casi todas las lesiones que se observan en el hígado como resultado de una enfermedad espontánea, pueden lograrse con agentes hepatotóxicos: necrosis en su triple aspecto, zonal, masiva o difusa; esteatosis; lesiones circulatorias intra-hepáticas; cirrosis de diferentes tipos; carcinoma hepatocelular y colangiocelular; angiosarcoma; colestasis con o sin evidencia de lesión del hepatocito o del conducto biliar. También mediante agresiones tóxicas al hígado, se consiguen alteraciones específicas, como las sinusoidales, cuerpos acidofílicos, anormalidades nucleares y nucleolares y megacitos. La capacidad para producir diferentes tipos de daño hepático, permite a la experimentación originar estados de enfermedad donde profundizar en la faceta histopatológica.

La capacidad del hígado para regenerarse, después de una resección o agresión, ha sido siempre considerada como un fenómeno enigmático e interesante. Mientras que la mayor parte de los ensayos se han enfocado hacia la respuesta regenerativa a la resección quirúrgica de una porción de hígado, determinadas pruebas han utilizado la lesión tóxica. Por ejemplo, la adecuada y rápida actividad regeneradora del hígado se ha visto que se relaciona inversamente con la edad, en respuesta a la lesión conseguida con tetracloruro de carbono (183).

La experimentación acerca de la patogénesis de la cirrosis ha empleado también modelos de hepatotoxicidad. Las observaciones de que la fibrosis postnecrótica puede ser «pasiva»—colapso postnecrótico— o «activa»—con síntesis y degradación de colágeno—, se derivan de los ensayos con tetracloruro de carbono (182). Asimismo, en hepatopatías logradas por esta misma toxina, ha sido explorada la reversibilidad potencial de la cirrosis y el uso de agentes farmacológicos para prevenir o revertir esta enfermedad hepática.

VULNERABILIDAD HEPATICA A LA LESION TOXICA

El destino biológico de los agentes tóxicos y otros compuestos extraños, depende de una serie de factores que afectan su distribución en el organismo, su excreción y su metabolismo. Aunque alguno de estos xenobióticos puede ser eliminado sin sufrir cambios, la mayor parte de ellos son transformados. El hígado es el órgano principalmente encargado del metabolismo de estas sustancias, mediante sistemas enzimáticos no específicos. Su gran susceptibilidad a ser lesionado por estos agentes hepatotóxicos parece ser una consecuencia de su papel primordial en el proceso de transformación de estos agentes. Son diversas las causas que contribuyen a la vulnerabilidad del hígado frente a los xenobióticos. Entre ellas pueden citarse como las más directas, aquellas derivadas de la concentración que dichos compuestos alcanzan en la víscera, las conversiones metabólicas que tienen lugar en el hepatocito y quizás también la posición del hígado como puerta de entrada hacia los tejidos.

La acción defensiva del hígado ante las toxinas ingeridas, en parte debida a su localización estratégica, sirve para explicar la evolución de los sistemas enzimáticos que toman parte en el metabolismo de los agentes extraños. Se considera que los sistemas enzimáticos que se encargan de metabolizar las sustancias tóxicas se localizan en lugares estratégicos de entrada o salida y se ha sugerido que los existentes en el hígado deben desarrollarse como mecanismo de defensa frente a los agentes tóxicos naturales ingeridos a menudo en la dieta (166). El principal mecanismo que posee el hígado frente a las toxinas es la biotransformación de compuestos liposolubles en metabolitos más polares que pueden ser excretados por la bilis o la orina. El proceso incluye dos fases: en la primera se encuentran aquellas reacciones que convierten un grupo funcional en otro –como es la oxidación del etanol a acetaldehído– o introducen grupos polares en compuestos no polares –como la hidroxilación de compuestos aromáticos, la reducción de compuestos nitrosos y la hidrólisis de los ésteres– En la segunda fase se encuentran las reacciones de conjugación del compuesto inicial o de su producto metabólico, con glucuronato, sulfato, glicocola, glutamina, glutatión o grupos metilo. La fase primera, llevada a cabo por oxidasas de función mixta ubicadas en el retículo endoplásmico, es posible que actúe incrementando o disminuyendo la toxicidad del agente tóxico. La

fase segunda es un proceso detoxificador que permite la excreción de sustancias parcialmente peligrosas.

Son muchos los hepatotóxicos cuyas moléculas nativas presentan menor toxicidad que sus metabolitos y entre ellos cabe citar los siguientes: tetracloruro de carbono, dimetil y dietilnitrosoaminas, bromobenceno, acetaminofeno, tioacetamida, etanol, etc. La hepatotoxicidad de estas sustancias se intensifica por condiciones que elevan su metabolismo y disminuye mediante tratamientos que inhiben su conversión metabólica. Por el contrario, los productos del metabolismo de un agente dañino pueden mostrar una hepatotoxicidad menor que la molécula nativa.

Fué en 1958 cuando se descubrió que la mayor parte de las reacciones oxidativas en el hígado, están catalizadas por enzimas localizados en el retículo endoplásmico y que estos sistemas oxidativos requerían para su funcionamiento NADPH y oxígeno molecular (22). También desde entonces se sabe que una gran parte de estas reacciones microsomales están mediadas por la acción combinada de la NADPH-citocromo C reductasa y una hemoproteína sensible al monóxido de carbono, el citocromo P-450. El sistema enzimático citocromo P-450 se clasifica como sistema de oxidasas de función mixta. Los sustratos tóxicos se combinan con la forma oxidada del citocromo P-450 para formar complejos, que son reducidos mediante la NADPH-citocromo C reductasa. El complejo reducido del sustrato y el citocromo P-450 reaccionan con el oxígeno para formar complejos oxigenados, los cuales aceptan un segundo electrón dando lugar a complejos de «oxígeno activado». Estos complejos se descomponen dando lugar al tóxico y al citocromo P-450 activado.

En los pasados años se ha producido un espectacular avance en el conocimiento de la estructura y función de los diferentes isoenzimas involucrados en el metabolismo de xenobióticos. Los avances han tenido un gran apoyo en el desarrollo de los cultivos de hepatocitos (14), que retienen el citocromo P-450 activo. Tales cultivos pueden utilizarse para la experimentación *in vitro* del metabolismo de tóxicos o fármacos (163). Técnicas precisas de separación han permitido el aislamiento de varios isoenzimas del citocromo P-450 que difieren en su capacidad para ser inducidos frente a los diferentes agentes químicos y farmacológicos, en sus propiedades cromatográficas, en peso molecular, propiedades inmunoquímicas y especificidad por el sustrato (112). Se ha descrito con detalle el aislamiento de tres formas de citocromo P-450 en ratas tratadas con 3-metilcolantreno (195). De la misma manera, otros autores han aislado el isoenzima 3a de conejos tratados con imidazol y han demostrado que este isoenzima es idéntico a la forma inducida por tratamiento con etanol (111).

No todas las reacciones oxidativas NADPH-dependientes que se llevan a cabo en los microsomas, están catalizadas por el citocromo P-450, pudiéndose formar metabolitos por distintos mecanismos enzimáticos. Por ejemplo, las reacciones de N-desalquilación por microsomas hepáticos pueden llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes. En el primero, el citocromo P-450 cataliza la C-hidroxilación de un grupo amino terciario o secundario y forma un metabolito inestable que se descompone con la formación de una amina secundaria o primaria y un aldehído. En el segundo mecanismo, es una flavoenzima –amina-N-oxidasa– la que cataliza la conversión de una amina terciaria en su derivado N-óxido; el citocromo P-450, en una reacción no oxidativa, cataliza entonces el reordenamiento y descomposición de un intermediario N-óxido, para formar un aldehído y la correspondiente amina. Como el citocromo P-450 participa en ambos mecanismos, no es sorprendente que el monóxido de carbono bloquee la formación del producto final y por tanto, la relativa importancia de los dos mecanismos es difícil de calcular cuando sólo se determina el producto final. Sin embargo, como la formación de N-óxido vía flavoproteína NADPH-dependiente no se inhibe por monóxido de carbono, en este caso el intermediario N-óxido se acumula en los medios de incubación (125, 252).

Sistemas metabolizadores de sustancias tóxicas

La capacidad que posee el hígado para metabolizar sustancias extrañas puede ser modificada por una amplia variedad de compuestos (46). La administración de fenobarbital, por ejemplo, como también de una serie de sustancias químicas, entre las que cabe incluir el etanol, produce un incremento en la aptitud microsómica encargada del metabolismo de tales compuestos. Esa mayor capacidad o inducción del sistema enzimático, va acompañada por un aumento de retículo endoplásmico liso, sede de la maquinaria microsómica metabolizadora de tóxicos. La repercusión metabólica de la inducción de este sistema tiene mucho que ver con el problema farmacológico y clínico de las interacciones de fármacos y/o tóxicos. Un ejemplo bien conocido a este nivel lo presenta el problema del alcohólico frente a la anestesia, a los fármacos antidepresivos, etc. La capacidad de incrementar el metabolismo de sustancias tóxicas mediante compuestos inductores del sistema (46) y de frenarlo mediante la administración de inhibidores o por disminución de la ingesta proteica, ha proporcionado un medio muy útil para profundizar en el estudio de los mecanismos de toxicidad de una serie de sustancias (40). Las hepatotoxinas que son menos tóxicas que sus metabolitos, presentan una toxicidad mayor por pretratamiento del animal con una sustancia inductora del sistema microsómico oxidativo

y una toxicidad menor por pretratamiento del animal con inhibidores del sistema. Exactamente al contrario sucede con aquellas hepatotoxinas que son más tóxicas que sus metabolitos (254).

El mecanismo de inducción del citocromo P-450 por fenobarbital e hidrocarburos policíclicos ha sido investigado ampliamente. Se ha demostrado la existencia de cuatro formas de citocromo P-450 inducibles por fenobarbital con propiedades inmunoquímicas idénticas, las cuales existen en diferentes combinaciones según las razas y colonias de ratas (233). El poli (A)⁺ -mRNA hepático aislado a partir de grupos específicos de estas ratas y traducido *in vitro* da lugar a la síntesis de formas idénticas al enzima encontrado *in vivo*. Por lo tanto, un procesamiento significativo postraduccional de estas proteínas no tiene lugar *in vivo*. Se ha progresado mucho en la caracterización de la estructura de las formas de citocromo P-450 hepático inducidas por fenobarbital. La estructura de estas formas se ha deducido de un análisis de la estructura de tres cDNAs clonados (86). Estos estudios abren un camino para el análisis de la estructura tridimensional de la molécula.

La transformación de compuestos en metabolitos tóxicos puede tener lugar también por sistemas enzimáticos en los que no se encuentre involucrado el citocromo P-450. La tioacetamida es una toxina cuyo efecto lesivo se ejerce a través de su transformación en un compuesto necrogénico, la tioacetamida S-óxido. Como la toxicidad de la tioacetamida no se incrementa por pretratamiento con fenobarbital ni se inhibe por SKF 525-A se consideró que en su biotransformación no intervenía el citocromo P-450 (41). Posteriores estudios han llegado a demostrar que en la activación de la tioacetamida interviene mayoritariamente un sistema monooxygenado de función mixta dependiente del FAD, ya que el pretratamiento de los animales con metimazol, sustrato e inhibidor de la oxigenasa dependiente del FAD, produjo una remisión en la necrosis inducida por la tioacetamida S-óxido. Y por otro lado, el pretratamiento con SKF 525-A, inhibidor del sistema monooxygenasa dependiente del citocromo P-450, fué prácticamente inefectivo (51).

Se ha propuesto la existencia de tres vías metabólicas, a través de las oxidasas de función mixta, como las responsables de la génesis de la lesión letal: la formación de radicales libres, la formación de compuestos electrofílicos y la generación de especies activas de oxígeno. Los mecanismos implicados en la necrosis hepática mediada por el CCl₄ pueden incluirse como ejemplo de la primera. El papel de las uniones covalentes con macromoléculas, de los derivados electrofílicos puede aplicarse a los casos de necrosis hepática originada por bromobenceno y acetaminofeno. La producción de especies activas de oxígeno, por el sistema dependiente del citocromo P-450 hepático, es com-

parable a la formación de radicales libres como un medio de producir lesión hepática (68).

La reducción del oxígeno molecular en todas las células aerobias eucariontes dá por resultado especies activas o radicales libres de oxígeno que presentan una elevada toxicidad. El organismo ha desarrollado un sistema elaborado de defensas frente a estos intermediarios (82, 83). La defensa primaria la proporcionan los enzimas que atrapan catalíticamente estos productos intermediarios de la reducción del oxígeno. Los aniones superóxido (O_2^-) se eliminan por la acción de la superóxido dismutasa que los convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque el H_2O_2 no es excesivamente tóxico en solución acuosa, se ha postulado que la acción combinada con el anión superóxido puede llevar a la formación del radical hidroxilo ($\cdot OH$), de elevada toxicidad que se considera el principal responsable de la iniciación de la peroxidación lipídica (5).

La administración de benceno a ratas condujo a una degeneración progresiva del sistema hematopoyético. Se ha sugerido que en los fenómenos citotóxicos del benceno se registra una generación incrementada del anión superóxido y de lipoperóxidos, que se encuentra mediada por el radical hidroxilo (107).

La lesión hepática originada por el hidroxitolueno butilado, sin embargo, se encuentra asociada con la producción de metabolitos activos del tóxico y con una prolongada depleción de glutatión reducido y no con la peroxidación lipídica. El tratamiento previo con cloruro de cobalto, que inhibe el citocromo P-450 e incrementa el contenido hepático de glutatión, previno la toxicidad de este compuesto. Como la cisteína y el glutatión tienen capacidad para reaccionar con los metabolitos activados, puede prevenirse su unión con las proteínas con tal que existan concentraciones suficientes de estos tioles. Puede, por tanto, concluirse que los niveles bajos de glutatión reducido o excesivas cantidades de metabolitos activados conduce a que los residuos del hidroxitolueno butilado se unan a macromoléculas celulares esenciales y esta sea la causa de necrosis hepática (152).

Hepatoprotectores

Los agentes hepatoprotectores son sustancias que modifican los procesos inducidos por hepatotoxinas, bien bloqueando su evolución o ayudando a su recuperación. Pueden dividirse en tres clases 1) Los agentes antinecróticos, 2) los que estimulan la regeneración celular y 3) los que inhiben la fibrosis. Los agentes antinecróticos frenan los fenómenos primarios de toxicidad hepática inhibiendo las perturbaciones bioquímicas originadas por el agente hepatotóxico, bien actuando como atrapadores de radicales libres o alterando la respuesta celular a la agresión. Entre estos agentes antinecróticos puede clasificarse el glutatión.

El glutatión es el derivado tiólico más abundante en formas de vida y tejidos aeróbios y se encuentra involucrado en numerosas vías metabólicas. El hígado es uno de los órganos donde el contenido de este tri péptido es más elevado. Específicamente el glutatión es importante para mantener la integridad estructural de las membranas de la célula y los orgánulos, interviniendo también en la síntesis de los microtúbulos y macromoléculas. Durante la pasada década se demostró que el glutatión juega un papel muy destacado en reacciones de desintoxicación, protegiendo los sitios nucleofílicos vitales en el hígado frente a los ataques electrofílicos de moléculas reactivas (104, 141).

El bromobenceno ha sido uno de los primeros agentes hepatotóxicos estudiados con detalle, que ha puesto en evidencia el papel protector del glutatión frente a la hepatotoxicidad del 3,4-bromobenceno-óxido, su metabolito activo (102). Más recientemente (108), se ha estudiado el papel de los derivados sulfhidrúlicos, glutatión y cisteína, sobre compuestos orgánicos y metálicos. Los compuestos orgánicos tales como el bromobenceno y el acetaminofeno, sufren el metabolismo oxidativo microsómico dando lugar a los metabolitos reactivos que se inactivan por conjugación con el glutatión. En el caso del cadmio, éste exhibe una elevada afinidad por los grupos sulfhidrilos y por la metalotioneína. La elevada especificidad del cadmio por esta proteína rica en grupos sulfhidrilos, sirve para secuestrar con gran efectividad al ión cadmio.

En enfermedades hepáticas crónicas se ha observado que el ϵ -aminocapróico y la putrescina actúan como hepatoprotectores, ya que parece que estos compuestos inhiben las serina-proteasas neutras. Aunque no está del todo esclarecido el modo de actuación de estos hepatoprotectores, se ha observado que el activador del plasminógeno hepático y la actividad de la ornitina descarboxilasa disminuyeron a las 45 horas de administrar ϵ -aminocapróico y putrescina, por lo que se sugiere que la inhibición de las serina-proteasas inducidas podría prevenir la lesión hepática (178).

La capacidad hepatotóxica del ácido valpróico, agente anticonvulsivo, se ha demostrado que puede ser parcialmente prevenida por vitamina E. Una protección más completa se ha demostrado recientemente (26) en hepatocitos aislados con concentraciones elevadas de N, N' difenilenediamina. Estos resultados han proporcionado más pruebas sobre la responsabilidad de los radicales libres en la hepatotoxicidad del ácido valpróico. La protección incompleta de la vitamina E puede ser un reflejo de que su utilización está más bien canalizada hacia la estabilización de la membrana de los hepatocitos y hacia la activación de la regulación de la síntesis de la proteína del hemo, que para reaccionar con los radicales libres.

Otro agente hepatoprotector cuyo efecto ha sido ya demostrado por diferentes grupos de investigadores, es la S-adenosilmetionina. Estudios muy recientes llevados a cabo en el Instituto de Bioquímica del CSIC, han demostrado que la S-adenosilmetionina, a dosis tan bajas como 2 mg/Kg facilita la rápida recuperación de la necrosis inducida por tioacetamida. La administración de S-adenosilmetionina hizo descender de manera notable la actividad de las aminotransferasas plasmáticas en ratas tratadas con esta toxina, como también aminoró ostensiblemente zonas necróticas periportales observadas a microscopía óptica (162). El efecto protector de la S-adenosilmetionina frente a la intoxicación aguda producida por tioacetamida, según estos autores, se debe a que este nucleótido puede actuar a nivel de metilación de los fosfolípidos de membrana, lo cual contribuiría a la integridad celular.

Modificadores de la susceptibilidad

Los individuos varían notablemente en su respuesta a la misma dosis de un xenobiótico. Uno de los factores más importantes que causan esta diferencia individual es la amplia variabilidad que experimenta la capacidad hepática metabolizadora de tóxicos. Esta capacidad está influenciada por la edad, el sexo, la enfermedad, dieta y compuestos exógenos, incluyendo fármacos. Durante la pasada década ha habido un creciente interés por los factores genéticos. Aunque la importancia relativa de los factores ambientales y genéticos es un tema muy debatido, pueden citarse ejemplos acerca de las reacciones adversas a los fármacos o tóxicos, las cuales parece que son principalmente una consecuencia de anomalías transmitidas por herencia en el mecanismo transformador de xenobióticos. El metabolismo hepático de estas sustancias es un proceso complejo en el que están involucrados muchos enzimas. Cualquier alteración en la actividad de estos enzimas puede ejercer efectos notables sobre la capacidad terapéutica de los fármacos.

En los estudios sobre hepatotoxicidad experimental existen también factores que modifican o alteran la susceptibilidad del hígado al ataque de sustancias extrañas. Para muchas hepatotoxinas no se ha explorado su susceptibilidad hacia las diferentes especies. Para otras, como el tetracloruro de carbono, aflatoxinas, alcaloides pirrolidizínicos, dialquilnitrosoaminas, galactosaminas; tioacetamida y etionina, existe una cantidad considerable de información. Las ratas, por ejemplo, son susceptibles a una gran variedad de agentes tóxicos entre los cuales hay que destacar el tetracloruro de carbono, tioacetamida y etionina. Los mamíferos en general, son todos susceptibles al tetracloruro de carbono, mientras que los pollos, patos, palomas, ranas, etc., son resistentes (182). Existen también diferencias importantes entre las diversas especies en la susceptibilidad a las aflatoxinas.

Las diferencias entre especies y entre los individuos de una misma especie pueden encontrarse en la secuencia de aminoácidos de una proteína, que de ser portadora de un sitio de enlace propicio puede permitir a una toxina atacar solo a los individuos poseedores de esta proteína (139). Se ha sugerido que la especificidad de un órgano para la lesión tóxica puede en parte estar unida a la especificidad proteica de dicho órgano, que se desarrolla durante la diferenciación. De acuerdo con esto, las toxinas que afecten al hígado de manera selectiva, debe esperarse que se unan a proteínas hepatoespecíficas, de las cuales un ejemplo es la ligandina (92). No es necesario decir que la variabilidad de respuesta a los hepatotóxicos está relacionada con el metabolismo de las sustancias extrañas por parte del hígado. Para las hepatotoxinas que expresan su efecto adverso por medio de un metabolito de la molécula nativa, el grado mediante el cual el compuesto puede ser metabolizado a producto tóxico, por una especie determinada, podría establecer la vulnerabilidad de los miembros de dicha especie a la toxicidad de la sustancia. Por ello, la resistencia de los pollos a los efectos hepatotóxicos del tetracloruro de carbono, se atribuyen a su incapacidad para metabolizar este compuesto.

Entre distintas razas de la misma especie, pueden encontrarse diferencias significativas. Se ha observado que cuando ratas de la raza Long Evans Hooded (LHE) fueron tratadas con estreptozotina para provocarles diabetes, presentaron una susceptibilidad menor a la necrosis hepática inducida por acetaminofeno. Esta mayor resistencia se encontró asociada con una elevación en la capacidad de los animales para eliminar el fármaco—por conversión en los derivados glucuronilo y sulfato no tóxicos— unida a un incremento de los niveles hepáticos de glutathione. Estudios farmacocinéticos han revelado que ratas de la raza Sprague Dawley normales eliminan el acetaminofeno más rápidamente que

las ratas LEH normales y que el estado diabético produjo un incremento en la eliminación del acetaminofeno en ambas razas. Sin embargo, el efecto fué mucho mayor en las ratas LEH que en las Sprague Dawley. Ya vimos con anterioridad, que la eliminación del acetaminofeno se verifica mediante los derivados glucuronilo y sulfato. La capacidad mayor de glucuronidación se observó en las ratas LEH diabéticas y en las ratas Sprague Dawley control y diabéticas, en comparación con las LEH normales. Estos autores sugieren que las ratas LEH normales poseen una capacidad menor para producir UDP-glucuronato en respuesta a la demanda xenobiótica (177).

El efecto de la edad sobre la susceptibilidad a los agentes hepatotóxicos parece depender, al menos en parte, de la relevancia del metabolismo de los agentes respectivos hacia su toxicidad. La rata neonatal es menos susceptible que la adulta a la toxicidad del tetracloruro de carbono (183). Esta diferencia parece reflejar que este compuesto es menos tóxico que su(s) producto(s) metabólicos, y esa menor toxicidad desaparece en cuanto se desarrolla el sistema microsómico de oxidación dependiente del citocromo P-450. Sin embargo, la aflatoxina B₁ y los alcaloides del *Senecio* (187) son ejemplos de hepatotoxinas a las cuales la rata neonatal es más susceptible que la adulta. Algunos estudios sugieren que los animales viejos son en algún aspecto más susceptibles que los jóvenes al desarrollo de lesiones. Las respuestas regenerativas de ratas añosas a las alteraciones inducidas CCl₄ fueron menos vigorosas que las de ratas más jóvenes. La tioacetamida es una sustancia hepatotóxica para el animal adulto y no para el hígado neonatal de rata.

La información respecto al efecto de factores endocrinos sobre la hepatotoxicidad resulta aún fragmentaria y no permite una generalización. La hormona tiroidea parece que incrementa la hepatotoxicidad del CCl₄ y otros agentes (187), convirtiendo la necrosis de lesión centzonal a lesión media.

Se ha demostrado que el contenido protéico de la dieta influye de manera decisiva en la inducción de la ornitina descarboxilasa de hígado originada por administración de una sola dosis subletal de tioacetamida (207).

Peroxidación lipídica

La rotura peroxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana, como consecuencia de la producción y propagación de radicales libres, se encuentra involucrada en la patogénesis de las lesio-

nes hepáticas inducidas por agentes hepatotóxicos. El malonaldehído cuya producción se utiliza para medir el grado de peroxidación lipídica, produce numerosos efectos celulares, toda vez que se ha considerado que la isquemia y la anoxia se asocian con una disminución de los niveles de antioxidantes celulares. El examen del posible papel de la isquemia hepática sobre la peroxidación lipídica indica que es éste un fenómeno tardío en la necrosis hepática post-isquémica, puesto que solamente transcurridos noventa minutos no es observable en hígado un nivel elevado de peróxidos lipídicos (209).

Con una dieta exenta en antioxidantes se encontró una elevación en la peroxidación lipídica en hepatocitos aislados de ratas de edad diferente. Las ratas hembras de 3 meses de edad fueron las que mostraron mayor formación de malonaldehído. Los hepatocitos de ratas añosas fueron más susceptibles a la peroxidación inducida por agentes químicos que las células de ratas adultas (12 meses).

La depleción de glutation *in vivo* con diisopropilidenoacetona, incrementa la peroxidación lipídica en la fracción citosólica del hígado como consecuencia de la producción de etano. El efecto fué eliminado por adición de glutation al sistema *in vitro* (250). Por el contrario, la generación de peróxidos lipídicos microsómicos por Fe^{3+}/ADP fué estimulada por glutation, ditiotreitól o cisteína. La activación de la peroxidación lipídica no fué inhibida por la superóxido dismutasa, lo que hace pensar que en el proceso no se encuentra involucrado el anión superóxido. Se ha propuesto que la peroxidación lipídica se activa por una reducción, dependiente del grupo tiólico ó del ión férrico a ferroso. El control de la peroxidación lipídica *in vivo*, dependiente del tiol, se piensa que se lleva a cabo por vía de quelación de los metales de transición para controlar sus reacciones redox (229).

Un inhibidor de la peroxidación lipídica, el etilendiaminotetraacético (EDTA), se ha demostrado que ejerce efectos múltiples sobre los procesos metabólicos dependientes del hierro. El linoleato, solubilizado con detergente o liposomas de fosfolípidos microsómicos *in vitro*, originó un incremento en la autooxidación del Fe^{2+} y la peroxidación lipídica en el detergente EDTA, pero no en el sistema liposómico. Este último sistema Fe^{3+}/ADP es capaz de inducir la peroxidación lipídica mientras que el quelato $Fe^{3+}/EDTA$ no (230).

REGENERACION HEPATICA

El hepatocito de los mamíferos es una célula que posee una compleja capacidad funcional. A pesar de su elevado grado de especialización conserva la capacidad de proliferar en determinadas circunstancias. Esta respuesta proliferativa puede tener lugar con gran rapidez, lo que es sorprendente si se tiene en cuenta que en el animal adulto las velocidades basales mitóticas se sitúan entre 1 a $10^4 - 10^5$ hepatocitos. Uno de los aspectos integrales de casi todas las enfermedades hepáticas crónicas o progresivas, es la incapacidad de las células residuales para mantener la misma velocidad mitótica que la pérdida de células. El estímulo más común, para la división que afecta al parénquima hepático de los mamíferos, es la pérdida de las propias células en el hígado. En la respuesta mitótica caben oscilaciones desencadenantes que van desde la pérdida de una sola célula a la del 90% de la totalidad (99).

El término regeneración hepática no es del todo correcto. Aunque cada hepatocito residual se divide, en respuesta a la eliminación de masa hepática, el fenómeno no puede ser definido como un proceso regenerativo verdadero, ya que los lóbulos amputados, en caso de hepatectomía no serán nunca restaurados. Lo que ocurre es un incremento de la masa residual, mediante hiperplasia celular. En consecuencia, esta forma de reparación hepática, que ha sido tan frecuentemente explorada, es en realidad una hiperplasia compensatoria (12).

La pérdida de hepatocitos, desencadenantes de la respuesta mitótica, puede deberse a tres causas: infección, alteración química y amputación quirúrgica. Se sabe aún poco acerca de los medios por los que los hepatocitos responden a la pérdida de una sola célula o grupo pequeño de ellas. Este fenómeno ocurre, con gran frecuencia, a continuación de una pérdida celular por infección aguda. La localización de la respuesta mitótica, en el área de la pérdida celular, sugiere que este tipo de respuesta depende de una serie de reacciones incluidas en lo que se describirá después como respuesta general.

Si la pérdida celular en plan masivo se debe a agentes químicos o infecciosos o a hepatectomía parcial de una gran parte del hígado, la secuencia posterior del mecanismo de respuesta es prácticamente similar. En la mayor parte de los experimentos, el estímulo se consigue

por hepatectomía del 70% del hígado, y en tal caso la respuesta es similar en hombre y en ratón. No existe prueba alguna de regeneración si existe lesión en las células residuales. La regeneración no puede producirse por células sometidas a anoxia, por exposición durante largo tiempo a anestésicos y otros agentes tóxicos. La respuesta a la hepatectomía tiene lugar igualmente en cada lóbulo de tejido residual, por tanto no es una causa de lesión o herida. De hecho, la respuesta ofrece una distribución lobular distinta en el hígado normal. La actividad mitótica más rápida, se da en los hepatocitos del tercio periportal del lóbulo, si bien se ha demostrado que todos los hepatocitos tienen capacidad de respuesta (12).

A medida que transcurre la edad, en el hígado normal de rata, disminuye rápidamente la velocidad de proliferación celular y de síntesis de DNA (220), que en el animal adulto es baja. El hígado se encuentra en fase $G_0 - G_1$ del ciclo celular, lo cual no impide que sea uno de los tejidos transcripcionalmente más activos del organismo. La velocidad baja de incorporación de precursores metabólicos en la molécula de DNA, se debe a que menos de un 1% de los hepatocitos están en fase de síntesis polinucleotídica, lo cual indica que los enzimas citoplasmáticos, encargados del metabolismo de las piridinas, son poco activos. El DNA mitocondrial muestra también un recambio metabólico mínimo.

El hígado, mediante hepatectomía parcial, se convierte en un modelo experimental para estudiar la proliferación celular. Unas 18 horas después de la amputación quirúrgica se inicia la síntesis del DNA que alcanza su máximo entre las 24 y las 48 horas (24). Ensayos con precursores metabólicos radioactivos aclaran que los máximos de incorporación se alcanzan en los hepatocitos y después en las células epiteliales y en las de Kupffer. La proliferación en el parénquima hepático comienza en las zonas periféricas de los lobulillos y se va desplazando hacia las áreas centrilobulares. De esta manera en un plazo de 2 a 3 semanas el segmento hepático remanente recupera su número originario de células y su peso, mediante la hiperplasia compensatoria, en el curso de la cual el 90% de los hepatocitos se divide a las 24 - 48 horas después de la operación.

El conocimiento de los cambios en la función del hepatocito, que tienen lugar después de una hepatectomía parcial, es fundamental para comprender la regulación del crecimiento visceral. Un proceso tal como la desdiferenciación tiene lugar durante las transiciones proliferativas, e implica una regresión de las células adultas hacia un estado más primitivo y se considera un paso obligado en la regeneración hepática.

Recientes trabajos de Huerta y Bahena (98) pueden servir para explicar experimentalmente esta regresión o desdiferenciación que tiene

lugar en la regeneración. En hígado fetal de rata se sabe que la acción de las catecolaminas se regula principalmente por receptores β -adrenérgicos, mientras que en hepatocitos de animal adulto son los receptores α -adrenérgicos los que median la acción metabólica de la adrenalina. Estos autores han investigado sobre el papel de los receptores α y β adrenérgicos después de la hepatectomía parcial. Se ha demostrado que el efecto estimulador de la adrenalina sobre la glucogenolisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis, dirigida por receptores β -adrenérgicos al cabo de tres días, pasa a ser mediada por receptores β -adrenérgicos y al séptimo día retornó al estado normal primitivo.

En lo que respecta al efecto de la sobrecarga metabólica, originada por la hepatectomía, sobre la iniciación de la síntesis de DNA (156), se han estudiado los cambios en la carga energética del ATP ($CE = ATP + 0,5 ADP/ATP + ADP AMP$) con expresión de la sobrecarga metabólica y de la fosforilación oxidativa. Los niveles de ATP disminuyeron significativamente, mientras que la fosforilación oxidativa mitocondrial se incrementó a las 24 horas. La infusión de glucosa previno la caída del ATP, retrasó la iniciación de la síntesis del DNA y modificó el mecanismo de respuesta. Parece ser que la sobrecarga metabólica es la que se encuentra involucrada en la iniciación de la regeneración hepática.

Un nuevo método ha sido descrito (87), el cual permite a las ratas sobrevivir a la hepatectomía del 90%, sobre la base de los experimentos anteriormente indicados (156). La mortalidad del 100% se redujo a un 14% permitiendo a las ratas un libre acceso a un fluido de bebida con glucosa. En estas ratas la síntesis del DNA y el índice mitótico reveló una respuesta proliferativa conmensurada, con un poderoso estímulo regenerador.

Existen dos cuestiones aún sin resolver, que permitirán la elucidación de los cambios en la expresión genética durante el proceso de regeneración: diferencias en cantidad y calidad del mRNA, e interrelaciones entre el modelo de expresión genética y desarrollo hepático. Las respuestas a estas preguntas han de estar basadas en la cantidad de DNA repetitivo y no repetitivo que se transcribe, en la abundancia y complejidad del mRNA y en los datos comparativos de homología de los mRNAs para la albúmina, α -fetoproteína y fibrinógeno en hígado en desarrollo normal y en regeneración (69).

El hígado normal contiene la mayoría de las especies del RNA que se encuentran en la regeneración, antes y después de la iniciación de la síntesis del DNA. Las variaciones en mRNA hepático, contenido en las poblaciones de RNA, son suficientes para permitir la transición de los hepatocitos de un estado de reposo a otro de división. Finalmente, el análisis de la expresión de genes específicos sugiere que existe poca

similitud entre los modelos de expresión genética entre un hígado en regeneración y otro en desarrollo. Un grupo de investigadores (84), al examinar la concentración de diversos RNAs durante la regeneración hepática han encontrado que la mayor parte no experimenta apenas variaciones, tanto en su concentración como en su grado de transcripción. Por el contrario, la concentración de los mRNAs de la actina y de la tubulina se incrementó unas diez veces sin que aumentara su transcripción. Tampoco hay mayor velocidad de síntesis de RNA necesario para hacer pre-rRNA y mRNA para proteínas ribosómicas. La principal conclusión de estos estudios ha sido el hallazgo de que muchos de los constituyentes necesarios para el incremento o utilización de la masa celular, pueden ser suplementados por una conservación incrementada del RNAs transcrito.

Hepatectomía parcial y función del hepatocito

El efecto de la regeneración sobre las funciones normales del hígado de rata han sido objeto de varios estudios (20). Las enzimas del ciclo de la urea durante las primeras 24 horas del proceso, reflejan un balance de respuesta hacia dos requerimientos metabólicos: la canalización de la ornitina hacia poliaminas y su utilización para la eliminación del amonio. En las primeras cuatro horas después de la hepatectomía se origina una disminución en la actividad específica de todos los enzimas del ciclo de la urea. Los niveles se ajustan para dar respuesta al primer requerimiento. Después se percibe un desplazamiento hacia la normalidad (hacia las 24 horas), como si existiese un reajuste para dar respuesta al segundo requerimiento. Se ha estudiado el efecto de dietas ricas o pobres en proteínas sobre este mismo modelo, y en todos los casos se observa una caída de las actividades enzimáticas seguida de una recuperación. Con dieta pobre en proteínas parece que el proceso es más lento, mientras que con un mayor aporte se acelera. Estos resultados deben contemplarse frente a una panorámica de que un ayuno previo retrasa la respuesta proliferativa a la regeneración. Las diferencias observadas pueden ser un reflejo de la velocidad de recambio de los enzimas en los diferentes estados nutricionales.

Hay incrementos notorios en las concentraciones intracelulares de desoxinucleósidos trifosfatos en momentos inmediatamente anteriores a la síntesis de DNA en células en crecimiento. Estos aumentos cabe que se deban a un estímulo de la síntesis de los nucleótidos o a una disminución en la desfosforilación de los desoxinucleótidos. La desfosforilación de la timidina difosfato y monofosfato se encuentra disminuida en la fase de crecimiento de células hepáticas humanas. De acuerdo con todo esto, se ha investigado la desfosforilación enzimática de la ti-

midina trifosfato hallándose que disminuye al mismo tiempo que la síntesis de DNA se eleva. Estos resultados sugieren que la desfosforilación de la timidina trifosfato debe estar estrechamente ligada al proceso de síntesis del DNA (103).

Otro grupo de investigadores (213) han examinado la actividad de la (2' – 5') oligo (adenilato) sintetasa durante la regeneración en hígado de rata y concluyen que este enzima tiene interés en la hiperplasia regenerativa. Esta sintetasa ha sido detectada en células hepáticas de ratas normales y *germ free* donde el enzima es predominantemente nuclear. Después de una hepatectomía, la (2' – 5') oligo (adenilato) sintetasa disminuye rápidamente. Esta caída procede al inicio de la síntesis de DNA y alcanza un mínimo de 25% de la actividad control a las 20 horas, que es el momento en que aquella se aproxima al máximo. Estos datos han llevado a sus autores a considerar la hipótesis de que el sistema (2' – 5') oligo (adenilato) sintetasa participe en el control negativo de la proliferación celular.

También se han analizado las velocidades de formación y las vidas medias de las especies individuales del pre-rRNA y rRNA en hígado en regeneración. La conclusión es que la formación de ribosomas en hígado en regeneración está activada post-transcripcionalmente. Las vidas medias de todas las especies nucleolares pre-RNA y rRNA, disminuyen un promedio del 30%. El pre-rRNA procesado se dirige a través de la vía de maduración más corta, que es el 45 S a 32 S más 18 S a 28 S. La transferencia nucleocitoplasmática de ribosomas está acelerada y, como consecuencia, el tiempo para la formación y aparición de aquellos se acorta 1,5 veces para la subpartícula mayor y 2 veces para la pequeña. Los autores señalan que los «sitios control» en la formación intranucleolar de 28 S y 18 S rRNA son los precursores inmediatos de 28 S rRNA, 32 S pre-rRNA y el pre-rRNA primario, 45 S pre-rRNA, respectivamente. El paso limitante en los estados post-transcripcionales en la biogénesis de los ribosomas es la maduración del pre-rRNA (57).

Misión de las poliaminas

Las poliaminas han interesado a los investigadores en el campo de la regeneración hepática, a partir del hallazgo de una gran concentración de putrescina en tejidos con rápido crecimiento como el hígado de rata después de hepatectomía parcial (199, 225, 226).

Los experimentos recientes indican que durante las primeras horas después de la hepatectomía, el incremento en putrescina es paralelo a la actividad de la diamina oxidasa (201). Este enzima cataliza la oxida-

ción de la putrescina a γ -aminobutiraldehído. Dando por sentado que la diaminoxidación parece ser el paso limitante en el metabolismo oxidativo de la putrescina, se ha investigado su síntesis y degradación para esclarecer así el mecanismo responsable de su incrementada actividad en hígado en regeneración (200). Con inhibidores de la síntesis protéica se ha demostrado que el incremento se debe a una mayor capacidad de síntesis y no a un cambio en la vida media del enzima.

Han sido también estudiados (190) los efectos *in vivo* de un análogo de las poliaminas, el 1,3 diaminopropanol (DAP) sobre la regeneración hepática. El DAP es un análogo estructural de la putrescina y se cree que bloquea la formación de poliaminas por supresión de la ornitina descarboxilasa, enzima limitante de la síntesis. La infusión de DAP en ratas parcialmente hepatectomizadas, previno los consiguientes fenómenos de síntesis de espermidina y DNA en hígado en regeneración. La reducción de la biosíntesis del DNA reflejó un bloqueo en la entrada de los hepatocitos en la fase S, más que su inhibición *per se*.

Se ha demostrado, que un número de agentes que frenan la biosíntesis de poliaminas, producen la inhibición del crecimiento celular en cultivos. Estos agentes son casi todos los inhibidores de la ornitina descarboxilasa, el único enzima que forma putrescina en las células de mamíferos. La comparación de los inhibidores irreversibles de la ornitina descarboxilasa con los inhibidores competitivos, ha dado importancia a los primeros. El único compuesto que interfiere con la producción de poliaminas es el metilgloxal, el cual es un potente e irreversible inhibidor de la S-adenosil metionina descarboxilasa, cuyo producto actúa como fuente de grupos propilamina necesarios para convertir la putrescina en espermidina y espermina (168).

También la ornitina descarboxilasa ha generado un gran interés desde que se descubrió su implicación en el crecimiento celular. Este enzima, dependiente del piridoxal fosfato, controla el paso limitante de la biosíntesis de poliaminas. Se ha establecido una relación estrecha entre la actividad de la ornitina descarboxilasa y la velocidad de crecimiento en un gran número de sistemas. El incremento en su actividad enzimática, que se registra en células transformadas, es consecuencia de una mayor síntesis *de novo* de la proteína enzimática (242).

Estímulos regenerativos varios

Ya hemos visto anteriormente como el hígado de rata es el órgano más estudiado respecto a procesos proliferativos inducibles en animal adulto, cuales son la regeneración hepática y la hepatocarcinogénesis.

La hepatectomía parcial desencadena una hiperplasia e hipertrofia, ambas controladas y compensadas en un tejido sano, diferenciado y en reposo.

El estímulo que desencadena esta regeneración se considera que es de naturaleza humoral (25). El origen y la naturaleza de las señales humorales que modulan la regeneración hepática no está aún totalmente esclarecido. Existen pruebas evidentes que atribuyen un papel importante al factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la proliferación de hepatocitos de rata *in vivo* (24) e *in vitro* (58). Las investigaciones confirman que el factor de crecimiento epidérmico se une a receptores específicos y estimula la síntesis del DNA en hepatocitos en cultivo de rata adulta (138, 150, 184). El suero sanguíneo de ratas hepatectomizadas es más efectivo en la inducción de la síntesis del DNA en hepatocitos, que el procedente de ratas simplemente operadas (142). La proliferación diferencial de hepatocitos normales y de los genéticamente alterados, es una de las características esenciales en la mayor parte de los modelos de hepatocarcinogénesis (66).

También se han estudiado las relaciones del estrógeno y su receptor frente al crecimiento y regeneración del hígado de rata, encontrando un descenso notable en la concentración del receptor de estrógeno y en el número de células que lo contienen. La caída comienza a las tres horas de la hepatectomía y continúa hasta las 72 horas. Paralelamente se registra un mayor número de células que exhiben receptor de estrógeno en sus núcleos. La administración de 17 β -estradiol, en el momento de la extirpación, eleva la translocación del receptor de estrógeno hacia el núcleo y acelera la velocidad de síntesis del DNA. Todo parece indicar la transcendencia del estrógeno y su receptor en la promoción de la regeneración hepática (77).

El cultivo primario de hepatocitos de animal adulto está convirtiéndose, cada vez con más frecuencia, en un bioensayo para la detección de factores de crecimiento hepáticos. Nakamura y cols., (153) han atraído la atención hacia la influencia de la densidad celular sobre el crecimiento de hepatocitos de rata adulta en cultivo primario. Han sido capaces de demostrar, con bastante claridad, que las células hepáticas tienden a crecer mejor a bajas densidades, lo que hace pensar en que la interacción celular desempeña una destacada misión en la regeneración (154).

Utilizando el sistema de cultivo de hepatocitos como un bioensayo, el mismo grupo de investigadores (155) ha purificado parcialmente, un factor de crecimiento, a partir de ratas hepatectomizadas. Mediante ensayos similares, Michalopoulos y cols. (143), han descrito dos fracciones séricas activas en el control de la replicación de los hepatocitos.

Recientes trabajos (117) han utilizado la línea de células de hepatoma HTC como bioensayo para purificar la sustancia hepática estimuladora del crecimiento, que se encuentra en hígado de ratas tanto hepatectomizadas como lactantes. Este factor estimula el crecimiento de células HTC y la adición de suero fetal de ternera lo acrecenta en forma dependiente de la dosis. Otros investigadores (55) han empleado un sistema de cultivo de hepatocitos en monocapa para ensayar la regeneración, por medio de la actividad ornitina descarboxilasa, como marcador de la respuesta proliferativa. De esta manera han podido comprobar la existencia de un factor en el suero de rata después de la hepatectomía parcial, que se segrega al medio extracelular por células en regeneración. Este agente provoca el crecimiento de células hepáticas normales en cultivo, lo que prueba que éstas son las fuentes de los factores estimulantes que aparecen en suero sanguíneo.

La proliferación de células hepáticas en cultivo, depende de una amplia gama de factores no específicos, que hacen este sistema poco propicio para el aislamiento del factor de crecimiento específico para el hígado. El modelo definitivo, que permitirá poner de manifiesto la significación fisiológica real de un factor de crecimiento, será demostrar su actividad *in vivo*.

La posibilidad de que la regeneración tenga lugar, como resultado de un desequilibrio entre los factores estimulantes e inhibidores del crecimiento, ha sido reforzada por los aportes que describen una proteína de hígado de rata que inhibe específicamente la proliferación de células epiteliales no malignas (140). Esta proteína se encuentra al parecer en el citosol de los hepatocitos y su más alta concentración se sitúa en la región centrilobular.

Los hepatocitos de rata adulta, en cultivo primario, muestran una síntesis inducida del DNA y de la mitosis, cuando se adiciona al medio suero sanguíneo de ratas 48 horas después de haber sufrido la hepatectomía parcial. En estas condiciones el 80% de los hepatocitos inician su ciclo celular. Estos fenómenos se atribuyen (142) a una disminución de los factores preexistentes inhibidores del crecimiento, lo cual permite actuar a los de carácter estimulador de forma opuesta, favoreciendo el crecimiento hepático. La adición de hormonas a estos sistemas, ha puesto de manifiesto que la sustancia estimuladora no coincide, ni con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el derivado de las plaquetas (PDGF), ni con la tiroxina, glucagón o hidrocortisona.

Otros autores (115, 116) han investigado sobre un factor producido por el hígado en regeneración, que estimula la incorporación de timidina marcada en el DNA. Esta sustancia es específica del órgano e, *in vivo*, también de la especie. Se ha demostrado que es estable al calor y

precipita, si bien no se inactiva por etanol. De acuerdo con estos resultados, Morley y Boyer (151), años atrás, observaron en ratas tratadas con tioacetamida una proliferación hepatocelular reminiscente a la regeneración después de hepatectomía parcial. Estos mismos autores, aislaron a partir de suero de ratas intoxicadas con tioacetamida, un factor estable al calor y no dializable, que estimula la síntesis de DNA en hígado y cuyas propiedades son similares al factor de crecimiento identificado en suero de ratas parcialmente hepatectomizadas.

Otros autores (215) están también de acuerdo con los resultados anteriores y sugieren, después de estudios sobre trasplantes de hígado, la existencia de un factor sérico que estimula a los hepatocitos quiescentes para entrar en el ciclo celular. Sin embargo, estos autores no pudieron identificar ese factor, debido a las complejas interacciones *in vivo*. Para eludir esta complejidad, se ha utilizado un sistema *in vitro* que ha permitido la identificación y purificación de un factor de crecimiento específico en los hepatocitos (155). Se sabe que los hepatocitos de rata adulta en cultivo primario retienen muchas de las funciones hepáticas y responden a diversas hormonas igual que *in vivo*. Además, se sabe también, que estos hepatocitos pueden proliferar en cultivo cuando la densidad celular es baja y cuando se añade al cultivo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) e insulina. Por todo ello, parece establecido que los cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta son un sistema *in vitro* conveniente para estudios de crecimiento. En 1976 Richman y cols. (184), fueron los primeros que describieron que la insulina y el EGF eran potentes estimuladores de la síntesis del DNA en cultivos primarios de hepatocitos de rata madura y desde entonces son muchos los trabajos que han confirmado estas observaciones. Sin embargo, no existe ninguna descripción *in vivo* de que estos factores experimenten un incremento en suero después de la hepatectomía parcial y, por el contrario, existen algunos trabajos acerca de la rápida disminución de los niveles de insulina en sangre portal y periférica después de la hepatectomía. Además, la concentración de EGF en sangre de rata normal viene a ser del orden de 1 ng/ml, lo cual supone sólo una décima parte de la dosis efectiva para la síntesis del DNA en hepatocitos cultivados. Por tanto, el suero debe contener otros factores para el crecimiento de los hepatocitos aparte de la insulina y el EGF, y así se ha sugerido (142, 223), que el suero contiene factores que estimulan el crecimiento de los hepatocitos, diferentes del EGF y del PDGF. Se ha purificado parcialmente un factor específico para el crecimiento de los hepatocitos en cultivo primario denominado «hepatotropina», aislada de suero de rata (155). Se trata de una proteína aniónica de 150 KD, lábil al calor y al pH ácido. Debido a su elevada afinidad por la heparina, la hepatotropina puede tener una procedencia plaquetaria. Esta hepatotro-

pina fué efectiva a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y presenta su máximo efectivo a 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y su efecto resultó ser aditivo al de la insulina y el EGF.

Una técnica experimental que ha atraído un gran interés, es la implantación en el bazo de un injerto de células hepáticas aisladas. El equipo de Farber (76) ha explorado la supervivencia y proliferación de hepatocitos preneoplásicos inducidos químicamente, en el bazo. Mediante el pretratamiento de ratas con una dieta que contenía 2-acetilaminofluoreno y con trasplante de sus hígados a otros animales sometidos a hepatectomía parcial y a un régimen de alimentación con 2-acetilaminofluoreno, se ha podido conseguir la proliferación más rápida de células preneoplásicas implantadas.

El propósito de estos trabajos sería el desarrollo de un método que permitiera una rápida y adecuada proliferación para trasplantes humanos. Uno de los principales problemas a resolver sería el requerimiento de hepatocitos donadores con preneoplasia químicamente inducida. Se ha señalado (119), que un efecto similar puede obtenerse cuando se transplantan en el bazo de ratas, inmediatamente después de haberlas sometido a hepatectomía parcial, células derivadas de hígado pretratado con fenobarbital.

Cuando se inyectaron hepatocitos en tejido adiposo de ratas singénicas hepatectomizadas, la probabilidad de formación de nódulos transplantables de células hepáticas estuvo incrementada unas ocho veces por encima de aquellas inyectadas en ratas control (101). La regeneración en los animales recipientes estuvo acompañada por un incremento paralelo en la síntesis del DNA y mitosis en los hepatocitos en el lugar de trasplante. Este estudio define un medio en el cual las respuestas de hepatocitos paternos a estímulos de crecimiento sanguíneos pueden ser analizados y como tales, pueden permitir el desarrollo de bioensayos donde distinguir las alternativas naturales de los estímulos de la regeneración hepática.

En los últimos años se ha demostrado la existencia de síntesis replicativa del DNA en hepatocitos aislados de ratas adultas, mantenidos en cultivo de monocapa durante varios días (58). Es un hecho conocido que una serie de biocatalizadores desempeñan una misión destacada o son esenciales para la replicación del DNA en tales cultivos. Entre estos agentes cabe citar a hormonas como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la triyodotironina y el glucagón, así como también otras sustancias como el piruvato, el calcio, aminoácidos y factores del crecimiento hasta ahora no definidos (142, 184).

Cultivos primarios de hepatocitos, conseguidos a partir de hígados de ratas adultas a diversos tiempos -4, 8 ó 10 horas- después de

hepatectomía parcial del 70%, sintetizan cantidades pequeñas de DNA, comparadas con las de rata normal. Sin embargo, a las 24 horas después de la hepatectomía, la biosíntesis de DNA en hepatocitos aislados –evaluada por incorporación de timidina marcada con tritio– es tres veces superior a la considerada normal. La adición de insulina, al medio esencial, ejerce un efecto mínimo sobre la síntesis del DNA en todos los hepatocitos ensayados. La incorporación del factor de crecimiento epidérmico, sólo o en combinación con insulina, produce un incremento en la síntesis del DNA en hepatocitos de hígado en regeneración, que se pone de manifiesto a las 4 horas de la hepatectomía, y alcanza su máximo a las 24 horas de la operación (80).

Estos resultados muestran claramente que los hepatocitos sintetizan DNA, inmediatamente después de la hepatectomía parcial. La activación de la síntesis del DNA por el factor de crecimiento epidérmico puede resultar muy útil para el conocimiento de este mecanismo celular. De la misma manera que ocurre en los fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico cabe ejerza también su actividad mitogénica en hepatocitos. Los hepatocitos en cultivo, aislados a tiempos diferentes después de la hepatectomía parcial, representan un sistema óptimo para estudiar las interrelaciones del factor de crecimiento epidérmico con la actividad mitogénica y con el estado de los receptores. Estos mismos autores han determinado la unión del factor de crecimiento epidérmico a los hepatocitos, y han comprobado que los resultados conseguidos en hepatocitos aislados de ratas, a las 4 horas después de la hepatectomía, son los mismos que para los normales, pero son casi insignificantes en los aislados a las 12 y 24 horas después de la operación. Se ha demostrado en muchos ejemplos, que cuando la proliferación celular está estimulada la unión del EGF disminuye (23, 188, 205, 243).

La expresión de algunos oncogenes celulares podría desempeñar un papel importante en la regeneración hepática. Fausto y Sank (70) han encontrado que los dos únicos oncogenes que se incrementan durante el proceso de regeneración son *C-ras*, que codifica una proteína localizada en la membrana celular, y el oncogen *C-myc*, que codifica para una proteína localizada en el núcleo y que es capaz de unirse al DNA. La expresión de *C-ras* empieza a elevarse unas 18 horas después de la hepatectomía y alcanza un máximo entre 24 y 36 horas; los cambios relacionados con *C-myc* son similares, pero tienen lugar con 12 horas de antelación.

Algunos autores especulan sobre los cambios en la fosforilación de las proteínas de membranas y creen que pueden estar inducidos por una mayor expresión de los oncogenes durante la regeneración hepáti-

ca. Esto podría llevar a los hepatocitos a aumentar su respuesta a los factores de crecimiento circulantes. Asimismo, cabe que como consecuencia de la modificación de la forma celular, se establezca un modelo de expresión genética, que eventualmente conduzca a la iniciación de la síntesis de DNA. Otros investigadores (127) han encontrado que la expresión de estos oncogenes comienza a declinar rápidamente y retorna a los valores iniciales a las 8 horas, tiempo en el cual aún no ha comenzado la síntesis del DNA. Un mayor incremento en la transcripción de **C-myc** se ha citado cuando la síntesis protéica se inhibe con cicloheximida. Por tanto, la transcripción de **C-myc** se eleva inmediatamente después de que las células se estimulan para proliferar. La elevación poco duradera de la expresión de **C-myc** es debida a la represión de su transcripción por una proteína sintetizada inmediatamente después de la hepatectomía.

MODELO DE HEPATOTOXICIDAD CON TIOACETAMIDA

La tioacetamida es un agente hepatotóxico bien conocido (78). Su administración produce cambios hepáticos ultraestructurales tales como nucleolos incrementados en número y tamaño (109), alteraciones mitocondriales (193) y disrupción del retículo endoplásmico. En las primeras fases de la intoxicación se origina necrosis hepatocelular y la fase crónica se caracteriza por la aparición de nódulos (231). A partir de los primeros trabajos surgió un gran interés por este compuesto como modelo de toxina para estudiar la hepatotoxicidad, la hepatocarcinogenicidad y la respuesta celular a la agresión. De acuerdo con esto, se han llevado a cabo una serie de experimentos con objeto de esclarecer los mecanismos bioquímicos mediante los cuales la tioacetamida origina agrandamiento nucleolar, acumulación de RNA (110, 235) y anomalías en la transferencia de éste desde el núcleo al citosol (204). La tioacetamida se ha utilizado también como modelo experimental para conocer la biosíntesis del RNA pre-ribosómico en hígado de rata (3). Se ha descrito que una sola dosis de tioacetamida por vía oral, se asocia con una breve suspensión de la formación de RNA, seguida de una aceleración en la síntesis del RNA nuclear (28). También se ha descrito que la tioacetamida origina una aceleración en el transporte, dependiente de energía, del RNA del nucleolo al citoplasma. La administración repetida de este tóxico produjo un notable incremento en la síntesis de albúmina y en las cantidades del mRNA correspondiente a ésta (50, 221). Al mismo tiempo se ha visto, que el tratamiento con tioacetamida suprime la inducción, promovida por diversos agentes químicos, de la oxidasa microsómica de función mixta y de la tirosina aminotransferasa promovida por glucocorticoides (11, 249).

No está del todo claro si las consecuencias de la administración de tioacetamida se deben a un efecto generalizado sobre la síntesis y degradación de macromoléculas mediante un mecanismo de rebote compensatorio, que cuenta para algunos efectos anabólicos, o a un efecto químico de la expresión de genes individuales. Se ha analizado el efecto de una sola dosis de tioacetamida (i.p.) en la inducción de la síntesis del citocromo P-450 en relación con su efecto sobre la totalidad de la maquinaria sintetizadora y degradativa en hígado de rata. Los resultados obtenidos revelan claramente que estas condiciones no producen a nivel bioquímico cambios notables de toxicidad hepática. Puede obser-

vase un efecto anabólico débil a las 48 horas, que es cuando se registra un incremento en el contenido proteico y de RNA microsómico. La tioacetamida disminuyó de forma manifiesta el contenido de citocromo P-450 y el efecto persistió durante 96 horas después de su administración. Existe una inhibición de la síntesis actual de las especies proteicas del citocromo P-450, la cual debe estar conectada a una disminución en el mRNA correspondiente (196).

El descenso del mRNA correspondiente al citocromo P-450 b, por efecto de la tioacetamida, puede ser debida a la existencia de un bloqueo en la transcripción del gen correspondiente, aunque también haya que considerar otros factores, tales como la estabilidad del mRNA y el proceso de translocación del precursor del RNA a través de la membrana nuclear. El notable y prolongado efecto de la tioacetamida sobre el citocromo P-450 y la actividad asociada al metabolismo de tóxicos o fármacos, pueden ser las causas responsables de su acción como hepatocarcinógeno. No hay que olvidar que en la formación de su metabolito activo, la tioacetamida-S-óxido, se encuentra involucrado el sistema oxidasa microsómico de función mixta, dependiente del citocromo P-450 (249).

Los nódulos hepáticos inducidos en hígado de rata por administración crónica de tioacetamida, se consideran como precursores de hepatomas. Comparados con el hígado de rata normal, los nódulos muestran deficiencias y excesos enzimáticos. Entre los cambios observados se han reconocido algunos que caracterizan diferentes lesiones focales. Focos pequeños que acusan una actividad epóxido hidrolasa, pero una elevada actividad γ -glutamyl transpeptidasa (65), y nódulos más grandes persistentes y no persistentes que presentan actividades elevadas para ambos enzimas. Los nódulos no persistentes se remodelan con alteraciones concomitantes de las actividades enzimáticas, mientras que los persistentes proliferan, se tornan basofílicos y progresan hasta llegar a carcinoma hepatocelular (60).

La administración crónica de tioacetamida en el agua de bebida durante 24 semanas, origina una noduligénesis hiperplásica similar a la producida por nuestro grupo de trabajo por vía i.p. durante ocho semanas. Determinados autores (145) han preparado mitocondrias a partir de estos animales y han comprobado que su estado 4 de respiración se encuentra incrementado significativamente, mientras que el estado 3 declina a tal extremo que el control llegó casi a perderse. Como no se observan cambios en el contenido mitocondrial de citocromos b y aa_3 , se ha sugerido que la inhibición de la respiración mitocondrial del estado 3 y 3u se debe a una limitación en el transporte de sustratos de adenilnucleótidos a través de membrana. Sin embargo, no debe establecer-

se que los mecanismos translocadores redox –no limitadores de la respiración en condiciones normales–, estén ausentes en tal grado que lleguen a ser factores limitantes. Aunque no se han encontrado cambios absolutos de fosfatidilcolina y cardiolipina, en las membranas mitocondriales, si aparecen y notables, en la composición de ácidos grasos. Estos cambios indican la existencia de alteraciones generales en la fluidez de las membranas y se han propuesto para reflejar un desequilibrio del sistema elongación/desaturación. Una disminución en el contenido mitocondrial Mg^{2+} podría ser consecuencia de una alteración en la matriz de fosfolípidos que diera lugar a un incremento en la salida de Ca^{2+} y a una disminución en su retención. Después de suspender el tratamiento con tioacetamida, todas las funciones alteradas retornaron poco a poco a sus valores normales (145).

Sobre un modelo experimental de noduligénesis hiperplásica inducida por tioacetamida, –obtenido por inyección i.p. diaria (50 mg/Kg) durante ocho semanas–, han sido realizados una serie de experimentos en el Instituto de Bioquímica del C.S.I.C. La elección del modelo, después de una selección, ha sido debida a dos factores: escasa toxicidad del agente, y la gran reproductibilidad de las distintas facetas de enfermedad hepática. La escasa toxicidad permite lograr unos altos índices de supervivencia al tratamiento crónico (42), a la vez que evaluar la acción carcinogénica de la hepatotoxina sin que se enmascare por los efectos citotóxicos. También se ha señalado que los efectos necrogénicos iniciales desaparecen a las 48 horas y a partir de este momento los hepatocitos adquieren una resistencia tal, que se manifiesta con ausencia de necrosis en dosis sucesivas (37, 43).

En ratas tratadas con tioacetamida han sido evaluados en sangre y orina una serie de parámetros de funcionalidad hepática, con objeto de establecer un diagnóstico de las lesiones en este modelo experimental. Las elevadas actividades de fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa y γ -glutamil transpeptidasa y las inalteradas de aspartato y alanina aminotransferasas, señalan que la lesión hepática originada por administración crónica de tioacetamida, puede considerarse como enfermedad biliar obstructiva, con índices de proliferación e infiltración con tumores. También el aumento en las concentraciones de bilirrubina, tanto en plasma sanguíneo como en orina, son prueba de colestasis hepática y obstrucción hepatobiliar (135).

Las tasas decrecientes de creatinina en orina, simultáneas con las elevaciones de la creatinina quinasa plasmática, cabe interpretarlas como una consecuencia de la pérdida muscular debida al adelgazamiento. El valor muy bajo de aclaramiento de la creatinina, debido a la tioacetamida, es indicador de la existencia de algún grado de lesión renal (135).

Ciclo de la urea

La significación metabólica del ciclo de la urea es bien conocida ya que es el único sistema, operativo en hígado, que elimina amonio de los tejidos en animales ureotélicos, a través de la formación de urea (114). La actividad del ciclo de la urea es relevante debido a la diferente localización de sus enzimas; dos de ellas –carbamil-fosfato-sintetasa y ornitina transcarbamilasa– son mitocondriales, mientras que las demás se encuentran ubicadas en el citoplasma (123).

Los extractos hepáticos de ratas, intoxicadas con tioacetamida durante dos meses, presentan un menor nivel en la concentración de urea que en los animales control así como una considerable disminución en las actividades de tres de las enzimas del ciclo –carbamil-fosfato-sintetasa, ornitina transcarbamilasa y arginasa–. Además, el tratamiento crónico con el hepatotóxico, produce una elevada concentración de amonio hepático, acompañada de un incremento en las concentraciones de glutamato y glutamina (35, 71). Estos valores alterados demuestran que uno de los efectos hepatotóxicos de la tioacetamida es contribuir a un descenso el flujo de formación de urea con una acumulación concomitante del amonio, ambos síntomas reconocidos de fallo hepático. Los grupos amino de los diferentes aminoácidos son transferidos al 2-oxoglutarato para formar glutamato, y el «pool» de éste supone el principal donador de nitrógeno para el ciclo de la urea, tanto como aspartato o como amonio. En condiciones normales, el 90% del glutamato se transforma en aspartato, vía aspartato aminotransferasa, y el 10% se convierte en amonio, vía glutamato deshidrogenasa (123, 192).

Las actividades elevadas de la aspartato aminotransferasa y de la glutamato deshidrogenasa mitocondriales, en hígado tratado crónicamente con tioacetamida, es probable que sean consecuencia de la alta concentración de amonio (36). El incremento en ambas actividades fué paralelo a una elevación en la concentración de proteínas en la fracción mitocondrial.

Se sabe que el amonio se incrementa en ciertas circunstancias, tales como dieta rica en proteínas, diabetes, etc. El ciclo de la urea opera como mecanismo regulador, y aumenta su actividad para conseguir mantener el amonio intracelular a niveles normales. Mediante este mecanismo, la célula se protege de los efectos tóxicos de la acumulación de amonio. Existen dos mecanismos mayoritarios para la eliminación del amonio en hígado: el ciclo de la urea y la formación de glutamato y glutamina. Se desconoce cómo el ciclo de la urea resulta significativamente inhibido en ratas tratadas con tioacetamida durante dos meses, con el consiguiente aumento en la concentración hepática de amonio.

Este incremento, a su vez, inhibe la formación de 2-oxoglutarato, precursor del glutamato y la glutamina (105). A pesar de que la actividad de la glutamato deshidrogenasa –enzima encargada de sintetizar glutamato– se encuentra notablemente elevada por efecto de la intoxicación crónica con tioacetamida, la formación de glutamato se supedita a la disponibilidad de su precursor, el 2-oxoglutarato. Así que, en tanto en cuanto la cantidad de amonio se eleva, la de 2-oxoglutarato disminuye, no siendo la glutamato deshidrogenasa capaz, a pesar de su mayor efecto, de eliminar el exceso de aquel, mediante el proceso reductor de biosíntesis de glutamato.

Las aspartato y alanina aminotransferasas son dos enzimas de gran relevancia clínica, cuya evaluación en sangre sirve para el diagnóstico de hepatopatías agudas, y de cualquier otro proceso necrótico como el infarto de miocardio. Estas dos aminotransferasas están íntimamente relacionadas con el ciclo de la urea. En el área extramitocondrial, la oxidación del malato o la transaminación del aspartato, da lugar al oxaloacetato. Cuando la aspartato aminotransferasa citoplasmática disminuye, como es el caso del hígado de ratas con intoxicación crónica con tioacetamida, el «pool» de oxaloacetato lo hace también pero la disponibilidad del aspartato no resulta apenas afectada (36, 38, 73). El grado de relación de las aspartato y la alanina aminotransferasas y la glutamato deshidrogenasa con el ciclo de la urea, depende, exclusivamente, de los precursores de la urea. Estos resultados, particularmente la elevación de la actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa –cuando el ciclo de la urea se inhibe– proporcionan una nueva evidencia en conexión con los mecanismos regulatorios, involucrados en el control del metabolismo del amonio en hígado bajo condiciones patológicas.

La toxicidad del amonio ha acaparado la atención de numerosos investigadores, ya que a los niveles elevados de este compuesto en sangre, se les han atribuido las disfunciones neurológicas de la encefalopatía hepática o coma hepático, originadas por lesiones en este órgano o errores congénitos del ciclo de la urea.

A pesar de los mecanismos que posee el organismo de destoxicación del amonio este es un problema que aún no se conoce en su totalidad. Un gran número de hipótesis se han emitido, postulándose que la acción tóxica del amonio se realiza a nivel del metabolismo energético del cerebro. A este respecto se han descrito, en intoxicación crónica experimental, las disminuciones significativas de ATP en diversas áreas del sistema nervioso central. Debido a estas bajas concentraciones de ATP en caso de hiperamonemia, Grisolia y colaboradores en trabajos muy recientes (91), han pensado que cualquier medida dirigida a mejo-

rar el rendimiento energético puede ser beneficiosa a nivel terapéutico, en caso de intoxicación amónica por disfunción hepática. De acuerdo con ésto, han administrado L-carnitina, con objeto de aumentar las reservas energéticas metabólicas, y evitar los efectos tóxicos del amonio. La L-carnitina se sabe que ejerce un papel fundamental en el metabolismo de ácidos grasos, facilitando el transporte de los grupos acil-CoA al interior de las mitocondrias, favoreciendo así la oxidación de las cadenas grasas con generación de ATP.

Ciclo de los pentosa fosfatos

El ciclo de los fosfatos de pentosas, como también otros sistemas citoplasmáticos generadores de NADPH, pueden desempeñar una relevante misión en el desarrollo de la hepatotoxicidad. Cantidades considerables de NADPH y ribosa-5-fosfato son necesarias en procesos de desintoxicación y activación, y también para la biosíntesis y reparación de los ácidos nucleicos. Trabajos de nuestro grupo (37, 44) han estudiado el comportamiento de los dos ramales del ciclo de los monofosfatos de hexosa y también el de enzimas citoplasmáticos dependientes del NADPH, enzima málico e isocitrato deshidrogenasa, durante la noduligénesis hiperplásica inducida por tioacetamida. Los resultados obtenidos muestran que el ciclo de los fosfatos de pentosa, así como otros sistemas generadores de NADPH, están notablemente afectados por efecto de la tioacetamida. El tipo de alteraciones encontradas en las actividades de estas enzimas favorece la generación de NADPH y ribosa-5-fosfato y, por consiguiente, cabe que contribuya significativamente al mecanismo de detoxificación de reparación del DNA.

La función principal del ciclo de los fosfatos de pentosa es proporcionar equivalentes reductores, indispensables para procesos biosintéticos, y el ribosa-5-fosfato adecuado para la biosíntesis *de novo* de los ácidos nucleídos. Esta vía de los fosfatos de pentosa es muy operativa en tejidos que requieren un gran suministro de NADPH, ribosa-5-fosfato o ambos; este es el caso del tejido adiposo, la glándula mamaria durante la lactancia o la mucosa intestinal. Las características peculiares de este ciclo degradativo de la glucosa, le permiten funcionar como un sistema generador de NADPH, vía su ramal oxidativo, o como sistema generador de ribosa, con utilización tanto del ramal oxidativo como del no oxidativo. Ambos ramales pueden actuar como dos mecanismos paralelos, cuya finalidad es convertir monofosfatos de hexosa en monofosfatos de pentosa (42).

El análisis secuencial de algunas enzimas citoplasmáticas del ciclo de los fosfatos de pentosa se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio

(33, 37), en hígado de rata durante el tratamiento con tioacetamida; el objeto era conocer la dependencia cronológica –respecto a agentes hepatotóxicos– de la actividad de aquellas. Las variaciones encontradas, a los diferentes períodos de la intoxicación, parecen indicar una respuesta cronológica ordenada de acuerdo con la administración de la hepatotóxina. De las enzimas ensayadas, las acciones del enzima málico y la transaldolasa experimentan un incremento, anterior a las dos deshidrogenasas: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Estas dos últimas enzimas muestran mayor actividad solamente al cabo de cuatro semanas de tratamiento. Aunque las actividades de la transcetolasa, y de la isocitrato deshidrogenasa, disminuyen de manera notable desde los primeros momentos de la intoxicación, como el contenido protéico de la fracción citoplasmática es menor en hígados tratados con tioacetamida, la consecuencia es que sus efectos específicos no experimentan apenas cambios. Las variaciones encontradas pueden relacionarse con cualesquiera de los efectos descritos por otros autores y originados por la tioacetamida, tales como: alteraciones cualitativas en la concentración de proteínas no histónicas (89); regulación pluriescalonada de la biosíntesis y procesamiento del RNA (3, 121); influencia directa sobre la maquinaria ribosómica que sintetiza proteínas (90). Existe, asimismo, la posibilidad de que la tioacetamida modifique los tipos de degradación enzimática.

Sea cual fuere el mecanismo implicado, es un hecho que no se alteran de la misma forma los efectos de las enzimas ensayadas. Este tipo de variaciones, que indica una capacidad acrecentada de producción de NADPH y ribosa-5-fosfato, ha sido también observado por otros investigadores en distintos tipos de hepatomas (236). La mayor producción de NADPH y ribosa-5-fosfato puede utilizarse tanto en mecanismos de desintoxicación a nivel microsómico como para la biosíntesis y reparación de los ácidos nucleicos. La formación de glutamato, con la consiguiente eliminación de amonio del medio, es una reacción que requiere NADPH. Nuestros resultados (44) han aclarado que la tioacetamida promueve a un estado más oxidado en el par NADP/NADPH en el compartimento mitocondrial, que puede explicarse por la elevada biosíntesis de glutamato.

Una serie de investigadores (147, 148) se han ocupado de la extraordinaria adaptabilidad metabólica de los tumores, refiriéndose a evidencias experimentales anteriores (113), que indican que la glutamina y el glutamato son los principales sustratos respiratorios de las células neoplásicas; así como la presencia del enzima málico, dependiente del NAD(P) en mitocondrias. Hasta el momento, este enzima, que se encuentra ausente en mitocondrias de hígados normal, fetal y de recién

nacido, ha sido identificado en todos los tumores analizados. También se ha observado que la actividad glutaminásica mitocondrial se relaciona linealmente en varios hepatomas de rata con la velocidad de crecimiento y grado de malignidad de los mismos. La glutaminasa actúa sobre la glutamina dando lugar a glutamato, el cual sufre una aminotransferencia con el oxaloacetato y el piruvato por acción de las respectivas enzimas mitocondriales, las aspartato y alanina aminotransferasas. El 2-oxoglutarato resultante se incorpora al ciclo tricarboxílico, suple de esta manera el déficit de este metabolito resultante de la inhibición de la glucolisis y asegurando la supervivencia de la célula. El malato originado en el interior de las mitocondrias, se oxida por la malato deshidrogenasa a oxaloacetato, mientras que el transportado al interior de las mismas, procedente del citosol, es el que se degrada a piruvato y CO₂ por acción del enzima málico. Existen, por tanto, pruebas evidentes que refuerzan los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en tumores inducidos por tioacetamida (35, 37), referentes al metabolismo incrementado de la glutamina y el glutamato, mediado por las actividades enzimáticas que los interrelacionan. Cabe aquí insistir sobre el hecho de que las aminotransferasas aspartato y alanina –enzimas ubicadas tanto en el citoplasma como en el interior de las mitocondrias– sufren notables alteraciones en homogenados de hígado con nódulos hiperplásicos inducidos por tioacetamida (36). Estas alteraciones suponen que mientras que las dos actividades enzimáticas muestran una significativa disminución en el citoplasma, se elevan considerablemente en el interior de la mitocondria. Este notable incremento, paralelo al de la glutamato deshidrogenasa y de la glutamina sintetasa, puede estar directamente relacionado con los flujos disminuídos del ciclo de la urea, de la formación de piruvato a partir de glucosa y de la presencia del enzima málico intramitocondrial.

La elevada actividad encontrada en los enzimas del ciclo de los pentosa fosfatos en hígado de rata con noduligénesis hiperplásica originada por administración crónica de tioacetamida, y el que el mismo patrón de alteraciones haya sido demostrado en hepatomas de Morris por otros grupos de investigadores (236), hacen pensar que los intermediarios de la glucolisis se canalizan hacia la síntesis de los pentosa fosfatos, metabolitos constituyentes de los nucleótidos. Estas conclusiones están reforzadas por la disminución de la actividad glucoquinásica y la menor concentración de piruvato que aparece en los hígados y que se comenta más adelante.

En condiciones normales se sabe que el grado de contribución del ciclo de los pentosa fosfatos al metabolismo degradativo de la glucosa es de un 16% (8). Sería interesante profundizar en este aspecto metabólico el cual vendría a echar por tierra la teoría de la glucolisis incre-

mentada que se registra en los tejidos tumorales. Por un lado, la glucólisis está inhibida y además se canaliza hacia la formación de pentosa fosfatos y NADPH. Por otro lado el deficiente funcionamiento del ciclo de la urea ocasiona una acumulación de amonio (36). Además de las actividades incrementadas en los enzimas del ciclo de los pentosa fosfatos y en el enzima málico, existen en el interior de la mitocondria una serie de ellos que también elevan su actividad en la noduligénesis hiperplásica inducida por tioacetamida. Estos enzimas son la glutamato deshidrogenasa, la glutamina sintetasa, la glutaminasa y las aspartato y alanina aminotransferasa (36). Todas ellas están relacionadas con el metabolismo intramitocondrial del glutamato. Como han explicado otros investigadores (147, 148), en caso de tumores el ácido glutámico es la principal fuente de energía, y a falta de glucólisis, el esqueleto carbonado que alimentará el ciclo tricarboxílico será el 2-oxoglutarato derivado del aminoácido por transaminación con otros cetoácidos. La utilización de glutamina y glutamato para compensar la falta de piruvato en el ciclo tricarboxílico, bien pudiera tener como consecuencia un exceso del amonio libre. (35).

La falta de paralelismo en las variaciones de los cocientes NADP-/NADPH, encontradas en homogenados de hígado con noduligénesis inducida por tioacetamida (44), es similar a la encontrada por otros investigadores en hepatocitos aislados tratados con elevadas concentraciones de cloruro amónico (208). En estas condiciones, como sucede en nuestro modelo experimental, el suministro de amonio excede en mucho la capacidad del ciclo de la urea. Esta situación pudiera ser que afectase al mecanismo transportador de equivalentes reductores desde el citosol a la mitocondria, de tal modo que no pudiera equilibrarse el sistema de oxido-reducción en ambos compartimentos.

Las alteraciones metabólicas en hígado y su particular cronología, que precede a la formación de nódulos durante el tratamiento con tioacetamida, sugieren que los cambios de los enzimas de los pentosa fosfatos –como también en otros sistemas generadores y consumidores de NADPH, localizados en el citosol y/o en la mitocondria– pueden ser una consecuencia del mecanismo de adaptación visceral frente a la administración prolongada de xenobióticos (44).

Metabolitos y perfiles enzimáticos

Con este modelo experimental, se han llevado a cabo en nuestro laboratorio numerosos ensayos sobre las concentraciones de metabolitos en estado de equilibrio dinámico y de los perfiles enzimáticos en la

vía metabólico glucosa - piruvato. Lo conseguido en estos experimentos ha proporcionado una información valiosa acerca de los puntos cruciales que poseen una significación reguladora en los tejidos.

Se ha citado una disminución muy notable en la actividad de la glucoquinasa en casos de tumorigénesis hepática originada por tioacetamida (42). Este enzima, inducible y marcador hepático en roedores adultos, se caracteriza por una baja afinidad por la glucosa y participa en la eliminación del exceso circulante de ésta canalizándola hacia la síntesis de glucógeno. En hepatomas de Morris de crecimiento rápido se ha observado que la actividad de la glucoquinasa es escasa (240). Los estudios con hepatomas revelan su tendencia a perder algunos enzimas específicos para los hepatocitos. Se ha podido detectar que la amplitud de las alteraciones se relacionan directamente con la intensidad de proliferación celular y la disminución del grado de diferenciación.

Además de la glucoquinasa, los otros dos enzimas clave de la glucolisis: la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa, experimentan notorias desviaciones por efecto de la administración crónica de tioacetamida (37). La glucoquinasa junto con la piruvato quinasa disminuyen significativamente —a un 11 y 36 % respectivamente de la actividad control—. La fosfofructoquinasa, por el contrario, presenta una elevación superior a dos veces, desde el primer día de la administración del hepatotóxico. Esto ha llevado a evaluar su efecto *in vitro* sobre la actividad enzimática que ha permanecido inalterada (38).

Aunque los niveles hepáticos de glucosa no experimentan variaciones por efecto de la tioacetamida, es de destacar, que tanto la glucosa-6-fosfato como la fructosa-6-fosfato aparecen muy disminuídas. Esta caída puede ser debida al menos a dos causas: menor actividad glucoquinásica; mayor actividad fosfofructoquinásica. La disminución de la glucoquinasa es compensable por aumento de las diferentes isoenzimas de hexoquinasa, pero en cualquier caso, la mayor actividad de la fosfofructoquinasa, enzima unidireccional y consumidor de fructosa-6-fosfato, hacen que los niveles de esta hexosa fosfato y los de su antecesor la glucosa-6-fosfato, bajen notablemente. El estudio isoenzimático de estos efectos enzimáticos, ha sido llevado a cabo en hígados de rata con tumorigénesis experimental inducida por tioacetamida (34). Al determinar las actividades de los diferentes isoenzimas de la hexoquinasa, se ha podido observar que, aunque la glucoquinasa presente una disminución notable, las otras hexoquinasas, por el contrario, se incrementan acusadamente. Así, las actividades encontradas para las hexoquinasas I, II y III son de 130, 869 y 216% respectivamente (37, 42).

Los niveles de metabolitos glucolíticos colocados entre la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa aparecen incrementados por efecto de la tioacetamida. Hay que destacar, que los niveles bajos de piruvato (74%) y los elevados de fosfoenolpiruvato (155%) ratifican la actividad disminuída del enzima que los relaciona, la piruvato quinasa. En otros casos el desequilibrio entre las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, conduce a una redistribución análoga del patrón de metabolitos glucolíticos (9).

Si tenemos en cuenta que la piruvato quinasa desciende a un 36% y que la lactato deshidrogenasa no muestra alteración, los niveles de piruvato deberían ser aún más bajos. Esto hace pensar en otras fuentes de piruvato que compense el efecto de la caída de actividad piruvato quinásica. El mecanismo más plausible a tales fines es la estimulación del enzima málico, que actúa principalmente en el sentido de formación de piruvato a partir de malato (44).

A partir de los resultados obtenidos no se puede explicar el incremento en la actividad de la fosfofructoquinasa que se detecta desde la administración de la primera dosis del hepatotóxico. Los cambios observados en los efectores de la fosfofructoquinasa al final de los dos meses de tratamiento –ATP, ADP, AMP, citrato y fructosa-6-fosfato– no explican satisfactoriamente el notorio aumento de esta actividad. Cabe suponer la actuación de mecanismos de interconversión de formas inactivas en activas, como los propuestos por Brand y Söling (19), que implican el funcionamiento de señales hormonales fisiológicas y/o patológicas, como el amonio libre, que aparece en concentraciones elevadas en el caso de esta disfunción hepática.

Actividades enzimáticas diversas

El tratamiento prolongado con tioacetamida provoca una caída en las actividades enzimáticas de la ATP-citrato liasa, de la acetil CoA carboxilasa y de la ácido graso sintetasa (131). Estos resultados son compatibles con una baja incorporación del $^3\text{H}_2\text{O}$ en la fracción de ácidos grasos, que se observa después de la administración crónica de la hepatotoxina (136, 160, 161) y con las concentraciones de ácidos grasos y triacilglicéridos en extractos hepáticos (132). Por el contrario el enzima málico experimenta un notable incremento por efecto de la administración de tioacetamida. Este diferente comportamiento entre las enzimas lipogénicas se explica al considerar que la elevación en la actividad del enzima málico, enzima NADP. dependiente, tiene que estar relacionada con las actividades también elevadas de otros enzimas de este

tipo, como las deshidrogenasas del ciclo de los pentosa fosfatos. Esto puede interpretarse al considerar que el tratamiento crónico con tioacetamida reclama una producción mayor de NADPH, coenzima, que en estas condiciones experimentales se necesita mayoritariamente para reacciones de detoxificación y para la síntesis y reparación de los ácidos nucleicos y no para la formación de ácidos grasos (44).

La incorporación de los lípidos hepáticos del ^3H -glicerol, inyectado por vía porta, es menor, en ratas tratadas con tioacetamida que en los correspondientes controles, lo cual cabe sea debido a una menor actividad de la glicerol quinasa o a un defecto en el aporte circulatorio del hígado por causa de la noduligénesis. Por otro lado, no solo la actividad de la glicero-fosfato-aciltransferasa total (mitocondrial + microsomal), responsable más directa de la síntesis de glicerolípidos, no experimenta variaciones por efecto de la tioacetamida (32), sino que, en cambio, la fosfatidato fosfohidrolasa, que interviene controlando la síntesis de lípidos neutros, presenta valores altos. Aunque la proporción de ^3H -glicerol incorporado a la fracción de triacilglicéridos *in vivo* aparece elevada por la tioacetamida, no hay certeza completa de que la mayor capacidad de la fosfatidato fosfohidrolasa sea la responsable del incremento relativo de la biosíntesis de triacilglicéridos, ya que no se registra cambio aparente en la acumulación relativa del glicerol radioactivo en la fracción correspondiente al fosfatidato. Este aumento relativo de la fracción de triacilglicéridos podría derivarse de una mejor disponibilidad de los ácidos grasos o de una mayor actividad de la diacilglicerol acil transferasa. La acumulación de triacilglicéridos en hígado ha podido detectarse solo en la fase aguda de la intoxicación con tioacetamida (131, 132, 136), lo que podría ser debido a la combinación de una síntesis incrementada, promovida por una movilización de grasa periférica y/o por la deficiencia en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (81). La actividad total de la fosfatidato fosfohidrolasa en hígado se supone que está controlada por el equilibrio entre insulina, glucagón y glucocorticoides (21). El glucagón, a través del AMP cíclico y los corticoides, provocan una mayor actividad fosfohidrolásica por probable estímulo de su síntesis, mientras que la insulina antagoniza estas acciones (174, 175). El incremento de la actividad de estas hidrolasas aparece en un gran número de disfunciones hepáticas, derivadas de la ingestión de hepatotóxicos, que acompañan al hígado graso y también en los casos de *stress* metabólico. La expresión del aumento de la actividad fosfohidrolásica se ha visto que depende de su translocación, desde un reservorio inactivo en el citosol a las membranas del retículo endoplásmico donde se genera su sustrato, el ácido fosfatídico. Esta translocación se promueve en presencia de ácidos grasos (31, 133), los cuales se liberan mediante lipólisis en el tejido adiposo. Algunos factores como el

stress fomentan la liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo. Es interesante destacar que la elevada actividad de esta hidrolasa detectada en el hígado de ratas tratadas con tioacetamida, se acompaña con un incremento de la acción ligada a membrana (32).

El control de las actividades enzimáticas, tales como la tirosina aminotransferasa (21) y la ornitina descarboxilasa (30), se encuentra coordinado probablemente, en algunos aspectos, con el de la fosfatidato fosfohidrolasa, puesto que tanto los glucocorticoides como las elevaciones intracelulares del AMP cíclico estimulan la síntesis de estas tres proteínas enzimáticas. Así, tanto la actividad de la ornitina descarboxilasa (96) como la de la fosfatidato fosfohidrolasa (129) experimentan un notable incremento en hígado en regeneración. La administración aguda y crónica de tioacetamida produce elevaciones del orden de 50 y 40 veces, respectivamente (32, 168, 198), en la actividad de la ornitina descarboxilasa. Estos aumentos resultan mucho más acusados que los hallados para la fosfatidato fosfohidrolasa. La actividad de la tirosina aminotransferasa desciende cuando la tioacetamida se administra de manera crónica. Es conocido que la ornitina descarboxilasa posee velocidades muy rápidas de biosíntesis y degradación, si se comparan con las de otras enzimas. Este rápido *turnover* permite que las concentraciones intracelulares de poliaminas experimenten cambios bruscos. La biosíntesis de esta enzima (106) como la de la tirosina aminotransferasa (4) y la de la fosfatidato fosfohidrolasa (116), se inhibe por efecto de la espermina. En el caso de la ornitina descarboxilasa la inhibición parece ser un mecanismo *feed back*. La mayor actividad ornitina descarboxilásica se asocia con el crecimiento celular y con la formación tumoral (225), lo cual también requiere incremento de lípidos de membrana. Las poliaminas *in vitro* pueden estimular las actividades de la glicerol fosfato aciltransferasa (100) y de la fosfatidato fosfohidrolasa microsomal (145), con lo que es probable que se faciliten los efectos de los ácidos grasos de cadena larga sobre la translocación del enzima desde el citosol al retículo endoplásmico (97, 134). No se conoce aún si la acción de las poliaminas tiene lugar *in vivo*, pero todo parece apuntar que la actividad incrementada de la ornitina descarboxilasa está acompañada también por la de la fosfatidato fosfohidrolasa asociada a membranas. No existen pruebas evidentes de que la tioacetamida promueva una mayor biosíntesis de fosfolípidos en hígado de rata, si bien se ha encontrado un aumento en la síntesis *de novo* de triacilglicéridos hepáticos. En otros trabajos de nuestro grupo (164, 165) se ha podido observar que la administración crónica de tioacetamida origina una disminución en la incorporación de fosfato radioactivo a la fracción de fosfatidil colina en hígado.

De las tres vías metabólicas que utilizan ornitina, solo resulta notablemente intensificada, en hepatomas de Morris, la correspondiente a la biosíntesis de poliaminas conectada directamente con la ornitina descarboxilásica. Las otras dos, en las que participan la ornitina carbamoil transferasa (35) y la ornitina aminotransferasa se reducen simultáneamente con la aceleración del crecimiento tumoral (236). La descarboxilación de la ornitina no puede considerarse como fenómeno específico de tumor. En tejidos normales con un grado intenso de proliferación la actividad de esta descarboxilasa también se encuentra notablemente incrementada con una concomitante elevación en el contenido de poliaminas del tejido. A esto puede añadirse que la formación incrementada de poliaminas, característica de todos los tejidos con un rápido crecimiento, se relaciona directamente con la estimulación de la síntesis del RNA que procede a la replicación del DNA. Se ha encontrado que la ornitina descarboxilasa controla la actividad de la RNA polimerasa I funcionando como un factor que inicia la síntesis del RNA ribosómico (128).

Un objetivo más de estos ensayos ha sido el investigar si un complejo de rodio, cuya capacidad antitumoral y antibacteriana había sido previamente demostrada (47) podía mejorar alguno de los cambios bioquímicos producidos por la tioacetamida. De acuerdo con ello, dicho complejo de rodio (III) se administró a ratas a las que se había inducido una noduligénesis hiperplásica por administración crónica de tioacetamida. El complejo de rodio es capaz de restaurar algunos de los cambios inducidos por el hepatotóxico. Entre estos, cabe citar: el peso corporal y las actividades de las enzimas tirosina aminotransferasa, ATP-citrato liasa, acetil CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa (32). En contraposición a la recuperación de los valores normales en las actividades de las tres enzimas lipogénicas a que hemos aludido, el enzima málico experimenta un posterior incremento, cuando a las ratas intoxicadas con tioacetamida se les administra también el complejo de rodio. En un trabajo aún sin publicar (135), se ha podido observar, asimismo, cómo el complejo de rodio (III) es capaz de anular parcialmente los cambios inducidos por tioacetamida en los contenidos en sangre de fosfatasa alcalina aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa, γ -glutamil transpeptidasa, ácido úrico y bilirrubina e igualmente los de ácido úrico, bilirrubina y creatinina en orina.

Los mecanismos mediante los cuales el complejo antitumoral de rodio puede contrarrestar los efectos metabólicos de la tioacetamida no están aún establecidos. Se sabe que la tioacetamida induce la formación de un factor de crecimiento, presente en suero, que estimula la síntesis del DNA y la mitosis en hígado de rata (151). Por el contrario,

la acción específica de estos complejos está relacionada con la inhibición del crecimiento por su unión con el DNA (54). Una lesión primaria del DNA, que se supone que tiene lugar en el caso de los complejos de rodio (III) (45), podría detener la síntesis del polinucleótico y la proliferación celular sin una aparente alteración de la actividad metabólica.

HEPATOCARCINOGENESIS

Se ha progresado mucho en el conocimiento acerca de las fases de la patogénesis en las neoplasias experimentales del hígado desde el descubrimiento original, en 1935, de un modelo de carcinogénesis por Sasaki y Yoshida (194).

Un concepto fundamental de este avance también en otros órganos o tejidos, supone un proceso complicado en el cual poblaciones de células nuevas parecen jugar un papel importante. Una de las fases primeras, que incluso en hígado puede ser rápida, es la denominada «iniciación». Las fases subsiguientes, cuyo número se desconoce, se admite que poseen la naturaleza de una evolución celular. Aunque la segunda fase del desarrollo neoplásico se denomina a menudo «promoción», este podría reemplazarse por un término más dinámico tal como «desarrollo neoplásico» o «evolución celular neoplásica». A pesar de que otros modelos de carcinogénesis, tales como el de piel, ofrecen una distinción más clara entre la iniciación y el desarrollo neoplásico (15), recientes modificaciones del modelo hepático indican claramente que estos conceptos son aplicables al hígado sin notorias dificultades.

Una fase adicional, que parte del desarrollo neoplásico o promoción, es la denominada «progresión» mediante la cual una lesión benigna se convierte en neoplasma maligno (18). A nivel bioquímico la mayor diferencia entre los agentes iniciadores y los promotores de tumores se encuentra en su sitio de acción. Mientras que los iniciadores, o los productos de su metabolismo, se unen covalentemente a la molécula de DNA, el lugar primario de actuación de los promotores, parece ser la membrana celular a través de su interacción con los receptores celulares específicos (56, 206).

Se asume, que, en general, los promotores de tumores, ejercen su efecto pleiotrópico por interacción objetivos epigenéticos. Sin embargo, se han realizado también observaciones que ponen de manifiesto como los ésteres de forbol –los promotores del crecimiento más potentes– pueden actuar directa o indirectamente originando lesión en el DNA y aberraciones cromosómicas por medio de vías de activación del oxígeno. En una revisión reciente (232), se proporcionan pruebas de que el

promotor tumoral conocido como más potente, el diéster acetato y miristato de forbol, puede activar la formación tumoral al estimular la formación del anión superóxido, a través de la formación de una oxidasa dependiente del NADPH.

Además de los derivados del forbol son muchas las sustancias que exhiben actividad promotora tumoral. Por ejemplo, el fenobarbital incrementa la incidencia neoplásica en hígado cuando su administración va precedida, inicialmente, del 2-acetilaminofluoreno (171).

El esclarecimiento de determinados componentes biológicos y bioquímicos, en la secuencia de eslabones involucrados en el desarrollo del carcinoma hepatocelular, hace ahora posible desarrollar una hipótesis razonable que permita unificar el trabajo a través de análisis experimental.

El hígado es susceptible de sufrir efectos carcinogénicos a partir de una amplia variedad de agentes químicos, tales como productos del desarrollo industrial, sustancias naturales y radiaciones ionizantes. Con la mayor parte de los carcinógenos químicos, la inducción de cáncer hepático requiere en animal adulto varias semanas de exposición. La eliminación del agente cancerígeno a intervalos de tiempo más cortos, pueden conducir a una incidencia de cáncer bastante menor o incluso nula. Con diversas formas de radiaciones ionizantes una exposición es suficiente, si posteriormente se aplica otro inductor de la lesión hepática, como el tetracloruro de carbono o la tioacetamida.

En animales, tales como ratones y ratas, es posible conseguir la neoplasia experimental con una sola inyección de carcinógeno tal como el uretano, dimetilbenzantreno o dimetilnitrosoamina, después de hepatectomía parcial. La misma dosis puede no producir tumores en hígado de ratas adultas, pero sí en recién nacidos.

Los carcinógenos hepáticos pueden presentarse como potenciales (procarcinógenos) o actuales (carcinógenos). Estos últimos son compuestos electrofílicos que reaccionan con diversos constituyentes de la célula, como DNA, RNA y proteínas, en diferentes partes de la misma. Los procarcinógenos se convierten en carcinógenos mediante mecanismos enzimáticos localizados generalmente en el retículo endoplásmico (144). Las actividades de este sistema están sometidas a cambios según la dieta, tratamiento con fármacos, etc. Estas modificaciones pueden prevenir o acelerar el cáncer en presencia de sustancias carcinogénicas. Los compuestos electrofílicos poseen una elevada reactividad y las interacciones con las macromoléculas antes aludidas se verifican covalentemente. Algunos de los productos así formados son eliminados y entonces la macromolécula lesionada cabe sea sustituida por

otra sintetizada «de novo», como es el caso del RNA y la mayor parte de las proteínas; o sea reconstruida parcialmente por medio de las enzimas reparadoras.

De los diferentes constituyentes que se relacionan con el proceso de iniciación, el DNA sobresale como la molécula más simple que dirige la herencia genética. En el caso de la carcinogénesis inducida por una sola dosis de un compuesto como la dimetilnitrosoamina, después de hepatectomía parcial, existe un lapso de varias semanas entre el tiempo de recuperación a partir de las lesiones celulares iniciales y la subsiguiente aparición de otras alteraciones progresivas que conducen a la aparición del cuadro patológico hepático. Durante este lapso, el hígado no muestra cambios tisulares detectables, tales como alteraciones nucleolares, proliferación celular o proliferación ductular. Por tanto, existe aparentemente una memoria a largo plazo en la lesión o lesiones características de la iniciación.

Asumiendo que el DNA es, al menos, un objetivo destacado en la fase de iniciación, es razonable pensar en la aparición de cambios permanentes en su estructura o composición, como parte del proceso carcinogénico. Estas variaciones pueden consistir en modificaciones más o menos persistentes resultantes de formas ligadas al carcinógeno, o en la inducción de una lesión en la doble cadena de la molécula de DNA. La demora en la desaparición de una lesión reparable (por ejemplo por medio de una metilación), incrementa la probabilidad de que se induzca una forma de alteración para la cual la reparación incluya errores. En el hígado que posee un nivel bajo de proliferación, se requieren semanas de exposición a un carcinógeno para obtener una lesión permanente del DNA.

La fase de proliferación celular, dependiente aún de la presencia continuada del carcinógeno puede desempeñar una misión esencial, ya que asegura la clase apropiada de lesión molecular del DNA. La proliferación celular, inducida por hepatectomía parcial, suele facilitar en gran manera la inducción rápida de las lesiones del DNA. De todo lo anteriormente expuesto se deduce que el primer paso de la carcinogénesis hepática, la iniciación, implica una lesión permanente en el DNA, que se produce por una reparación defectuosa o inadecuada (63).

Los carcinógenos propiamente dichos, reaccionan con los ácidos nucleicos y las proteínas en lugares específicos de sus cadenas. En concreto, respecto a las proteínas, estas reacciones suelen originarse con grupos polares de metionina, tirosina, triptófano, lisina, etc. En cuanto a los ácidos nucleicos estas reacciones se verifican con las bases guanina, adenina y citosina. Esta interacción bioquímica entre los carcinógenos y las macromoléculas se considera como de la máxima importancia

en la iniciación de la malignidad. El proceso de alquilación de la guanina parece que es la lesión promutagénica más importante de la molécula de DNA. Los factores nutricionales, las hormonas y los xenobióticos, también juegan papeles que modifican notablemente el desarrollo del cáncer hepático en animales de experimentación, lo cual se califica de relevancia indudable frente al aspecto clínico (64).

Las alteraciones específicas de las macromoléculas que son críticas para la iniciación no son aún conocidas. Las interacciones de los carcinógenos químicos con el DNA ha conseguido atraer la atención de los investigadores para tratar de aclarar el mecanismo del proceso de iniciación. Existe una progresiva evidencia de que la O⁶-alquilguanina pueda ser cuantitativamente la lesión promutagénica más importante que ocasione un desapareamiento en las bases durante la replicación del DNA o una descodificación durante la transcripción. Se ha estudiado (179) la formación y persistencia de bases alquiladas del DNA, tales como la N⁷-metilguanina y la O⁶-metilguanina en las fases G₁ y S de células hepáticas «in vivo» después que el hígado en regeneración es expuesto a agentes N-nitroso alquilantes. Una rápida y completa eliminación de la O⁶-metilguanina debe tener lugar durante la fase-S como protección parcial de las células que sintetizan DNA a partir de bases desapareadas y/o a partir de hipometiladas en los sitios G-C. Por otro lado, los órganos que exhiben una elevada susceptibilidad a los agentes tumorigénicos a menudo muestran una capacidad más baja para la eliminación enzimática del producto de la alquilación promutagénica O⁶-alquilguanina a partir del DNA, que los otros órganos. La susceptibilidad del cerebro de rata a la inducción del cáncer por N-nitroso-N-etilurea es aparentemente mayor que el hígado. Si el efecto neoplásico de este compuesto depende de la replicación del DNA —que contiene la base O⁶-alquilguanina—, la susceptibilidad reflejaría el balance entre el efecto protector de la eliminación de la base por mecanismos de reparación y el efecto potenciador de la replicación celular. Otros autores (48), han analizado la cantidad de proteína aceptora del resto alquilo que posee capacidad para eliminar la O⁶-alquilguanina del DNA y también las velocidades relativas de replicación del ácido nucleico en cerebro y en hígado de ratas desde el 12° día hasta la semana cuarenta y ocho después del nacimiento. El máximo de sensibilidad del cerebro corresponde al tiempo en el que la cantidad de proteína aceptora es más baja y la velocidad de replicación del DNA más elevada. El mayor contenido de proteína aceptora en hígado fetal, comparado con el cerebro, es suficiente para explicar por qué el cáncer no es inducido en hígado a pesar de la elevada velocidad de replicación del DNA.

Existe una excepción, sin embargo, a la correlación entre la tumorigénesis organotrópica y la cantidad de O⁶-alquilguanina que persiste en el DNA a través de la replicación en la hepatocarcinogénesis en roedores a los que se administra agentes alquilantes. Swenberg y colaboradores (224), han cuantificado la cantidad de O⁶-etil-desoxiguanosina y O⁴-etil-desoxiguanosina en DNA de hepatocitos y células no parenquimatosas de ratas expuestas a dietilnitrosoamina en el agua de bebida durante 77 días. Sus resultados demuestran que la base derivada de la timidina desaparece del DNA de los hepatocitos a una velocidad 200 veces menor que lo hace la correspondiente a la guanina. El DNA de las células no parenquimatosas contiene aproximadamente la mitad de la base derivada de la timidina que los hepatocitos, pero 2,5 veces más de la asignada a la guanina. Estos autores apoyan la sugerencia de que la O⁶-alquilguanina debe ser la lesión promutagénica responsable de la inducción del angiosarcoma hepático después de la exposición a los agentes metilantes y que la O⁴-alquilguanina sería la causante de la iniciación del carcinoma hepatocelular. Otros investigadores (169) han comparado también la cantidad de O⁶-alquilguanina en DNA de hígado después de inyección intraperitoneal de dietilnitrosoamina y dimetilnitrosoamina a ratas. El derivado dietil es algo más potente como hepatocarcinógeno que el otro y origina solamente una décima parte de O⁶-etilguanina que O⁶-metilguanina inducida por el metil derivado. La O⁶-metilguanina se elimina tres veces más deprisa que la O⁶-etilguanina. Estos autores opinan que deben existir otros aductos en el DNA –posiblemente O-alquilpirimidinas– que contribuyen a la iniciación de tumores por el dietilnitrosoamina.

En la hepatocarcinogénesis experimental se dan pruebas suficientes, que demuestran los efectos de sustancias promotoras del crecimiento y que se diferencian de los iniciadores y de los carcinógenos completos. De acuerdo con los resultados experimentales de Slaga y colaboradores (212) se ha sugerido que el efecto promotor depende de la dosis y, a diferencia de los agentes iniciadores, es reversible y posee un nivel-no efecto. Los resultados epidemiológicos están de acuerdo con esta hipótesis y no se conoce prueba alguna que ponga en evidencia una mayor formación tumoral en individuos, expuestos a agentes promotores putativos, por un largo período de tiempo.

Una vez establecido, en base experimental y epidemiológica que la promoción es un proceso reversible y que posee un umbral, la tarea principal es tratar de establecer un fundamento teórico para esta hipótesis, el cual debe incluir el conocimiento de la función promotora o del desarrollo neoplásico. Hasta el momento, se desconoce la mayor parte del mecanismo de promoción y no hay una teoría unificada. El principal

efecto de estos agentes es la expansión de la población de células iniciadas en el interior de un tejido dado (203). Un factor implicado en el proceso cabe sea el incremento de la proliferación celular como el ya indicado para el efecto del crecimiento regenerativo después de una hepatectomía parcial.

El descubrimiento de que el receptor celular de los promotores del crecimiento —esteres de forbol—, es una proteína quinasa regulada por fosfolípidos (39), ha estimulado el interés de los investigadores dedicados a campos tales como el cáncer o la bioquímica celular. La inducción de la proliferación celular es un fenómeno que adquiere el mayor relieve en hígado, órgano en reposo, si se compara con otros tejidos con un mayor recambio celular como el epidérmico. Otro factor que cabe intervenga decisivamente frente al fenómeno de promoción, es la comunicación intercelular, la cual ha sido puesta de manifiesto en cultivo de células hepáticas (245). Este factor juega un papel inhibitorio y se admite que mantenga la evasión de las células preneoplásicas del control de crecimiento.

Williams (246) ha resumido una serie de efectos celulares que facilitan el crecimiento de células neoplásicas en tumores. Los puntos principales son: el aumento de la expresión del fenotipo neoplásico; la activación de la proliferación celular, mediada por la citotoxicidad, influencias hormonales, inmunosupresión o acciones a nivel de membrana celular (inhibición de la comunicación intercelular). La promoción puede estar mediada por uno de estos efectos por sí solo o en combinación con los demás.

Por supuesto que un gran número de sustancias se han identificado como promotoras de la hepatocarcinogénesis, gran parte de ellas se encuentran entre los contaminantes ambientales o entre los fármacos de uso frecuente. Entre los primeros se citan los pesticidas organoclorados y entre los segundos el fenobarbital. Ninguno de estos compuestos revela efectos mutagénicos en sistemas *in vitro*. Se han desarrollado tumores *in vivo*, especialmente en ratones y solamente después de un tratamiento muy prolongado.

La trascendencia de estos descubrimientos para la carcinogénesis humana, no se ha establecido con solidez hasta el momento. En primer lugar, se sabe poco acerca de la existencia de un umbral para el efecto promotor, y haría falta profundizar en este conocimiento a la hora de establecer evaluaciones y riesgos. En segundo lugar, hace falta conocer hasta qué punto y manera los resultados epidemiológicos revelan una correlación entre la ingestión de promotores conocidos y la incidencia de tumores.

Una sola inyección, de la mayoría de los hepatocarcinógenos, induce solo alteración en una cadena del DNA. Sin embargo, algunos carcinógenos, como la nitrosomorfolina, derivados del 2-acetilaminofluoreno o el nitrosodiuracilo, inducen una lesión en la doble cadena (218) del polinucleótido. La administración de dimetilnitrosoamina, durante la regeneración hepática posterior a la hepatectomía, se asocia con la aparición indistintamente, de cambios en la doble cadena o en una sola del DNA (181).

En general, la hepatocarcinogénesis, originada por administración de agentes químicos, induce alteraciones en los cromosomas e irregularidades mitóticas, en períodos tan cortos de exposición como una semana (219). Los rayos X provocan efectos similares (237). Con ambos, agentes químicos e irradiación, las alteraciones cromosómicas cabe persistan en forma latente durante varios meses.

En contraste con los hepatocitos, las células del epitelio ductular proliferan prácticamente con cada tratamiento hepatocarcinogénico. Esta respuesta morfológica y funcional se asemeja a la de la colangitis y colestasis (62).

A las pocas semanas de iniciarse un tratamiento hepatocarcinogénico aparece una nueva población de células, a manera de múltiples focos pequeños esparcidos por todo el hígado. Esta población suele consistir en clones que pueden crecer expansivamente, comprimiendo el hígado que los rodea y formando nódulos más o menos discretos. Esta población de hepatocitos prolifera al mismo tiempo que la original se inhibe, mostrando un crecimiento lento y progresivo a medida que el carcinógeno se administra. Si cesa ésta, la nueva población de células tiende a desaparecer. La velocidad de emergencia de la población celular parece influenciarse por el estado inmunológico del huésped (85). Cuando el suministro del carcinógeno cesa, el proceso de regresión aparente de los nódulos de la población nueva, puede prevenirse mediante inyecciones de dosis necrotizantes de dimetilnitrosoamina o por hepatectomía parcial. Con tratamientos inmunopresores, como suero antilinfocito o radiación X, no es posible evitar la regresión de los nódulos reversibles, los cuales no provocan reacción en el hígado que los circunda (63).

Si la exposición al tratamiento carcinogénico es continua, aparecerá otra nueva población celular, la cual continuará durante semanas aunque el carcinógeno deje de ser administrado. Esta tercera población, derivada de células seleccionadas de la anterior, adquiere una propiedad de irreversibilidad relativa. El nódulo formado por esta nueva población de células se clasifica como de naturaleza hiperplásica (62).

Las dos poblaciones de hepatocitos, que surgen secuencialmente, poseen características bioquímicas y estructurales diferentes. Entre otros cambios, hay que destacar que las células de estas poblaciones llevan consigo alteraciones en el proceso degradativo del glucógeno en respuesta al ayuno y al glucagón; también se registra una disminución progresiva de la glucosa-6-fosfatasa y de la ATPasa, junto con una expansión notable del retículo endoplásmico liso en el citoplasma (67).

El carcinoma hepatocelular, conseguido con el 2-acetilaminofluoreno contiene glucógeno, y de él una pequeña parte se encuentra en forma ligada. Varias semanas después de la eliminación del carcinógeno de la dieta el DNA procedente de los nódulos hiperplásicos, muestra variaciones en su espectro de absorción, en su densidad y en su apariencia ultraestructural. Este indica la persistencia de una ligazón del 2-acetilaminofluoreno al DNA de los nódulos hiperplásicos.

Los nódulos, tanto reversibles o regenerativos, como irreversibles o hiperplásicos, son más resistentes a la acción citotóxica del tetracloruro de carbono y de la dimetilnitrosoamina, que el hígado circundante. Este hígado circundante, no nodular, sufre necrosis hemorrágica en condiciones en las que los nódulos no; esta diferencia está condicionada por la variable resistencia de las células frente al carcinógeno (63).

Selección y evolución celular.

El paso de los hepatocitos originales a la nueva población celular, se caracteriza por una resistencia selectiva a la acción citotóxica del carcinógeno. Estas células resistentes son las que dan origen a otra nueva población, la cual establece otro proceso de selección de crecimiento. Por tanto, las células hepáticas resistentes y proliferativas se desarrollan dando lugar a otra nueva población la cual, a través de un proceso selectivo, introducirá la malignidad. Esta última población de células –irreversible y no dependiente del carcinógeno– mediante la progresión y el incremento de la malignidad, es la que llevará finalmente, al carcinoma hepatocelular, incluyendo la metástasis. El proceso de iniciación surge con la primera administración del carcinógeno, y sigue cronológicamente después el proceso de selección –resistencia y crecimiento– que da lugar a nuevas poblaciones. Por último el proceso de progresión selecciona la malignidad originando la metástasis.

La interferencia con la función del hepatocito, incluyendo la muerte celular y la necrosis (65), desencadena un estímulo para la proliferación regenerativa celular, quizás similar a la que ocurre después de la elimi-

nación quirúrgica de una porción de hígado. Sin embargo, la población original de hepatocitos no responde por sí misma debido a la inhibición citotóxica. Inicialmente, la única población que podría responder serían las células del epitelio ductular. En vista de la relativa especificidad celular de activación de bastantes cancerígenos hepáticos, cabe asumir que los sistemas apropiados, activadores enzimáticos, están ausentes o son muy bajas en las células ducturales.

Como se ha indicado con anterioridad, una de las primeras consecuencias, derivadas de la administración del hepatocarcinógeno, es la aparición de nuevas poblaciones de células, que comienzan a responder al estímulo de la proliferación celular. Merced a las alteraciones, inducidas en sus macromoléculas por el carcinógeno activado, desarrollan resistencia a éste y pueden funcionar y proliferar en su presencia. La resistencia es posible lograrla por diversos mecanismos: desarrollo de una tolerancia al carcinógeno; disminución o pérdida de la capacidad de activación del procarcinógeno; alteración básica de su organización celular, de tal manera que no responda más a la misma lesión bioquímica de manera normal. Una de las características ultraestructurales de las células, de las nuevas poblaciones, es el abundante retículo endoplásmico liso existente en ellas. Las sustancias inductoras del «sistema enzimático metabolizador de sustancias extrañas» provocan también la proliferación del retículo endoplásmico. Estas poblaciones celulares se caracterizan por una pérdida progresiva de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa. Por tanto, el nuevo retículo endoplásmico liso es por algunos calificado de hipertrófico, aunque hipoactivo (62), incluso para aquellos efectos enzimáticos responsables de convertir procarcinógenos en carcinógenos.

Una base alternativa, para explicar la resistencia relativa de las nuevas poblaciones de células, cabe sea la pérdida de proteínas de enlace, tal como la ligandina y otras (122), que es posible que participen en la incorporación y metabolismo de los cancerígenos. También las células pueden adquirir propiedades de superficie que retarden o prevengan la incorporación del carcinógeno al medio. La observación de que estas nuevas poblaciones de células presentan cambios ultraestructurales en la membrana plasmática, está de acuerdo con la última posibilidad.

El posterior desarrollo del cáncer hepático es observable como ejemplo de evolución celular, cuya dirección principal es la selección de un crecimiento más eficiente, seguido de la adquisición de propiedades tales como invasión y metástasis (62). Este es en principio, asimismo, la teoría de Foulds (79), quien al analizar diversos procesos carcinogénicos indica que esta variabilidad se explica satisfactoriamente por la idea del desarrollo independiente y consolidación de la malignidad.

Las fuerzas que conducen a la progresión del tumor constituyen una selección natural de variantes de la población heterogénea de células neoplásicas. La mayor parte de los tumores, con excepción de los hereditarios, son de origen clonal y proceden de una célula transformada única. En tanto en cuanto la población celular patológica permanece fenotípicamente homogénea, no presenta base para la progresión tumoral vía selección natural de variantes: mayor autonomía; crecimiento más rápido; mejor adaptación al escaso suplemento de oxígeno; nutrientes y otros factores vitales, etc. De esta manera, mientras tal población celular neoplásica permanezca monoclonal se comportará como neoplasma benigno o adenoma, tan pronto como se vuelve heterogénea la progresión comienza y se seleccionan preferencialmente variantes malignas.

En lo concerniente a las relaciones entre el carcinoma hepatocelular y los nódulos regenerativos e hiperplásicos, cabe preguntarse: ¿son las nuevas poblaciones de células –descritas con anterioridad– precursores obligatorios del cáncer? De acuerdo con experimentos de Farber y cols. (65), la población derivada de los hepatocitos originales, aunque aparece regularmente cuando se administra un carcinógeno –por ejemplo el 2-acetilaminofluoreno en la dieta durante semanas y meses– puede ser eliminada, o de menor duración, cuando la carcinogénesis se inicia con una o más inyecciones de un derivado muy activo como el N-hidroxi 2-aminofluoreno; en estas circunstancias los nódulos aparecen y crecen sin más estímulos exógenos (13). En composición estos nódulos están formados por células de las dos poblaciones. Un concepto importante en el estudio de la carcinogénesis es determinar la presencia de fases obligatorias y variables, que dependan del estímulo y de las circunstancias. Como las circunstancias durante la inducción del cáncer cambian, la necesidad de ciertas fases puede también hacerlo.

En este contexto, la carcinogénesis es recomendable contemplarla más fácilmente desde el punto de vista de la probabilidad. Ante un hígado, sometido en su totalidad a la acción de un carcinógeno, solo una pequeña parte de las células dará lugar a nódulos reversibles; muchos se desarrollarán, pero sólo una mínima proporción se convertirán en irreversibles. De estos nódulos irreversibles a menudo se desarrollan una multitud, pero sólo unos pocos lo hacen durante la vida del animal. El nódulo irreversible, por otra parte, está formado por muchas células, pero sólo algunas de ellas adquirirán la malignidad y desarrollarán carcinomas hepáticos. Por tanto, es afirmable que existe una selección continua hacia un número progresivamente menor de células reactivas apropiadas, cada una de ellas con probabilidad más acentuada de desarrollo y evolución hacia el cáncer.

El desafío para el investigador interesado en el estudio del desarrollo neoplásico, es tratar de aislar, identificar y concentrar las diferentes clases de células en cada fase del proceso, para aplicarlas los más avanzados métodos en biología molecular. Esto presupone que las diferentes poblaciones de células identificadas hasta la fecha, y aquellas por identificar, sean parte de una secuencia lineal que conduzca al cáncer, dentro de las condiciones apropiadas de selección y crecimiento. Si bien son aún incompletas las pruebas acerca de la validez de todo lo anteriormente expuesto, no obstante, una serie de hechos demostrados sostienen estas hipótesis; cada sustancia hepatocarcinogénica induce, virtualmente, una serie de cambios comunes, entre los cuales se incluyen lesiones focales o nodulares, regenerativas e hiperplásicas; otros componentes, a menudo tan tóxicos como los hepatocarcinógenos —el naftilisotiocianato— llevan a alteraciones citotóxicas en el hígado, pero no a la formación de poblaciones nuevas de células, y no han demostrado hasta la fecha su capacidad carcinógena en las especies estudiadas. Con una sustancia de capacidad carcinogénica comprobada, como el 2-acetilaminofluoreno, se encuentra una forma ligada al glucógeno, en la tercera población de células, y en el carcinoma hepatocelular, pero no en las células del hígado circundante. El carcinoma hepatocelular surge en el interior de nódulos hiperplásicos, sin que haya evidencia acerca de su aparición en otro lugar de la viscera.

En casos de carcinoma hepatocelular, experimental y humano, la producción incrementada de α -fetoproteína, se da en las primeras fases de la carcinogénesis. La α -fetoproteína, aparece a la vez que la población de células que inducen la formación de nódulos regenerativos (158). Se halla en elevadas concentraciones en sangre fetal, materna y en la de adultos con hepatomas, y rara vez con otros tumores (1); las cantidades son muy pequeñas en individuos normales. Es, por tanto, un ejemplo de antígeno asociado oncofetal. Como el incremento de la biosíntesis de α -fetoproteína es una propiedad adquirida en las primeras fases de la carcinogénesis, en animales sin evidencia patológica, el análisis de la inmunofluorescencia positiva de aquella es utilizable como prueba específica para el diagnóstico del carcinoma hepatocelular (59). La significación biológica y bioquímica de la producción de α -fetoproteína es aún bastante oscura y cabe preguntarse por qué reaparece una propiedad de hígado fetal en momentos en los que la proliferación celular depende del carcinógeno.

Otra singularidad de los cánceres hepáticos es la aparición de isoenzimas diferentes, especialmente en relación con el metabolismo de los glúcidos. En general, los tipos de isoenzimas se relacionan con el crecimiento de los neoplasmas. En línea con esto están los ensayos

de Weinhouse (240), quien ha demostrado que los isoenzimas en las nuevas poblaciones de células, se parecen a los encontrados en los hepatocitos originales y no a los de cáncer hepático. Estos resultados necesitan confirmación, ya que la implicación de las observaciones del citado investigador llevaría a la conclusión de que la producción de isoenzimas es un fenómeno más tardío que la formación de α -fetoproteína, en la secuencia de cambios que conducen al cáncer y su formación relacionable más con la progresión de un cáncer.

Otro aspecto importante de la fase de desarrollo neoplásico es el control inmunológico del huésped. Friedrich-Freska (85) sugieren que los factores inmunológicos desempeñan un papel muy al principio del proceso de la carcinogénesis hepática. Sin embargo, la notable ausencia de respuesta a conjuntos de células de las poblaciones celulares segunda y tercera y la falta de algún efecto mensurable del suero anti-linfocito o irradiación X, sobre la regresión de nódulos de la población segunda, no refuerzan la suposición de una mayor actividad de la inmunidad celular en la fase inicial de la carcinogénesis. Por otro lado, antes de alcanzarse conclusión alguna, concerniente a la importancia de los factores inmunológicos en la génesis del cáncer hepático, es necesario y urgente más trabajo; tanto acerca de la modulación del proceso patológico por modificaciones del ambiente inmunológico, como sobre la antigenicidad de diferentes poblaciones de células en relación con la de neoplasmas malignos.

Lesiones pretumorales

En fases iniciales de carcinogénesis química, se han detectado zonas de células precursoras posibles de carcinoma hepático. Cameron y cols., (29), han analizado los focos proliferativos de hepatocitos -resistentes al 2-acetilaminofluoreno- que emergen treinta horas después de hepatectomía parcial en ratas, previamente tratadas con una sola dosis de dietilnitrosoamina. Esta resistencia celular frente a otros agentes hepatotóxicos se considera como propiedad marcadora de premalignidad.

En los focos de hepatocitos resistentes se da un incremento notorio en la actividad de la -glutamyl transferasa, la cual a las tres semanas de tratamiento asciende hasta 30-40 veces el valor normal, que supone el encontrado en hepatomas. Los nódulos hiperplásicos, con actividades -glutamyl transferasa treinta veces superior a la normal, se conceptúan todavía como precursores de hepatomas. En zonas circunscritas de hepatocitos, alterados en las fases iniciales de la carcinogéne-

sis inducida por dietilnitrosoamina, se han descrito actividades muy disminuídas, o desaparecidas de glucosa-6-fosfatasa y de la ATPasa (204).

En hígado de ratas treinta días después del tratamiento con dietilnitrosoamina se han detectado histoquímicamente zonas celulares transformadas que presentaban una acumulación de glucógeno después de haber sido sometidas a ayuno total durante dieciocho horas (1). En estas células las variaciones circadianas de la actividad mitótica desaparecen completamente, lo que lleva consigo un descontrol sobre la división que indica la naturaleza neoplásica de las zonas anteriormente mencionadas. Por tanto, el término tan usado de «lesiones preneoplásicas» es inapropiado, ya que en ese momento existen células neoplásicas. Una de las propiedades más características de los hepatomas completamente desarrollados, es la pérdida del control «*feedback*» en el complejo proceso de la síntesis del colesterol. Este fenómeno puede revelarse en hígado de rata en las fases primarias de la carcinogénesis química con etionina, meses antes de que el tumor aparezca (191).

El complejo de carcinogénesis en neoplasmas inducidos por radiaciones (49) encaja, en general, con todo lo ya citado para la carcinogénesis química. La rápida lesión conseguida por irradiación en el DNA y cromosomas hepáticos –la latencia de tales cambios, el papel de la proliferación celular y la necesidad de una cierta selección– para estimular el desarrollo de las células alteradas (237)– todo ello indica la existencia de una similitud fundamental entre la carcinogénesis inducida por radiación y por agentes químicos.

La naturaleza esencial de las alteraciones celulares progresivas, que conducen en sus últimas causas al cáncer hepático, continúan siendo un reto. El proceso fundamental es adquirir una sucesión de mutaciones, estimuladas en su desarrollo en virtud de la selección del huésped. Puede considerarse como un proceso semejante a la diferenciación, desencadenado por alteración química en algunas células hepáticas en la población original, incitadas por el medio ambiente del huésped. La presencia de señales lesivas en el DNA en la nueva población con un cancerígeno, 2-acetilaminofluoreno, hace pensar en cambios muy sutiles en algunas células, preparadas para una selección y desarrollo posterior. Sin embargo, el análisis aclaratorio del proceso carcinogénico ha conducido a una reconciliación e integración de los conceptos mutación somática y diferenciación alterada. La posibilidad de aislar selectivamente, por medio de crecimiento diferencial; poblaciones nuevas de células, que surgen a lo largo de la carcinogénesis hepática, resulta ahora factible. Obviamente, la clave del éxito de tal acercamiento es clarificar la naturaleza esencial de las fuerzas que con-

ducen a la selección, y operan en las diferentes fases durante el desarrollo neoplásico. Tal acercamiento –acoplado al conocimiento de la carcinogénesis en poblaciones hepáticas «in vitro»– ofrece una esperanza real acerca de las fases, a través de las cuales los hepatocitos se desenvuelven durante la evolución celular hacia el cáncer. Este sería uno de los interesantes desafíos de la moderna biología en su aplicación a la investigación del cáncer.

Rediferenciación o regresión

Se ha expuesto, con anterioridad, cómo proliferaciones focales de hepatocitos alterados se observan, prácticamente, en cada modelo de hepatocarcinogénesis experimental (7, 173, 214, 244).

Estas proliferaciones comienzan a manera de colecciones microscópicas de células, que surgen inmediatamente después de la iniciación y van creciendo hasta llegar a convertirse en nódulos visibles, después de exposición continuada a carcinógenos o a otros promotores ambientales. Los nódulos se han denominado de diversa manera: nódulos neoplásicos, hiperplásicos, adenomas, etc., y se ha demostrado que son lugar de origen para el carcinoma hepatocelular. Estos nódulos presentan tipos característicos y consistentes, con estructura celular, bioquímica, histoquímica y arquitectura tisular muy diferente –desde el punto de vista fenotípico– de los hígados normales, sea cual fuere su estado de desarrollo, y son al menos de dos opciones conocidas. La mayoría de ellos (90 al 98%) desaparecen en el proceso denominado «regresión», remodelación o maduración fenotípica, pero algunos persisten, aumentan de tamaño y, eventualmente, dan lugar a nuevos nódulos de los cuales surgirá el carcinoma hepatocelular.

Una cuestión fundamental, para el conocimiento de la hepatocarcinogénesis experimental, se relaciona con la naturaleza del proceso de regresión. Los hepatocitos alterados fenotípicamente en los nódulos, inducidos por carcinógenos, pueden remodelarse en otros de hígado adulto normal –rediferenciación– o remplazarse por los procedentes del tejido hepático circundante.

Hasta la fecha los experimentos demuestran que, durante la remodelación, los marcadores histoquímicos previamente negativos para los nódulos –tales como la glucosa-6-fosfatasa– vuelven a retornar, mientras que los típicamente positivos de las formaciones nodulares como la γ -glutamyltranspeptidasa y la epóxido hidrolasa desaparecen. Posteriores aportes del grupo de Farber (227), han establecido, por primera vez, que la mayoría de los hepatocitos, que participan en el proceso de

remodelación de los nódulos, se encontraban presentes durante el desarrollo y no derivaban de los de fuera de éstos. De este modo, el proceso de remodelación consistiría, esencialmente, en la rediferenciación de los hepatocitos en vez de una regresión.

Los nódulos hepáticos muestran, además del espectro de alteraciones fenotípicas ya citadas respecto a los normales adultos una característica relacionada aparentemente con la resistencia a los efectos citotóxicos de los xenobióticos (61). Como los nódulos remodelados hacia hígado adulto normal presentan cambios en sus características fenotípicas –y como ésto ocurre con la participación activa de una gran parte de los hepatocitos presentes durante el desarrollo de aquellos– cabe concluir que el proceso remodelador es un fenómeno programado genéticamente. Así, una curiosa población nueva de hepatocitos, inducida por un carcinógeno químico durante la iniciación, expresa un proceso complicado de diferenciación, que parece ser fenotípicamente diferente de algún otro tipo visto durante el desarrollo normal; ésto justificaría la utilización del término «rediferenciación». De acuerdo con Tate-matsu y cols. (227), si esta conclusión es válida, entonces debe suponerse que el proceso de remodelación es un fenómeno fisiológico normal, cuya información está presente en el genoma del hígado adulto. Ello sugeriría que es normal una mayor expresión del hígado durante la iniciación o la postiniciación. El fenómeno de remodelación se considera como una forma de adaptación fisiológica a la acción de los xenobióticos, y es posible juegue un papel positivo en la evolución. Por otra parte se sabe poco aún acerca de las bases para la elección de cualquier nódulo, en una de las dos opciones: remodelación o persistencia. El proceso de remodelación descrito por estos autores (227), es el mismo ya indicado por otros investigadores como reversibilidad o regresión de los nódulos (228).

Los nódulos hiperplásicos que persisten a lo largo de la hepatocarcinogénesis química tienen un distinto tipo de crecimiento, función y perfil proteico, que se diferencia claramente del hígado normal o no nodular. Se ha puesto de manifiesto, directa e indirectamente, la relación que existe entre estos nódulos hepáticos persistentes y el cáncer hepatocelular. La mayoría de los nódulos se han citado también en hepatomas, lo que hace suponer que entre ambas formas existe una continuidad (64). Recientemente (75) se ha analizado el estímulo diferencial del metabolismo de la progesterona en nódulos hiperplásicos de rata macho, y se ha puesto de manifiesto cambios en la diferente respuesta de la membrana microsomal a la unión con la hormona, la cual es similar a la encontrada en hepatoma.

Noduligénesis hiperplásica

Un nódulo neoplásico o hiperplásico en hígado es definible como una lesión persistente en crecimiento expansivo, que incluye hepatocitos alterados de forma característica y dispuestos de manera irregular. Los nódulos son, generalmente, esféricos y pueden ocupar áreas superiores a un lóbulo hepático. Muchos de estos nódulos muestran una demarcación notable entre el parénquima que los rodea, el cual se encuentra a menudo comprimido. En hígados cirróticos –como ocurre en el caso de la tioacetamida– los nódulos se hallan demarcados por tejido conjuntivo. Los hepatocitos que entran a formar parte de estos nódulos exhiben alteraciones características citoplasmáticas, mitocondriales nucleares y en el retículo endoplásmico (36, 37, 38). Las áreas portales y las venas centrales, cuando no están ausente, se localizan en el interior de los nódulos (6). En estos nódulos cabe distinguir, mediante microscopía óptica, al menos cuatro tipos de células diferentes: células «claras» que acumulan una excesiva cantidad de glucógeno; «acidofílicas», cuya característica es una hipertrofia en el retículo endoplásmico liso, y que también almacenan glucógeno; «vacuolizadas» con numerosas gotas lipídicas en su interior, y «basofílicas» que carecen de glucógeno y son ricas en ribosomas. Las células de los dos primeros tipos están en mayoría en los nódulos que se pueden clasificar como preneoplásicos. A medida que éstos vayan dando paso a las células «vacuolizadas» y a las «basofílicas», el nódulo irá acercándose a un estado neoplásico.

El enigmático panorama de los nódulos neoplásicos se clarificará cuando se consigan detectar los cambios celulares, paso a paso, durante la hepatocarcinogénesis. Las células claras y acidofílicas, preceden en semanas y a veces en meses, el desarrollo de los nódulos neoplásicos. Estos dos tipos de células forman generalmente focos localizados, predominantemente en las zonas periféricas del lóbulo y en menor grado en las regiones centrales. El término «area hiperplásica», utilizado frecuentemente para definir estas alteraciones, ha sido discutido, ya que la misión de una hiperplasia regenerativa celular en el desarrollo de un foco es algo que permanece sin demostrar.

En las últimas fases de la hepatocarcinogénesis las células «claras» y «acidofílicas» del foco frecuentemente se entremezclan con otras «vacuolizadas» y «basofílicas». Por tanto, puede hablarse de focos preneoplásicos, siempre y cuando prevalezcan los dos primeros tipos de células (52).

Algunas veces las células que en estados intermedios todavía contienen cantidades considerables de glucógeno, toman parte de la for-

mación de carcinomas trabeculares incluso pueden metastatizar en los pulmones. Sin embargo, como ya demostraron convincentemente los estudios en hepatomas de Morris transplantables, los carcinomas hepatocelulares están formados, casi exclusivamente, por células intensamente basofílicas, es decir ricas en ribosomas y pobres en glucógeno. Por otra parte, en los hepatomas de Morris transplantables de crecimiento lento, se han detectado células ricas en glucógeno que contienen cisternas de retículo endoplásmico con inclusiones de citoplasma. Cabe considerar justificada la aparición de tales estructuras de retículo endoplásmico en células con acúmulo de glucógeno, como una primera y temprana muestra de su transformación neoplásica (6).

Una cuestión importante, a la que hasta el momento no se ha dado respuesta satisfactoria, es la concerniente al período eclipse de transformación de un nódulo neoplásico en carcinoma hepatocelular, que fluctúa entre unas pocas semanas a muchos meses. Respecto a si los nódulos hiperplásicos son un paso obligatorio para la hepatocarcinogénesis, bastantes observaciones bioquímicas y morfológicas aclaran que los cambios celulares característicos pueden también tener lugar en el parénquima hepático. Cuando tales focos están compuestos por células basofílicas, es lógico denominarlos microcarcinomas o carcinomas *in situ*. Los focos basofílicos de este tipo pueden mostrar cambios atípicos celulares prominentes, junto con una notable elevación de la mitosis.

Alteraciones pre y neoplásicas

Durante la administración de carcinógenos químicos se desarrollan diferentes lesiones focales y nodulares en hígado de roedores antes de originarse el carcinoma hepatocelular. Estas lesiones preneoplásicas pueden distinguirse del parénquima hepático normal, mediante algunos marcadores bioquímicos. La γ -glutamyl transpeptidasa es un marcador importante de poblaciones preneoplásicas y de la misma forma que la α -fetoproteína, cuya presencia está demostrada en hígado fetal, desaparece a las pocas semanas del nacimiento y posteriormente aparece sólo en epitelio del conducto biliar (29).

En diversos modelos de hepatocarcinogenicidad (173, 214), se ha evaluado la capacidad relativa de inducir lesiones focales mediante la determinación histológica de la γ -glutamyl transpeptidasa (129). Como el desarrollo de tumores hepáticos en animales de experimentación, está precedido de glucogenogénesis hepatocelular, varios enzimas del metabolismo de carbohidratos pueden considerarse como marcadores

bioquímicos importantes. Así, en hígado de ratas tratadas con N-nitrosomorfolina, se ha examinado el comportamiento de varios enzimas del metabolismo de carbohidratos, que fueron también identificados por métodos histoquímicos: glucógeno sintetasa, glucógeno fosforilasa, glucosa-6-fosfatasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (93). Los focos con acúmulo de glucógeno que aparecen tempranamente, mostraron una reducción de la actividad enzimática de la fosforilasa del glucógeno y en la glucosa-6-fosfato fosfatasa, y un incremento simultáneo en la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se elevaron en focos con células mezcladas, en nódulos neoplásicos y en los tumores que emergen en las últimas fases. Esto hace pensar que existe una canalización progresiva desde el glucógeno hacia la glucólisis y el ciclo de los fosfatos de pentosa. Entre otros estudios acerca de las propiedades bioquímicas de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas, se ha encontrado un nuevo fucogangliósido –glucolípido que contiene fucosa–, que se acumula por administración de 2-acetilaminofluoreno. Este glucolípido no ha sido detectado nunca en hígado normal (95) y puede considerarse como producto de transformaciones premalignas y como marcador de membranas para la identificación de lesiones premalignas. Los focos hiperplásicos, los nódulos y hepatomas, son lesiones proliferativas caracterizadas por alteraciones bioquímicas, que muestran diversos grados de crecimiento autónomo. El contenido del DNA se relaciona con el tipo histológico de cáncer o grado de malignidad de los tumores. Se ha estudiado el contenido en DNA de estas lesiones proliferativas, especialmente los focos pre-neoplásicos, en hígado de rata, inducidos por 2-acetil aminofluoreno (149). El tipo de DNA de los focos alterados fué comparable al de los tejidos metaplásicos o displásicos y está considerado como uno de los cambios precancerosos. De importancia particular ha sido el descubrimiento de que los histogramas del DNA de los focos hiperbasofílicos mostraron un tipo aneuploide similar al del carcinoma hepatocelular. Al contrario de lo que ocurre con la carcinogénesis química en animales, en la que aparecen focos preneoplásicos morfológica e histológicamente distintos, antes de que la hepatocarcinogénesis se haga patente, los cambios preneoplásicos en humanos son controvertidos.

Los cambios fenotípicos que tienen lugar en los focos detectables histoquímicamente de hepatocitos alterados que aparecen invariablemente en ratas tratadas con carcinógenos han sido intensamente estudiados, en los últimos años, con el objeto de profundizar en los procesos neoplásicos.

Recientemente se ha puesto a punto un sistema experimental nuevo, que consistió en administrar a una rata macho o hembra un día después del nacimiento una dosis i.p. de un carcinógeno como el benzopireno. Después del destete los animales fueron sometidos a un promotor como el fenobarbital, administrado en la dieta. El crecimiento de los focos se relacionó directamente con el número de marcadores fenotípicos por foco, pero una fracción sustancial de los tumores observados presentaron un menor número de marcadores que los focos más complejos. Estos autores han sugerido que los focos emergen como resultado de una serie específica de cambios celulares exclusivamente inducibles por estímulos carcinogénicos, pero que los focos no se transformarían en tumores (170, 171).

También se ha investigado la cinética del ciclo celular en lesiones preneoplásicas en hepatocarcinogénesis, para explorar la proliferación celular. Los hepatocitos resistentes, que representan una de las primeras poblaciones preneoplásicas, mostraron una prolongación del ciclo celular, debido en gran parte a una prolongación de la fase S, cuando se comparó con hepatocitos en regeneración (186).

Las características neoplásicas han sido también observadas en nódulos hepatocelulares y tumores de ratón (189), para ver la posibilidad de que tuviera lugar una regresión espontánea de tumores hepatocelulares. Se obtuvieron biopsias secuenciales de ratones macho C3H tratados con dieldrina, de animales tratados con N-dietilnitrosoamina y de ratones no tratados. Sólo unos pocos ratones presentaron una progresión histológica de adenoma a carcinoma. Se observó en algunos casos, un cambio en el tipo predominante de células en adenoma, de claras a basófilas. Los carcinomas hepatocelulares aparecieron en algunos animales a los dos años de edad. De estos resultados puede deducirse que los tumores hepáticos espontáneos y los tumores en ratones tratados con carcinógenos completos o compuestos no genotóxicos, presentaban una fuerte tendencia a progresar y que la regresión tumoral en ratón no era común.

Oncogenes y hepatomas experimentales

Con el objeto de observar el fenómeno de la inducción de fenotipos asociados a hepatomas, trabajos muy recientes de Sinha y Cols., (210) han utilizado una línea celular epitelial, derivada de hígado de rata, después de la transfección con oncogenes. Aunque se sabe que los cultivos primarios de hepatocitos no tienen capacidad de dividirse, es posible transformarlos mediante virus tales como el SV40 (118). Se ha con-

seguido de esta manera una línea celular derivada de hígado de rata, en división continua y poco diferenciada, la BL8, que ha facilitado el estudio de un único gen transformante (130). Se ha estudiado sobre esta línea celular, los efectos del gen *ras* y de otro gen marcador de resistencia a drogas, el G418, con lo que se obtuvieron colonias transformadas y resistentes. Por transfección solo con el gen de resistencia fueron obtenidos los controles. Las colonias transformadas por el gen *ras* mostraron una morfología alterada a la vez que un crecimiento independiente y una capacidad tumorigénica en ratón. Estas características no aparecieron en las colonias resistentes no transformadas.

Este mismo grupo de investigadores (210) ha tratado de observar los efectos de la transfección con el gen *ras* activado, sobre los niveles de la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa. Se sabe que la actividad de este enzima se relaciona con la proliferación hepática. La γ -glutamil transpeptidasa es una proteína asociada a membrana (234) que se encuentra normalmente ausente en hepatocitos de rata adulta. Esta actividad enzimática se induce durante los cambios preneoplásicos en hígado y también durante la regeneración hepática (94).

En células transformadas por transfección de las células BL8 con el gen *ras* en conjunción con el gen de resistencia a drogas, la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa fué mucho más elevada en el caso de las colonias transformadas que en el de las colonias resistentes (210).

* * * * *

FINAL

Uno de los objetivos de la hepatotoxicidad experimental es el análisis del destino metabólico de un compuesto dado y de la influencia de factores exógenos y endógenos sobre ese metabolismo. La finalidad de estos análisis es proporcionar evidencia científica de la potencialidad tóxica de una sustancia y suministrar información apreciable sobre los diversos factores concernientes a su uso, sin riesgos, por el hombre.

En la evolución de un tumor maligno durante la carcinogénesis química, ya hemos indicado, se encuentran involucradas lesiones en el DNA. Los carcinógenos químicos y los promotores de tumores, en con-

traposición con los virus oncogénicos, no pueden introducir nueva información genética en las células. Así, durante el proceso de transformación, estas sustancias deben reclamar genes presentes en las células para inducir y mantener el estado transformado. Resulta atractiva la hipótesis de que los agentes químicos pueden actuar induciendo alteraciones en el estado de integración y/o expresión de los oncogenes, como también la relación de estas alteraciones con la expresión de genes fetales, la transcripción de enzimas inapropiadas y la diferenciación de células cancerosas. Una de las áreas de investigación futura en el proceso de promoción tumoral es la identificación de proteínas específicas fosforiladas por la proteína quinasa C, para poder comprobar la cascada de reacciones que tiene lugar en este proceso.

Los hepatocitos aislados presentan un excelente medio para resolver problemas relacionados con las interacciones entre tóxicos, fármacos y otros agentes procedentes del medio ambiente. Los hepatocitos en cultivo mantienen la mayor parte de la actividad funcional del hígado intacto y resultan muy útiles para investigar la citotoxicidad de los xenobióticos sobre el metabolismo celular.

Los factores hepatotrópicos más activos pueden utilizarse en cultivos de hepatocitos donde estimulan la síntesis del DNA y la proliferación celular. De esta manera es hoy posible conseguir que poblaciones de células homogéneas del parénquima hepático, identifiquen los factores hepatoproliferativos para estudiar su mecanismo de acción. El establecimiento de sistemas que permiten la replicación de los hepatocitos en cultivo amplía el horizonte para el estudio del complejo y multiescalonado proceso de la carcinogénesis. También se puede ya investigar directamente acerca del efecto de los carcinógenos o de la replicación sobre hepatocitos iniciados, y la asociación entre los factores de crecimiento, la regeneración y la carcinogénesis. Es de esperar que con una combinación propicia de suplementos al medio de cultivo, factores de crecimiento y sustratos, se pueda llegar a conseguir condiciones favorables que permitan el crecimiento clónico de los hepatocitos.

La aplicación de estas técnicas a hepatocitos humanos podrá proporcionar en el futuro una información singular, no conseguida hasta el momento a partir del hígado. El cultivo de hepatocitos humanos y la posibilidad de su conservación a muy bajas temperaturas, puede llegar a reducir o reemplazar a los procedentes de animales de experimentación. Se evitará con ello, en estudios farmacológicos y toxicológicos, el problema de la extrapolación al hombre de resultados obtenidos en animales.

Llegado este momento trascendental e irrepetible en mi vida de la toma de posesión como Académica Numeraria de esta Real Academia, finalizo mi discurso de ingreso, no sin antes reiterar mi rendido agradecimiento por vuestra generosidad y atención. He dicho.

BIBLIOGRAFIA

1. Abelev, G. I. (1971) *Adv. Cancer Res.* 14, 295-358.
2. Abell, C. W. y Monahan, T. M. (1973) *J. Cell. Biol.* 59, 549.
3. Anderson, M. N., Raghunveera-Ballal, N. y Busch, H. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 129-135.
4. Auburger, A., Samson, M. y Lecam, A. (1983) *Biochem. J.* 214, 679-685.
5. Badwey, J. A. y Karnovsky, M. L. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 697-726.
6. Bannash, P. (1976) *Cancer. Res.* 36, 2.555-2.562.
7. Bannash, P., Mayer, D. y Hacker, H. J. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 605, 217-245.
8. Baquer, N. Z., Cascales, M. y McLean, P. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 263-269.
9. Baquer, N. Z., Cascales, M., McLean, P. y Greenbaum, A. L. (1976) *Eur. J. Biochem.* 68, 403-413.
10. Barbasson, H., Fridman-Manduzio, A., Leliever, P. y Betz, E. H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 13, 13-18.
11. Barker, E. Z. y Smuckler, E. A. (1972) *Mol. Pharmacol.* 8, 318-326.
12. Becker, F. F. (1974) *The liver. Normal and abnormal functions.* (ed. F.F. Becker) pp 69-86. Marcel Dekker, Ins. Nueva York.
13. Becker, F. E. (1983) *J. Natl. Cancer. Inst.* 71, 553-558.
14. Begue, J. M., Guguen-Guillouzo, C., Padeloup, N. y Guillouzo, A. (1984) *Hepatology* 4, 839-842.
15. Beremblum, I. (1941) *Cancer Res.* 1, 44-84.
16. Bernard, C. (1878) *La Science Experimentale* p. 237. París Bailliere. Citado por Zimmerman (1976). Ref. 40.
17. Bishop, J. M. (1985) *Cancer* 55, 2.329-2.333.
18. Boutwell, R. K. (1964) *Prog. Exp. Tumor Res.* 4, 207-250.
19. Brand, I. A. y Soling, H. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7.824-7.831.
20. Brebnor, L. D. y Balinski, J. B. (1983) *Life Sci.* 32, 1.391-1.396.
21. Brindley, D. N. (1984) *Prog. Lipid. Res.* 23, 115-133.
22. Brodie, B. B. y Gillette, J. R. (1958) *Ann. Rev. Biochem.* 27, 427-488.
23. Brown, K. D., Blay, J., Irvine, R. F., Heslop, J. P. y Berridge, M. J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 377-384.

24. Bucher, N. L. R., Patel, U. y Cohen, S. (1978) *Adv. Enzyme Reg.* 16, 205-213.
25. Bucher, N. L. R. (1984) *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* 9, 15-26.
26. Buchi, K., N., Gray, P. D., Rollins, D. E. (1984) *J. Clin. Pharmacol.* 24, 148-153.
27. Burnet, F. M. (1976) *en Inmunology, Aging and Cancer*, San Francisco. W. R. Freeman, p. 136.
28. Bush, H., y Smetana, K. (1970) *The nucleolus*, pp 492-497.
29. Cameron, R., Kelln, J., Kolin, A., Malkin, A. y Farber, E. (1978) *Cancer. Res.* 38, 823-829.
30. Canellakis, Z. N. y Theoharides, R. C. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4.436
31. Cascales, C., Mangiapane, E. H. y Brindley, D. N. (1984) *Biochem J.* 219, 911-916.
32. Cascales, C., Martín-Sanz, P., Pittner, R. A. Hopewell, R. Brindley, D. N. y Cascales, M. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 2.655-2.661.
33. Cascales, C., Craciunescu, D. G. Martín-Sanz, P. y Cascales, M. (1987). *Biol. Trace Element Res.* 12 (1) en prensa.
34. Cascales, C., Cerdán, S., Boscá, L. y Cascales, M. (1987) (en preparación).
35. Cascales, M., Feijoo, B., Cerdan, S., Cascales, C., y Santos Ruiz, A. (1979) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 129-132.
36. Cascales, M., Robles-Chillida, E. M., Feijoo, B., Cerdan, S., Martín-Sanz, P., y Santos-Ruiz, A. (1982) *Rev. Esp. Fisiol.* 38 supl. 105-112.
37. Cascales, M., Cerdan, S., Robles-Chillida, E. M. y Feijoo, B. (1982) Premio de la Real Academia de Farmacia.
38. Cascales, M., (1987) *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas* (Coord. M. Cascales y F. Ferrándiz) C.S.I.C. Madrid.
39. Castagna, M., Takai, Y., Kibuchi, K. y Saino, K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7.847-7.851.
40. Castro, J. A., de Ferreyra, E. C., de Castro, C. R. y de Fenos, O. M. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 295-302.
41. Castro, J. A., Acosta, N. D., de Ferreyra, E. C., de Castro, C. R. Díaz Gómez, M. I. y de Fenos, O. M. (1974) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 30, 79-86.
42. Cerdan, S. (1978) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
43. Cerdan, S., Cascales, M., Chacon, M. P., Cascales, F y Santos-Ruiz, A. (1978) *Arch. Toxicol.* Suppl. 1, 221-224.

44. Cerdan, S., Cascales, M. y Santos Ruiz, A. (1981) *Mol. Pharmacol.* 19, 451-455.
45. Cleare, M. J. (1974) *Coord. Chem. Rev.* 12, 349-405.
46. Conney, A. H. (1967) *Pharmacol. Rev.* 19, 317-366.
47. Craciunescu, D. G., Ghirvu, C. y Doadrio, A. (1983) *Anal. Real Acad. Farm.* 49, 515-530.
48. Craddock, V. M., Henderson, A. R. y Gash, S. (1984) *Cáncer Res. Clin. Oncol.* 108, 30-55.
49. Curtis, H. J. y Tilley, J. (1972) *Rad. Res.* 50, 539-542.
50. Chakrabarty, P. K., Schneider, W. C. (1978) *Cáncer Res.* 38, 2.043-2.047.
51. Chieli, E. y Mavaldi, G. (1984) *Toxicology* 31, 41-52.
52. Daoust, R. y Calami, R. (1971) *Cáncer Res.* 31, 1.290-1.296.
53. Decker, K. y Keppler, D. (1972) *Progress in Liver Disease.* (eds. H. Popper y F. Schaffner) vol. IV pp. 183-189. Grune & Stratton, Inc. Nueva York.
54. Dehand, J., Jordanov, J. y Bech, J. P. (1975) *Chem. Biol. Interactions* 11, 605-609.
55. Demetriou, A. A., Seifler, E. y Levenson, S. M. (1983) *J. Surg. Res.* 35, 163.
56. Driedger, P. E. y Blumberg, P. M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 567-571.
57. Dudov, K. P. y Dabeva, M. D. (1983) *Biochem. J.* 210, 183-192.
58. Enat, R., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, A. y Reid, L. M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1.411-1.415.
59. Engelhardt, N. V., Goussev, A. I., Shipova, L. J. y Abelev, G. I. (1971) *Inst. J. Cáncer* 7, 198-206.
60. Enomoto, K. y Farber, E. (1982) *Cáncer Res.* 42, 2.330-2.335.
61. Eriksson, L., Ahliwalia, M., Soewak, J., Lee, G., Sarma, D. S., Roomi, M. J. y Farber, E. (1983) *Environ. Health Perspect.* 49, 171-174.
62. Farber, E. (1973) *Methods Cáncer Res.* 7, 345-375.
63. Farber, E., Sarma, D. S. R., Rajalakshmi, S. y Shinozuka, H. (1975) *The liver. Normal and Abnormal Functions.* Part. B (ed. F. F. Becker) pp. 755-771. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
64. Farber, E., y Cameron, R. (1980) *Adv. Cáncer Res.* 31, 125-226.
65. Farber, E. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 486-494.
66. Farber, E. (1984) *Carcinogénesis* (Lond) 5, 1-5.
67. Farber, E. (1984) *Cáncer Res.* 44, 4.217-4.223.
68. Farber, E. y Gerson, R. J. (1984) *Pharmacol. Rev.* 36, 71 S.

69. Fausto, N. (1984) *Mol. Cell Biochem.* 59, 131-136.
70. Fausto, N. y Shank, P. R. (1983) *Hepatology* 3, 1.016-1.023.
71. Feijoo, B., Cascales, C., Cascales, M. y Santos Ruiz, A. (1976) *Clin. Toxicol.* 18, 262-264.
72. Feijoo, B., Aylagas, H., Cascales, M. y Santos Ruiz, A. (1982) *Rev. Esp. Fisiol.* 38 supl. 123-128.
73. Feijoo, B., Toledo, C., Aylagas, H. y Cascales, M. (1984) *Rev. Esp. Oncol.* 31, 15-20.
74. Feinman, L., Rubin, E. y Lieber, C. S. (1972) *Liver and Drugs*, (eds. F. Orlandi y A. M. Jezequel) pp. 41-83. Academic Press. Nueva York.
75. Feuer, G., Stuhne-Sekalec, L., Roomi, M. W. y Cameron, R. G. (1986) *Cáncer Res.* 46, 76-80.
76. Finkelstein, S. D., Lee, G., Medline, A. y Farber, E. (1983) *Am. J. Pathol.* 110, 119-124.
77. Fisher, B., Gunduz, N., Saffer, E. A. y Zheng, S. (1984) *Cáncer Res.* 44, 2.410-2.415.
78. Fitzhugh, D. H. y Nelson, A. A. (1948) *Science* 108, 626-628.
79. Foulds, L. (1975) *Neoplastic Development*. Vol. 2, pp. 205-237. Academic Press. Nueva York.
80. Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M. L. y Starzl, T. E. (1986) *Cáncer Res.* 46, 1.318-1.323.
81. Franke, H., Zimmerman, T. y Dargel, R. (1983) *Virchows Arch.* 44, 99-113.
82. Fridovich, T. (1978) *Science* 201, 875-880.
83. Fridovich, T. (1983) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-257.
84. Friedman, J. M., Chung, E. Y. y Darnell, J. E. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 37.
85. Friedrich-Freska, H., Gossner, W. y Borner, P. (1969) *Z. Krebsforsch* 72, 226-239.
86. Fujii-Kuriyama, Y., Mikuzami, Y., Kawajiri, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79, 2.793.
87. Gaub, J. e Iversen, J. (1984) *Hepatology* 4, 902-907.
88. Gillette, J. R. y Jollow, D. T. (1974) *The Liver. Normal and Abnormal Functions* (ed. F. F. Becker) part A. pp. 165-210. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
89. González-Mújica, F. y Mathias, A. P. (1973) *Biochem. J.* 133, 441-445.
90. Gressman, A. M. y Greiling, H. (1978) *Exp. Mol. Pathol.* 28, 39-47.

91. Grisolia, S. (1987) en *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas*. (coord. M. Cascales y F. Ferrándiz) C.S.I.C. Madrid (en prensa).
92. Habib, W. H., Pabst, M. J. Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M. y Jacoby, W. B. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA 71, 3.879.
93. Hacker, H. J., Moore, M. A., Mayer, D., Bannas, P. (1982) *Carcinogenesis* 3, 1.265-1.271.
94. Holmes, E. H., Hakomori, S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7.698-7.703.
95. Hanigan, H. M. y Pitot, H. C. (1982) *Carcinogenesis* 3, 1.349-1.354.
96. Holta, E. (1977) *Biochemistry* 16, 91-100.
97. Hopewell, R., Martín-Sanz, P., Martín, A., Saxton, J. y Brindley, D. N. (1985) *Biochem. J.* 232, 485-491.
98. Huerta-Bahena, J. Villalobos-Molina, R. y García-Sanz, A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 763, 112-117.
99. Ivanetich, K. M., Thumser, A. E. A., Ziman, M. R., Baruch, Y. y Kirsch, R. E. (1986) en *The Liver Annual* 5(eds. I. M. Arias, M. Frenkel, M. y Wilson, J. H. P.) pp. 71-115. Elsevier Sci. Pub. Amsterdam. Nueva York.
100. Jamdar, S. C. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 81-94.
101. Jirtle, R. L. y Michalopoulos, G. (1982) *Cáncer Res.* 42, 3.000-3.004.
102. Jollow, D. J., Mitchell, J. R., Zampiglione, N. y Gillette, J. R. (1974) *Pharmacology* 11, 151-169.
103. Kamei, M., Otani, S. Matsui, I. y Morisawa, S. (1982) *Febs Lett.* 150, 332-336.
104. Kaplowith, N., Aw, T. Y. y Ookhtens, M. (1985) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 715-744.
105. Katunuma, N., Okada, M. y Nishii, Y. (1966) *Adv. Enzyme Reg.* 4, 317-335.
106. Kay, J. E. y Lindsey, W. L. (1973) *Biochem. J.* 132, 791-796.
107. Khan, W. A., Gupta, A. Shanker, U. (1984) *Biochem Pharmacol.* 33, 2.009-2.014.
108. Klaassen, C. D., Bracken, W. M., Dudley, R. E., Goering, P. L., Hazelton, G. A. y Hjelle, J. J. (1985) *Fund. Applied Toxicol.* 5, 806-815.
109. Kleinfeld, R. G. y Koulis, S. (1953) *Anat. Rec.* 128, 433-440.
110. Kleinfeld, R. G. y Von Haam, E. (1959) *J. Biophys. Bipchem. Cytol.* 6, 393-398.
111. Koop, D. R. y Coon, J. M. (1984) *Mol. Pharmacol.* 25, 494-501.

112. Koop, D. R., Morgan, E. T., Tarr, G. E. y Coon, J. M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8.482-8.490.
113. Kovacevic, Z. (1971) *Biochem. J.* 125, 757-763.
114. Krebs, H. A., Hems, R. y Lund, P. (1973) *Biochem. J.* 134, 697-705.
115. La Breque, D. R. (1982) *Am. J. Physiol.* 242, G281-G288.
116. La Breque, D. R. (1982) *Am. J. Physiol.* 242, G289-G295.
117. La Breque, D. R.; Wilson, M., Foguerty, S. (1984) *Exp. Cell Res.* 150, 419-424.
118. Lafargue-Frayssinet, C., Estrade, S., Rosa-Lomidon, B., Frayssinet, C., Cassingena, R. (1984) *Cancer lett.* 22, 31-39.
119. Lee G., Makowka, L., Medline, A., Farber, J. L. (1981) *Hepatology* 1, 526-531.
120. Leonard, T. B., Dent, J. G., Graichen, E. M., Lyght, O. y Pop, J. A. (1982) *Carcinogénesis* 3, 851-856.
121. Leonard, T. B. y Jacob, S. T. (1977) *Biochemistry*, 16, 4.538-4.554.
122. Litwack, G., Morey, K. S. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 38, 1.141-1.148.
123. Lowenstein, J. M. (1972) *Physiol. Rev.* 52, 382-414.
124. Luetteke, N. C. y Michalopoulos, G. K. (1985) *Cancer Res*, 45, 6.331-6.337.
125. Machinist, J. M., Orme-Johnson, W. H. y Ziegler, D. M. (1966) *Biochemistry* 5, 2.939-2.943.
126. Majerus, P. M. y Jackobs, R. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3.588-3.542.
127. Makino, R., Hayashi, K. y Sugimura, T. (1984) *Nature* 310, 687-698.
128. Maneu, C. A. y Russel, D. H. (1977) *Science*, 195, 505.
129. Mangiapane, E. H., Lloyd-Davies, K. A. y Brindley, D. N. (1973) *Biochem. J.* 134, 103-112.
130. Manson, M. M., Legg, R. Y., Watson, J. V., Green, J. A. y Neal, G. E. (1981) *Carcinogénesis* 2, 661-670.
131. Martín-Sanz, P. (1981) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
132. Martín-Sanz, P., Santos Ruiz, M. R. y Cascales, C. (1981) *Anal. Real Acad. Farm.* 47, 201-214.
133. Martín-Sanz, P., Hopewell, R. y Brindley, D. N. (1984) *Febs Lett* 175, 284-288.
134. Martín-Sanz, P., Hopewell, R. y Brindley, D. N. (1985) *Febs Lett* 179, 262-266.

135. Martín-Sanz, P., Cascales, C., Robles-Chillida, E. M., Cascales, M. y Brindley, D. N. (1987) Enviado a *Cáncer Res.*
136. Martín-Sanz, P., y Cascales, M. (1987) En preparación.
137. Martínez-Honduvilla, C. J., Cascales, M., Cerdán, S., Riesco, L. y Santos-Ruíz, A. (1981) *Organ directed Toxicity. Chemical Indices and Mechanisms* (IUPAC) (Eds. S. S. Brown, D. S. Davies) pp. 183-189. Pergamon Press. Oxford. Nueva York.
138. Mc Gowan, J. A., Strain, A. S., Bucher, N. L. R. (1981) *J. Cell Physiol.* 108, 353-363.
139. McLean, E. K. (1970) *Pharmacol. Rev.* 22, 429-483.
140. Mc Mahon, J. B., Malen-Shibley, L. y Iype, P. T. (1984) *J. Biochem. Clin.* 259, 1.803-1.086.
141. Meister, A. y Andersen, M. E. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
142. Michalopoulos, G., Cianculli, H. D., Novotny, A. R., Kligerman, A. D., Strom, S. C. y Jirtle, R. L. (1982) *Cáncer Res* 42, 4.673-4.682.
143. Michalopoulos, G., Houk, K. A. y Dolar, M. L. (1984) *Cáncer Res* 44, 4.414-4.419.
144. Miller, J. A. (1970) *Cáncer Res.* 30, 559-576.
145. Moller, B. y Dargel, R. (1985) *Exp. Path.* 28, 55-57.
146. Moller, F. y Hough, M. R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 711, 521.
147. Moreadith, R. W. y Lehninger, A. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 69, 6.215-6.221.
148. Moreadith, R. W. y Lehninger, A. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 29, 6.222-6.227.
149. Mori, H., Tanaka, T., Sugie, S., Takahashi, M. y Williams, G. M. (1982) *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 1.277.
150. Moriarty, D. M. y Savage, C. R. Jr. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 505-518.
151. Morley, C. G. D. y Boyer, J. L. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 477, 165-176.
152. Nakagawa, Y., Tayama, K. y Nakao, T. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 2.669.
153. Nakamura, T., Tomita, Y. y Ichihara, A. (1983) *J. Biochem.* 94, 1.029-1.035.
154. Nakamura, T., Yoshimoto, R. Nakayama, Y. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7.229-7.233.
155. Nakamura, T., Nawa, K. Ichihara, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1.650-1.659.

156. Ngala Kenda, J. F., De Hemptinne, B. y Lambotte, L. (1984) *Eur. J. Surg. Res.* 16, 294.
157. Nothangel, A. (1886) *Berl. Klin. Wschr.* 3, 31. Cit. Zimmerman 1976. Ref. 339.
158. Okita, K., Gruenstein, M., Klaiber, M. y Farber, E. (1974) *Cáncer Res.* 34, 2.758-2.766.
159. Okuda, K., Koern, H., Nomura, F., Iida, S. y Ohnishi, K. (1986) *Hepatic tumors. En: The Liver annual* 5 (eds. Arias I. M., Frenkel, M. y Wilson, J. H. P.) Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam, New York, pp. 394-418.
160. Osada, J., Palacios, E., Cascales, M. y Santos Ruiz, A. (1982) *Rev. Esp. Fisiol.* 38, Suppl., 129-134.
161. Osada, J. y Palacios Alaiz, E. (1983) *An. Real Acad. Farm.* 49, 705-714.
162. Osada, J., Aylagas, H., Sánchez-Vegazo, I., Gea, T., Millán, I. y Palacios Alaiz, E. (1986) *Toxicology Letters* 32, 97-106.
163. Paine, A. J., Maurer, G. y Von Wartburg, B. R. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 3.111-3.114.
164. Palacios, E., Osada, J., Arce, C., Aylagas, H. y Santos Ruíz, A. (1982) *Rev. Esp. Fisiol.* 38, Suppl., 135-140.
165. Palacios Alaiz, E., Osada, J., Aylagas, H. y Cascales, M. (1984) *Abstr.* 16 FEBS Meeting. Moscú n° 362.
166. Parke, D. V. y Williams, R. T. (1969) *Brit. Med. Bull.* 25, 256.
167. Pegg, A. E., Conover, C. y Wrona, A. (1978) *Biochem. J.* 170, 651-660.
168. Pegg, A. E., Borchardt, R. T. y Coward, J. K. (1981) *Biochem. J.* 194, 79-89.
169. Pegg, A. E., Scicchitano, D. y Dolan, M. E. (1984) *Cáncer Res.* 44, 3.806.
170. Peraino, C., Fry, R. J. M. y Staffeld, E. (1971) *Cáncer Res.* 31, 1.506-1.512.
171. Peraino, C., Staffeld, E. F., Carnes, B. A., Ludeman, V. A., Blomquist, J. A. y Vesselinovitch, S. D. (1984) *Cáncer Res.* 44, 3.340-3.347.
172. Pitot, H. C., Barsness, L. y Goldworthy, T. (1978) *Nature* 271, 456-458.
173. Pitot, H. C. y Sirica, A. E. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 605, 191-215.
174. Pittner, R. A., Fears, R. y Brindley, D. N. (1985) *Biochem. J.* 225, 455-462.
175. Pittner, R. A., Fears, R. y Brindley, D. N. (1985) *Biochem. J.* 230, 525-534.

176. Pittner, R. A., Bracken, P., Fears, R. y Brindley, D. N. (1986) *FEBS Lett.* 207, 42-46.
177. Price, V. F., Jollow, D. J. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 687-695.
178. Putnam, C. W., Buckley, A. R. y Warneke, J. A. (1984) *Surgey*, 96, 214.
179. Rabes, H. M., Kerler, R., Rode, G., Schuster, C. y Wilhelm, R. (1984) *Cáncer Res. Clin. Oncol.* 108, 36-45.
180. Rainsfeld, I. H. (1974) *The Liver. Normal and Abnormal Functions*. Part A. (ed. F. F. Becker) pp. 203-223. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
181. Rajalaksmi, S. y Farber, E. (1973) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 32, 833-839.
182. Recknagel, R. O. (1967) *Pharmacol. Rev.* 19, 145-208.
183. Recknagel, R. O. y Glende, E. A. (1973) *C. R. C. Crit. Rev. Toxicol.* 2, 263-297.
184. Richman, R. A., Claus, T. H., Pilkis, S. J. y Friedman, D. L. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3.589-3.593.
185. Rosenbaum, F. (1882) *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 15, 450. Cit. Zimmerman, 1976. Ref. 469.
186. Rotstein, J., MacDonald, P. D. M. y Rabes, H. M. (1984) *Cáncer Res.* 44, 2.913.
187. Rouiller, C. (1964) *Experimental toxic injury of the liver* En: *The Liver* (ed. C. Rouiller) Vol. II pp. 335-476. Acad. Press, Nueva York.
188. Rozengurt, E., Brown, K. D. y Pettican, P. (1981) *J. Biochem. Clin.* 256, 716-722.
189. Ruebner, B. H., Gershwin, M. E. y Meierhenry, E. F. (1984) *J. Natl. Cáncer Inst.* 73, 493.
190. Rupniak, H. T., Gladdene, J. G. y Paul, D. (1982) *Eur. J. Cáncer Clin. Oncol.* 18, 1.353.
191. Sabine, J. R. (1976) *Progressive loss of cellular metabolic controls during hepatic carcinogenesis*. En: *Control Mechanisms in Cancer* (ed. Criss W. E.) New York, pp. 351-362.
192. Sallach, H. J. y Fabien, L. A. (1969) *Nitrogen metabolism of aminoacids*. En: *Metabolic Pathways III*. 3rd edition. (ed. Greenberg, D. M.) pp. 1-94. Acad. Press. New York.
193. Salomon, J. C. (1962) *J. Ultrastruct. Res.* 7, 293-307.
194. Sasaki, T. e Yoshida, T. (1935) *Wirchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 295, 175-200. Cit. Farber, 1975. Ref. 1.
195. Sasaki, T., Soga, A. e Yabusaki, Y. (1984) *J. Biochem.* 96, 117-126.

196. Satyabham, S. y Padmanaban, G. (1984) *Biochem. J.* 218, 317-377.
197. Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P. y Friedrich-Frescka, H. (1972) *J. Natl. Cáncer Inst.* (U.S.) 49, 93-106.
198. Seely, J. E. y Pegg, A. E. (1983) *Biochem. J.* 216, 701-707.
199. Seiler, N., Bolkenius, F. N. y Knodgen, B. (1980) *Biochem. Biophys. Acta.* 633, 181-190.
200. Sessa, A., Desiderio, M. A. y Baizini, M. (1981) *Cáncer Res.* 41, 1.929.
201. Sessa, A., Desiderio, M. A. y Perin, A. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 698, 11.
202. Shapot, V. S. (1977) *Arkhiv. Pathol.* 39, 3-11.
203. Shearer, R. y Emelot, P. (1975) *Eur. J. Cáncer* 11, 145-150.
204. Shearer, R. W. (1974) *Biochemistry* 13, 1.764-1.767.
205. Shoyab, M., Delarco, J. E. y Todaro, G. J. (1979) *Nature* (Lond) 279, 387-391.
206. Shoyab, M. y Todaro, G. J. (1980) *Nature* (Lond) 288, 451-455.
207. Siegler, J. M. y Kazarinoff, M. N. (1984) *J. Nutr.* 114, 574-580.
208. Sies, H., Akerboom, P. M. y Tager, J. M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 301-307.
209. Silver, E. H. y Szabo, S. (1983) *Exp. Mol. Pathol.* 38, 69.
210. Sinha, S., Marshall, C. J. y Neal, G. E. (1986) *Cáncer Res.* 46, 1.440-1.445.
211. Slaga, T. J. (1983) *Cáncer Surv.* 2, 595-612.
212. Slaga, T. J., Klein-Szanto, A. J. P., Triplett, L. L., Yoti, L. P. y Trosko, J. E. (1981) *Science* 213, 1.023-1.025.
213. Smekens-Ettienne, M., Goldstien, J. y Ooms, H. A. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 269-273.
214. Solt, D. y Farber, E. (1976) *Nature* 263, 701-703.
215. Starzl, T. E., Porter, K. A., Francavilla, J. A., Benichou, J. y Putman, C. V. (1977) *Hepatotropic factors. Ciba Symposium* pp. 112-129, Elsevier.
216. Stege, T. E., Mischke, B. S. y Zipperen, W. C. (1982) *Exp. Gerontol* 17, 273.
217. Stenback, F., Mori, H., Furuya, K. y Williams, G. M. (1986) *J. Natl. Cáncer Inst.* 76, 327-333.
218. Steward, B. y Farber, E. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 773-779.
219. Stiller, D., Ainlacher, E. y Schmidt, T. (1972) *Exp. Pathol.* 6, 80-86.
220. Stoker, E., Wullstein, H. K. y Brau, G. (1973) *Virchows Arch. Abt. B* 14, 93-103.

221. Stolf, A. M. S., D'Abronzio, F. H., Wang, L., Salles, J. M., Andrade, H. F., Jr., Silva, S. M. F. y Bretani, R. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1.576-1.584.
222. Strain, A. J., Mc Gowan, J. A., Bucher, N. L. R. (1982) *In Vitro* (Rockville) 18, 937-946.
223. Strain, R. K., Yap, S. H. y Shafritz, D. A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 74, 4.346-4.350.
224. Swenberg, J. A., Dyroff, M. C. y Bedell, M. A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81, 1.692.
225. Tabor, C. W. y Tabor, H. (1976) *An. Rev. Biochem.* 45, 285-306.
226. Tabor, C. W. y Tabor, H. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
227. Tatematsu, M., Nagamine, Y. y Farber, E. (1983) *Cáncer Res.* 43, 5.049-5.058.
228. Teebor, G. W. y Becker, F. F. (1971) *Cáncer Res.* 31, 1-3.
229. Tien, M., Bucher, J. R. y Aust., S. D. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 279-285.
230. Tien, M., Morehouse, L. A. y Bucher, J. R. (1982) *Arch. Biochim. Biophys.* 218, 450-458.
231. Tongiani, R., Mavaldi, G., López, M. y Puccinelli, E. (1976) *Histochemistry* 47, 1-21.
232. Troll, W. y Wiesner, R. (1985) *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 25, 509-528.
233. Valsuk, G. P., Ghrayeb, J., Ryan, D. E., Reik, L., Thomas, P. E., Levin, V. y Walz, F. G. Jr. (1982) *Biochemistry* 21, 789-798.
234. Vanderlaan, M. y Phares, W. (1981) *Histochem. J* 13, 865-877.
235. Villalobos, J. G., Steele, W. J. y Bush, H. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 91, 233-238.
236. Weber, G., Trevisani, A. y Heinrich, P. C. (1974) *Adv. Enzym. Reg.* 12, 11-41.
237. Weber, M. M. y Stich, H. F. (1965) *Can. J. Biochem.* 43, 811-816.
238. Weinberg, R. A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 651, 25-35.
239. Weinberg, R. A. (1983) *Sci. Amer.* 249, 126-143.
240. Weinhouse, S. (1972) *Cáncer Res.* 32, 2.007-2.016.
241. Weinstein, I. B., Gattioni-Celli, S., Kirschmeien, P., Lambert, M., Hsiao, W., Backer, J., Jeffrey, A. (1984) *Cancer cells. The transformed phenotype.* Cold Spring Harbor Lab. pp. 229-237.
242. Weis, J. M., Lembach, K. J. y Boucek, R. J. (1981) *Biochem. J.* 194, 229-239.

243. Wharton, W., Loef, E., Pledger, W. J. y O'Keefe, E. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5.567-5.571.
244. Williams, G. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 605, 167-189.
245. Williams, G. M. (1981) *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 577-583.
246. Williams, G. M. (1984) *Fund. Appl. Toxicol.* 4, 325-344.
247. Worster-Drought, C. (1923) *Brit. Med. J.* 1, 145.
248. Yanagi, S., Sasaki, y Yamamoto, N. (1981) *Cancer Letters* 12, 7-91.
249. Yoshida, T. y Neal, R. A. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 2.095-2.098.
250. Younes, M. y Siegers, C. P. (1983) *Toxicol. Letters* 15, 213.
251. Ziegler, E. y Obolonsky, N. (1888) *Beitr. Path. Anat.* 2, 291. Citado por Zimmerman, (1976), Ref. 637.
252. Ziegler, D. M. y Pettit, F. H. (1966) *Biochemistry* 5, 2.932-2.938.
253. Zimmerman, H. J. (1975) *Hepatic injury caused by therapeutic agents*. En: *The Liver, Part. A.* (ed. Becker F. F.), pp. 225-302. Marcel Dekker, Inc. New York.
254. Zimmerman, H. J. (1976) *Experimental Hepatotoxicity*. En: *Handbook of experimental pharmacology*. XVI. Experimental production of diseases. Part. 5, Liver. (ed. O. Eichler), pp. 1-120. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

**DISCURSO
DE
CONTESTACION**

Por el Académico de Número Exce-
lentísimo Señor Don Angel Santos
Ruíz

Sres. académicos
Señoras y Señores:

Son dos las razones fundamentales que me traen a esta prestigiosa tribuna, en el señalado día de la toma de posesión de María Cascales Angosto como Académica Numeraria de esta corporación del Instituto de España: una, que es mujer; otra, que es mi discípula. Con espíritu crítico diríase que ambas son motivaciones subjetivas, y sin duda es así, pero ampliamente compensadas por la objetividad de los indudables y destacados méritos de la recipientaria.

La palabra mujer se emplea para designar a cada una de las personas del sexo femenino, que, en unión del masculino, constituyen la sociedad humana. Gozan todos los miembros de ésta, de personalidad por ser capaces de derechos y obligaciones; parece lógico, pues, que los pertenecientes a ambos sexos disfruten de las mismas atribuciones dentro de la escala jurídica. La transformación lenta pero segura, dado el constante cambio de los hábitos, de las instituciones y de las formas, ha modificado mentalidades y permitido alteraciones legislativas en otros tiempos inasequibles. El injusto relieve predominante del varón, en el derecho de cuño napoleónico, está superado en los códigos, y debe estarlo también en los corazones.

La estructura personal de la mujer es ahora, por tanto, menos dispersa, más concéntrica, unívoca y acabada. Su *ser-ya* comienza antes y se prolonga en el tiempo con una estabilidad capaz de acompasar la versátil irregularidad de los proyectos del hombre. La deficiente capacidad de abstracción que, de ordinario, se atribuye a la mujer no es

piamente impotencia; resulta más de su oposición al riesgo de evasión de lo real que tanto puede darse en el varón. La mujer posee personalidad independiente, lo que no significa una mala entendida igualdad con el hombre, una burda imitación de sus quehaceres que, en el fondo, sería un falso e injusto reconocimiento de inferioridad. El dicho anónimo lo refleja al indicár que cuando la hembra quiere hacerse varón, no pasa de dejar de ser mujer.

No cabe duda que la sociedad es susceptible de perfección, que hay que buscar la armónica integración de las funciones de los dos sexos, sin otro predominio que funcionalmente quepa establecer. Por otra parte, como ha escrito Monseñor del Portillo, el pretender llegar a una uniformidad sería destructora de la personalidad de cada uno. La actitud existencial de la mujer y del hombre son evidentemente distintas. El trueque de papeles de hacer pasar a un hombre por mujer y al contrario, queda, en general, un lúdico y fugaz pasatiempo o turbio y permanente comportamiento anómalo. No en vano sus psicologías son distintas, y no otra cosa, a fin de cuentas, que el enunciado significativo de los radicales de la existencia. La, a veces denostada, rima filosófica popular de Ramón de Campoamor resume así el repudio al equívoco:

«Del hombre tiple
y de la mujer tenor
librenos Señor»

I

En 1891 publicó el diplomático Don Juan Varela su conocido artículo «Las Mujeres y las Academias» en el que se desahuciaba de éstas a aquellas, con sonrisa galante, y pretextos edulcorados, a vueltas y revueltas de distingos, tiras y aflojas. Los Académicos no querían entonces faldas entre ellos y si alguna vez transigían era con las de vestiduras tales. No obstante, intelectuales, sin pruritos de acre criticismo, han revisado los valores culturales y científicos de la generación actual y han puesto los puntos sobre las íes. De ahí la entrada de distinguidas literatas en la Real Academia Española de la Lengua. Si sopesamos con tino, si contrapesamos con tacto, aclararemos sombras que no eran sino penumbras. En consecuencia a este escudriñar minucioso, nadie debiera perder tiempo en oponerse a la incorporación del sexo femenino en las Academias que tratan de ciencias puras o aplicadas. Por eso estamos hoy, y ahora, en acto más bien insólito; quizá todavía con ciertos remilgos por parte de minoría proclives a distingos, reticencias y prosopopeya.

Cada vez más, y justificadamente, la mujer ocupa puestos en las diversas ramas del quehacer humano. Concretamente en el campo de las ciencias farmacéuticas el sexo femenino tiene misiones específicas destacadas, tanto en cantidad como en calidad; en la docencia, en la investigación, en la administración y, por supuesto, en otras variadas ocupaciones profesionales y científicas como la industria, la oficina de farmacia o los laboratorios analíticos. En lógica derivación la fémina debe tener un lugar en lo académico. En esta histórica casa ha tiempo que figura en la categoría de miembro correspondiente, pero era necesario que pasase, asimismo, por la puerta que da acceso a los de número, Yo asumo gozosamente la responsabilidad de dar entrada oficialmente en una Real Academia de la rama de ciencias, por primera vez en la historia de nuestro país, a una dama española.

La historia académica debe ser la suma de sucesivas innovaciones que se superpongan a formas que deben prescribir. La auténtica actividad creadora, junto con las modalidades de las circunstancias del momento, debe luchar por nuevas fórmulas. No podemos limitarnos a observar si se han cumplido normas periclitadas, sino aplicar criterios justos y libres que permitan valorar la belleza de la reforma necesaria. Un ideal de pensamiento receptivo y abierto, en las antípodas del privativo y autosuficiente, implica una actitud renovada, una voluntad integradora de aportes, hasta ahora arbitrariamente evacuados por concepciones estrechas. Es grato consignar que la admisión de María Cascales Agosto en esta Real Corporación no se realiza en un contexto de reservas mentales, de escamoteos o de regateos instintivos. Una entidad académica ovillada en la esfera de su autosuficiencia es, al menos potencialmente, una cultura etnocida, degeneradora de valores extrínsecos. No ha anidado en nosotros el rechazo de Eurípides a la mujer docta, ni hemos compartido con Aulo Gelio su sentimiento expresado en *Mulier malum necessarium*. Por ello, no en vano, en este momento crucial, prendemos fuego al montón de viruta desechable y arrojamos la piedra en el lado dormido del inmovilismo. Yo quiero proclamar, como alma de este siglo de vértigos, que en este caso la meditación ha ganado a la acción, y la justa réplica al anhelo, sin que haya pasado inadvertida la enjudia auténtica de la posible controversia.

II

Obvio es que los que me escuchan y bastantes otros más, quieran saber de los méritos en concreto de quien accede al Instituto de España en condición tan singular.

Muchas han sido las mujeres que a mi lado han trabajado. De todas guardo el mejor recuerdo como eficaces colaboradoras en las tareas científicas diarias. Pero debo reseñar, porque lo considero plausible, que no han tendido al unisexo actual, tan en boga y tan equivoco. La exquisitez femenina ha sido –salvo rara excepción– la norma común en todas ellas. Por descontado que María Cascales Angosto fué siempre ejemplar a tal respecto. Y si alguno lo dudase ahí tiene en este momento, frente a mí, el ejemplo vivo indiscutible. Diríamos en léxico farmacológico que no es un sucedáneo de Adán, sino Eva con sus cualidades relevantes. Desde muy joven se puso al servicio de su vocación científica, con despliegue de dotes de energía, talento y desprendimiento que le permitieron, en momentos decisivos de su vida, ir adelante hasta llegar a la dedicación total. Ha sido mujer organizadora con perspicacia crítica, alterada a veces por la aspiración a un orden no visible en el desorden de la presentación.

Como ya he apuntado en ocasiones anteriores siempre he preferido –con mortificación evidente del amor propio– que los que conmigo han trabajado no se limitasen a seguirme. He procurado no ser maestro dominante que impone límites de pensamiento de sus seguidores. De ambicionar alguna autoridad ha sido la de hacer reflexiones y no precisamente en mi dirección. Acepto mejor una oposición viva que una aprobación muerta. Acierto hay en la verdad nietzscheana a aludir al poco agradecimiento de aquel que no pasa de ser discípulo. A mi lado se ha dado siempre una rentable indiscriminación formativa, en lo especializado, en lo ideológico y en lo racial: han colaborado farmacéuticos, médicos, veterinarios y científicos de variadas ramas; cristianos y agnósticos, judíos unos y musulmanes otros. Por descontado que, en pluralismo constructivo, mujeres y hombres. Hoy, unos son –en España y en el extranjero– profesores, otros investigadores y los demás profesionales destacados en múltiples perfiles. Sea bien entendido que, con estas manifestaciones de razonable convivencia, no pretendo difuminar mi manera de pensar en la neblina de la ambigüedad. Creo que en el transcurso de una ya larga vida pública y privada ha quedado muy clara –sin arrogancias ni timideces– mi independencia ideológica social y política y la personal y acendrada adhesión a la ortodoxia católica, con todas sus consecuencias. Por ello he procurado siempre defender la libertad colectiva e individual de los demás, en un uso legítimo de la propia.

Mi referencia a María Cascales Angosto, hoy y ahora, no quisiera que estuviese nutrida de datos inertes, como los usuales, sino que fuese algo vivo, interpretativo, con proyección capaz de orientar certeramente, sin manierismos decadentes. Vasari decía que sus pintores coetáneos tenían *piu de maniera che di natura*. Lo penoso aquí estribaría en

que los medios de enfocar y definir los escamotease y sustituyera por gestos. He intentado eludir los escollos, que me han salido al paso, en esta singladura que es la presentación oficial, me he encaminado sucintamente por el sendero de su conocimiento, sin pausas pero con calma. Se trata de una excepción que obliga a rendir especial honor a este inesperado nuevo miembro de nuestra familia académica. La distinción entre vida biológica y biográfica, que utilizaba profundamente Ortega y Gasset, se aprecia incluso intuitivamente: es enunciar dos dimensiones diferentes de la personalidad. El biógrafo debe ser algo más que un panegirista y buscar aquéllos rasgos o facetas entrañables de un personaje. Debe dar una visión más cercana de él y tender a descifrar el jeroglífico profundo de sus motivaciones. Deseo que en mi disertación no se imponga el rodeo y que el claro curso del torrente sustituya al insulso meandro sintáctico. Es justo actualizar a Tomas Carlyle: *Sincerity, here too, we find to be the measure of worth.*

Ana Sastre ha declarado que el tomar determinada actitud es cosa que cada cual debe espiar mirando sinceramente a través de los cristales, y llegar a saber qué ruta de montes o de llanos, qué nieblas o qué soles, están en su camino. El abundante material que he tenido a mano para hacer la presentación protocolaria de María Cascales Angosto, ha sido tal, que se ha impuesto una severa selección. Un arreglo lejos de una minuciosa exposición y más cerca de una amplia, pero precisa, referencia. Sólo así cabe el intento de abordar en corto espacio las cualidades características, el timbre y orden de una intensa vida. No quisiera nadar y guardar la ropa y estar por razonamiento dentro y por sentimiento fuera. Me acuerdo ahora de Unamuno cuando decía que el sentimiento piensa y el pensamiento siente; y asimismo, de Zubiri cuando hablaba de la razón sentiente.

El comienzo de la labor científica de María Cascales Angosto se remonta al año 1958 en que entra a formar parte del Departamento de Bioquímica (Centro Coordinado del C.S.I.C.) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. En él ha realizado su carrera científica a través de todos los tramos de la escala investigadora, que van desde Becaria a Directora del Instituto, pasando por los cargos de Ayudante de Sección, Colaboradora Científica, Investigadora Científica y Jefe de Sección.

Como méritos particulares dentro de esta institución es destacable su condición de académica correspondiente, durante casi una década, con aportes de conferencias, comunicaciones científicas e intervención en tribunales varios. A esto hay que añadir el haber sido galardonada con los Premios Alter de 1966 y 1968, los Premios Abelló de 1970 y 1975 y también la más alta recompensa que supone el denominado

Premio de la Real Academia de Farmacia, en 1981. A tales distinciones habría que sumar otras de distintas entidades científicas como la Medalla-Condecoración del Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia, al que pertenece como Miembro Correspondiente.

III

Contra nuestra costra pintoresca hay que cerrar, si queremos que España gane alta mar en las corrientes universales. Las espléndidas cualidades entramadas que atesora el pueblo hispano no pueden quedar recubiertas de malformaciones, debido a la inercia, la rutina y la tristeza del bien ajeno. Tenemos que dejar a un lado el castizo ladeo de hombros ante cuestiones vitales y entrar en el rigor sistemático y la reflexión exigente. María Cascales Angosto ha tendido a hacerlo y las llamadas apremiantes, las curiosidades eminentes –e inminentes– los quiebros y requiebros de lo original y originario de algunos predilectos temas bioquímicos han llegado eficazmente a su numen múltiple, pero no prolijo. En pos de los alardes científicos, en que la aboca su labor y la desemboca su discreción, no se presentan señales de algo fallido. Casi nada de cuanto ha salido de su quehacer especulativo se ha malogrado, y si todo no alcanza el mismo grado de valor neto y estimación, no por ello deja de poseer atractivo.

Sus trabajos de investigación son enjundiosos, vibrantes como cuadros de color y, entre tantas decenas, cualquiera de ellos es digno de una antología rigurosa. Hasta ahora tiene publicados sesenta y cinco, y seis en prensa –redactados en español, francés e inglés– en las más importantes y prestigiosas revistas nacionales y extranjeras. Su aporte a los congresos internacionales en diferentes países se cifra en setenta y siete comunicaciones y ponencias. Su obra científica ha sido repetidamente citada en revisiones críticas extranjeras, entre otras *Annual Review of Biochemistry* y el *Comprehensive Biochemistry*. Incluso ha sido aludida en libros como el *Textbook of Biochemistry* de West y Todd, *The Enzymes* de Boyer y *The Liver Normal and Abnormal Functions* de Becker.

Su comportamiento, a veces justificadamente atrevido, hace buena a la Condesa de Noailles: «*Eve, sois sans orgueil, sans prudence et sans peur*». María Cascales Angosto ha unido al rigor en la captación de fuentes, la exacta y posterior interpretación de los resultados conseguidos, con técnicas capaces de satisfacer a una rigurosa inspección científica. En consecuencia lógica de ello, al incorporar nuevos elementos de juicio ha proyectado nuevas luces sobre algunos pasajes científicos.

Lo que justifica el interés de sus realizaciones es el propio conjunto, por lo que aporta en las distintas facetas que abarca; más amplia que el planteamiento inicial y con buen desarrollo en todos sus ámbitos.

La garantía de la solidez de su labor experimental ha quedado reafirmada en las numerosas ayudas económicas recibidas a lo largo de los años. Superan en este momento la docena, y corresponden a: Alter S. A., British Council, Comisión Asesora de Investigación científica y técnica (CAICYT), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social y Ministerio de Educación y Ciencia.

Su trabajo ha sido, y es, ritmo y tiempo: suma ordenada de irradiaciones de intensidad. Circunvalación y abrazo de las cosas concretas, inmerso en lo vital y abarcable. Su quehacer ha sido hembruno y no hombruno, cuestión de una vocal de gran repercusión en un comportamiento. En general María Cascales Angosto ha actuado con plausible naturalidad, sin equívocos, con flexibilidad en las normas, aunque a veces, como buena fémina, la haya costado no supeditarse a la rigidez del perjuicio y enrevesarse y descomedirse en las maneras o en los modos. Ha tratado de agradar en su trato, sin caer en estudiada afectación de modales y adornos. No hay que olvidar que tiene ascendencia andaluza, y a mí me recuerda su personalidad a las ventanas bajas de las casas de esa tierra, cargadas de flores con sus aromas y colores, pero que detrás de lo brillante y espectacular poseen la reciedumbre del hierro forjado de sus rejas.

IV

En cuatro fundamentales pueden cifrarse los planteamientos y problemáticas investigadoras llevadas a cabo en el transcurso de más de cuarenta años, en el laboratorio de la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, que tuve el honor de dirigir. Me refiero a los tratados con mi intervención personal, que fueron los siguientes: Bioquímica de la descarboxilación y del 4-aminobutirato; Bioquímica de oligoelementos; Bioquímica de la germinación de semillas; Bioquímica de hepatopatías experimentales, que abarca desde el metabolismo de la patogénesis alcohólica al cuadro del síndrome cirrótico experimental. Precisamente este cuarto y último tema fué realizado siempre con la colaboración de María Cascales Angosto, la cual prontamente tuvo en él un protagonismo tan merecido como esencial.

En el discurso que acabamos de escuchar ha abordado las hepatopatías experimentales en general para dar paso, a continuación, a concreciones imprescindibles. En consecuencia, ha tratado de la vulnerabilidad del hígado a las lesiones tóxicas y de los sistemas metabolizadores de las hepatotoxinas, con aportaciones relacionadas con los modificadores de la susceptibilidad y hepatoprotectores. El mecanismo de la regeneración hepática ha sido, igualmente, motivo de su atención detallada, con referencia a la hepatectomía parcial, la función del hepatocito y los estímulos regenerativos varios. Pero el aporte más personal se ha referido a su eficaz ejecutoria conectada con las alteraciones metabólicas de un modelo de hepatotoxicidad experimental inducido por tioacetamida, fuente de múltiples originales trabajos de investigación.

Por supuesto, que la hepatocarcinogénesis tenía lógicamente que ser objeto también de su razonable preocupación especial. En este amplio apartado ha abordado puntos tan destacados como la selección y evolución celular, las lesiones pretumorales, los fenómenos de rediferenciación y regresión, la noduligénesis hiperplásica, las lesiones pre y neoplásicas y los oncogenes en conexión con el hepatoma experimental.

En la imposibilidad de referirme adecuadamente a lo principal de lo expuesto en tan notable exposición, me atenderé exclusivamente a comentar algo del siempre candente problema neoplásico.

Bunnet señaló en 1976, que cuanto mayores eran sus saberes acerca de la estructura histórica de los mamíferos, de sus complicaciones interaccionales inter e intracelulares, más se convencía de que el conocimiento detallado de los procesos malignos, y su control a nivel práctico, no sería nunca posible. Pues bien, poco después, en 1983, le rectificaba Weinberg, al indicar que los detalles moleculares de la carcinogénesis deberán estar completos hacia el final de esta década. Para Bishop el contraste entre estas dos declaraciones ratifica el reciente alto grado de avance conseguido en la penetración de las complejidades de la célula cancerosa.

A menudo, se cree que una vez que el neoplasma se desarrolla, su metabolismo, relacionado con la división celular, está completamente incontrolado por el huésped. Los trabajos de Mechitov y sus colaboradores demuestran que ésto no es completamente cierto. Se sabe que los glucocorticoides inhiben la síntesis del DNA en células hepáticas. Ciertos hepatomas primarios, inducidos en ratas mediante dietilaminoozobenceno, responden a la hepatectomía parcial con una perceptible irrupción de la biosíntesis del DNA, previamente suprimida por dexametasona. Lo mismo ocurre en el hígado normal en regeneración. La falta de respuesta de la formación de DNA a los corticoides, no parece estar

involucrada en el desarrollo de los tumores primarios. El fallo de otros factores de control del huésped permite evolucionar el neoplasma.

Como el AMP cíclico –en grandes aportes– suprime la proliferación, y en algunas células sus concentraciones alcanzan los valores más bajos en la fase de mitosis, es posible, según Abbell y Nonahan, que su brusco descenso sirva como mecanismo desencadenante de aquella. Esta asunción ha de ser considerada con la suficiente cautela. La teoría de Foulds sugiere la idea de no equivalencia entre las diferentes propiedades de los neoplasmas. Hoy día se da la posibilidad de elegir un modelo adecuado entre la multitud de tipos de tumor maligno y es necesario distinguir sus características obligatorias por un lado, y las facultativas por otro.

Las características biológicas adquiridas por los tumores malignos, como son el crecimiento incontrolado y la agresividad, no se explica solamente por aparición de reacciones enzimáticas específicas y la biosíntesis de nuevas proteínas. Ha de reconocerse una situación singular: las propiedades especiales de las células cancerosas están engendradas –producidas– por los mismos compuestos inherentes a las normales. A pesar de que la causa inicial de la transformación neoplásica es la mutación de genes reguladores –la alteración transmitida por herencia en el funcionamiento de la maquinaria genética celular– en un último análisis los cambios se materializan a nivel epigenético; en el carácter de transcripción y transporte de la información genética desde el núcleo al citoplasma, para la programación de la maquinaria sintetizadora de proteínas.

Después de un análisis crítico cabe establecer una correlación directa entre las actividades carcinogénicas y mutagénicas y los compuestos químicos, como base para una mejor comprensión de la naturaleza genética de las transformaciones anormales. El posible significado biológico del polimorfismo molecular de enzimas y proteínas, con otras funciones como las variaciones en isoenzimas, pueden acarrear cambios en el fenotipo celular, en la ontogenia, en la diferenciación y, asimismo, en la transformación neoplásica. La combinación de la biología molecular con la patofisiología permite relacionar el desarrollo del tumor con su efecto sobre el paciente. Es recomendable destacar que los bioquímicos, en sus ensayos experimentales sobre la carcinogénesis, a veces fracasan al no encontrar un lenguaje común con los clínicos; quienes, a su vez, no siempre son capaces de enlazar con los hallazgos experimentales. En esto, sólo los investigadores parecen ser culpables, debido a la predilección de la mayoría de ellos por los estudios en células cancerosas «in vitro» con el comportamiento de las células «in vivo». Este acceso ofrece información valiosa sobre las peculiaridades

des de las alteraciones de la homeostasis en el individuo que sufre el proceso neoplásico, y abre nuevas perspectivas para la aplicación de los resultados del laboratorio a la clínica.

En lo que atañe a procesos neoplásicos experimentales, y bajo condiciones designadas apropiadamente, la hipótesis umbral asume que la «dosis no efecto», para un determinado agente químico, puede precisarse. Aunque dicho concepto tiende a perder popularidad, lo cierto es que para un compuesto carcinogénico, supone que la inducción de un tumor pueda no tener lugar o ser muy improbable. Los científicos que están de acuerdo con esta teoría, admiten que los bajos niveles ambientales de sustancias químicas no suponen un peligro cancerígeno significativo. La hipótesis lineal asume que cada molécula de carcinógeno químico reacciona con un receptor de la cadena de DNA en una célula del organismo. Se conocen otros modelos a ser considerados –si se acepta que dos o más compuestos son imprescindibles para la inducción del cáncer– pero todos ellos implican la carencia de un umbral. De acuerdo con estas premisas se presentan variados dilemas sobre la regulación de la exposición ambiental, u ocupacional, a los agentes químicos; entre ellos se incluyen carcinógenos a niveles definidos en alimentos, en el medio ambiente y también fármacos diversos. Dado que, en la mayoría de casos, las consecuencias son prácticamente inexistentes, gran parte de los especialistas son proclives a apoyar el punto de vista de que los agentes carcinogénicos no exhiben umbral.

Las observaciones anteriores tienen implicaciones obvias, que indican la existencia de mecanismos de defensa en el organismo frente a la exposición, en dosis mínimas, a compuestos carcinogénicos y mutagénicos. No obstante, mientras unos científicos insisten en que las sustancias químicas pueden seguir la misma curva dosis-respuesta en la producción de cáncer, otros sostienen que la radiación como entidad física interacciona con el DNA al azar, con producción radicales libres en las regiones inter e intracelulares. Una sustancia química, sin embargo, debe seguir una vía metabólica establecida y transportarse antes de tener posibilidad de reaccionar con el DNA. Por tanto, debe competir con numerosos obstáculos antes de alcanzar el núcleo celular. Por ello, tantas y cuantas sustancias químicas interaccionan con componentes intracelulares sin que se inicie un tumor. Para Falk solo una acción en sitios específicos del DNA es la que induce la formación del cuadro neoplásico. En consecuencia, la probabilidad de que un carcinógeno químico afecte al lugar exacto para producir tumores debe ser muy baja, cuando actúa en pequeñas cantidades. Jones y Grendon deducen, a partir de sus resultados, que a dosis mínimas el período de latencia neoplásica pudiera estar comprendido en períodos de varias veces la

vida del animal, por lo cual establecen un «umbral práctico». Esta sugerencia ha sido criticada con severidad y la posición más conservadora –ante el peligro para el ser humano– es la calificación de «no-umbral» para toda sustancia carcinogénica. En diversos países, como los Estados Unidos, existe una cláusula aclarando que el principio de tolerancia cero, debe ser retenida en todas las áreas de la legislación actualmente cubiertas y debe extenderse también para cubrir la mayor parte de la exposición a carcinógenos. Las excepciones serían solamente aceptables después de una justificación extraordinaria.

V

En María Cascales Angosto su ruptura con lo rutinario se produce como una consecuencia de exigencia interior y no de mera búsqueda de lo distinto porque sí. En el campo de su ciencia específica no ha querido valerse solamente de sus propios impulsos y ha buscado nuevos horizontes, un quehacer con otra melodía. Y en su independencia ha buscado la dependencia en otros lares. Ahí están sus estancias en el extranjero, que pueden resumirse así: de mayo a junio de 1962, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del *Centre National de la Recherche Agronomique* en Versalles con el Prof. Morel; de septiembre de 1965 a agosto de 1966 en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Kansas, en Estados Unidos, con el Profesor Santiago Grisolía; en mayo de 1968 en Israel, donde asistió como invitada a un curso organizado por el *Weitzman Institute of Sciences*, en colaboración con la Fundación Edmond de Rostchild de París; en agosto de 1970 en visita a los Departamentos de Bioquímica y Microbiología de la Universidad de Bristol y al Departamento de Bioquímica de la *Medical School* de la Universidad de Edimburgo (Reino Unido); de octubre de 1972 a agosto de 1973 en el *Courtauld Institute of Biochemistry del Middlesex Hospital* en Londres (Reino Unido) con una Beca de la *Royal Society*, donde trabajó con la Dra. Patricia McLean; de enero a febrero de 1975 de nuevo en Estados Unidos en la *Kansas University*, con el citado Profesor Grisolía; en marzo de 1982 en Reading (Gran Bretaña) en el Departamento de Bioquímica del *University Hospital and Medical School*, con objeto de establecer una colaboración científica Hispano-Británica, con el Prof. David N. Brindley; en octubre de 1984 volvió a este mismo lugar, dentro del marco de la Acción integrada n° 29/64 con el Reino Unido, financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia y el *British Council*.

En cierto modo se ha dado en ella una esporádica disposición aventurera que la ha capacitado para abandonar sin alharacas su recinto originario, e ir a fundirse esporádicamente en lo bueno foráneo. María Cascales Angosto, de acuerdo con su inmediato maestro Federico Mayor Zaragoza, ha sabido enfrentarse con la rutina, el automatismo y todo lo que conculca la capacidad creadora. Ha escapado de lo seriado sin perder la identidad, lejos de la novedad frívola. Al fin y al cabo se trata de ser capaz de volar a contraviento.

VI

Consideraba Leonardo da Vinci que la vida bien empleada es bastante larga. A este tenor pienso que lo es la mía cuando al cabo de los años los que fueron mis discípulos, y luego mis colaboradores, han pasado después a ser maestros con equipo propio y eficiente. Este es el caso de María Cascales Angosto que ha descartado la clase peor de admiración y ha tratado de cultivar la mejor. No se ha contentado con ser, sino que ha intentado también hacer. Ha comprendido que la virtud de un simple complacer es transitoria y se ha aplicado al cultivo de algo más duradero. Ha sabido enterarse de que el tiempo no marchita el fruto de una sonrisa y que el altruismo ejerce un encanto indestructible. Ha ahondado y cultivado aquellas facultades del espíritu que se hallan a salvo del poder corrosivo, como el oro de la herrumbre.

Una característica específica ha sido su ayuda a quienes, por una u otra causa, necesitaban orientación o apoyo, o ambas cosas. Para mí no cabe duda de su influjo en el mundo científico de su entorno, que se refleja en la frase *Das Ewigweibliche* de Goethe, es decir en el eterno femenino. Un ocuparse de los demás ha consistido la dirección de tesis doctorales que ha llenado gran parte de su tiempo. Cuenta en su haber con una decena de doctores, discípulos suyos, al que hay que sumar alguno más de pronta verificación. Es justo indicar que su acción en el campo de formación de científicos se completa con la lectura de ocho tesis. Entre los que fueron sus colaboradores se encuentran investigadores del C.S.I.C., profesores universitarios, miembros de la administración estatal y distinguidos profesionales.

En un tiempo de crisis plurales, que acaso puede resumirse en una generalizada crisis de identidad, es satisfactorio descubrir que al intentar probar que sus intenciones no han estado en desacuerdo con los hechos. La trayectoria de María Cascales Angosto corres-

ponde a una línea recta y honda de trabajo serio, intenso, sin mezquindad de horario; de desvelo por otros como hemos referido. Ello no ha impedido derivaciones colaterales, con salpicaduras de lo contradictorio. Su femeneidad polivalente la lleva a veces, en caleidoscopio entrañable, a ser tolerante y arisca, cordial y recelosa, concentrada y expansiva, narcisista y sencilla. A la vista de esta relación de hechos creo que pudiera tener razón Chamfort al escribir: *Les femmes ont dans le coeur une fibre de plus.*

Terso y plateresco es su historial. Lúcido y lúcido; con irisación y adornos de los que no pierden la línea ni el sentido armónico de la composición. A veces, en su curriculum sorprende la novedad de una imagen con la garbosa desorbitación de cualquier tropo. Su sentido de comunidad se refleja en su pertenencia a entidades científicas: entre ellas están la Sociedad Española de Bioquímica, la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas y la Asociación de Personal Investigador. Derivación de ello, entre otras causas, es su adscripción en el transcurso del tiempo a numerosas comisiones científicas, contribuyendo eficazmente a reuniones internacionales como Secretaria de Comisiones Organizadoras, Presidenta de Mesa y Ponente de Mesas Redondas.

María Cascales Angosto ha sabido asirse legítimamente a la norma verídica que presupone su voluntad de ser, por modo absoluto e íntegro. Se ha enraizado con ahincada solicitud de permanencia en el ciclo cronológico que le cupo en suerte y se ha avenido estrictamente a las exigencias contemporáneas, incluso burocráticas. En consecuencia, ha sido designada en ocasiones varias como Vocal de Tribunales de Oposiciones a plazas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro de Jurados calificadoros de Premios.

En determinadas épocas ha buscado un cierto aislamiento justificado, porque estamos inmersos en una magma colectivo, en una agobiante atmósfera. Es lógico, por tanto, postular un gajo de soledad en el vital contorno, para buscar el ángulo remoto donde hallar la cumbre, aparentemente inaccesible, de la eficacia. No sería justo aplicarla lo señalado por Bocaccio en su *Filostrato: Volubil sempre come foglia al vento*, por el contrario, la constancia ha sido norma suya. Al científico no se le debe juzgar a la ligera. Solo después de observar un largo seguimiento de su trayectoria, es viable intentar un enjuiciamiento de la lógica ilación que relacionan sus actos y sus palabras. Las gentes acostumbrañ a encarar frívolamente los enunciados, bajo instigaciones emocionales. Esta superficialidad y emotividad, suelen ser provocadoras de injusticias, desencantos y contradicciones. Solo los capaces de reflexionar con sosiego pueden –aunque no siempre– descifrar las trabazones del acaecer investigador. Este remansarse ha permitido a María Cascales

Angosto el intervenir en coloquios y conferencias que van desde 1961 hasta la fecha, en un número que sobrepasa la veintena, pronunciadas en las Facultades de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca, Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, *Medical School* de la Universidad de Nottingham y Hospital de Cruces de Bilbao.

VII

Una mujer con la preparación adecuada tiene, hoy día, derecho y libre acceso a muy distintos campos de actividades profesionales y científicas, orientándose y orientándolas hacia una vertiente de entrega, y servicio, que puede completar y agilizar todo aquello demasiado duro y conceptual, obra más bien de la mente varonil. Muestra evidente es que María Cascales Angosto haya sido becada en numerosas ocasiones por la Comisaría de Protección Escolar de la Fundación Juan March, la *Royal Society*, el *British Council*, la *Deutsche Forschungsgemeinschaft* de *Bad Godesberg* y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Pauta rei, todo cambia constantemente como decían los filósofos griegos, siglos ha, pero la vida científica implica una adaptación continua a un contorno y a unas circunstancias. Los ajustes no son, pues, nada nuevo y por ello lo ha hecho en la medida que ha sido absolutamente indispensable para producir un bien o servicio. En consecuencia, como complemento de su ocupación investigadora, hay que reseñar sus actividades docentes ocasionales. *Ex abundantia enim cordis os loquitur* (San Lucas 6, 45), recordemos sus cursos de doctorado en la Universidad Complutense y los cursos especiales, en la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de Madrid y en esta Real Academia de Farmacia.

En este fluir hacia los demás están sus relaciones internacionales de colaboración, en las que hay que destacar su misión como colaboradora e investigadora principal en los *Grants* FG-SP 118 y FG-SP 131, concedidos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para tratar de la ontogénesis de enzimas en semillas de pino a través de estratificación y de las enzimas descarboxilantes de origen vegetal y animal.

Al frente del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto del C.S.I.C. y de la Universidad Complutense de Madrid, María Cascales Angosto actúa hoy comprometida con el esfuerzo, animosa, procurando que brote a su alrededor ese calor indispensable para que las empresas arraiguen. Ejerce su tarea con fe, no exenta de dificultades e incomprendiones, dispuesta a dar a cada día pruebas de fortaleza y dinamismo. Con exigencia consigo misma, intenta vencer las trabas burocráticas e introducir la tensión de la modernización, que eleva a la categoría de proyecto diario. Este cargo es una herencia árdua que le proporciona satisfacciones y también sinsabores y preocupaciones.

A lo largo de su discurrir ha tenido la suficiente disciplina interior para ajustarse a la realidad efectiva, sin nostalgia de pasado ni anticipaciones imaginativas de futuro. Ha sabido —al menos en lo que conozco— afrontar las circunstancias realísticamente, sin hurtar los problemas planteados. Precisamente ahí, en la tentación de esquivar acontecimientos poco gratos, radica el peligro designado *daemonem meridianum* en el salmo 90 de la bíblica versión Vulgata, que Casiano ha descrito con caústico verismo; se trata de la tentación que atormenta al monje en la hora sexta; que sería equiparable a la crisis general de valores fundamentales en ciertos estadios de la vida humana.

VIII

No son de extrañar las alabanzas derramadas en torno al sexo débil. Su cuantificación daría elevadas cifras y a ello he querido contribuir en este caso concreto que nos ocupa. Se trata de hacer justicia al ensalzar en lo específico, o en lo genérico, las cualidades inefables de la femineidad. Pero este deshilvanado relato que escuchan no es el fin. La labor de María Cascales Angosto continúa con afán vital e ilusionado. Para ella podría escogerse como lema el dístico de un escudo que encontré mi paisano Víctor de la Serna de sus antepasados en una torre derruida, y que rescató para su madre Concha Espina:

«Velar se debe a la vida de tal suerte
que viva quede en la muerte».

El hecho de presentar a una persona exclusivamente como un edificio molecular complejo, no tiene, en verdad, nada de auténticamente enriquecedor. El ser humano es afectivo, tiene ideales, y no se pueden explicar todos sus comportamientos a través de los genes, de las leyes de la materia. No solamente existe la naturaleza y no todo responde a

explicaciones mecanicistas. Por eso deseo añadir que María Cascales Angosto es culta, con buenos afanes y alientos. Propende —como refleja Amiel en su *Journal Intime*— a la asimilación rápida, con aptitud para resaltar detalles y agradecerlos. Es sincera aunque a veces le cueste delatar su intimidad. Pero, en general, no expresa nada con circunloquios anfibología o prejustificantes que sean vuelo de campanas de asustadizos y tapabocas para maldicientes. Personalmente destacaría su fidelidad, ya que así puede llamarse a una coherencia que ha durado toda su vida científica y social tanto más de agradecer en estas calendas de autoevaluaciones egolátricas y fáciles mudanzas caprichosas interesadas.

En estas palabras de hoy, he intentado despojarme deliberadamente de todo interés personal para penetrar, como los creyentes mahometanos, con la planta desnuda bajo las bóvedas solemnes del templo de la verdad. Sin embargo ha sido difícil inclinarme sobre una biografía para mí tan cercana, con un ánimo fríamente crítico. Es complicado —y por ello pido disculpas— hacer una vivisección de criaturas que para la ciencia he visto a mi lado nacer.

Quiero inisitr en que, desde ahora, gracias a Dios, no está vigente la Ley Sálica, en esta real Academia, y lo digo después de haber transpasado el pórtico de la obra de María Cascales Angosto. Es posible, a pesar de ello, que no se haya roto totalmente la capa de recelo de los estanqueros de la gloria de los demás; de los definidores del bien y del mal, que les cuesta perdonar a una mujer que pueda prescindir de ellos para incrustar su nombre en la actual historia de la bioquímica hispana. Pero su capacidad de trabajo y constancia creo que han quedado manifiestas. Todos los días de su vida ha aportado algo al acervo bioquímico: revisión bibliográfica o ensayo experimental, sin torrenteras, con discreto fluir. En toda ocasión ha sido pródiga en sus gratitudes, con indicación de fuentes y reconocimiento de deudas y citación de prestadores. Virtudes más laudables cuanto menos afines al temperamento femenino, pletórico en ocasiones de impacencias, sentimentalismos e incluso de prejuicios. La mujer propende a la asimilación, y con avidez receptiva, pule, termina y perfecciona, si bien, a veces, pueda costarla encontrar la raíz propia. Sin embargo, en el haber de María Cascales Angosto pueden inscribirse números inalienables: agudeza, donaire, síndéresis e instinto, que para Balzac equivale a perspicacia.

Es posible que haya sido reiterativo exhibir el blasón de considerar a María Cascales como una de mis más dilectas discípulas. También es verdad que el proverbio turco recuerda que una onza de vanidad deteriora un quintal de mérito; más, al fin y al cabo, y para mi disculpa, repito que es ésta una de las pocas compensaciones y desahogos que tenemos aquellos que hemos dedicado nuestros desvelos con preferen-

cia a la ciencia en su ambivalente faceta docente y especulativa. Así mismo me ha movido a ello la amistad, en la que pueden inscribirse las formas cardinales de la auténtica, recogidas por Laín Entralgo. Cifra éste los rasgos distintivos del amigo en la triada: benevolencia o querer bien; beneficencia o hacer el bien siempre que sea posible; y confianza o comunicar lo que hay de más íntimo y propio. Todo ser humano se halla metafísicamente implantado en la realidad, a través de sus personales creencias, y una de ellas se refiere, por descontado a la amistad; de ahí San Juan: «quién permanece en la amistad, permanece en Dios y Dios en él»...

A pesar de todo, hasta aquí he intentado cuidadosamente la máxima de neutralidad en mi exposición. Pero al llegar el momento final de bienvenida a la nueva académica, en nombre de esta Real Corporación, solicito venia para la galantería. Acepten que, esperanzadamente, en gesto caballeresco me incline, y con ademán hidalgo ondee mi chambergó, para dar entrada a la protagonista en su futuro Académico, al acorde poemático de las estrofas del soneto heterosilábico de Manuel Machado:

«En la hora exaltada
de estos nuevos loores,
todo la gaya gesta de tu poeta es...
tirar de la lazada
que ata el ramo de flores
y que las flores caigan a tus pies»...