



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**Departamento de Ciencias
Biomédicas**

**Papel protector de la N-acetilcisteína
en un modelo animal de fallo
hepático fulminante**



*Memoria que presenta la Licenciada Beatriz San Miguel de Vega para la
obtención del grado de Doctora por la Universidad de León*

León, 2008



UNIVERSIDAD DE LEÓN

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. Dña. M^a Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez, Directores de la Tesis Doctoral: “Papel protector de la N-acetilcisteína en un modelo animal de fallo hepático fulminante” realizada por la Doctoranda Dña. Beatriz San Miguel de Vega, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a ____ de _____ de 2008.

Los Directores de la Tesis

Fdo: Dra. M^a Jesús Tuñón González

Fdo: Dr. Marcelino Álvarez Martínez



UNIVERSIDAD DE LEÓN

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y Norma 7ª de las
Complementarias de la ULE)

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día ____ de _____ de 2008, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: "Papel protector de la N-acetilcisteína en un modelo animal de fallo hepático fulminante", dirigida por los Dres. Dña. M^a Jesús Tuñón González y D. Marcelino Álvarez Martínez y presentada por Dña. Beatriz San Miguel de Vega y cuyo título en inglés es "Protector effect of N-acetylcysteine in an animal model of fulminant hepatic failure".

Lo que firmo para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a ____ de _____ de 2008.

VºBº DIRECTORA DPTO.

SECRETARIA DPTO.

Fdo: Dra. M^a Jesús Tuñón González

Fdo: Dra. Nélida Fernández Martínez

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras deben de ser por justicia de profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de, una manera u otra, han contribuido a que este proyecto haya llegado al final a buen puerto.

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Javier González Gallego, Catedrático del Área de Fisiología, Director del Instituto de Biomedicina de la Universidad de León e investigador responsable del grupo de trabajo CIBEREHD de León, por la confianza depositada en este trabajo y por la inestimable oportunidad que me ha brindado al integrarme en sus proyectos científicos.

A los directores de esta tesis, Dr. Marcelino Álvarez Martínez y Dra. María Jesús Tuñón González. Su empeño personal y profesional ha hecho posible la realización de este trabajo. Además de reconocer el honor y satisfacción que me ha supuesto disfrutar de sus sugerencias y brillantes ideas científicas, he sentido su cercanía, preocupación, su implicación personal y amistad.

Al Doctor José Miguel Prieto Martín, del Laboratorio de Sanidad Animal de Asturias, por su apoyo para la realización de los estudios de inmunohistoquímica.

A la Dra. María del Carmen Ferreras Estrada por su consejo y ayuda en el estudio histológico.

A todos los miembros del Área de Fisiología, en especial a, Irene, Elena, Virginia, Susana, Gracia, Belén, Rodrigo, Javi, Victoria y a los demás miembros del área porque todos han contribuido en cierta medida, con sus consejos, ánimo y apoyo, a la finalización de esta tesis.

Por último y no por ello menos importante, quiero agradecer a mis padres el apoyo y cariño que me han prestado en todo momento, a ellos mi amor profundo, por su constancia y comprensión y en especial a mi niña Sandra y a Armando las personas que más han sufrido las consecuencias derivadas de la elaboración de una tesis doctoral, a las que más horas de tiempo he robado y las que más se han alegrado de su finalización. Sin el amor, el cariño y la estabilidad emocional que me han transmitido durante estos años nunca lo hubiese conseguido. Esta tesis también es vuestra.

A mis padres
A mi marido
Y especialmente a mi niña

Parte de los resultados recogidos en la presente memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

San Miguel B, Gonzalo Orden M, Regueiro Purriños M, Orden MA y Tuñón MJ.
Enfermedad hemorrágica vírica del conejo: Diagnóstico por técnicas de imagen.

XIII Jornadas Internacionales De Cirugía Veterinaria: Secive 04.

Córdoba, 4 al 6 de Noviembre de 2004.

San Miguel B, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J y Tuñón MJ.

Efecto de la administración de N-acetilcisteína (NAC) sobre la supervivencia en un modelo animal de fallo hepático fulminante (FHF).

XXX Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 17-19 de Febrero de 2005.

Gastroenterol Hepatol 28 (1), 106, 2005.

San Miguel B, Álvarez M, Sánchez-Campos S, Culebras JM, González-Gallego J y Tuñón MJ.

Mecanismos apoptóticos en un modelo animal de fallo hepático fulminante.

XXXI Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 15-17 de Febrero de 2006.

Gastroenterol Hepatol 29 (1), 170, 2006.

San Miguel B, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J y Tuñón MJ.
Effect of N-acetylcysteine administration on survival in an animal model of
fulminant hepatic failure.
19th European Congress on Surgical Infections
Athens, Greece 25-28 Mayo 2006.
Surgical Infections 7: 225, 2006.

San-Miguel B, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J y Tuñón MJ.
N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of
fulminant hepatic failure.
Apoptosis 11: 1945-1957, 2006.

García-Lastra R, San Miguel B, Jorquera F, Álvarez M, González-Gallego J y
Tuñón MJ.
Implicación de las vías de señalización MAPK y los factores de transcripción
AP-1 y NF-kappaB en un modelo animal de fallo hepático fulminante.
XXXIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado.
Madrid, 20-22 de Febrero de 2008.
Gastroenterol Hepatol 31 (1): 125, 2008.

García-Lastra R, San Miguel B, Jorquera F, Álvarez M, González-Gallego J y Tuñón MJ.

MAP kinase dependent pathway are activated during programmed cell death in a viral model of fulminant hepatic failure.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver.

Milan, Italia, 23-27 de Abril de 2008.

García-Lastra R, San Miguel B, Álvarez M, Mauriz JL, Culebras JM, González-Gallego J y Tuñón MJ.

Influence of mitogen-activated kinases and transcription factors activation during apoptosis induction in a viral model of fulminant hepatic failure.

21st European Congress on Surgical Infections.

Antalya-Turquía, 1-3 de Mayo de 2008.

Surgical Infections 9: 300, 2008.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIF	factor inductor de apoptosis (“apoptosis inducing factor”)
Apaf-1	factor activador de apoptosis (“apoptotic peptidase activating factor”)
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
ALT	alanina amino transferasa
AST	aspartato amino transferasa
BR	bilirrubina
CAD	desoxirribonucleasa activada por caspasa (“caspase-activated dextyribonuclease”)
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CID	coagulación intravascular diseminada
Cit-c	citocromo-c

dATP	desoxiadenosín-trifosfato
DD	dominio de muerte (“death domain”)
EEM	error estándar de la media
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
EGTA	ácido etilén glicol tetraacético
ELISA	ensayo inmunoenzimático
EROs	especies reactivas de oxígeno
FHF	fallo hepático fulminante
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación (forma reducida)
GSSG	disulfuro de glutación (forma oxidada)
GST	glutación S-transferasa
Glu	glucosa
Glu-6-P-DH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
H-E	hematoxilina-eosina
hpi	horas posinfección
ICAD	inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa (“inhibitor of caspase-activated DNase”)

IL	interleucina
INF- γ	interferón- γ
kb	kilo bases
LDH	lactato deshidrogenasa
MAPK	proteínas cinasas activadas por mitógenos (“mitogen-activated protein kinases”)
NAC	N-acetilcisteína
NAD ⁺	nicotín adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADP	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADH	nicotín adenín dinucleótido (forma reducida)
NADPH	nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF- κ B	factor de transcripción nuclear kappa B (“nuclear factor-kappa B”)
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa (“nitric oxide synthase”)
O ₂ [·]	radical anión superóxido
OH [·]	radical hidroxilo
OPT	optaldehído
PAP	peroxidasa-antiperoxidasa

pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
Pm	peso molecular
pi	posinfección
POD	piruvato oxidasa
PMSF	fenilmetil-sulfonil fluoruro
RER	retículo endoplásmico rugoso
RHD	enfermedad hemorrágica del conejo (“rabbit haemorrhagic disease”)
RL	radical libre
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (“reverse transcription-polymerase chain reaction”)
SAM	S-adenosil-L-metionina
SH	grupo tiol
SDS	dodecil sulfato sódico
SOD	superóxido dismutasa
SODm	superóxido dismutasa mitocondrial

SSF	suero salino fisiológico
TAE	tampón acético tris/EDTA
TEMED	tetrametiletilendiamina
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α (“tumor necrosis factor- α ”)
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral (“tumor necrosis factor receptor”)
U	unidad
UV	ultravioleta
V	voltios
γ -GT	γ -glutamiltanspeptidasa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. El fallo hepático fulminante	7
2.1.1. Etiología	8
2.1.1.1. Etiología infecciosa	9
2.1.1.2. Etiología tóxica	9
2.1.1.3. Otras etiologías	10
2.1.2. Clínica	11
2.1.2.1. Alteraciones del sistema nervioso central	12
2.1.2.2. Alteraciones renales y del equilibrio ácido-base	16
2.1.2.3. Alteraciones respiratorias	19
2.1.2.4. Alteraciones de la coagulación	20
2.1.2.5. Alteraciones metabólicas	21
2.1.3. Anatomía patológica	22
2.1.4. Fisiopatología	23
2.1.5. Diagnóstico	25
2.1.6. Clasificación	26
2.1.7. Tratamiento	27
2.2. Importancia de la apoptosis en el fallo hepático fulminante	35

2.2.1. Familia Bcl-2	39
2.2.2. Caspasas: la clave en el mecanismo de apoptosis	41
2.2.3. Vías de la apoptosis	43
2.3. Modelos animales de fallo hepático fulminante	45
2.3.1. Modelos quirúrgicos	47
2.3.1.1. Hepatectomía total y parcial	47
2.3.1.2. Desvascularización	49
2.3.2. Modelos inducidos por sustancias químicas	50
2.3.3. Modelos víricos	51
2.4. La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fallo hepático fulminante	53
2.4.1. Patogénesis	54
2.4.2. Cuadro clínico	56
2.4.3. Lesiones	57
2.4.3.1. Lesiones macroscópicas	57
2.4.3.2. Lesiones microscópicas	59
2.5. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes	60
2.5.1. Glutación	62
2.5.1.1. Estructura y propiedades químicas	62
2.5.1.2. Biosíntesis y degradación	64
2.5.1.3. Regeneración	66
2.5.1.4. Funciones biológicas	68
2.6. N-acetil-L-cisteína	70
2.6.1. Química y farmacocinética	71
2.6.2. Mecanismo de acción	72

3. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.1. Aparatos	81
3.2. Soluciones	82
3.3. Animales	83
3.4. Diseño experimental	83
3.4.1. Obtención del inóculo vírico	83
3.4.2. Titulación del virus	83
3.4.3. Inoculación de los animales	84
3.4.4. Recogida de muestras	86
3.5. Métodos analíticos	87
3.5.1. Determinaciones en plasma	87
3.5.1.1. Actividad aspartato aminotransferasa (AST)	87
3.5.1.2. Actividad alanino aminotransferasa (ALT)	88
3.5.1.3. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	89
3.5.1.4. Concentración de glucosa	89
3.5.1.5. Concentración de bilirrubina	90
3.5.2. Determinaciones en hígado	91
3.5.2.1. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico	91
3.5.2.2. Obtención de homogeneizado total	93
3.5.2.3. Obtención de la fracción citosólica	93
3.5.2.4. Concentración de proteína	93
3.5.2.5. Concentración de glutatión reducido (GSH)	95
3.5.2.6. Concentración de glutatión oxidado (GSSG)	96
3.5.2.7. Actividad glutatión peroxidasa (GPx)	97
3.5.2.8. Actividad glutatión reductasa (GR)	98
3.5.2.9. Actividad glutatión-S-transferasa (GST)	100

3.5.2.10. Western blot	101
3.5.2.11. Extracción y purificación del ADN	104
3.5.2.12. Cuantificación del ADN	105
3.5.2.13. Electroforesis del ADN en gel de agarosa	105
3.5.2.14. Actividad enzimática de las caspasas -3 y -8	107
3.5.3. Tratamiento estadístico	109
4. RESULTADOS	111
4.1. Efectos de la NAC sobre la supervivencia en conejos infectados con el virus de la RHD	113
4.2. Efectos de la NAC sobre la anatomía e histología hepática en conejos infectados con el virus de la RHD	114
4.3. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático en conejos infectados con el virus de la RHD	123
4.4. Efectos de la NAC sobre el estrés oxidativo hepático en conejos infectados con el virus de la RHD	126
4.5. Efectos de la NAC sobre la expresión y actividad hepática de marcadores apoptóticos en conejos infectados con el virus de la RHD	129
4.6. Efectos de la NAC sobre la fragmentación del ADN en el hígado de conejos infectados con el virus de la RHD	136
4.7. Efectos de la NAC sobre la actividad hepática caspasa-3 y -8 en conejos infectados con el virus de la RHD	137

5. DISCUSIÓN	139
5.1. Efectos de la NAC sobre la supervivencia de los conejos infectados con el virus de la RHD	141
5.2. Efectos de la NAC sobre la anatomía e histología hepática en conejos infectados con el virus de la RHD	143
5.3. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros plasmáticos en conejos infectados con el virus de la RHD	145
5.4. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros hepáticos en conejos infectados con el virus de la RHD	147
5.5. Efectos de la NAC sobre marcadores de apoptosis en el hígado de conejos infectados con el virus de la RHD	152
6. CONCLUSIONES	161
7. BIBLIOGRAFÍA	167

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Principales etapas de la apoptosis	39
Esquema 2.	Representación esquemática de la activación de una caspasa	42
Esquema 3.	Vías de la apoptosis	45
Esquema 4.	Estructura química del glutatión	63
Esquema 5.	Síntesis del glutatión	65
Esquema 6.	Ciclo de oxido-reducción del glutatión	67
Esquema 7.	Estructura química de la N-acetil-L-cisteína	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentaje de animales vivos en los distintos periodos y grupos estudiados	114
Figura 2.	Relación hepática GSSG/GSH en los distintos periodos y grupos estudiados	127
Figura 3.	Expresión hepática de Fas-L en los distintos periodos y grupos estudiados	130
Figura 4.	Expresión hepática de Bax en los distintos periodos y grupos estudiados	131
Figura 5.	Expresión hepática de Bcl-2 en los distintos periodos y grupos estudiados	132
Figura 6.	Relación Bax/Bcl-2 en los distintos periodos y grupos estudiados	133
Figura 7.	Expresión hepática del Cit-c en los distintos periodos y grupos estudiados	134
Figura 8.	Expresión hepática de PARP en los distintos periodos y grupos estudiados	135
Figura 9.	Actividad hepática de la caspasa-3 en los distintos periodos y grupos estudiados	137
Figura 10.	Actividad hepática de la caspasa-8 en los distintos periodos y grupos estudiados	138

ÍNDICE DE TABLAS E IMÁGENES

Tabla 1.	Evolución del peso corporal en los 7 días de tratamiento en los distintos periodos y grupos estudiados	113
Tabla 2.	Parámetros plasmáticos en los distintos periodos y grupos estudiados	125
Tabla 3.	Parámetros hepáticos en los distintos periodos y grupos estudiados	128
Imagen 1.	Titulación del virus por la técnica de hemoaglutinación	84
Imagen 2.	Aspecto del hígado en los animales infectados con el virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos.....	115
Imagen 3.	Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo control	116
Imagen 4.	Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo RHD a las 24 hpi.	116
Imagen 5.	Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo RHD+NAC a las 24 hpi.	117
Imagen 6.	Hallazgos histológicos de los animales pertenecientes al grupo RHD entre las 36 y 48 hpi. ..	118

Imagen 7.	Hallazgos histológicos de los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC entre las 36 y 48 hpi.	118
Imagen 8.	Hallazgos histológicos de los animales supervivientes al virus de la RHD.	119
Imagen 9.	Aspecto del núcleo de hepatocitos de los distintos grupos estudiados entre las 36 y 48 hpi.	120
Imagen 10.	Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD a las 12 hpi.	121
Imagen 11.	Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD a las 24 hpi.	121
Imagen 12.	Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD entre las 36 y 48 hpi.	122
Imagen 13.	Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de la caspasa-3 entre las 36 y 48 hpi.	123
Imagen 14	Electroforesis de ADN hepático en gel de agarosa en los distintos grupos experimentales entre las 36 y 48 hpi.	136

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El fallo hepático fulminante (FHF) es un síndrome clínico muy grave resultante de la necrosis hepática y del fallo funcional del parénquima hepático, de rápida progresión, en un hígado previamente sano, asociado con una alta mortalidad (60-90%), a pesar de los grandes avances que se han producido en los últimos años en la terapia tanto del manejo de los cuidados intensivos mediante diversos soportes hepáticos bioartificiales como del trasplante hepático. Se caracteriza por la presencia de encefalopatía hepática (EH) junto con signos de insuficiencia hepatocelular, especialmente ictericia y coagulopatía. La mayoría de los pacientes experimentan un deterioro rápido y mueren a no ser que reciban un trasplante de urgencia. Solo un bajo porcentaje de estos pacientes recuperan la función hepática normal.

El mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo del FHF tiene gran importancia en la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas por lo que se considera que el uso de modelos animales que brinden la oportunidad de investigar sobre esta grave patología tiene una gran trascendencia. De hecho, aunque una de las principales etiologías de FHF es de naturaleza vírica, la mayor parte de los modelos desarrollados hasta el momento son quirúrgicos o utilizan sustancias químicas y no reflejan de modo idóneo el patrón de la enfermedad humana de FHF. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han comprobado que la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) presenta características bioquímicas, histológicas y signos clínicos compatibles con el FHF del hombre por lo que cumple los requisitos necesarios para ser considerado como modelo animal del FHF humano.

La apoptosis es la primera respuesta celular ante las principales agresiones tóxicas, víricas o daños de isquemia/reperfusión que se producen en los diversos órganos y tejidos. En el hígado juega un papel fundamental en la masiva muerte celular que se produce en el FHF, por lo que se supone que es uno de los principales mecanismos implicados en la patogénesis del mismo. De hecho, su inhibición previene la inflamación y la fibrosis que se desarrollan en esta patología hepática por lo que se supone que el desarrollo de inhibidores de la apoptosis sería una estrategia terapéutica de gran relevancia para mejorar el estado de los pacientes afectados de esta patología.

Aunque no existe tratamiento efectivo para el FHF, solamente la N-acetilcisteína, un conocido antioxidante que inhibe la formación de radicales libres y dona grupos sulfidrilos necesarios para la síntesis de glutatión, ha probado su eficacia en los casos de FHF producido por sobredosis de paracetamol, mejorando numerosos parámetros bioquímicos indicadores de fallo hepático. La N-acetilcisteína, además, mejora numerosos marcadores de apoptosis y es un compuesto citoprotector con múltiples aplicaciones terapéuticas entre las que podemos destacar dicha utilización en el fallo hepático inducido por la sobredosis de paracetamol en el hombre.

Por todo ello, en este estudio el principal objetivo ha sido comprobar el posible efecto protector de la administración de N-acetilcisteína en conejos infectados con el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, modelo animal de FHF de etiología vírica, sobre diversos parámetros plasmáticos y hepáticos indicadores de daño hepático así como sobre diversos marcadores de muerte celular por apoptosis.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El fallo hepático fulminante

En el año 1970, Trey y Davidson definieron la hepatitis fulminante como un cuadro clínico agudo, de pocas semanas de evolución y sin evidencias de enfermedad hepática previa (Trey y Davidson, 1970). El fallo hepático agudo o fulminante (FHF) es un síndrome clínico muy grave asociado con una alta morbilidad y mortalidad (Lee, 1993), a pesar de los grandes avances que se han producido en los campos tanto del manejo de los cuidados intensivos como en el trasplante hepático (Previs y cols., 1998; Nussler y cols., 2006). El FHF se caracteriza por un rápido deterioro de la función hepática con desarrollo de encefalopatía hepática en pacientes sin historia previa de enfermedad hepática o con alteraciones hepáticas crónicas (O'Grady y cols., 1993). Las etiologías del FHF son muy diversas, con variaciones geográficas, e incluyen hepatitis víricas, hepatotoxinas, anormalidades cardiovasculares, hepatitis autoinmunes, alteraciones metabólicas y anormalidades anatómicas del hígado; no obstante, en una gran proporción de pacientes se desconoce su etiología (Riordan y Williams, 2000).

El FHF no se considera como una enfermedad, sino como un síndrome que se produce como consecuencia del fallo funcional de una gran parte del parénquima hepático (Rosser y Gores, 1995). El diagnóstico del cuadro se basa, por un lado, en la ausencia de enfermedad hepática previa, y por otro, en la presencia de signos clínicos y analíticos que evidencian la menor función celular hepática, siendo un buen índice el alargamiento del tiempo de protrombina que no se corrige con vitamina K.

2.1.1. Etiología

Las causas que originan el FHF son diversas y existe una considerable variación geográfica. Los virus y los fármacos son los responsables de la mayoría de los casos sin embargo, en un alto porcentaje de los pacientes la etiología es indeterminada (O'Grady, 2005). En la mayoría de los casos el FHF es originado principalmente por infecciones víricas especialmente por el virus de la hepatitis B pero también por el A y por el E (Acharya y cols., 2000). Ahora bien, en países como el Reino Unido y en los EEUU, más del 65% de los casos de FHF son debidos a drogas y fármacos siendo la intoxicación por paracetamol la principal causa de FHF (Bernal, 2003). En España el principal responsable es el virus de la hepatitis B mientras que la intoxicación por paracetamol es la causa de un bajo número de casos; y en uno de cada tres casos no se conoce su etiología (Escorsell y cols., 2007).

Las causas que originan el FHF las podemos dividir en tres grandes grupos:

1. Infecciosas (50-70%)
2. Fármacos, toxinas y venenos (20-30%)
3. No tóxicas ni infecciosas: vasculares, metabólicas, misceláneas, indeterminadas (5%)

2.1.1.1. Etiología infecciosa

La hepatitis vírica aguda constituye una de las causas más frecuentes de FHF, aunque con una variabilidad geográfica en su prevalencia que puede oscilar desde el 72% en París al 33% en Londres (Bernuau y col., 1986; O'Grady y cols., 1989), con un valor del 40% en el caso de España (Escorsell y cols., 2007). Los principales virus implicados son los virus de las hepatitis A, B, D y E. En el caso del virus A el riesgo de que desencadene hepatitis fulminante o subfulminante es bajo (0,01%) y del conjunto de las hepatitis víricas que pueden evolucionar de forma fulminante es la que tiene el mejor pronóstico. El virus B es la causa principal de FHF a escala mundial, llegando a ser responsable del 70% de los casos de origen vírico (Papaevangelou y cols., 1984). Las hepatitis producidas por el virus E provocan FHF sobre todo en mujeres en el tercer trimestre de embarazo con gran incidencia en zonas de África y Asia (Ramalingaswami y Purcell, 1988).

Otros virus implicados en el FHF son los herpes simples tipo 1 y 2, varicela-zoster, citomegalovirus, Epstein-Barr, adenovirus, paramixovirus y de forma aislada se han comunicado casos atribuibles a parvovirus B19, cosackie B y arbovirus, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Bernuau y cols., 1986; Liang y cols., 1993., Langnas y cols., 1995; Feranchak y cols., 1998).

2.1.1.2. Etiología tóxica

Con excepción de la hepatitis por paracetamol que es frecuente en algunos países, la hepatitis debida a intoxicaciones provoca únicamente el 1-

2% de los casos de FHF y en ocasiones se determina la etiología tóxica por exclusión de otras causas (Bernuau y cols., 1986; Abboud y Kaplowitz, 2007). El paracetamol es la causa del 50 al 60% de los casos de insuficiencia hepática fulminante en el Reino Unido (O'Grady y cols., 1989), predominando en este caso la intención suicida sobre el envenenamiento accidental. La tasa de hospitalización debido a una sobredosis accidental o intencionada de paracetamol se estima en más de 26.000 casos al año en USA (Nourjah y cols., 2006).

Otros agentes causantes de FHF son los anestésicos halogenados, sobre todo el halotano, los antiinflamatorios no esteroideos, los agentes anti-BK isoniazida y pirazinamida o los inhibidores de la monoamino oxidasa, sobre todo si se asocian con inductores enzimáticos (Boelsterli y cols., 1995).

Las setas del género *Amanita* y disolventes industriales como el tetracloruro de carbono e hidrocarburos volátiles se encuentran entre los agentes capaces de causar FHF.

2.1.1.3. Otras etiologías

Aunque con una baja frecuencia también son causas de FHF las asociadas al embarazo (ruptura hepática espontánea), enfermedad venooclusiva, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, metástasis tumorales, sepsis, isquemia y el fallo del trasplante hepático (Grabhorn y cols., 2006; Eisenbach y cols., 2007).

2.1.2. Clínica

Tanto las manifestaciones clínicas como los datos de laboratorio son comunes en las diferentes etiologías, salvo peculiaridades específicas. La EH constituye un criterio diagnóstico. Casi siempre la hiperbilirrubinemia es de tipo conjugado y la ictericia es un signo precoz y rápidamente progresivo. Hay un descenso progresivo del tamaño hepático con disminución de la matidez a la percusión.

Se producen graves trastornos de la coagulación por diferentes mecanismos que favorecen el sangrado en diversas localizaciones, siendo la más frecuente el tracto digestivo superior (erosiones agudas de la mucosa gástrica). La insuficiencia renal aparece en el 30-75% de los casos y se asocia a un peor pronóstico. Es habitual la circulación hiperdinámica, caracterizada por taquicardia, hipotensión, aumento del gasto cardíaco y disminución de las resistencias periféricas, relacionado todo ello con un desequilibrio entre factores vasodilatadores y factores vasoconstrictores a favor de los primeros.

Es común la hipocapnia secundaria a la hiperventilación central que se produce en la EH y la hipopotasemia secundaria a pérdidas e hiperaldosteronismo secundario. La hiponatremia es generalmente dilucional. Pueden aparecer hipomagnesemia e hipocalcemia. Los pacientes con FHF desarrollan infecciones frecuentes de origen entérico. Siendo frecuentes también las infecciones por Gram + y hongos, favorecidas por el manejo diagnóstico y terapéutico de estos enfermos. En su patogenia se implican alteraciones funcionales de los neutrófilos, disminución del complemento sérico y quizás una deficiencia de la función de las células de Kupffer.

Analizaremos por sistemas las características clínicas y la patogenia de su afectación en el curso del FHF.

2.1.2.1. Alteraciones del sistema nervioso central

La patogenia de la EH no es todavía muy conocida, no obstante los dos factores implicados han sido el incremento de la concentración de amonio en el sistema nervioso central y el aumento del ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor inhibitor (Lee, 1993; Mas y Rodes, 1997).

La neurotoxicidad del amonio es bien conocida. Su concentración en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) aumenta en el FHF. El amonio inhibe los canales de cloro, lo que contribuye a la depresión del sistema nervioso central (SNC), disminuye la neurotransmisión glutamatérgica, causando neurodepresión y además altera la barrera hemato-encefálica. No obstante, existen varias observaciones que van en contra de que el amonio sea el único factor en el desarrollo de la encefalopatía: a) la pobre correlación entre su concentración en plasma y LCR y la gravedad de la encefalopatía; b) la aparición de encefalopatía con niveles de amonio normales; c) el hecho de que concentraciones bajas de amonio producen excitación en lugar de neurodepresión (Jalan y Haynes, 1997). Se ha propuesto un papel para otras neurotoxinas derivadas del intestino tales como mercaptanos, fenoles o ácidos grasos de cadena corta.

El estado normal de alerta está determinado por un fino equilibrio entre los neurotransmisores excitadores e inhibidores. Por un lado, el glutatión es el neurotransmisor excitador más importante en el cerebro; en la encefalopatía

sus niveles están reducidos, los mecanismos de recaptación están alterados y los sitios de unión presentan una regulación a la baja. Por otro lado, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitor y su tono está aumentado en la EH, lo que se asocia con alteraciones de la función motora y la depresión de conciencia, dos manifestaciones cardinales de la encefalopatía. El mecanismo por el cual dicho tono aumenta es desconocido: la disminución de los receptores GABA presinápticos y el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica estarían favoreciendo el aumento de la activación de los receptores GABA, junto con la síntesis de neuroesteroides por la astrogli (Basile y Jones, 1997).

Por último, se ha sugerido que el amonio por sí solo aumentaría directamente la neurotransmisión GABAérgica (Basile y Jones, 1997). Parece probable que el amonio, en las concentraciones que comúnmente se detectan en el FHF, contribuye a las manifestaciones de la encefalopatía ya sea potenciando la neurotransmisión GABAérgica o aumentando sinérgicamente la acción de los agonistas endógenos del receptor benzodiazepínico. Este concepto explica por qué algunos pacientes con encefalopatía tienen niveles normales de amonio y por qué, en otras circunstancias, no responden a los antagonistas del receptor de benzodiazepinas y racionaliza el tratamiento de la encefalopatía que está encaminado tanto a la disminución de los niveles de amonio como a la disminución del tono GABAérgico.

No sólo la encefalopatía, como desorden metabólico, afecta el nivel de conciencia de estos pacientes sino también el edema cerebral con aumento concomitante de la presión intracraneal (PIC). Generalmente progresa siguiendo cuatro etapas que van desde la confusión con alteraciones de la

personalidad (I) hasta el coma (IV), pasando por el comportamiento inapropiado con sopor, letargia, ataxia y asterixis marcada (II). El grado III se caracteriza por estado de estupor, lenguaje inarticulado, solamente se responden órdenes simples, clonus y Babinski y rigidez. El aumento de la PIC es poco frecuente en pacientes con encefalopatía grado I/II; no obstante, en las etapas tempranas aumentaría el líquido cerebral hasta alcanzar el máximo en las etapas avanzadas. El edema cerebral aparece en un 50 a 85% de los pacientes con FHF y encefalopatía grado III/IV (Lee, 1993; Atillasoy y Berk, 1995; Mas y Rodes, 1997). El edema cerebral puede conducir a herniación cerebral y muerte (25%). Existen dos teorías para explicar la patogénesis: la hipótesis de la “glutamina” y la hipótesis de la “hiperemia cerebral”. La hipótesis de la glutamina se basa en el hecho de que el amonio es detoxificado en el cerebro y convertido en glutamina, cuyos efectos osmóticos en los astrocitos puede conducir al desarrollo de edema cerebral (Blei, 2005; 2008). El hinchazón de los astrocitos puede conducir al desarrollo de edema cerebral y es un hecho neuropatológico prominente en el FHF (Blei, 1991; Blei y cols., 1992; Norenberg y cols., 2007). La concentración de amonio cerebral está relacionada con la herniación cerebral en pacientes de FHF (Clemmesen y cols., 1999).

Las células se adaptan a cambios crónicos de la osmolaridad activando mecanismos de regulación a corto y largo plazo. La adaptación aguda supone una pérdida de osmolitos inorgánicos a través de la activación de canales de potasio y cloro y del eflujo pasivo de osmolitos orgánicos (polioles: mioinositol, sorbitol; aminoácidos y sus derivados: taurina, alanita y prolina; metilaminas, glicerilfosforilcolina) a través de canales de membrana activados por la inflamación (McManus y cols., 1995). En la adaptación crónica, la hinchazón

celular inhibe la transcripción de genes encargados de la síntesis de los transportadores y de las enzimas responsables de la síntesis de los osmolitos orgánicos (Lee, 1993; McManus y cols., 1995). Por lo tanto, no solo influye la ganancia de glutamina por los astrocitos sino también si existe un tiempo suficiente para compensar dicho efecto a través de la pérdida de osmolitos orgánicos, lo que conduce al edema cerebral. La dependencia temporal explicaría el desarrollo más frecuente de edema cerebral en las formas hiperagudas de FHF (Lee, 1993).

La hipótesis de la “hiperemia cerebral” propone que el edema se produce como consecuencia de una elevación del flujo sanguíneo cerebral, lo que altera las fuerzas hidrostáticas presentes en los capilares cerebrales. Estudios realizados en pacientes con FHF (Larsen y cols., 1995a; 1995b; Strauss y cols., 1997a; 1997b) y en modelos experimentales (Dempsey y Kindt, 1982) indican que las arteriolas cerebrales están dilatadas. En pacientes con FHF, la liberación de endotoxinas desde el intestino a la sangre portal puede aumentar la concentración plasmática del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de algunas interleucinas (IL-1 β e IL-6) durante la respuesta inflamatoria del hospedador (Wilkinson y cols., 1978, De-la-Mata y cols., 1990). A su vez, las citocinas son potentes estimuladores de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), por lo que, el estado hiperdinámico de la circulación sistémica, junto con el alto gasto cardíaco y la baja resistencia vascular, puede llevar a la producción de excesivas cantidades de óxido nítrico (NO) en el endotelio del enfermo con FHF (Schneider y cols., 1994). Otros estudios sugieren que el desarrollo de edema cerebral puede depender tanto de la acumulación de glutamina en los astrocitos como de los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (Master y cols., 1998; Cordoba y cols., 1999).

Según otros autores, el hígado necrótico también podría estar involucrado en la génesis de la hiperemia cerebral pues la hepatectomía, en pacientes inestables en espera de trasplante hepático, conduce a una estabilización de los parámetros hemodinámicos sistémicos. Aunque, es posible que las citocinas u otros compuestos liberados por el hígado necrótico puedan contribuir a la vasodilatación cerebral, otras situaciones asociadas con la necrosis masiva del tejido hepático, tales como pancreatitis, no están asociadas con edema cerebral. Asimismo, se ha indicado que en la cirrosis el edema puede aparecer en ausencia de necrosis tisular (Cordoba y cols., 1999).

2.1.2.2. Alteraciones renales y del equilibrio ácido-base

Las alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico en el FHF son muy complejas. Entre el 30 y el 75% de los pacientes con FHF desarrolla insuficiencia renal oligúrica, lo cual agrava el pronóstico. Debido a la disminución de la síntesis de urea por el hígado, la azoemia no es un buen indicador de la función renal, y se prefiere la creatininemia (Ring-Larse y Palazzo, 1981).

Algunos pacientes desarrollan necrosis tubular aguda, vinculada al shock hipovolémico, bacteriemia y nefrotoxicidad inducidas por drogas, presentándose con un aumento de la natriuria y una orina isosmolar. No obstante, en la evolución lo más frecuente (aproximadamente en el 50% de los pacientes) es el desarrollo de un fallo renal funcional, habiéndose descartado los factores prerrenales y la necrosis tubular aguda. Los riñones de estos pacientes son histológicamente normales o casi normales con la función

tubular renal preservada de manera que el trasplante hepático o la mejoría del cuadro revierte el fallo renal (Bihari y cols., 1986).

El fallo renal funcional, al igual que en la cirrosis, se relaciona con el desequilibrio entre los factores neurohumorales vasoconstrictores y vasodilatadores renales, a favor de aquellos, secundario a la disminución del volumen circulante eficaz por vasodilatación periférica y esplácnica. Se ha demostrado a nivel neuronal un aumento de la actividad simpática con la existencia de un reflujo hepatorenal; en lo humoral, un aumento del sistema renina-angiotensina II-aldosterona, un aumento de la hormona antidiurética con refractariedad a la hormona natriurética auricular; y a nivel intrarrenal un aumento de la endotelina 1 con una disminución de la calicreína urinaria y una alteración de las prostaglandinas renales. De manera que, al igual que en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorenal, los pacientes con FHF e insuficiencia renal exhiben una grave vasoconstricción renal con disminución de la perfusión renal y del filtrado glomerular con una función tubular conservada en el contexto de una marcada vasodilatación sistémica (Hoofnagle y cols., 1995; Lee, 1997; Wendon y Ellis, 1997). Esta forma de disfunción renal no remite a menos que exista una mejoría simultánea de la función hepática. El pronóstico del síndrome hepatorenal es desfavorable con una mortalidad del 90%.

Aproximadamente un 50% de los pacientes con FHF exhiben signos clínicos asociados con hipertensión portal como ascitis y síndrome hepatorenal. Se ha sugerido que la hipertensión portal podría estar causada por un aumento de la resistencia hepática al flujo sanguíneo portal como consecuencia del colapso sinusoidal y distorsión de la arquitectura hepática

después de producirse la necrosis hepatocelular extensa (Navasa y cols., 1992).

La hipopotasemia se produce frecuentemente en las fases tempranas y puede desencadenar arritmias letales. La hiponatremia es la expresión bioquímica del aumento de retención de agua y la disminución de depuración del agua libre. Ello se debe a una disminución del filtrado glomerular, que determina una menor llegada de orina primaria a los segmentos distales de la nefrona, junto con el aumento de la hormona antidiurética. La inhibición de la secreción de esta hormona, así como su inhibición periférica por la demecociclina y la expansión del volumen con plasma aumenta la generación de agua libre. La hipernatremia puede seguir a la trasfusión de grandes cantidades de plasma fresco, especialmente en ausencia de diuresis o con el uso de diuréticos osmóticos. La hipofosfatemia es común particularmente en casos de sobredosis por paracetamol (Valla y cols., 1989).

La alcalosis es un hallazgo frecuente en el FHF (Bihari y cols., 1985; Mizock y Falk, 1992). En etapas tempranas de la EH frecuentemente se observa una alcalosis respiratoria de origen central, secundaria a algún mediador tóxico. Se asocia con una disminución de la disociación de la oxihemoglobina, y una disminución de la perfusión cerebral y del consumo de O₂ cerebral.

También es precoz una alcalosis metabólica y puede deberse a la hipopotasemia, o ser secundaria al fallo en la alcalinización de la orina. La aspiración gástrica puede potenciar este problema así como también la disminución de la natremia.

En la evolución se desarrolla una acidosis metabólica láctica, particularmente asociada con la hipoglucemia y el fallo de la circulación periférica. Se ha sugerido que la acidosis láctica puede deberse tanto al fallo de la gluconeogénesis como a un aumento del metabolismo aeróbico. Por último, puede existir también una acidosis respiratoria por depresión del centro respiratorio secundario al edema cerebral.

2.1.2.3. Alteraciones respiratorias

En relación al centro respiratorio, inicialmente se produce una hiperestimulación que lleva a una alcalosis respiratoria pero en la evolución, y de forma secundaria al aumento de la presión intracraneal, puede desarrollarse una acidosis metabólica por depresión del centro respiratorio que conduce al paro respiratorio.

En relación con el parénquima pulmonar y del intercambio de gases, estos pacientes presentan una insuficiencia respiratoria tipo I, debido a una hipoxemia con normo o hipocapnia. La hipoxemia es secundaria a varios mecanismos: aspiración del contenido digestivo en las vías aéreas, edema pulmonar lesional, atelectasia por secreciones retenidas que no pueden expectorar, íleo pronunciado con ascenso diafragmático y neumonía, como complicación infecciosa. Se ha descrito un síndrome hepatopulmonar que consiste en la tríada: disfunción hepática más hipoxemia más dilatación vascular pulmonar (Castro y Krowka, 1996).

A nivel macrocirculatorio, el patrón típico del FHF es muy similar al de la sepsis, con gasto cardíaco aumentado y disminución de la resistencia vascular

periférica, que en la evolución puede llegar a la hipotensión y shock. A veces el shock puede ser de causa central por depresión del centro vasomotor, siendo de muy difícil tratamiento (Harrison y cols., 1991).

En la microcirculación se produce una disminución de la tasa de extracción de oxígeno con una diferencia arterio-venosa del oxígeno disminuida a pesar de la alta disponibilidad del mismo, lo cual favorece la lactoacidosis. La corrección de la macrocirculación con vasoconstrictores e inotrópicos, empeora la oxigenación tisular agravando la acidosis metabólica (Wendon y Ellis, 1997). Se pueden observar arritmias cardíacas incluyendo extrasístoles ventriculares, bloqueos y bradicardia, que pueden ser secundarias a alteraciones en la oxigenación del miocardio y aumento de la presión intracraneal.

2.1.2.4. Alteraciones de la coagulación

Las alteraciones en el mecanismo de la coagulación son un hallazgo prácticamente constante en el FHF, debido al papel del hígado en la síntesis de los factores de la coagulación con excepción del factor VIII, que es sintetizado por el endotelio. El tiempo de protombina (TP) se halla prolongado (en general <50%), siendo éste un elemento pronóstico. El factor VII es el primero en disminuir por su vida media corta y se afecta poco con el aumento del catabolismo. El descenso de este factor indica que el daño hepático ha ocurrido independientemente de los factores dependientes de vitamina K y es un factor pronóstico (<15%) y de seguimiento evolutivo. La concentración de

fibrinógeno es la última en disminuir, ya que el hígado preserva la capacidad de sintetizarlo hasta las etapas finales del FHF.

Si bien puede ocurrir una fibrinólisis y una coagulación intravascular diseminada (CID) de bajo grado, estos síndromes son difíciles de distinguir de los cambios debidos a fallos de la síntesis hepática. No obstante, la CID puede acentuarse por complicaciones hemorrágicas, reposición de factores, infección o endotoxemia. Se altera la función y el número de plaquetas que se sitúan por debajo de 100.000/ μ l (Lee, 1993).

2.1.2.5. Alteraciones metabólicas

Una situación frecuente (más del 40%) es la hipoglucemia, secundaria a la alteración de la gluconeogénesis y a los bajos niveles de glucógeno hepático (Lee, 1997). Por otra parte, los niveles de insulina están elevados por una disminución de su metabolismo, lo que aumenta su vida media; este aspecto junto con la hiponatremia, puede explicar parte de las manifestaciones encefálicas.

La presencia de hipoglucemia constituye otro elemento pronóstico. No es raro que estos pacientes presenten una pancreatitis asociada que puede ser causa de íleo o distensión abdominal y de la hiperdinamia.

2.1.3. Anatomía patológica

En la mayoría de los casos, se produce una necrosis masiva de los hepatocitos; no obstante, la insuficiencia hepatocelular sin necrosis es característica del hígado graso agudo del embarazo y del síndrome de Reye, sugiriendo que la muerte real de las células no es un rasgo universal o esencial. Ciertas condiciones como el daño inducido por disolventes orgánicos o la intoxicación por acetaminofeno afectan en particular a la región centrolobulillar. En contraste, el hígado graso agudo se caracteriza por la acumulación de grasa microvesicular en las células intactas.

Vinculado con el patrón enzimático podemos hablar de dos tipos anatomopatológicos de lesión hepática en el FHF:

En el tipo I aparecen áreas confluentes de necrosis hepatocitaria, y cursa con una elevación muy marcada de las transaminasas séricas (mayores de 1.000 U/l) y de la bilirrubinemia. Sus causas pueden ser virus hepatotropos, tóxicos como el paracetamol, halotano o isoniazida, intoxicación por *Amanita phalloides* o isquemia hepática.

El tipo II se caracteriza por un acúmulo microvesicular de grasa en el citoplasma hepatocitario, sin desplazamiento de los núcleos. Aunque también aumenta la transaminasemia, lo hace en menor grado. Algunos ejemplos de este tipo de FHF son la degeneración aguda grasa del embarazo, el síndrome de Reye, la toxicidad por tetraciclinas o ácido valproico y la hepatitis aguda alcohólica (Lee, 1993; 1997).

2.1.4. Fisiopatología

La gravedad y duración del FHF depende, por una parte, del grado de alteración de las actividades de síntesis, de biotransformación y de eliminación de endotoxinas resultantes de la pérdida de funcionalidad de los hepatocitos y las células de Kupffer, junto con los efectos sistémicos de los mediadores liberados por el hígado dañado y, por otra, de la velocidad y extensión a la que estos acontecimientos se ven equilibrados por la regeneración hepática. Diversas investigaciones sugieren que el daño hepático en el FHF es el resultado tanto de la acción directa del fármaco, toxina, virus u otra causa, como de la liberación de citocinas de las células no parenquimatosas activadas, es decir, las células de Kupffer, las células estrelladas y las células endoteliales (Andus y cols., 1991; Rosser y Gores, 1995). La activación de estos tipos de células puede, además, reducir la microcirculación intrahepática en los sinusoides, exacerbando la isquemia local. También se ha indicado que los pacientes con FHF presentan bajos niveles plasmáticos de fibronectina, proteína que actúa como una opsonina no específica para las partículas circulantes, tales como desechos celulares, fibrina y bacterias, además de estar involucrada en la hemostasia. Esta disminución en su concentración se debería a un incremento en su consumo en el proceso de fagocitosis más que a una falta de síntesis en el hígado dañado (Almasio y cols., 2000).

Varios estudios han implicado a las propias células residentes del hígado, especialmente las células de Kupffer y las células endoteliales, en combinación con elementos del sistema inmune como participantes en el proceso destructivo que lleva al fallo hepático bien sea por necrosis o por apoptosis (Pessayre y cols., 1999). La apoptosis está presente en el hígado

tanto durante su desarrollo como en la etapa adulta. Durante la embriogénesis la apoptosis es necesaria tanto para el desarrollo de las vías biliares como del parénquima hepático. El primitivo sistema biliar intrahepático se desarrolla a partir de una doble capa cilíndrica denominada lámina ductal. Terada y Nakanuma observaron un incremento de los niveles de Bcl-2 en estadios tardíos del desarrollo de la lámina ductal si lo comparaban con estadios más tempranos (Terada y Nakanuma, 1995). Posteriormente, en malformaciones en las que persiste la lámina ductal se observó un descenso en el número de células apoptóticas así como un incremento en los niveles de Bcl-2 comparándolos con fetos control de similares edades (Sergi y cols., 2000).

No se conoce demasiado sobre la implicación de la apoptosis en el parénquima hepático de una persona adulta sana; por el contrario, si se sabe que la apoptosis esta involucrada en numerosas patologías hepáticas como son enfermedades hepáticas autoinmunes, hepatitis víricas crónicas, en procesos hepáticos asociados al consumo de alcohol, en procesos cancerígenos como en el hepatocarcinoma y el colangiocarcinoma (Guicciardi y Gores, 2005), y en la patogénesis del FHF el cual se caracteriza por una incontrolada muerte masiva de hepatocitos (Leifeld y cols., 2006).

La apoptosis de los hepatocitos es el proceso más importante en el mecanismo molecular del fallo hepático (Togo y cols., 2004; Eichhorst, 2005), porque la apoptosis es la primera respuesta celular del hígado ante una amplia variedad de sustancias tóxicas (Doggrell, 2004). La muerte masiva de hepatocitos por apoptosis se ha puesto de manifiesto en diversos modelos de FHF como son el inducido por galactosamina más LPS (Arvelo y cols., 2002; Wang y cols., 2003), hepatitis por herpes simples (Hashimoto y cols., 2003) o

el modelo inducido por la concanavalina A (Trautwein y cols., 1998; Kim y cols., 2000). Sin embargo, no existen muchos datos sobre la trascendencia de la apoptosis en el FHF humano (Kasahara y cols., 2000; Ryo y cols., 2000; Streetz y cols., 2000; McGregor y cols., 2003).

2.1.5. Diagnóstico

La encefalopatía hepática junto a la aparición de una coagulopatía en el contexto de una enfermedad hepática aguda definen la presencia de una insuficiencia hepatocítica aguda. Dicho de otra forma, el diagnóstico del FHF se basa en la presencia de 2 ó 3 aspectos clínicos: ictericia y encefalopatía, junto con algunos datos bioquímicos: aumento de la BR total a expensas de la directa, prolongación del TP (<50%) y disminución del nivel plasmático del factor V. En general, la prolongación del TP por debajo del 50% precede en horas o semanas a la aparición de encefalopatía clínicamente evidente (Caraceni y VanThiel, 1995; Mas y Rodes, 1997).

En muchos casos este síndrome clínico se asocia con edema cerebral, alteración de la función renal y disfunción orgánica múltiple. Se pueden distinguir diferentes patrones de presentación vinculados a la etiología del FHF; por ejemplo, el FHF por sobredosis de paracetamol se presenta generalmente con encefalopatía y coagulopatía graves que puede progresar rápidamente al edema cerebral con poca o escasa ictericia; en cambio en los pacientes con FHF por hepatitis vírica a menudo se presenta con intensa ictericia pero con menos probabilidad de desarrollar edema cerebral (Lee, 1993).

2.1.6. Clasificación

Desde que en 1970 Trey y Davidson propusieran una definición para el FHF, algunos autores han aportado distintas clasificaciones con el objetivo de establecer un pronóstico y una acción terapéutica en cada caso basándose fundamentalmente en la duración del periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas clínicos o la aparición de ictericia y el desarrollo de encefalopatía. Así en el King's College Hospital de Londres, O'Grady y Williams en base al análisis de 635 pacientes comprendidos entre 1972 y 1985 proponen 3 categorías (O'Grady y cols., 1993):

- 1.- Fallo hepático hiperagudo: cuando la encefalopatía se produce dentro de los primeros 7 días desde la aparición de la ictericia.
- 2.- Fallo hepático agudo: cuando el intervalo entre la ictericia y la encefalopatía se encuentra entre los 8 y los 28 días.
- 3.- Fallo hepático subagudo: cuando la encefalopatía se produce entre las 5 y las 12 semanas de la aparición de la ictericia.

Si bien el primer y segundo grupo tienen alta incidencia de edema cerebral (69 y 56%, respectivamente), el segundo grupo tiene un desfavorable pronóstico sin trasplante hepático (7% de supervivencia) a diferencia del primer grupo (36% de supervivencia) en donde el tratamiento médico adquiere mayor importancia. El tercer grupo tiene baja incidencia de edema cerebral (14%), aunque el pronóstico con tratamiento médico es también desfavorable (14% de supervivencia).

Por otra parte, en el Hospital Beaujou de París, Bernuau y Durand clasificaron el FHF en dos grupos (Bernuau y Durand, 1997):

1.- Fallo hepático fulminante: cuando la encefalopatía se desarrolla dentro de las 2 semanas de iniciada la ictericia.

2.- Fallo hepático subfulminante: cuando el intervalo entre la ictericia y la encefalopatía se sitúa entre las 2 y 12 semanas.

Las manifestaciones de hipertensión portal, incluyendo ascitis y hemorragia digestiva por várices esofágicas son más comunes en el síndrome de fallo hepático subfulminante. El espectro de las alteraciones neurológicas también difieren: en el fallo hepático subfulminante la encefalopatía puede no producirse hasta muy avanzada la enfermedad, en cambio en el FHF el grado de EH y su duración son importantes predictores pronósticos. Aunque el edema cerebral y la herniación cerebral es la mayor causa de muerte en el FHF, con una incidencia superior al 50%, es infrecuente en los fallos hepáticos subfulminantes y las hepatopatías crónicas, en las que se vale de mecanismos compensadores que previenen el desarrollo de herniación cerebral mediante la inhibición de los factores que inician el edema vasogénico y citotóxico (Assy y Minuk, 1997; Williams, 1997).

2.1.7. Tratamiento

El manejo de los pacientes con FHF debe comenzar tan pronto como sea posible y la remisión del paciente a las unidades especializadas es fundamental (Bernuau, 2004). El tratamiento curativo de los pacientes con FHF

depende del tratamiento médico y del trasplante de hígado (TH). Son fundamentales tres aspectos: a) la recuperación espontánea sin secuelas es posible en algunos pacientes, b) la terapéutica inapropiada, en especial con los fármacos, puede agravar inesperadamente el estado del enfermo y c) el TH es un tratamiento eficaz (Bernuau y cols., 1986).

El tratamiento médico va dirigido a proporcionar a estos pacientes medidas de apoyo, sin que se produzca deterioro yatrogénico alguno, hasta que se recuperen de manera espontánea o se proceda al TH. A la hora de considerar el tratamiento médico se debe tener en cuenta tres máximas fundamentales: 1) la regeneración hepática es el objetivo fundamental y debe intentarse por todos los medios, 2) hay que seguir exhaustivamente el curso de la enfermedad y repetir periódicamente valoraciones pronósticas y 3) el metabolismo de los fármacos está profundamente alterado, por lo que se deben extremar los cuidados a la hora de prescribirlos (Tygstrup y Ranek, 1981). El tratamiento de este síndrome no puede depender de la atención primaria, urgencias, emergencias, sala de hospitalización o sala de cuidados intermedios. Es perentoria la atención de estos enfermos de entrada en una Unidad de Cuidados Intensivos, tanto mejor cuanto más experiencia tenga con pacientes de este tipo, y con habilidad para el tratamiento del fallo multiorgánico. Cuanta mayor sea la experiencia, más fidelidad en la valoración pronóstica será factible (Tygstrup y Ranek, 1986).

El apoyo nutricional adecuado requiere de la administración intravenosa de 200 a 300 g de dextrosa hipertónica al 10%, a la cual debe añadirse un preparado multivitamínico (especialmente del grupo B), potasio, fósforo y magnesio. Puede ser necesario administrar grandes cantidades de fosfato

potásico. La ingesta diaria de agua y sodio se ajustará a las disfunciones neurológicas, hemodinámicas y renales. No se recomienda administrar soluciones de aminoácidos ni de lípidos, ya que no se ha demostrado que posean eficacia terapéutica (Gecelter y Gomer, 1995; Chandra y Mehendale, 1996).

Un aspecto crucial en el tratamiento de FHF lo constituye el manejo de la insuficiencia renal. La oliguria, que sugiere la existencia de hipovolemia relativa, hace necesario proceder al relleno vascular mediante solución de albúmina humana. Esta expansión vascular pierde eficacia más adelante, en el curso de la insuficiencia hepática, cuando puede ser un factor importante que contribuya a elevar la presión intracraneal. Las dosis altas de manitol pueden también perjudicar la función renal. Puede estar indicada la terapéutica de sustitución renal durante el intervalo de espera del órgano, o como complemento del TH, debido a que el edema cerebral grave se acompaña a menudo de insuficiencia renal importante. La diálisis no es por si misma un tratamiento eficaz y además puede tener efectos perjudiciales al eliminar factores plasmáticos solubles que intervendrían en la regeneración hepática (Mas y Rodes, 1997).

La encefalopatía y el edema cerebral son las causas más frecuentes de muerte en estos pacientes debido al enclavamiento cerebral producido por el aumento de la PIC. En este sentido, los trastornos metabólicos que son potencialmente perjudiciales para la función cerebral, como la hipoxemia, hipoglucemia, hiponatremia, hipofosfatemia y acidosis metabólica, deben prevenirse y corregirse (Jalan, 2005).

Debe monitorizarse la PIC fundamentalmente en los casos de EH avanzada (a partir del grado III). Esta técnica lleva consigo riesgo de complicaciones pero la colocación de sensores de presión intracraneales, colocados preferentemente en posición epidural, que disminuye el riesgo de complicaciones, se ha mostrado de gran eficacia para la prevención de la herniación cerebral secundaria al edema así como para la selección de pacientes tributarios de TH (Mayberg y Lam, 1996; Córdoba, 2002).

El manejo de los trastornos metabólicos obliga a administrar bolos adicionales de dextrosa y monitorizar cuidadosamente las cifras de glucemia para detectar y corregir las hipoglucemias, que son asintomáticas la mayoría de las veces. Hay también que corregir la hipofosfatemia. La alcalosis no debe tratarse. Si existe acidosis metabólica hay que diagnosticar y tratar los factores desencadenantes y perfundir bicarbonato sódico o recurrir incluso a hemodiálisis (Lee, 1997).

Debido a que los trastornos de la coagulación constituyen el elemento pronóstico más valioso en la insuficiencia hepática, no debe intentarse corregirlos si no hay hemorragias. La administración de plasma fresco congelado no mejora la supervivencia, modifica el estado de la coagulación que al ser el pronóstico más fiel expone al paciente a la indicación inadecuada del TH. La trombopenia obliga algunas veces a transfundir plaquetas junto con pequeñas cantidades de heparina para impedir que aumente la CID. Se ha recomendado prevenir las hemorragias gastrointestinales con antiseoretos tipo antagonistas H₂, pero estos pueden ser perjudiciales en los pacientes con FHF de modo que su uso es controvertido. El sucralfato es tan eficaz como los

antagonistas H2 en cuanto a prevenir hemorragias digestivas relacionadas con el estrés (Lee, 1997).

Las infecciones y la sepsis son otra causa importante de muerte. Recientemente se han asociado valores bajos de fibronectina en plasma con una mayor mortalidad del FHF al relacionarse directamente con una mayor incidencia de infecciones llegando incluso a suponer un 75% de las muertes si no se trata correctamente. No está demostrada todavía la utilidad terapéutica de los antibióticos empleados profilácticamente. La bacteriemia y las infecciones bacterianas parenquimatosas deben tratarse con los antibióticos adecuados. Los aminoglucósidos están contraindicados a causa de que su nefrotoxicidad aumenta por la insuficiencia hepática. Las infecciones micóticas, cuya incidencia aumenta con el uso de antagonistas H2, requieren tratamiento antifúngico en los pacientes con cultivos positivos procedentes de lugares significativos (Rolando y cols., 1993; 2000).

La regeneración hepática es una respuesta fundamental del hígado ante el daño tisular. Se considera que el índice de regeneración hepática puede ser fundamental en el pronóstico de estos pacientes (Doria y cols., 2007). Se ha observado que, tras el tratamiento con el factor de crecimiento TGF β en un modelo de FHF en ratas provocado por tetracloruro de carbono, aumentó de forma clara (Armendariz-Borunda y cols. 1993). El agente antimicrobiano ciprofloxacino también aumenta significativamente la actividad de regeneración hepática en un modelo de FHF en rata, muy probablemente por bloquear los receptores de la membrana hepatocitaria para el ácido γ -aminobutírico, un inhibidor de la regeneración hepática, cuyos niveles están muy elevados en el FHF (Kaita y cols., 1998). En la regeneración hepática

están implicadas una compleja red de citocinas y factores de crecimiento que actúan de una manera ordenada, la anfiregulina, un factor de crecimiento, se ha observado que contribuye a la regeneración hepática en sus fases más tempranas tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo* pudiendo tener aplicaciones terapéuticas en la fabricación de medicamentos para el daño hepático agudo (Berasain y cols., 2005). Recientemente se ha observado que la proteína caveolina-1 es esencial para la regeneración hepática ya que está implicada en la acumulación y regulación del metabolismo de los triglicéridos; ratones sin caveolina-1, deficientes en esta proteína, mueren tras una hepatectomía parcial a diferencia de los ratones normales que son capaces de sobrevivir regenerando su hígado en pocos días (Fernández y cols., 2006; Frank y Lisanti, 2007). Si bien en cultivos celulares también se han demostrado estos efectos, para algunos autores las aplicaciones de la caveolina-1 en el proceso de regeneración hepática son mínimas (Mayoral y cols., 2007).

El TH constituye hoy en día el único tratamiento curativo del FHF (Oertel y Shafritz, 2008). Suele realizarse el trasplante hepático ortotópico (THO) y, debido a las condiciones de emergencia, pueden usarse injertos incompatibles desde el punto de vista del sistema ABO. Solo se han descrito algunos casos de trasplante de hígado heterotópico. Más del 12% de los trasplantes que se realizan son debidos a un FHF; los rangos de supervivencia de estos pacientes son de un 75-90% (O'Grady, 2005). La muerte cerebral preoperatoria o postoperatoria es una importante causa de mortalidad que afecta sobre todo a los pacientes en los que se asocia el FHF con la insuficiencia respiratoria aguda preoperatoria. El principal requisito previo para el TH en los pacientes afectados de FHF es llegar a un pronóstico individual exacto, con el fin de trasplantar precozmente a los pacientes que, en otro caso,

fallecerían y, por el contrario, no realizar el trasplante en aquellos otros que vayan a sobrevivir espontáneamente. Esta decisión tienen que tomarla hepatólogos con experiencia en pacientes afectos de FHF. A pesar de los excelentes resultados obtenidos con el TH en el FHF, es preciso tener precaución por dos motivos esenciales. En primer lugar, se han apreciado casos de recuperación espontánea en pacientes comatosos en los que se había decidido el TH, pero que no se había llevado a cabo por falta de donante. Estas recuperaciones inesperadas hacen imposible asegurar que algunos pacientes podrían haber evitado el trasplante. En segundo lugar, se desconoce todavía el pronóstico a largo plazo de la inmunosupresión continuada, así como el riesgo real de linfomas o neoplasias al cabo de 20 o más años en estos sujetos trasplantados. Probablemente, los criterios que más se adecúen a la selección de pacientes en nuestro medio, son los utilizados por el King's College Hospital (O'Grady y cols., 1989).

El THO es el medio más eficaz para restituir rápidamente la función hepática y tratar el edema cerebral (Boudjema y cols., 1997). Las principales causas de THO en pacientes con FHF en USA fueron: causa indeterminada, seguida por distintos tipos de hepatitis. En Reino Unido si bien predomina la intoxicación por paracetamol entre las causas de FHF, si consideramos el THO, las causas más frecuentes del mismo no son las determinadas por el acetaminofeno. La edad promedio de los pacientes que reciben THO por FHF es de aproximadamente 28 años, siendo menor que la de los pacientes trasplantados por otras causas que es de 44 años (Boudjema y cols., 1997).

Debido a la cada vez mayor demanda de órganos para el trasplante y la escasez de éstos, se han desarrollado técnicas para mejorar la utilización de

estos órganos y para emplear un mismo órgano entre dos receptores. Así, se han mejorado las técnicas de trasplante hepático auxiliar, de hígado dividido y trasplante hepático de donante vivo relacionado.

El trasplante hepático auxiliar consiste en que el lóbulo hepático derecho o izquierdo del hígado del donante se trasplanta mientras que el hígado nativo se mantiene en su lugar. Cuando este hígado se recupera del daño y se ha regenerado completamente, el injerto puede extraerse o se puede cesar el tratamiento inmunosupresor. De esta forma, se evita la inmunosupresión durante toda la vida y la potencial toxicidad medicamentosa.

El trasplante de hígado dividido consiste en que un hígado puede ser utilizado por dos receptores, generalmente adulto y niño. El procedimiento requiere dividir el hígado en sus lóbulos derecho e izquierdo. El trasplante hepático de donante vivo relacionado consiste en que uno de los padres cede al niño el lóbulo izquierdo o el segmento lateral izquierdo de su hígado. Este método permite que el trasplante sea rápido y el órgano de gran calidad (Metselaar y cols., 1990; McCarthy y Wilkinson, 1999; Belghiti y cols., 2004; O'Grady, 2007).

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas y tratamientos tales como los sistemas artificiales de apoyo hepático, así como el trasplante de hepatocitos que es menos invasiva y puede efectuarse repetidas veces siendo una alternativa al trasplante total del órgano (Bilir y cols., 2000; Strom y Fisher 2003; Nussler y cols., 2006). En numerosos estudios previos los hepatocitos aislados de hígados de cadáveres fueron infundidos a pacientes afectados de FHF a la arteria esplénica o a la vena porta mejorando tanto los niveles de amonio como el TP (Strom y cols., 1997; Bilir y cols., 2000).

Los sistemas de apoyo hepático deben cumplir cuatro objetivos: 1) mantener la función metabólica del hepatocito, 2) estabilizar otros órganos críticos, 3) disminuir las complicaciones extrahepáticas y 4) promover la regeneración hepática. Se pueden clasificar según su forma de actuar en dispositivos físico-químicos, biológicos y mixtos.

Los físico-químicos consisten en sistemas de hemoperfusión con láminas de carbón activado cubierto de albúmina al cual se le han agregado resinas sintéticas neutras o de intercambio aniónico junto con geles de agarosa. También se han desarrollado membranas de hemodiálisis modificadas con mayor permeabilidad.

Los biológicos consisten en plasmaféresis de alto volumen o dispositivos conteniendo hepatocitos aislados o componentes hepáticos. Existen dos sistemas de soporte hepático extracorpóreo mixto donde se utiliza tejido biológico combinado con materiales no biológicos: el "HepatAssist TM 2000" y el "Extrahepatic Liver-Assist Device", el primero utiliza hepatocitos de porcino y el segundo una línea celular derivada de hepatoblastoma humano. Ambos sistemas han demostrado mejorar los parámetros clínicos y podrían ser utilizados como puente para el trasplante, pero aún son necesarios más estudios (Kjaergard y cols., 2003; Stadlbauer y cols., 2008).

2.2. Importancia de la apoptosis en el fallo hepático fulminante

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular descrito por primera vez en Grecia para indicar un deterioro en la función celular. En el

hígado este fenómeno fue descrito por Kerr durante un estudio en el cual relató la atrofia del órgano después de la ligadura de la vena porta (Kerr, 1971). El proceso conlleva un proceso fisiológico controlado de eliminación de componentes individuales de un organismo sin provocar la destrucción o el daño del mismo (Kerr y cols., 1972).

También conocida como muerte celular programada, a pesar de que algunos autores argumentan que no es un sinónimo apropiado (Sloviter, 2002), se caracteriza por grandes cambios morfológicos en la célula y predominantemente en el núcleo. Es un mecanismo esencial para el correcto funcionamiento de los organismos multicelulares jugando un papel fundamental en una gran variedad de acontecimientos biológicos entre los que se incluyen la morfogénesis, procesos de recambio celular y la eliminación de células dañadas, infectadas por virus o envejecidas (Reed, 2001; Booy y cols., 2005; Hashemi y Krocak, 2005).

Sin embargo, la apoptosis también se ve involucrada en una gran variedad de patologías como en daños neurológicos agudos, procesos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, inmunológicas y en el cáncer (Antonsson y Martinou, 2000).

El término apoptosis fue introducido por Kerr para describir una forma de muerte hepatocelular que se producía en patologías de isquemia hepática (Kerr, 1971). Estudios posteriores acuñan el término apoptosis para describir una forma de muerte celular con características morfológicas distintas de la necrosis (Kerr y cols., 1972; Schwartzman y Cidlowski, 1993). Sin embargo, a pesar de que la apoptosis y la necrosis se consideran entidades totalmente distintas, un nuevo punto de vista está emergiendo y se considera que la

apoptosis y la necrosis son frecuentemente la consecuencia de los mismos factores desencadenantes y de las mismas vías de señalización (Malhi y cols., 2006).

El hígado está continuamente expuesto a una gran cantidad de sustancias nocivas entre las que podemos incluir toxinas, células tumorales y patógenos como los virus. El proceso de apoptosis contribuye a la prevención de la replicación, diseminación y persistencia de los virus (Ghavami y cols., 2005; Fisher y cols., 2007).

En el proceso de apoptosis se aprecian cambios morfológicos y bioquímicos característicos pero, sin duda, una de las características más destacadas es la ausencia de respuesta inflamatoria. Sin embargo, la apoptosis hepatocelular en condiciones patológicas puede causar una reacción inflamatoria como consecuencia de un infiltrado de neutrófilos resultado de la activación de células estrelladas y de la fibrosis hepática (Canbay y cols., 2004).

Desde el punto de vista morfológico se observan los siguientes cambios seriadados y estereotipados (Palet y Gores, 1995; Kroemer y cols., 2005).

- Contracción de la célula y disminución del volumen citoplasmático.
- Pérdida de contacto entre células próximas.
- Aparición del denominado “blebbing” en la membrana celular (protuberancias o “burbujas” en la superficie celular).
- Dilatación del retículo endoplásmico.

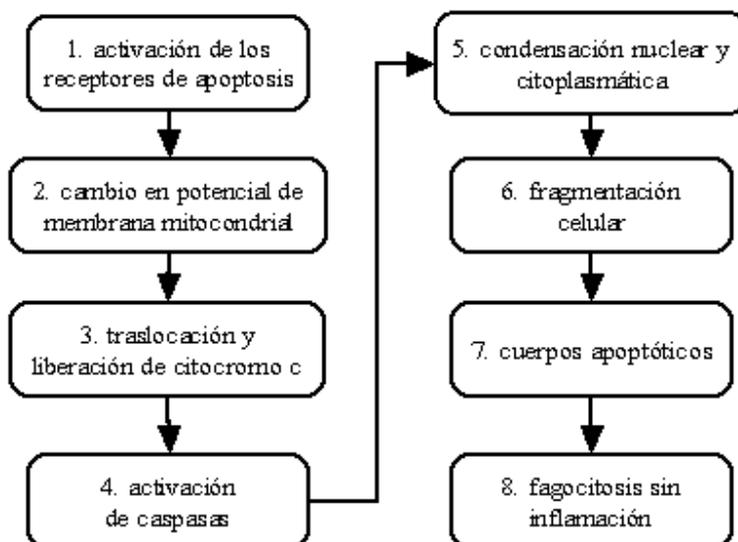
- Condensación de la cromatina.
- Fragmentación de la célula en múltiples vesículas rodeadas de membrana celular, conteniendo componentes citoplasmáticos y nucleares (“cuerpos apoptóticos”).

Estos cambios morfológicos se pueden observar tanto en cortes histológicos como en cultivos celulares (Kiechle y Zhang, 2002). Si bien es cierto que normalmente se evidencian pocas células apoptóticas puesto que éstas son eliminadas por células vecinas o por macrófagos (Reed, 2000).

El ADN de una célula apoptótica se encuentra a menudo fragmentado en unidades oligonucleosomales denominadas “laddering” de aproximadamente 180 a 200 pb (Earnshaw, 1995).

Los cambios bioquímicos son más precoces y no completamente conocidos. El primer cambio detectado es una modificación en el potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) que origina traslocación y liberación del citocromo c (Cit-c) al citoplasma celular; también se produce una redistribución de los lípidos de la membrana así como la activación de proteasas intracelulares (caspasas).

Las fases más importantes y representativas de la apoptosis se resumen en el esquema 1.



Esquema 1: Principales etapas de la apoptosis. 1, fase de inducción; 2, 3 y 4, fase efectora; 5, 6, 7 y 8, fase de degradación.

2.2.1. Familia Bcl-2

Es una familia de proteínas formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular. La familia Bcl-2 tiene como característica la homología de todos sus miembros con Bcl-2 que fue la primera que se descubrió (Bakhshi y cols., 1985; Tsujimoto y cols., 1985). Todas las proteínas de esta familia presentan en su estructura al menos una de cuatro secuencias consecutivas descritas denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH), y que se numeran desde BH1 hasta BH4 (Reed, 2008). De estos dominios parece que BH3 está directamente relacionado con una función pro-apoptótica y el resto de ellos con una función anti-apoptótica. En

función de la presencia o ausencia de las regiones de homología la familia Bcl-2 se subdivide en 3 subfamilias (Lindenboim y cols., 2000):

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, contienen los cuatro dominios de homología.
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): Bax, Bak, Bok, no presentan el dominio de homología BH4.
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): Bad, Bid, Bik, Blk, únicamente poseen el dominio de homología BH3 en su estructura.

Una característica destacable de esta familia de proteínas es la capacidad que poseen de dimerizar con ellos mismos y con otros miembros de la familia. Se ha propuesto que las proteínas proapoptóticas promueven la muerte celular al unirse a proteínas antiapoptóticas; la susceptibilidad de que una célula desencadene un mecanismo de apoptosis va a depender de la relación existente entre proteínas anti y proapoptóticas (Oltvai y Korsmeyer, 1994)

La proteína Bcl-2 es la proteína prototipo de esta familia, pesa 26 KDa y posee los 4 dominios que la definen. Bcl-2 es una proteína integral de membrana y se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana externa de la mitocondria, el retículo endoplásmico y la envuelta nuclear. Es en esas membranas, gracias a que puede formar una estructura similar a un poro, desarrolla una de sus posibles funciones: modificar el flujo de moléculas o pequeñas proteínas a través de ellas, interviniendo en la estabilidad de orgánulos como la mitocondria ante la existencia de posibles daños. Su sobreexpresión puede evitar o al menos retrasar varias formas de muerte

celular programada como las inducidas por retirada de factores de crecimiento, irradiación, glucocorticoides y múltiples drogas quimioterápicas (Kannan y Jain, 2000).

La proteína Bax fue la primera proteína conocida asociada con Bcl-2 *in vivo*. Tiene un peso molecular de 21 KDa y posee la habilidad de suprimir la capacidad de Bcl-2 para bloquear la apoptosis actuando de este modo como su antagonista. Se localiza en el citoplasma o indirectamente unido a la superficie mitocondrial en una célula no apoptótica pero ante un estímulo apoptótico se inserta en la membrana mitocondrial externa (Wolter y cols., 1997; Antonsson y cols., 2001) lo que provoca la apertura de canales en la mitocondria que permiten la salida de factores proapoptóticos de la misma.

2.2.2. Caspasas: la clave en el mecanismo de apoptosis

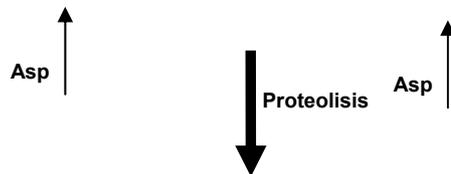
Las caspasas fueron descritas por primera vez como miembros ejecutores de la apoptosis en estudios realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Horvitz y Shaham, 1996). Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que regula la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas la ruptura se produce a nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas).

En los mamíferos se conocen más de 14 caspasas de las cuales no todas intervienen en procesos de muerte celular; de hecho, algunas de ellas intervienen en los procesos inflamatorios. La primera proteasa encontrada en

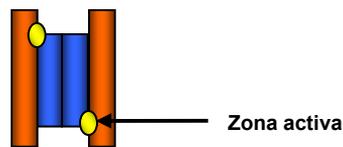
mamíferos se denominó ICE (interleukin-1 β -converting enzyme) o caspasa-1 (cisteína-aspartasa-1) (Alnemri y cols., 1996) y es uno de los pocos miembros de la familia al que no se le ha podido relacionar directamente con el proceso de la apoptosis, sino más bien con el de la inflamación.

Las caspasas son proteasas citoplasmáticas expresadas como zimógenos inactivos con una estructura bien definida: un pro-dominio N-terminal muy variable tanto en longitud como en secuencia, con funciones de regulación y activación, y una región catalítica formada por dos dominios uno grande y otro pequeño que dan lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada por proteólisis (Thornberry y Lazebnik, 1998) (Esquema 2).

A. Proenzima



B. Enzima activada



Esquema 2: Representación esquemática de la activación de una caspasa.

Las caspasas pueden ser incluidas en dos categorías:

- Caspasas iniciadoras: caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 14 que son activadas por oligomerización y se caracterizan por poseer un pro-dominio largo y estar involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada.
- Caspasas ejecutoras: caspasas 3, 6 y 7 que son activadas por otras proteasas entre las que se incluyen las caspasas iniciadoras y que se caracterizan por poseer un pro-dominio corto y actuar al final de la cascada sobre los componentes celulares proteolizándolos.

2.2.3. Vías de la apoptosis

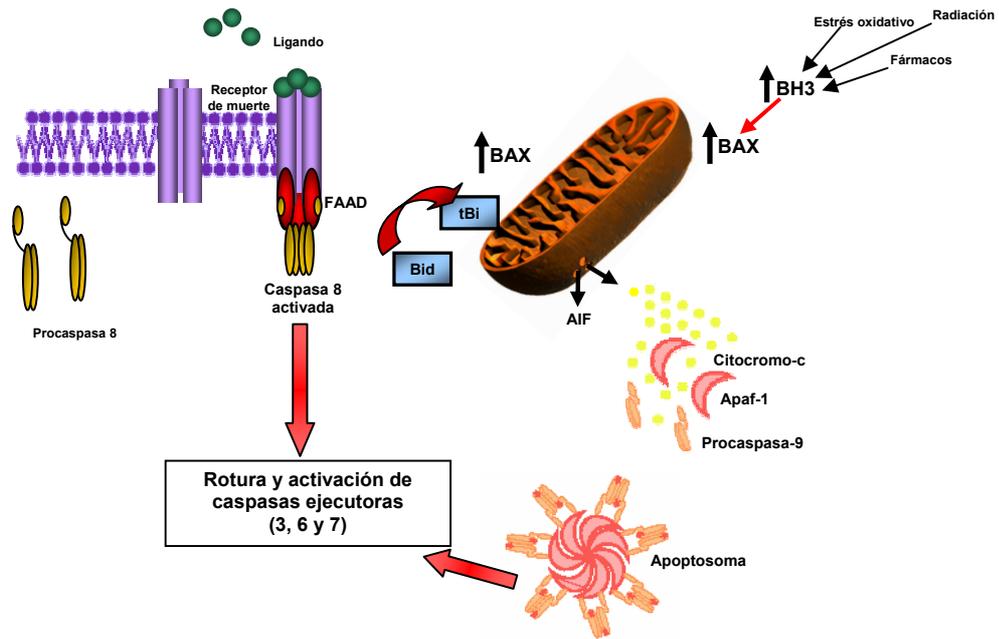
El Proceso de apoptosis puede ser iniciado por dos vías de activación:

La vía extrínseca se inicia por la implicación de alguno de los numerosos receptores de muerte situados en la superficie celular cuando sobre ellos actúa el correspondiente receptor. La gran mayoría de los receptores de muerte involucrados en esta vía pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) que contiene un dominio citoplasmático implicado en las interacciones proteína-proteína que se denomina el dominio de muerte (DD) (Locksley y cols., 2001). Los receptores de muerte mejor conocidos son el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada denominada Fas. Es una vía muy rápida y de escasa sofisticación basada en el reclutamiento de moléculas adaptadoras a través de sus DD, cuya única función es aproximar y activar a una caspasa iniciadora, la

caspasa 8 o la caspasa 10 (Chinnaiyan y cols., 1995; Lavrik y cols., 2005), que a su vez activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas-3 y -7 (Esquema 3). Esta vía de apoptosis puede inhibirse por una proteína denominada FLIP que se une a la procaspasa-8. Algunos virus y células producen FLIP y utilizan este inhibidor para proteger a las células infectadas y normales de la apoptosis (Moumen y cols., 2007).

En la vía intrínseca la mitocondria juega un papel clave experimentando los principales cambios que se producen durante la apoptosis. Los mecanismos por los que la mitocondria permite la salida de factores proapoptóticos aún no están aclarados. Uno de los mecanismos que permiten la activación de esta vía mitocondrial es la producción de un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa lo que provoca la apertura de poros, denominados poros mitocondriales de permeabilidad transitoria, que permiten la liberación de factores proapoptóticos localizados en el espacio intermembrana al citosol. Entre estos factores podemos destacar el Cit-c o el factor inductor de apoptosis (AIF) (Kluck y cols., 1997; Susin y cols., 1999). Un segundo mecanismo es la generación de un cambio en el potencial transmembrana de la membrana mitocondrial interna lo que permite la apertura de canales en la membrana mitocondrial externa permitiendo la salida de proteínas localizadas en el espacio intermembrana (Green y Reed, 1998; Chang y Yang, 2000). La liberación de estos factores al citoplasma está a su vez regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (Tsujimoto y cols., 1985; Green y Reed, 1998; Korsmeyer, 1999; Willis y cols., 2003). La liberación del Cit-c al citosol conduce a la formación de una estructura heptamérica denominada apoptosoma. Se trata de un complejo de alto peso molecular formado por el Cit-c, la proteína adaptadora (Apaf-1) y dATP. Apaf-1 se oligomeriza lo que

provoca un reclutamiento simultáneo de la procaspasa 9 que permite su activación (Zou y cols., 1999) (Esquema 3).



Esquema 3: Vías de la apoptosis

2.3. Modelos animales de fallo hepático fulminante

Existen pocas condiciones en medicina que sean más graves y desalentadoras que el FHF. Tanto el conocimiento como el tratamiento de este síndrome han estado limitados por la falta de modelos animales satisfactorios. Así han sido muchos los intentos de desarrollar un modelo adecuado y reproducible utilizando una gran variedad de especies y de modalidades,

desde los modelos inducidos por manipulación quirúrgica, entre los que se incluyen la isquemia hepática, la hepatectomía completa y la utilización de sustancias hepatotóxicas tales como el acetaminofeno, azoximetano, concanavalina A, sulfoximina butionina, galactosamina y anatoxina-endotoxina, entre otras. Sin embargo, hasta el momento actual no se ha descrito un modelo sencillo que refleje de modo idóneo el patrón de la enfermedad humana de FHF y los que se utilizan presentan limitaciones importantes (Newsome y cols., 2000; Rahman y Hodgson, 2000).

El modelo ideal debería presentar criterios clínicos y bioquímicos bien definidos que, como los criterios pronósticos del *King College* para el FHF (O'Grady y cols., 1989) sean capaces de lograr una estimación acertada de prognosis. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de los modelos desarrollados cumple estas premisas. Además los criterios clínicos y bioquímicos utilizados para indicar la existencia del FHF y las dificultades que supone la investigación en pacientes, hacen que los modelos animales tengan un papel fundamental en los estudios futuros.

Un modelo ideal de FHF, según criterios ampliamente reconocidos por la comunidad científica, debería cumplir una serie de requerimientos entre los que se incluyen: que el modelo pueda ser reversible en el sentido de que algunos animales puedan sobrevivir al proceso si se utiliza un tratamiento adecuado; los resultados obtenidos deben ser reproducibles, esto es, conducir a la muerte en un periodo de tiempo determinado y que la extensión del daño hepático pueda ser medible y estandarizable. Además la muerte debe producirse por fallo hepático, es decir, los acontecimientos producidos tras el daño tienen que reflejar el patrón clínico típico del hombre y la muerte debe ser

el resultado directo del daño producido al hígado; por consiguiente, los animales no tratados deberían morir con signos de fallo hepático progresivo en un periodo de tiempo conocido. Además, el animal debe ser de un tamaño suficiente como para permitir una adecuada toma seriada de muestras sanguíneas y de diversos tejidos mientras se llevan a cabo los tratamientos adecuados. Y finalmente todos los métodos utilizados deben presentar el menos riesgo para las personas involucradas en los estudios (Terblanche y Hickman, 1991).

2.3.1. Modelos quirúrgicos

Los modelos quirúrgicos de FHF pueden ser clasificados en tres categorías: la hepatectomía (total o parcial), la desvascularización (total o parcial) y aquellos que resultan de la combinación de los dos anteriores.

2.3.1.1. Hepatectomía total y parcial

Los modelos quirúrgicos de eliminación total y/o parcial del hígado se han desarrollado con éxito en diversas especies animales después del primer intento realizado en perros (Mann, 1921). En cerdos se describió un modelo potencialmente reversible, que combina la hepatectomía parcial (70%) con la derivación portocava y produce la muerte por FHF después de un periodo de tiempo suficientemente largo como para permitir estudios sobre soportes

hepáticos; el animal es de tamaño adecuado y la técnica no presenta peligro (Filipponi y cols., 1991, Fukueda y cols., 2006).

Se ha podido establecer en ratas que una resección del 95% del hígado es un buen modelo de FHF (He y cols., 2003) mientras que en ratones una hepatectomía de menos del 90% es el límite de seguridad como modelo de estudio de regeneración hepática ya que por encima de dicho valor se encuentra en un nivel de fallo hepático mortal (Makino y cols., 2005).

La hepatectomía total del hígado presenta los inconvenientes de la ausencia de productos derivados de la necrosis hepática y transmisores de señales fundamentales en el mecanismo patogénico del fallo hepático. Por otro lado, sus ventajas se limitan a la reproductibilidad y a su utilidad para el estudio de diversos soportes artificiales *in vivo* en ausencia de los productos tóxicos eliminados o producidos por el hígado dañado. A pesar de los inconvenientes reseñados la hepatectomía se ha utilizado en ratas para estudios de regeneración hepática (Eguchi y cols., 1996; 1997) y en cerdos como modelo reproducible para comprobar la eficacia y función de diversos sistemas temporales de soportes hepáticos (Filipponi y cols., 1999).

Se ha podido demostrar en ratas sometidas a diversos grados de hepatectomía parcial, mediante el análisis de ADN, que el FHF inducido es consecuencia tanto del incremento de la apoptosis como de la disminución de la regeneración hepática (Morita y cols., 2002).

2.3.1.2. Desvascularización

La desvascularización completa del hígado se ha utilizado con éxito para inducir un fallo hepático reproducible en cerdos que pueda ser utilizable para el estudio de diversos sistemas de soportes hepáticos artificiales y/o bioartificiales (Ytrebo y cols., 2002; Gao y cols., 2005; Sen y cols., 2006) o para la constatación del efecto de sustancias antioxidantes tales como la N-acetilcisteína (Ytrebo y cols., 2001).

Para comprobar la eficacia de diversos sistemas de soporte tanto artificiales como bioartificiales se utilizan con frecuencia animales como el cerdo al que se le induce un fallo hepático mediante la isquemia del órgano por derivación portocava y ligadura de la arteria hepática (Nakazawa y cols., 2002) o mediante desvascularización total (Ytrebo y cols., 2002).

También se ha utilizado un modelo de FHF en perros mediante una derivación portocava combinada con la ligadura del conducto biliar para comprobar un nuevo sistema de hígado bioartificial mediante la inoculación de hepatocitos porcinos en biorreactores (Chen y Ding, 2006). Recientemente, se ha desarrollado un modelo porcino en el que se combina una resección del 75-80% del hígado después de un periodo de isquemia (Ladurner y cols., 2005).

En estudios realizados sobre los dos tipos de modelos quirúrgicos de FHF, se puso de manifiesto que la desvascularización parece más útil para estudiar el desarrollo y tratamiento del FHF causado por la isquemia y sus efectos secundarios, mientras que la hepatectomía parcial parece superior en la investigación del estatus de la falta del hígado y el tratamiento del FHF mediante sistemas de soportes hepáticos bioartificiales (Fruahuf y cols., 2004).

2.3.2. Modelos inducidos por sustancias químicas

El uso de agentes químicos tales como el acetaminofeno, sulfoxinina butionina o galactosamina aunque en algunos casos pueden reproducir un número de importantes características clínicas tales como la hipoglucemia, encefalopatía y aumento de enzimas hepáticas, requieren la administración repetida, una monitorización estrecha de sus concentraciones o una terapia de soporte y existen un gran número de factores que pueden causar variabilidad entre distintos experimentos. Además, la constatación de hipertensión intracraneal, una de las características principales del FHF en el hombre, no siempre se produce y, en otros casos, tampoco se ha demostrado el aumento de las toxinas implicadas en la encefalopatía hepática y el edema cerebral del FHF del hombre. A pesar de ello el uso de sustancias químicas hepatotóxicas se ha utilizado y se usa con frecuencia como modelo de FHF.

El acetaminofeno (paracetamol) es un fármaco de uso común y que puede causar daño hepático. Recientes estudios proponen que la apoptosis juega un papel clave en la inducción de fallo hepático por acetaminofeno (Ferret y cols., 2001; Kanno y cols., 2000). Sin embargo, los resultados de numerosos estudios en modelos animales en los que se utiliza el acetaminofeno para inducir fallo hepático agudo reflejan resultados no muy homogéneos debido a la existencia de importantes variaciones en el metabolismo hepático de detoxificación del fármaco relacionadas con la especie y con la edad (Gregus y cols., 1988; Rahman y cols., 2002). Otros aspectos importantes que no se han estandarizado en estos modelos y que conlleva resultados diferentes es la dosis óptima del fármaco y la vía de administración.

La D-galactosamina es una sustancia que es metabolizada por la vía de la galactosa en el hígado, que produce graves alteraciones en el metabolismo del ARN de los hepatocitos y finalmente la necrosis hepática por lo que se ha utilizado para desarrollar modelos de FHF (Keppler y cols., 1968; Newsome y cols., 2000). Los resultados obtenidos no son muy homogéneos, el intervalo entre el daño infringido a los animales y la muerte presenta muy poca uniformidad, es un producto caro para emplearlo en grandes animales y finalmente carece de inocuidad (Sielaff y cols., 1995; Rahman y Hodgson, 2000).

El uso de tetracloruro de carbono ha sido ampliamente utilizado como inductor de daño hepático crónico, especialmente como modelo de cirrosis hepática primaria (Pavanato y cols., 2003). Ahora bien, como agente inductor de FHF su uso ha sido muy restringido por ser muy poco reproducible y muy variable interespecíficamente (Shi y cols., 1997; Rahman y Hodgson, 2000).

2.3.3. Modelos víricos

A pesar de que la hepatitis vírica es una de las causas más importantes de FHF, el uso de agentes infecciosos para desarrollar modelos animales de FHF ha sido en general muy desafortunado (Khan y cols., 2006) y solamente ratones transgénicos que sobreexpresan las proteínas del virus de la hepatitis C (HBV) o ratones BALB/cj infectados con el MHV-3 han ofrecido alguna luz sobre los mecanismos del FHF inducido por virus (Ando y cols., 1993; Ding y cols., 1997). Sin embargo, estos modelos murinos tienen limitaciones significativas en lo que hace referencia a la ausencia de medidas de la presión

intracraneal, la principal causa de muerte en el FHF humano, o en los datos sobre las toxinas implicadas en la encefalopatía hepática y el edema cerebral además del pequeño tamaño de los modelos que hacen imposible la prueba de nuevos sistemas de soporte hepático (Newsome y cols., 2000; Rahman y Hodgson, 2000).

Nuestro grupo ha descrito un modelo animal de FHF producido por la infección experimental de conejos con el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) (Tuñón y cols., 2003). En este modelo se reproducen los parámetros bioquímicos e histológicos y los signos clínicos más representativos del FHF del hombre. Se detecta un aumento significativo en las actividades plasmáticas de las transaminasas, lactato deshidrogenasa y la concentración de bilirrubina. Además, se produce un aumento en la concentración plasmática de los aminoácidos aromáticos con una disminución significativa del índice de Fischer e hipoglucemia, al igual que en el FHF del hombre.

Los trastornos de la coagulación observados en este modelo son la disminución de los factores V y VII y la prolongación del TP. En las últimas etapas de la enfermedad los animales presentan signos neurológicos de encefalopatía hepática, coma y muerte cerebral. Asimismo, se indican incrementos significativos en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del TNF- α (Sanchez-Campos y cols., 2004) al igual que se ha descrito en pacientes con FHF (Muto y cols., 1988). El TNF- α es un agente que puede conducir tanto a la proliferación celular como la apoptosis; su sobreexpresión se correlaciona tanto con el índice de apoptosis en el FHF como con la regeneración hepática (Webber y cols., 1998). Por tanto, el

conjunto de análisis y observaciones recogidas en los animales infectados por el RHDV refuerza su posible utilización para el estudio de la patogénesis y el tratamiento del FHF, puesto que cumple la mayoría de los requisitos para ser considerado un buen modelo de FHF (Belanger y Butterworth, 2005).

2.4. La enfermedad hemorrágica del conejo como modelo de fallo hepático fulminante

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD, del inglés rabbit haemorrhagic disease) fue identificada por primera vez en China en 1984 (Liu y cols., 1984). En mayo de 1989 fue inscrita en la Lista B del Código Zoonosanitario Internacional de la Oficina Internacional de Epizootias. El agente que provoca la enfermedad se inscribe en el género *Lagovirus* de la familia *Caliciviridae* (Ohlinger y cols., 1990; Meyers y cols., 1991); dicho virus no se replica en ningún otro vertebrado (Gould y cols., 1997), y no se ha señalado hasta la fecha su transmisión al hombre, aún entre las poblaciones más expuestas al virus.

La RHD se caracteriza por una alta morbilidad y una mortalidad cercana al 95% en los animales adultos, mientras que, los gazapos menores de 8 semanas de edad son resistentes a la infección (Xu y Chen, 1989). Los conejos mueren en un rango de tiempo definido, entre las 36 y las 54 horas posinfección (p.i.) con signos clínicos característicos de un FHF progresivo y coma.

2.4.1. Patogénesis

Tras la infección, el primer órgano en el que se detecta el virus es el hígado en el que origina una hepatitis primaria de naturaleza fulminante caracterizada por necrosis focal. Asimismo, se produce daño en el endotelio vascular que origina la puesta en marcha de los mecanismos de la coagulación para su reparación así como de fibrinolisis, provocando el desarrollo de una coagulación intravascular diseminada (CID), lo que se plasma en la presencia de numerosos trombos de fibrina en los vasos de pequeño calibre de muchos órganos, entre otros, el hígado, riñón, pulmón y cerebro. El consumo de los factores de la coagulación junto con la reducción del número de plaquetas y la prolongación de los tiempos de trombina y protrombina conduce a una peor coagulación y a la presencia de hemorragias en diferentes órganos. La CID puede ser responsable de la muerte repentina de algunos animales y juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad; si bien la grave necrosis hepática sería el factor determinante de la aparición de la CID al inducir una condición de hipercoagulabilidad en la circulación sistémica (Ueda y cols., 1992; Sánchez-Campos y cols., 2004).

El síndrome hemorrágico que se observa en los conejos (Duff y cols., 1994) es secundario a la gran disminución en la síntesis de los factores de la coagulación en su forma inactiva como consecuencia de la grave afectación hepática. Este hecho es característico de ciertas formas de hepatitis (“hepatitis fulminantes”) humanas (hepatitis A, B y E). De hecho, tanto en la RHD como en el hombre con hepatitis E se presenta con frecuencia una CID que se ha atribuido a la intervención secundaria de endotoxinas bacterianas, después de la afectación vírica de los hepatocitos (Purcell y Ticehurst, 1988). Entre las

lesiones más características se observa una necrosis con acumulación de pigmentos y de hemosiderina en las células de Kupffer, lesiones que son comparables a las observadas en las hepatitis A, B y E en el hombre (Carman y cols., 1998).

En infecciones experimentales, el virus está presente en los hepatocitos desde periodos postinfección muy tempranos; a las 12 horas postinfección (hpi) se localiza en un 0,03% de los hepatocitos, a las 18 hpi en un 3%, a las 24 hpi en más del 25% y en el periodo transcurrido entre las 36 y las 48 hpi se puede encontrar en más del 50 ó 60% (Prieto y cols., 2000).

El cuadro clínico se corresponde con el de una encefalopatía hepática como consecuencia de la afectación del sistema nervioso central por el fallo de la depuración hepática.

Se ha descrito que en esta patología existe un proceso de muerte celular programada, y que la apoptosis es una constante en los animales infectados con el virus de la RHD (Jung y cols., 2000). El fenómeno afecta principalmente a los hepatocitos, pero también presentan signos típicos de apoptosis los macrófagos y las células endoteliales (Alonso y cols., 1998). La apoptosis de los hepatocitos produce una destrucción parenquimatosa extensa que causa una hepatitis fulminante letal que es característica de la RHD. Toda vez que las células apoptóticas son los lugares de una aumentada actividad procoagulante, la apoptosis de estas poblaciones celulares podría constituir el primer paso en la patogenia la CID y una vía común a otras enfermedades hemorrágicas víricas. Las células apoptóticas pueden encontrarse en diversos tejidos de conejos infectados por el virus de la enfermedad hemorrágica desde

las 40 hpi si bien se ve incrementada a partir de las 70 hpi en conejos que mueren espontáneamente (Alonso y cols., 1998).

2.4.2. Cuadro clínico

La enfermedad puede evolucionar de forma sobreaguda, aguda, subaguda y crónica. La forma de presentación más frecuente es la aguda. En un brote, entre un 5 a un 10% de los animales presentan formas subagudas o crónicas.

El periodo de incubación oscila entre las 24 hasta como máximo las 72 horas, y la muerte puede presentarse en las 12-48 horas posteriores a la repentina aparición de varios signos clínicos.

La forma sobreaguda está caracterizada por la muerte repentina de los animales sin apenas signos previos.

La forma aguda está caracterizada por signos clínicos compatibles con los de una encefalopatía hepática. Se presentan signos generales como anorexia, fiebre y signos de encefalopatía como apatía, insensibilidad al medio circundante, postración, decúbito lateral, signos nerviosos (convulsiones, contracciones, ataxia, parálisis posterior, pedaleo, opistótonos), signos respiratorios (disnea, epistaxis o descarga muco-hemorrágica nasal), signos oculares y hemorragias por aberturas corporales, antes de la muerte. Los animales que se recuperan de la forma aguda a veces muestran ictericia grave, sobreviniéndoles la muerte a las pocas horas (Xu y Chen, 1989). En los estadios finales de la enfermedad los animales aparecen con una gran

postración e insensibles a estímulos externos. Dicha postración se acompaña de episodios convulsivos, en los que el animal, que normalmente se encuentra en esta fase en una reacción postural anormal, apoyado sobre un costado, es capaz de elevarse del suelo de la jaula acompañando en ocasiones dicho movimiento de un fuerte chillido. También se observa en algunos animales ataxia y parálisis del tercio posterior cuando se intenta colocarlos en una postura natural (Argüello y cols., 1988). Todas estas manifestaciones clínicas indican la existencia de una afectación del sistema nervioso central. La muerte súbita se produce como consecuencia de un fallo múltiple pluriorgánico derivado del edema y de la congestión pulmonar, necrosis adrenocortical, desórdenes circulatorios, renales y necrosis hepática.

La forma subaguda se caracteriza por signos clínicos similares a los de la forma aguda pero de naturaleza más moderada y de más largo tiempo de evolución.

Finalmente en la forma crónica los animales que sobreviven a la enfermedad muestran hipertermia, depresión y anorexia transitoria y seroconvierten entre los 4 y 6 días postinfección.

2.4.3. Lesiones

2.4.3.1. Lesiones macroscópicas

Las lesiones observadas en los animales son variables y pueden ser, en ocasiones, no muy evidentes. La necrosis hepática, la esplenomegalia,

junto con una coagulopatía que origina la presencia de hemorragias generalizadas, son las lesiones más frecuentes.

Al realizar la necropsia, las lesiones más destacables se presentan en el hígado, tráquea, riñones y pulmones, acompañadas de claros signos de retraso en la coagulación sanguínea, así como de la presencia de abundantes hemorragias en forma de petequias y equimosis en la mayor parte de los órganos. En un elevado número de casos se observa esplenomegalia y tumefacción y hemorragias en el timo; mientras que, sólo en algunos animales es detectable la presencia de ictericia. Cuando la necropsia se realiza en hembras en gestación muertas por la enfermedad es frecuente la presencia de abundantes hemorragias en los fetos y en el útero.

Las lesiones más frecuentes se localizan en el hígado que siempre está afectado. En las formas de presentación aguda, el hígado está hipertrofiado, friable y tiene una coloración gris-amarillenta; mientras que, en las formas sobreagudas el hígado está hipertrofiado, presenta una superficie oscurecida y un dibujo lobulillar muy marcado (Marcato y cols., 1991). Los pulmones presentan un aspecto claramente edematoso y congestivo, salpicándose de un número variable de hemorragias en todos sus lóbulos, puntiformes en las formas sobreagudas y de tamaños variables en las formas de presentación aguda. La tráquea muestra una mucosa muy congestiva y hemorrágica, y con frecuencia está repleta de un exudado espumoso sanguinolento, como consecuencia del edema pulmonar.

2.4.3.2. Lesiones microscópicas

El hígado es el órgano más afectado, mostrando en la mayor parte de los casos evidentes signos de necrosis aguda multifocal y una rápida exudación leucocitaria (hepatitis aguda necrótica). La necrosis muestra una condensación acidófila (degeneración acidófila subcutánea, ocasionalmente con la formación de cuerpos de Councilman) o lisis citoplasmática (Mikami y cols., 1999). Los focos necróticos en muchas ocasiones pueden confluir y formar extensas áreas de necrosis local, principalmente en la periferia de los lóbulos. Dentro de los pequeños focos necróticos se observan a menudo microtrombos intrasinusoidales.

Otras lesiones hepáticas son las debidas a fenómenos de apoptosis, degeneración hidrópica, rotura citoplasmática, esteatosis microvascular, binucleación, megalocitosis de los hepatocitos y depósito de pigmentos y/o depósitos de hierro. De forma más infrecuente se observa una moderada fibrosis periportal (Marcato y cols., 1988; 1991). Se constata asimismo, la presencia de pequeños focos diseminados de hemorragias intralobulares.

En la tráquea y en los pulmones se observan lesiones edematosas y congestivas asociadas a menudo a la presencia de hemorragias y microtrombos en los capilares. En el resto de los órganos y tejidos es frecuente observar fenómenos de cariorrexis del tejido linfoide (bazo, timo, ganglios, placas de Peyer...) y microtrombos, siendo estos últimos muy frecuentes en los capilares de los glomérulos renales (Rosell y cols., 2002).

2.5. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes

El metabolismo del ATP requiere oxígeno. El oxígeno molecular en la mitocondria se convierte en H₂O por un mecanismo de reducción generándose radicales superóxido (O₂⁻) que posteriormente originan H₂O₂ y metabolitos relacionados. Bajo condiciones fisiológicas estos radicales libres (RL) se generan en un 15, 45, 35 y 5% en las mitocondrias, microsomas, peroxisomas y compartimento citosólico, respectivamente (Chance y cols., 1979).

Aunque en las mitocondrias hepáticas se genera aproximadamente el 15% de los RL, esta cantidad es pequeña comparada con la cantidad de oxígeno utilizado en este orgánulo, lo cual indica la presencia de un potente mecanismo que inhibe la formación de dichos radicales. Los O₂⁻ se forman predominantemente en el complejo I y en el complejo III de la cadena respiratoria (Turrens y cols., 1985).

Otra fuente de RL son los peroxisomas. Estos orgánulos son ricos en enzimas que generan H₂O₂. Las enzimas implicadas en la β-oxidación (proceso en el que se forma H₂O₂) se hallan presentes en estos orgánulos en donde se degradan cadenas largas de ácidos grasos en ácidos grasos de cadena media que se transfieren a la mitocondria por la lanzadera de carnitina. Los peroxisomas también contienen enzimas implicadas en el metabolismo del ácido glioxílico, purinas y aminoácidos en los que se forma H₂O₂.

El citocromo P₄₅₀ microsómico cataliza reacciones que generan O₂⁻ mediante mecanismos dependientes de NADPH (Kuthan y Ullrich, 1982). Algunos compuestos que experimentan destoxificación por reacciones catalizadas por el citocromo P₄₅₀ se convierten en intermediarios reactivos que

inician la peroxidación lipídica provocando daño en la membrana microsómica que causa a su vez daño hepatocelular (Slater, 1984).

El daño celular que pueden causar los RL se traduce en peroxidación lipídica, inactivación enzimática, alteraciones del estado de oxido-reducción intracelular y daño en el ADN (Slater y cols., 1987).

Las células de los mamíferos poseen sistemas de defensa antioxidante, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, para hacer frente a los RL. Esta defensa antioxidante incluye a varios componentes, tanto endógenos como exógenos en origen, que funcionan de forma interactiva y sinérgica para neutralizar los radicales libres (Machlin y Bendich, 1987; Jacob y Burri, 1996).

- a) Actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión disulfuro reductasa (GR) y glutatión transferasa (GST) que catalizan reacciones de neutralización de RL (Inoue y cols., 1992).
- b) Proteínas y péptidos que se unen a metales pesados, como la ferritina, lactoferrina, albúmina y ceruloplasmina, que secuestran al hierro libre y al cobre, los cuales son capaces de catalizar reacciones de oxidación. El tripéptido glutatión es el principal compuesto no enzimático de defensa antioxidante.
- c) Antioxidantes derivados de nutrientes como el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E), carotenoides y otros compuestos de bajo peso molecular como el ácido lipoico. La vitamina C es considerada como el antioxidante hidrosoluble más importante de los líquidos extracelulares y es capaz de neutralizar las

especies reactivas del oxígeno (EROs) en la fase acuosa antes de que éstas inicien la peroxidación lipídica. La vitamina E, es el mayor antioxidante liposoluble, siendo realmente efectivo en la protección de las membranas celulares. Los betacarotenos y otros carotenoides, también aportan protección antioxidante en tejidos ricos en lípidos, actuando de forma sinérgica junto a la vitamina E.

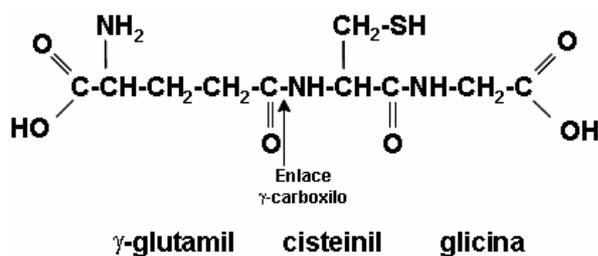
- d) Numerosos fitonutrientes antioxidantes presentes en una amplia variedad de comidas vegetales, como son los flavonoides.

2.5.1. Glutación

2.5.1.1. Estructura y propiedades químicas del glutación

El glutación es el compuesto tiol no proteico más abundante de las células de mamíferos, microorganismos y de la mayoría de las plantas. Es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) con dos aminoácidos, glutamato y glicina, los cuales determinan su disposición, y otro aminoácido, la cisteína que es responsable de sus funciones (Esquema 4). El glutación está presente en casi todas las células de los animales, aunque predominantemente en el tejido hepático (Hammond y cols., 2001). Su molécula posee dos características fundamentales: por un lado un enlace γ -glutamilo y por otro un grupo tiol (SH), grupo que lo hace extraordinariamente reactivo para las sustancias tóxicas, o no, naturales o exógenas a la célula e incluso consigo mismo (Meister y Anderson, 1983). Puede encontrarse predominantemente en la forma reducida (GSH) y también en la forma oxidada (GSSG). El grupo SH es el responsable

de su actividad química y se estima que más del 90% del sulfuro no proteico de la célula está en forma de GSH (Dickinson y Forman, 2002a).



Esquema 4: Estructura química del glutatión

El GSSG procede de la oxidación del grupo SH del GSH en el residuo de cisteína. Hasta una tercera parte del glutatión total celular puede encontrarse como mezcla de disulfuros con otros componentes que poseen grupos SH, como la cistina, coenzima A y los residuos de cisteína de algunas proteínas (Lomaestro y Malone, 1995).

Las células eucariotas tienen cuatro reservorios principales de glutatión. Casi el 90% del GSH celular se encuentra en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplásmico y en el núcleo (Lu, 1999; Masella y cols., 2005). En el retículo endoplásmico, donde el GSH está implicado en la formación de puentes disulfuro proteicos, la relación GSH a GSSG es 3:1. En el citoplasma y en las mitocondrias, la razón excede de 10 a 1. El GSH citosólico del hígado de la rata se renueva rápidamente con una vida media de 2-3 horas (Dickinson y Forman, 2002b).

Existen tres elementos clave en la estructura del glutatión que determinan sus funciones:

- I. La unión entre el glutamato y la cisteína se realiza a través del grupo γ -carboxílico del glutamato; esta unión es resistente a todas las peptidasas con excepción de la γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT). Como quiera que esta enzima se localiza en la superficie externa de la membrana de los hepatocitos, el glutatión es resistente a la degradación intracelular y sólo se metaboliza fuera de la célula (Ballatori y cols., 1986).
- II. La glicina, en posición C-terminal, protege al péptido de la degradación por las γ -glutamyl ciclotransferasas y es parte esencial en la especificidad de las enzimas dependientes de glutatión (Dickinson y Forman, 2002a).
- III. Finalmente, de todos los grupos químicamente reactivos presentes en la molécula de glutatión, el grupo más activo con respecto a su función biológica y bioquímica es el grupo tiol de la cisteína. Cuando el GSH es oxidado a su forma GSSG, sus funciones antioxidantes desaparecen (Dickinson y Forman, 2002a).

2.5.1.2. Biosíntesis y degradación

El hígado contiene las concentraciones de GSH más importantes del organismo y es único en dos aspectos en lo que se refiere a la síntesis de GSH

(DeLeve y Kaplowitz., 1990; 1991). En primer lugar, el hepatocito es el único capaz de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de la transulfuración, y en segundo lugar, la tasa de biosíntesis de GSH en el hepatocito está regulada por su tasa de transporte al plasma, la bilis y la mitocondria por medio de diferentes sistemas transportadores (Sies y cols., 1978; Ookhtens y Kaplowitz, 1998). El GSH es sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína y L-arginina por la acción consecutiva de la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) y la glutatión sintetasa en dos reacciones dependientes de ATP (Huang y cols., 1988; Lu, 1999) (Esquema 5).



Esquema 5: Síntesis del glutatión

La primera etapa en la biosíntesis de GSH, limita la velocidad de reacción y está catalizada por la γ -GCS, que requiere tanto Mg^{2+} como Mn^{2+} . La γ -GCS está compuesta de una cadena pesada de aproximadamente 73 kDa, y de una cadena ligera con un peso molecular de 31 kDa, que son codificadas por diferentes genes tanto en el hombre como en la rata (Misra y Griffith, 1998; Lu, 2000).

El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintetasa. La glutatión sintetasa purificada del riñón de rata tiene un peso molecular de 118 kDa y está compuesta aparentemente por dos subunidades

idénticas (Lu, 1999). Esta segunda reacción en la síntesis del glutatión no está sujeta a un proceso de inhibición por retroalimentación.

Una vez que se sintetiza el GSH, éste puede ejercer su función o bien ser degradado para participar en otros procesos metabólicos como el ciclo γ -glutamilo que aporta precursores de aminoácidos para la síntesis del propio GSH (Dickinson y Forman, 2002a).

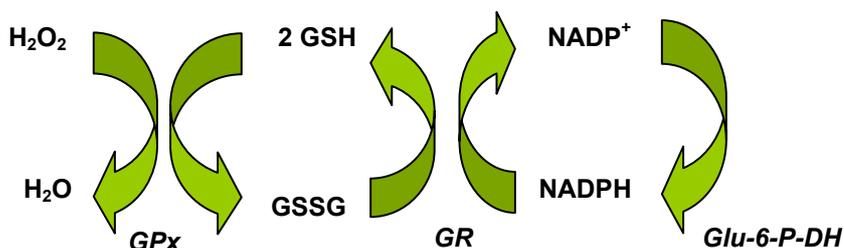
Si bien el glutatión es sintetizado en el interior de la célula, su degradación tiene lugar fuera de la misma. Las enzimas responsables de la degradación del GSH son la γ -GT y diversas peptidasas, que son proteínas unidas a la membrana que se localizan en la superficie apical de las células epiteliales. Tras el catabolismo del glutatión se forman los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, que pueden ser reabsorbidos al interior de la célula para volver a sintetizar GSH (Paolicchi y cols., 2002). Los individuos que presentan déficit en la actividad γ -GT y los animales de experimentación tratados con inhibidores de dicha actividad enzimática, presentan concentraciones elevadas de GSH en plasma y orina (Anderson y Meister, 1986).

2.5.1.3. Regeneración

La regeneración del glutatión está catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), que es la flavoproteína más ampliamente distribuida (Esquema 3). Dicha enzima se localiza en el citosol y está formada por dos subunidades idénticas (Meister y Anderson., 1983). La enzima no está

completamente protegida de la inactivación y es reactivada por compuestos oxidados, similares al GSSG y por tioles. La inactivación se debe a una modificación covalente intramolecular, que bloquea la aparición de ditioles en el lugar de unión del glutatión, habiéndose descrito la implicación directa de cationes metálicos específicos, tales como Zn^{2+} o Cd^{2+} , en dicho bloqueo (Peinado y cols., 1991).

La GR cataliza la reducción de los GSSG mediante el NADPH procedente de la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato. La actividad de la GR está controlada por el estado de óxido-reducción del NADPH y por las concentraciones de glutatión. La relación intracelular de GSSG/GSH se mantiene generalmente baja, menor de 1:10 por acción de la GR.



Esquema 6: Ciclo de oxidoreducción del glutatión

Cuando un tejido se expone a una gran cantidad de radicales libres, puede no ser capaz de mantener la relación entre ambas formas de glutatión y se acumula el GSSG. Esto provoca una alteración del estado de óxido-reducción intracelular, inactivación de enzimas que poseen uno o más grupos SH en sus sitios activos, como por ejemplo la S-adenosin-L-metionina

sintetasa y la formación de enlaces disulfuro inter o intramoleculares (Lieber y cols., 1990).

En determinadas circunstancias, la capacidad para reducir el GSSG puede estar disminuida, acumulándose éste en el interior de la célula, por lo que se activan los sistemas de transporte para su expulsión desde el polo canalicular al exterior de la célula (Lauterburg y cols., 1984). La exportación de GSSG se ha demostrado experimentalmente en estudios realizados con ratas y humanos sometidos a ejercicio extenuante con el fin de provocar estrés oxidativo. Bajo estas condiciones el GSSG plasmático aumenta en forma proporcional al GSSG del hígado y músculo esquelético (Gohil y cols., 1988).

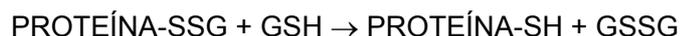
Una baja concentración de GSSG en plasma es indicativa de la eficacia del sistema GPx/GR (Fernández-Checa y cols., 1997).

2.5.1.4. Funciones biológicas

El GSH es el principal tiol intracelular antioxidante, y como tal, participa en un gran número de funciones defensivas. Sin embargo, tiene además otras funciones:

- 1) La detoxificación de xenobióticos (como el bromobenceno o el acetaminofeno) o sus metabolitos. Estos compuestos son electrófilos y forman conjugados con el GSH de forma espontánea o mediante la acción de la enzima glutatión S-transferasa (GST). Los conjugados formados son excretados desde la célula y, en el caso de los hepatocitos, a la bilis (Dickinson y Forman, 2002a).

2) El GSH interviene en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas para evitar la oxidación de los grupos SH (Dickinson y Forman, 2002a).



El equilibrio GSSG/GSH regula un gran número de procesos metabólicos celulares que incluyen la actividad de diversas enzimas, actividades de transporte, y de expresión de genes mediante la alteración de los factores de transcripción (Dickinson y Forman, 2002b).

3) El peróxido de hidrógeno endógeno es reducido por el GSH en presencia de la GPx dependiente de selenio. Como resultado, el GSH es oxidado a GSSG, que es a su vez reducido a GSH por la GR a expensas de NADPH, formando un ciclo de óxido-reducción. Tanto la GPx como la GST pueden reducir peróxidos orgánicos. El peróxido de hidrógeno también puede ser reducido por la CAT, que está presente en los peroxisomas (Mates y cols., 1999).

El estrés oxidativo puede sobrepasar la capacidad de la célula de reducir el GSSG a GSH, produciéndose un acúmulo de GSSG en el citosol. Para proteger a la célula de un cambio en el equilibrio de oxidoreducción, el GSSG puede ser exportado de forma activa fuera de la célula o reaccionar con un grupo SH de una proteína (Colell y cols., 1997).

4) Una de las funciones más importantes del glutatión es la de servir de almacenamiento de la cisteína, ya que este aminoácido es extremadamente inestable fuera de la célula y de forma rápida se autooxida a

cistina, en un proceso con potencial formación de EROs. El ciclo del γ -glutamilo, permite que el GSH sirva como una fuente continua de cisteína (Orlowski y Meister., 1970).

5) La modulación de procesos celulares fundamentales como la síntesis de ADN, mecanismos relacionados con los microtúbulos y funciones inmunológicas (Dickinson y Forman, 2002b); así como también interviene en la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides (Sies, 1999).

6) El GSH es esencial para la conversión, catalizada por la endoperóxido isomerasa, de prostaglandina H₂ a prostaglandinas D₂ y E₂ (Lu, 1999).

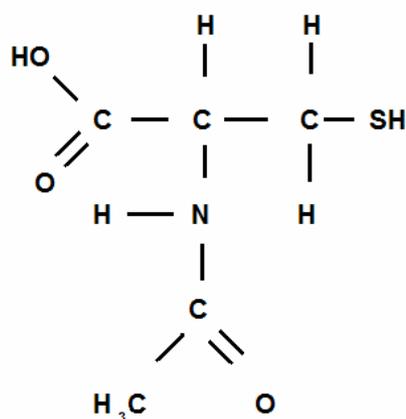
2.6. N-acetil-L-cisteína

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un compuesto tiólico, precursor del GSH que ha sido utilizado en la clínica durante los últimos 45 años y que está presente en numerosos vegetales entre los que podemos destacar ajos, cebollas, pimientos y espárragos (Hsu y cols., 2004; Demirkol y cols. 2004). La NAC tuvo su primera aplicación en el tratamiento de enfermedades congestivas y obstructivas pulmonares asociadas con hipersecreción mucosa tales como la bronquitis crónica y la fibrosis quística debido a sus propiedades mucolíticas. La NAC se ha usado también como fármaco alternativo en el tratamiento de la intoxicación por paracetamol (Kelly, 1998). En la actualidad la NAC se emplea en el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio en adultos, en casos de inmunodeficiencia en humanos causada por infección

vírica, en enfermedades pulmonares y cardíacas y en hepatitis (Sarnstrand y cols., 1995; Laurent y cols., 1996; Nakamura y cols., 2002; Pan y cols., 2003).

2.6.1. Química y farmacocinética

La NAC es una variante acetilada del aminoácido L-cisteína de peso molecular 163,2 KDa (Ziment, 1988) (Esquema 7).



Esquema 7: Estructura química de la N-acetil-L-cisteína

La NAC es rápidamente absorbida por vía oral, si bien experimenta una metabolización importante en las células del intestino delgado y del hígado que produce la incorporación de la NAC a proteínas formando un importante número de metabolitos; de hecho, solo un pequeño porcentaje de la NAC llega intacto al plasma y secundariamente a los tejidos (De Caro y cols., 1989; Gregory y Kelly, 1998).

Solo el 3% de la NAC es excretada en las heces tras su administración por vía oral lo que indica la completa absorción de la NAC y de sus metabolitos. Por regla general las concentraciones más elevadas de la NAC aparecen en el plasma en menos de una hora tras su administración oral. Su vida media en plasma se estima en 2,15 horas y a las 10-12 horas de su administración ya no se detecta.

La gran diversidad de aplicaciones farmacológicas de la NAC se debe principalmente a las propiedades químicas del grupo tiol de la molécula, lo que incluye sus actividades nucleofílica y de óxido-reducción que la confieren propiedades antioxidantes (Cotgreave, 1997).

2.6.2. Mecanismo de acción

La mayoría de los efectos beneficiosos de la administración oral de la NAC son debidos bien a la capacidad de reducir extracelularmente la cistina a cisteína, o bien a la capacidad de donar grupos SH.

Al ser una sustancia donadora de grupos SH, la NAC puede estimular la síntesis de GSH, favorecer la actividad de la enzima GST, favorecer la detoxificación y actuar directamente sobre los radicales libres de oxígeno (De Vries y De Flora, 1993).

La NAC funciona como un antioxidante que reduce eficientemente las EROs, formándose en dicho proceso disulfuro de NAC como principal producto final (Moldeus y cols., 1986). Además de su capacidad para interaccionar directamente con especies oxidantes y con radicales libres, la NAC ejerce su

efecto antioxidante indirectamente favoreciendo la síntesis de glutatión el cual a su vez actúa como sustrato de la GPx (Hoffer y cols., 1996).

Se ha podido comprobar, tanto en estudios realizados *in vivo* como *in vitro*, que la NAC es capaz de aumentar la biosíntesis intracelular de GSH; de hecho, la NAC favorece la captación de cistina de las células en cultivo para la posterior biosíntesis de GSH (Issels y Nagele, 1989). Así mismo puede incrementar las concentraciones del tripéptido en eritrocitos (Bernard y cols., 1997) y en células de hígado y pulmón (De Flora y cols., 1985) y recuperar los valores normales de GSH tras una disminución provocada experimentalmente (Nakata y cols., 1996). También se ha indicado que la NAC ejerce un efecto protector contra la citotoxicidad inducida por el insecticida "Paraquat" al actuar como un precursor del GSH y aumentar sus concentraciones intracelulares (Hoffer y cols., 1996). Los efectos tóxicos de la ciclosporina A han sido prevenidos por la NAC al disminuir la peroxidación lipídica, mejorar los niveles plasmáticos de ALT, AST y mejorar las enzimas antioxidantes (Kaya y cols., 2008).

La NAC se ha empleado como un antídoto en la intoxicación por acetaminofeno (paracetamol) por su capacidad para actuar como precursor del GSH intracelular (Corcoran y Wong, 1986). Dos isoenzimas del citocromo P₄₅₀ convierten el paracetamol en un metabolito reactivo la N-acetilbenzoquinonimina que disminuye el glutatión hepático y consecuentemente daña el hígado. El paracetamol además de disminuir los niveles de glutatión también inhibe la actividad de la GST citosólica. La administración de NAC, una hora después de la intoxicación, puede prevenir ambos efectos (Pratt e Ioannides, 1985). Cuando la NAC se administra

simultáneamente con el paracetamol aumenta la supervivencia y se reduce el daño hepático (Bray y cols., 1992).

La NAC puede mantener la síntesis de GSH incluso en situaciones en las que su demanda está incrementada tal y como ocurre en la metabolización del paracetamol; sin embargo, en ausencia de incrementos en los niveles de estrés, la NAC parece no tener efectos en los niveles de GSH en plasma; de hecho, la administración de NAC a voluntarios sanos, no incrementa los niveles de cisteína total, ni los niveles de glutatión mientras que su administración junto con el paracetamol sí incrementa los niveles de estas sustancias (Burgunder y cols., 1989).

El esteroisómero D de la NAC no es apto para la biosíntesis del GSH y está desprovisto de un efecto protector en ratones tratados con paracetamol; sin embargo, el esteroisómero L previene el daño hepático y la depleción del tripéptido (Whitehouse y cols., 1985).

El efecto beneficioso de la NAC y de los ésteres del GSH en la prevención del daño hepático inducido por el paracetamol, se debe a que es un precursor en la síntesis del GSH y no a una reacción directa de estas moléculas con el metabolito reactivo del paracetamol. La NAC estimula la síntesis de glucógeno en hígado de rata aislado y perfundido (Itinose y cols., 1989). Además, la NAC aumenta la velocidad de almacenamiento de glucógeno *in vivo*. De hecho, la acción protectora de la NAC frente a la depleción de glucógeno producida por paracetamol es consecuencia tanto de la aceleración de la biotransformación del paracetamol como de la estimulación de la síntesis de glucógeno (Itinose y cols., 1989).

La NAC también parece mejorar la regeneración hepática cuando se administra conjuntamente con la ciprofloxacina en pacientes que sufren FHF secundario a una hepatitis isquémica. Del mismo modo consigue recuperar tanto los parámetros bioquímicos como de oxigenación tisular (Assy y cols., 2007).

La NAC corrige la disminución en la concentración de GSH y resulta un perfecto preservador de la membrana celular y de las actividades CAT, SODm y GPx en ratas con obstrucción biliar (Pastor y cols., 1997).

El tratamiento con NAC *in vivo* aumenta la destoxificación por el hígado y pulmón de algunos agentes mutagénicos al promover la síntesis y metabolismo del GSH y restringir la biotransformación del agente mutagénico o carcinogénico en sustancias o metabolitos más tóxicos (De Flora y cols., 1985). Aunque la NAC no parece aumentar la concentración del citocromo P-450 en los microsomas hepáticos y pulmonares sí parece estimular las enzimas citosólicas involucradas en la reducción del NADP y en la reducción del GSH y en la destoxificación de xenobioticos (De Flora y cols., 1985).

Dado que el grupo SH es esencial para la defensa contra las EROs no es de extrañar que la NAC sea un potente destructor del ácido hipocloroso y sea capaz de reducir los radicales hidroxilo (OH \cdot) y el peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$) (Aruoma y cols., 1989).

La NAC ha sido empleada con éxito como agente protector frente a las radiaciones; al parecer ejerce este efecto al modificar las concentraciones endógenas de interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferon (INF)- γ proporcionando protección al sistema hematopoyético frente

a la radiación. *In vitro*, se ha comprobado que las concentraciones bajas de NAC incrementan significativamente las concentraciones de IL-1 α y β e IL-2 mientras que, las concentraciones elevadas provocan una menor concentración de citocinas (Baier y cols., 1996). *In vivo* la NAC ofrece protección contra los rayos γ mejorando las defensas enzimáticas antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y reduciendo la fragmentación del ADN (Mansour y cols., 2008).

Para servir como precursor en la síntesis del glutatión en los hepatocitos la NAC es diacetilada convirtiéndose en una de las defensas antioxidantes más importantes (González-Mangado y Morera Prat, 2001). Además, se ha demostrado que la NAC experimenta una importante desacetilación en el intestino de la rata, siendo la cisteína el principal metabolito que ingresa en la circulación portal (Cotgreave y cols., 1991). La desacetilación de la NAC es específica, ya que el isómero D se metaboliza muy poco tanto en tejidos de rata como en humanos lo mismo que sucede con el homodisulfuro de L-NAC (Sjödín y cols., 1989). Diversos trabajos realizados en humanos han puesto de manifiesto que tras la administración intravenosa de NAC, ésta es desacetilada por las células endoteliales, las cuales utilizan la cisteína formada en dicho proceso para la biosíntesis intracelular de glutatión a la vez que ponen a disposición de otros tipos celulares dicho sustrato (Cotgreave y cols., 1991).

En trabajos experimentales realizados con ratas a las que se les induce una colitis por ácido acético se ha comprobado que la administración de NAC reduce la extensión del daño en la mucosa del colon, atenúa el incremento en la actividad mieloperoxidasa y en los niveles de malondialdehído y restaura la

disminución en las actividades de enzimas antioxidantes y otras sustancias tales como el GSH (Cetinkaya y cols., 2005).

La NAC también ha sido empleada satisfactoriamente como agente antifibrótico en modelos animales de fibrosis pulmonar (Serrano-Mollar y cols., 2003); tanto la disminución de los depósitos de fibrina como el descenso de los niveles de TBARs y el incremento del glutatión hepático se consiguieron tras la inducción de fibrosis hepática por el agente dimetilnitrosamina (Vendemiale y cols., 2001) si bien la disminución de la fibrosis hepática no se pudo mejorar tras la oclusión del conducto biliar (Tahan y cols., 2007).

Estudios *in vitro* demuestran que la NAC inhibe la apoptosis inducida por el cisplatino en líneas celulares cancerígenas, inhibiendo tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis (Wu y cols., 2005). También mejora significativamente los efectos secundarios que origina este tóxico tras el tratamiento de quimioterapia (Dickey y cols., 2005). Además, es esencial la elección de una dosis y una vía adecuada para la administración de la NAC puesto que pueden afectar a sus propiedades beneficiosas (Dickey y cols., en prensa).

Los efectos secundarios que se producen tras la administración de una dosis oral elevada de NAC son frecuentes pero no graves; lo más común es que aparezcan náuseas, vómitos, diarreas, reacciones alérgicas en la piel y dolor de cabeza (Kelly, 1998; Kao y cols., 2003). También se puede producir una reacción anafiláctica frente a la NAC con liberación de histamina y aparición de sarpullido, prurito, angioedema, broncoespasmo, taquicardia y cambios en la presión arterial (Ziment, 1988; Kelly, 1998). Diversos estudios realizados en animales en relación con su posible efecto tóxico frente al

embrión han obtenido resultados contradictorios por lo que no es recomendable la administración de NAC durante el embarazo y de realizarse debe hacerse con mucha precaución (Tenenbein, 1984).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aparatos

Los medios instrumentales utilizados en el presente estudio han sido los siguientes:

- **Autoclave:** Raypa, modelo Sterilmatic.
- **Aparato de transferencia:** Bio Rad, Transblot SD.
- **Balanzas de precisión:** Sartorius, modelo 135925.
Sartorius, modelo R200D.
- **Baños termostáticos:** Selecta, modelo 135925.
Selecta, modelo CE95.
Selecta, modelo Unitronic 32.
- **Centrífugas:** Beckman, modelo XL-100K. Rotor 70:1 Ti.
Eppendorf, modelo 5451C.
Sorvall, modelo RC-5B.
- **Cubetas de electroforesis horizontal:** BioRad, Sub-cell GT.
Serva, Blue Marine 100.
- **Espectrofluorímetro:** Hitachi, modelo F-2500.
- **Espectrofotómetro:** Hitachi, modelo U-2000.
Milton Roy, modelo Spectronic 2001.
- **Escáner para diapositivas:** Nikon LS-30®.
- **Fuente de alimentación:** Bio-Rad modelo 200/2.
- **Granatario:** Sartorius, modelo 1216 MP.
- **Homogeneizador:** Polytron.
- **Material quirúrgico:** Bisturís (hoja 24), pinzas, tijeras, agujas, jeringuillas, cánulas, guantes estériles, etc.

- **Material de laboratorio de carácter general:** Pipetas y micropipetas automáticas, agitadores de tubo, gradillas, frigoríficos, arcones congeladores de -80°C, ordenadores, etc.
- **Microscopios ópticos:** Nikon OPTIPHOT-2.
Nikon Eclipse E 400®.
Nikon Provis AX 70®.
- **Microscopio electrónico:** JEOL JEM1010.
- **Microtomo de rotación:** Leitz 1512.
- **Película para diapositivas:** Ektachrome 100 ASA.
- **pHmetros:** Crison, modelo 2001.
Meteor, modelo 991 A.

3.2. Soluciones

Las principales soluciones y/o productos utilizados en la realización de este estudio han sido los siguientes:

- Pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, San Louis, USA) se disuelve en solución salina hasta una concentración final de 5 mg/ml.
- Suero salino fisiológico (SSF): NaCl 154 mM.
- N-acetilcisteína (Sigma Chemical Co, San Louis, USA) 150 mg/Kg en SSF.

3.3. Animales

Se emplearon 64 conejos machos de raza Nueva Zelanda Blanca de 9-10 semanas de edad con un peso comprendido entre los 2 y los 2,5 Kg. Los animales se mantuvieron en jaulas individualizadas con comida y agua “*ad libitum*” en una habitación climatizada a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana se les mantuvo en periodo de aclimatación.

3.4. Diseño experimental

3.4.1. Obtención del inóculo vírico

La cepa de virus utilizada fue AST/89 cedida amablemente por el Dr. Prieto Martín del Laboratorio de Sanidad Animal de Asturias.

El inóculo vírico (cepa AST/89) para la infección experimental se preparó a partir de hígados de animales recién muertos previamente inoculados con el virus de la RHD. Los hígados se homogeneizaron al 10% en PBS de pH 7,2 y sometidos a dos centrifugaciones sucesivas (500 xg durante 20 minutos y 6.000 xg durante 30 minutos). El sobrenadante se filtró a través de un tamaño de poro de 0,2 μm , y se conservó en alícuotas a -80°C.

3.4.2. Titulación del virus

Para titular el virus de la RHD empleamos la técnica de hemoaglutinación. Se utilizaron glóbulos rojos humanos del tipo 0, que fueron

recogidos frescos en solución de Alsever y se mantuvieron durante 8-10 horas. A continuación, se centrifugaron y lavaron con PBS. Tras una nueva centrifugación, los glóbulos rojos se resuspendieron en PBS y se realizaron diluciones dobles seriadas de los sobrenadantes filtrados de los homogeneizados de tejido hepático en placas de microtitulación de fondo redondo. Las placas se sellaron con película plástica adhesiva para evitar la evaporación y se incubaron toda la noche a 4°C. La dilución más alta en la que se observó hemoaglutinación completa contiene una unidad hemoaglutinante en el volumen del inóculo vírico depositado (Imagen 1).

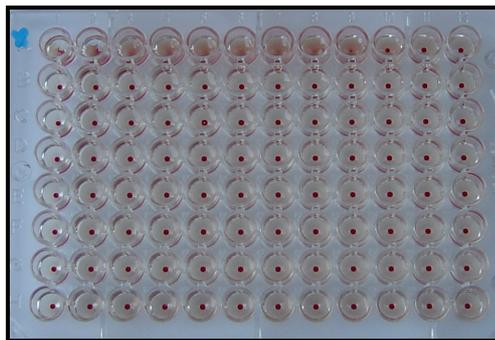


Imagen 1: Titulación del virus por la técnica de hemoaglutinación

3.4.3. Inoculación de los animales

El estudio se llevo a cabo en dos fases:

En una primera fase se estudió la supervivencia y la fragmentación del ADN; para ello se emplearon 20 conejos. Tras el periodo de aclimatación la

mitad de los animales (n=10) recibieron diariamente durante una semana una inyección intraperitoneal (i.p.) de NAC (150 mg/Kg) diluido en SSF y la otra mitad el mismo volumen pero únicamente de SSF. El séptimo día todos los animales fueron inoculados por vía intramuscular con 2×10^4 unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del virus de la RHD. A estos animales se les dejó morir espontáneamente.

En la segunda fase, llevada a cabo sobre 44 animales, se realizaron estudios en sangre y en tejido hepático; para ello, la mitad de los animales (n=22) recibieron una dosis diaria de 150 mg/Kg de NAC por vía intraperitoneal durante 7 días y los otros 12 recibieron, durante el mismo tiempo y por la misma vía SSF. El séptimo y último día, además de las dosis correspondientes de NAC y SSF, los 40 animales fueron inoculados por vía intramuscular con 2×10^4 unidades hemoaglutinantes de la cepa AST/89 del virus de la RHD.

Se emplearon como grupo control 4 animales, dos de cada grupo (NAC y SSF, respectivamente) que, una vez extraída la sangre correspondiente, fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. El resto de animales fueron sacrificados a las 12, 24, 36, y 48 hpi mediante una inyección de pentobarbital sódico.

Los grupos experimentales utilizados en nuestro estudio fueron los siguientes:

- Grupo control (Grupo C)
- Grupo de animales infectados (Grupo RHD)
- Grupo de animales infectados y tratados con NAC (Grupo RHD + NAC)

3.4.4. Recogida de muestras

La extracción de sangre se realizó en la vena marginal de la oreja. En los animales control se realizó antes del sacrificio; y en los animales infectados, en el momento de la inoculación (tiempo 0) y a las 12, 24, 36 y 48 hpi.

Los hígados se extrajeron de todos los animales infectados a medida que fallecían y de los animales control de forma programada.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados, para determinar los parámetros bioquímicos. El plasma, resultante de la centrifugación durante 10 minutos a 2.500 xg a 4°C, se congeló a -80°C hasta la realización de los análisis. En todos los casos se realizaron las necropsias de los animales infectados y controles, se extrajo el hígado, se pesó, se troceó y se tomaron 3 muestras por animal. La primera se incluyó en formalina al 10%, para estudios histológicos e inmuistoquímicos, la segunda, tras su lavado en SSF frío se congeló inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización para los estudios de biología molecular, y, la tercera muestra, de un tamaño aproximado de 0,5 cm² se introdujo en un eppendorf con glutaraldehído y se empleó para microscopía electrónica.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Determinaciones en plasma

3.5.1.1. Actividad aspartato aminotransferasa (AST)

Fundamento:

La actividad de la aspartato aminotransferasa (AST, ASAT, GOT, glutamato oxalacetato, EC 2.6.1.1), se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) basada en el método de Deneke y Rittersdorf (1985).

La AST cataliza la reacción de α -cetoglutarato y ácido alanín sulfínico a piruvato y glutamato.

En una segunda reacción, el piruvato se hidroliza bajo la acción de la piruvato oxidasa (POD) a acetilfosfato, anhídrido carbónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En presencia de POD, el H_2O_2 oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul.

Método:

La determinación se realizó mediante tiras reactivas específicas para la enzima, en las que se depositaron 32 μ l de la muestra. A través de una medición cinética a 567 nm en un autoanalizador (modelo Reflotrón), se obtuvo directamente la actividad enzimática de la AST en U/l.

3.5.1.2. Actividad alanino aminotransferasa (ALT)

Fundamento:

La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT, ALAT, GPT, glutamato piruvato transaminasa, EC 2.6.1.2), se determinó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) basada en el método de Deneke y Rittersdorf (1984).

La ALT cataliza la reacción de α -cetoglutarato y alanina a piruvato y glutamato.

En una segunda reacción, el piruvato se hidroliza bajo la acción de la POD a acetilfosfato, anhídrido carbónico y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). En presencia de POD, se oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul.

Método:

La determinación se realizó mediante tiras reactivas específicas para la enzima, en las que se depositaron 32 μ l de la muestra. A través de una medición cinética a 567 nm en un autoanalizador (modelo Reflotrón), se obtuvo directamente la actividad enzimática de la ALT en U/l.

3.5.1.3. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Fundamento:

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) se analizó en plasma mediante una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) de determinación cinética según el método de Weisshaar y cols., (1975).

La LDH cataliza la reacción de piruvato y NADH a L-lactato y NAD⁺.

Método:

Se utilizó un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic, ajustando la absorción a 340 nm. Se empleó una cubeta con 1 cm de paso de luz. La temperatura de medición fue de 37°C.

3.5.1.4. Concentración de glucosa

Fundamento:

Para determinar la concentración de glucosa en plasma se utilizó una prueba comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) según el método descrito por Werner y cols. (1970) que se basa en la transformación de glucosa en glucosa-6-fosfato bajo la acción de la hexoquinasa y de ésta en 6-fosfogluconato mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Reactivos:

La mezcla reactiva contiene:

- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0,35 U/ml)
- Hexoquinasa (8 U/ml)
- ABTS (2,2-azino-di-3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-6-sal diamónica) (1,0 mg/ml)

Método:

En un tubo de ensayo se colocaron 40 µl de plasma y 1 ml de solución reactiva, se incubaron a 25°C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 340 nm.

Posteriormente, se determinó la absorbancia de una muestra estándar cuya concentración de glucosa era de 0,505 mM. La concentración de glucosa en la muestra se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$nM = 5,55 \times A_{\text{muestra}} / A_{\text{estándar}}$$

3.5.1.5. Concentración de bilirrubina

Fundamento:

La bilirrubina (BR) total se une en presencia de cafeína con el ácido sulfanílico diazotado para formar un colorante azoico (Vink y cols., 1988).

Método:

Se utilizó una longitud de onda de 578 nm con una cubeta de un cm de paso de luz. La temperatura de incubación fue de 20-25°C. Se midió la extinción de la muestra frente al blanco.

3.5.2. Determinaciones en hígado

3.5.2.1. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Para los estudios de microscopía óptica se recogieron muestras de hígado que se fijaron inmediatamente en formalina tamponada al 10%. Tras su deshidratación e inclusión en parafina Gurr se procedió a la obtención de cortes seriados de 4 μm de grosor, mediante la utilización de un microtomo de rotación 1512 (Leitz), con adaptador para cassettes y cuchillas recambiables. La técnica de tinción empleada para el estudio histopatológico fue la de hematoxilina-eosina (H-E).

Para los estudios de la expresión inmunohistoquímica de la proteína VP60 del virus se realizaron cortes de tejido de 5 μm que se tiñeron por el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Sternberg y cols., 1970). La peroxidasa endógena es bloqueada por inmersión de las secciones histológicas, durante 10 minutos, en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol preparado en el momento, seguido por tratamiento con tripsina al 1% en cloruro cálcico (pH 7,8) durante 10 minutos a 37°C. Las secciones se lavaron

con agua corriente y se aclararon con un tampón de solución salina/Tris con el 1,6% de NaCl (TST) y se incubaron con una mezcla al 10% (v/v) de un suero de cabra normal y al 3% (p/v) de albúmina sérica bovina en TST, durante 15 minutos. Después del secado, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con un antisuero frente a la VP60 obtenido en cobaya y diluido 1/2.000. Varias secciones de cada grupo de experimentos se emplearon como controles séricos mediante la omisión del suero inmune primario y su sustitución con suero preinmune. Después de lavar con TST, todas las secciones se incubaron a temperatura ambiente, durante 30 minutos, con una dilución 1:20 de anti-inmunoglobulinas de cobaya obtenidas en cabra (SIGMA) y a continuación con un complejo PAP de cobaya (1:4.000), lavando entre ambas incubaciones con TST. Para visualizar los inmuno-complejos se utilizó el tetracloruro de aminobencidina; las secciones se contrastaron ligeramente con hematoxilina de Mayers. Las células positivas se contaron en 10 campos, escogidos al azar, a 200 aumentos.

Para poner de manifiesto la expresión de la caspasa-3, tras el secado de las láminas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal de la caspasa-3 a dilución 1:50. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario diluido 1:4.000; más tarde, se aplicó el sistema de detección de inmunohistoquímica formado por la inmunoglobulina anticonejo biotinilada y el conjugado estreptavidin peroxidasa. Ambos reactivos detectan el antígeno presente en el tejido reaccionando con el anticuerpo primario. Para que esta reacción fuera visualizada se aplicó una gota de solución sustrato cromógena diaminobencidina líquida (DAB) al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando como colorante de contraste la hematoxilina.

3.5.2.2. Obtención de homogeneizado total

Se homogeneizaron 0,2 g de hígado con 1 ml de tampón Tris/HCl (10 mM; pH 7,4). El homogeneizado obtenido se pasó a un eppendorf y se centrifugó a 12.000 xg durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se alicuotó en diversos tubos eppendorf y se almacenó a -80°C.

3.5.2.3. Obtención de la fracción citosólica

Para la obtención de la fracción citosólica hepática se procedió a la homogeneización de 1 g de hígado en 10 ml de tampón manitol, sacarosa, EDTA (pH 7,4) y, posteriormente, se centrifugó a 750 xg durante 15 minutos a 4°C recogiendo el sobrenadante que se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 12.000 xg; finalmente, el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 100.000 xg durante 1 hora. Se recogió este último sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta la realización de los análisis.

3.5.2.4. Concentración de proteína

Fundamento:

Se empleó una modificación del método de Lowry y cols. (1951) realizada por Markwell y cols. (1978) que se basa en la reducción de la proteína con el cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con la proteína tratada.

Método:

Los reactivos que se utilizaron para éste método analítico fueron:

- Reactivo A: carbonato sódico (2%) hidróxido sódico (0,4%) tartrato sódico (0,16%) y dodecil sulfato sódico (1%)
- Reactivo B: sulfato de cobre (4%)
- Reactivo C: Folin Ciocalteu (50%)

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 2 ml los siguientes reactivos:

- Muestra
- Agua destilada
- Reactivo D (100 ml de A + 1 ml de B)

Tras incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a la mezcla anterior el reactivo C y, posteriormente, se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a leer espectrofotométricamente la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

Para calcular la concentración de proteína presente en las muestras se elaboró una recta patrón utilizando como solución madre albúmina bovina (fracción V, Sigma). El rango de medidas fue de 0,0625 a 1 mg de proteína por ml de agua destilada. La concentración de proteína se expresó en mg/ml.

3.5.2.5. Concentración de glutatión reducido (GSH)

Fundamento:

Se siguió el procedimiento descrito por Hissin y Hilf (1976), basado en la reacción específica del GSH con el optaldehído (OPT) a pH 8,0 formándose un producto altamente fluorescente que se activa a 350 nm con un máximo de emisión a 420 nm. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de homogeneizados hepáticos preparados en tampón fosfato sódico/EDTA (0,1 M); pH 8,0 y H₃PO₄ al 25% y centrifugados a 105.000 xg durante 30 minutos a 4°C.

Método:

Se incubó, a temperatura ambiente y durante 15 minutos, la siguiente mezcla:

- 1,8 ml de tampón fosfato/ EDTA (0,1 M; pH 8,0)
- 0,1 ml de homogeneizado diluido (0,5 ml en 4,5 ml del mismo tampón)
- 0,1 ml de OPT (7,5 µM)

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. Como blanco reactivo se utilizó la mezcla de incubación sustituyendo los 100 µl de muestra diluida por tampón fosfato/EDTA.

Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSH de 0,81 a 32,54 nM.

3.5.2.6. Concentración de glutatión oxidado (GSSG)

Fundamento:

Se determinó según el método de Hissin y Hilf (1976), con algunas modificaciones. Dicho método se basa en la reacción del GSSG con el fluoróforo OPT a pH 12; a este elevado pH del medio, la conversión de glutatión reducido a glutatión oxidado es prácticamente nula. Para la realización de la técnica, se utilizaron los mismos sobrenadantes de homogeneizados hepáticos descritos en el aparato anterior, usándose inmediatamente tras su obtención.

Método:

Se introdujeron, en tubos de rosca, 0,5 ml de vinilpiridina y 1 ml de sobrenadante de homogeneizado hepático. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 9 ml de NaOH (0,1 N) y se agitó de nuevo.

Se incubó, a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad las siguientes sustancias:

- 0,1 ml de la mezcla anterior
- 1,8 ml de NaOH (0,1 N)

- 0,1 ml de OPT (7,5 μ M)

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. En el blanco reactivo se sustituyeron los 0,1 ml de la mezcla con la muestra por NaOH (0,1 N), con el fin de estimar la fluorescencia debida a la vinilpiridina. Para el cálculo de las concentraciones se realizó una recta patrón con soluciones crecientes de GSSG de 0,33 a 1,63 mM.

3.5.2.7. Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

Fundamento:

La actividad GPx (EC 1.11.1.19) se determinó según el método de Guntzler y Flohé (1985). La determinación espectrofotométrica de la actividad GPx conlleva la medida de la oxidación de NADPH por la GR.

Dicha oxidación puede ser registrada espectrofotométricamente a 340 nm.

Método:

La mezcla de incubación contenía:

- 50 μ l de tampón fosfato (0,1 M; pH 7,0)
- 50 μ l de muestra (fracción citosólica hepática)
- 100 μ l de GR (2 U)

- 50 µl de GSH (40 mM)
- 50 µl de NaN₃ (20 mM)
- 50 µl de NADPH (2,4 mM)

Se determinó la variación de la absorbancia a 340 nm, inducida por el consumo de NADPH que no depende del hidroperóxido, tras la incubación de la mezcla durante 5 minutos a 25°C. Posteriormente, se añadieron 100 µl de la solución de peróxido de hidrógeno 2 mM y se registró nuevamente la disminución de la absorbancia a esta misma longitud de onda.

El coeficiente de extinción molar del NADP⁺ es de 6,2 mM⁻¹.cm⁻¹. La concentración se obtuvo de la forma siguiente:

$$C = \frac{\Delta E/\text{min}}{7,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} \times \text{dilución utilizada}$$

3.5.2.8. Actividad glutatión reductasa (GR)

Fundamento:

Se llevó a cabo por el método de Pinto y cols. (1984). La GR es una flavoproteína que cataliza la reducción del GSSG en presencia de NADPH.

La oxidación de NADPH es seguida espectrofotométricamente a 340 nm.



Método:

La mezcla reactiva contiene, en un volumen final de 1 ml, los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato potásico (0,1 M, pH 7,0)
- GSSG (20 mM)
- NADPH (2 mM en tampón Tris/HCl 10 mM; pH 7,0)
- H₂O destilada
- Fracción citosólica

Se determinó el descenso de la absorbancia del NADPH a 340 nm, a 30°C, durante 5 minutos. La actividad GR de la muestra se calculó considerando un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 7,6 mM⁻¹cm⁻¹. Los valores se expresaron en nmol de NADP⁺ formados/mg de proteína.minuto.

3.5.2.9. Actividad glutatión-S-transferasa (GST)

Fundamento:

Se determinó utilizando la reacción del glutatión con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) (Habig y cols., 1974), un sustrato de amplio espectro para la actividad catalítica de todas las isoformas de GST.

Método:

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml, los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato sódico (0,2 mM; pH 6,5)
- CDMB (20 mM)
- GSH (20 mM)

Dicha mezcla se incubó a 25°C durante 3 minutos y posteriormente se añadió la muestra (fracción citosólica), y se monitorizó el incremento de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos.

La actividad GST se calculó considerando un coeficiente de extinción molar del CDMB de $9,6 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores se expresaron en nmol de CDMB formados/ mg de proteína.minuto.

3.5.2.10. Western blot

La determinación de las proteínas Bax, Bcl-2, Cit-c, Fas-L y PARP se llevó a cabo por Western blot utilizando el sistema de Laemmli (1970).

Reactivos:

- Tampón de lisis: NaCl 140 mM; EDTA 15 mM; glicerol 10%; Tris 20 mM; pH 8,0.
- Mezcla de inhibidores de proteasas; PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina.
- Solución de ebullición: H₂O; Tris/HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pirrolina 0,5%.
- Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 0,2 M; SDS 3,5 mM; pH 8,8.
- Tampón de transferencia; Tris 25 mM; glicina 0,2 M y metanol 20%.
- PBS: NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,4 mM; NaHPO₄ 8 mM; KCL 2,7 mM.
- PBS-Tween 0,05%.
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 2% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween.

Método:

Una vez obtenidos los homogeneizados y su posterior cuantificación se procedió a:

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se tomaron entre 15-100 μg de proteína a la que se le añadió solución de ebullición y se incubó durante 2 minutos a 100°C.

A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (10-12%) en tampón de electroforesis.

Para la realización del gel se preparó la siguiente mezcla:

- 3 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida (Sigma, Chemical Co. San Louis, USA).
- 4,75 ml del tampón Tris/HCl 0,75 M; pH 8,8.
- 0,5 ml de SDS al 2%.
- 0,43 ml de persulfato amónico al 1%.
- 0,3 ml de TEMED al 1%.
- 1 ml de H₂O milliQ.

b) Transferencia

Las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para permitir su exposición a los anticuerpos.

Para realizar la transferencia, una vez extraído el gel se equilibra en tampón de transferencia. La transferencia se realiza a 13 V durante 20 minutos. Para comprobar que la transferencia había sido realizada con éxito se introdujo la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. La membrana se lavó en agitación con PBS. Posteriormente, se sometió a la solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

a) Incubación con anticuerpos

La membrana se incubó toda la noche con los anticuerpos específicos para Bax, Bcl-2, Cit-c, Fas-L y PARP (Santa Cruz Biotechnology, INC). Transcurrido este periodo se lavó seis veces con PBS-Tween. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo antiglobulina de conejo o ratón unido a HRP (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, se volvió a lavar seis veces con PBS-Tween.

b) Revelado

La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando la prueba comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente, se introduce en un cassette junto con una película (Amersham Hyperfilm ECL, UK) durante aproximadamente 5 minutos. Tras el revelado y secado de la película se lleva a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando un software comercial Fluor-S-Multimager (Bio Rad).

3.5.2.11. Extracción y purificación del ADN

Para la obtención de ADN a partir de hígado se empleó una prueba comercial (DNeasy[®]Tissue QUIAGEN). Se tomaron 25 mg de muestra que se colocaron en un eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 180 µl de tampón ATL; a continuación se adicionaron 20 µl de proteinasa K y la mezcla se incubó a 55°C durante toda la noche. Se pipetearon en el eppendorf 40 µl de RNasa (1 mg/ml) y se agitó vigorosamente. Tras ello se añadieron 200 µl de tampón AL y se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se lavó el ADN con 1 ml de etanol al 70%. El contenido se pipeteó a una columna de ADN donde se añadieron 500 µl de tampón AW1 y se centrifugó 1 minuto a 8.000 xg; se desechó la parte inferior resultante y sobre la columna de extracción de ADN se añadieron 500 µl de tampón AW2 centrifugando durante 3 minutos a 14.000 xg y descartando nuevamente la parte inferior de la columna. Finalmente, se añadieron 200 µl de tampón AE y se centrifugó 1 minuto a 8.000 xg obteniéndose de esta forma el ADN diluido.

La pureza del ADN se estimó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm de longitud de onda, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Siendo: A_{260} y A_{280} las absorbancias a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda, respectivamente.

3.5.2.12. Cuantificación del ADN

Método:

Se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro, a 260 nm de excitación y 280 nm de emisión, de la siguiente mezcla:

- 693 µl de tampón TAE 1x
- 7 µl de muestra

Como blanco reactivo se utilizaron 700 µl de tampón TAE.

Para el cálculo de las concentraciones se consideró que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg de ADN. El resultado se expresó como µg/ml.

3.5.2.13. Electroforesis del ADN en gel de agarosa

Fundamento:

Se utilizó el método descrito por Sambrook y Russell (2001) que consiste en separar, identificar y purificar distintos fragmentos de ADN según su peso molecular mediante electroforesis.

Reactivos:

- Agarosa

- Tampón TAE 50x: Tris 2 M; EDTA 0,5 M; ácido acético glacial 5,7%; pH 8,0
- Bromuro de etidio
- Tampón de carga 1x (azul de bromofenol 1,25%; azul de xileno 0,25%; sacarosa 40%)
- Marcador de peso molecular del ADN (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) que incluye fragmentos desde 75 a 1.000 pb

Método:

Los geles de agarosa se prepararon a partir de la siguiente mezcla:

- 2 g de agarosa
- 100 ml del tampón TAE 1x
- 5 μ l de bromuro de etidio

Se mezclaron 1 μ g de ADN previamente extraído con 2 μ l de tampón de carga y se depositaron en el gel previamente elaborado. Del marcador de peso molecular se utilizaron 0,7 μ g, mezclados con 0,4 μ l de tampón de carga.

Los fragmentos de ADN se separaron en una cubeta de electroforesis que contenía tampón TAE 1x, estableciéndose una diferencia de potencial entre ambos polos de 80 V durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las bandas de ADN que fue de aproximadamente 2 horas. El seguimiento de la electroforesis se realizó observando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta, ya que el bromuro de etidio actúa como agente intercalante y permite visualizar las bandas de ADN.

Uno de los principales marcadores bioquímicos indicativos de muerte celular por apoptosis es la separación y ruptura del ADN cromosómico por zonas internucleosomales en fragmentos de aproximadamente 200 pb.

3.5.2.14. Actividad enzimática de las caspasas -3 y -8

Para su cuantificación se empleó una técnica fluorogénica. Se utilizó un sustrato compuesto por una secuencia peptídica reconocida por la caspasa 3 (N-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartato amida, Ac-DEVD), dicho péptido está conjugado con un compuesto fluorescente basado en la cumarina denominado 7-amino-4-metil cumarina (AMC). El conjugado Ac-DEVD-AMC no tiene capacidad fluorescente, pero cuando es roto por acción de la caspasa 3 activa, el producto resultante emite fluorescencia que puede ser cuantificada.

Reactivos:

- Tampón de ensayo a pH 7,5, conteniendo HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0,1%, DTT 5 mM y glicerol 1%
- Ac-DEVD-AMC 10 mM en dimetilsulfóxido (DMO)

Método:

La mezcla reactiva contenía:

- 50 µg de proteína
- 10 µl de sustrato

- Tampón de ensayo hasta completar 1.000 μ l

Para calcular el valor inicial (t=0) se leyó la fluorescencia que emitía la mezcla en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de $\lambda=380$ nm y a una longitud de onda de emisión de $\lambda=460$ nm. A continuación, se incubó la mezcla en un baño termostatzado a 37°C hasta pasar 15 (t=15), 30 (t=30) y 45 (t=45) minutos, tras los cuales se procedió a realizar nuevas lecturas de fluorescencia.

Una vez medida la fluorescencia de las muestras se calcularon los incrementos de fluorescencia correspondientes a los tres intervalos de tiempo ensayados, comprobándose que los ensayos eran lineales. El resultado se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por minuto y mg de proteína.

$$\text{UAF/min/mg prot} = (\text{UAT}_{45} - \text{UAT}_0)/\text{min reacción/mg proteína}$$

Para la cuantificación de la actividad de la caspasa-8 se utilizó una técnica fluorogénica similar a la anteriormente descrita. El sustrato empleado en este caso fue el Ac-IETD-AFC, formado por el péptido N-acetil-isoleucil-glutamil-treonil-aspartato amida (Ac-IETD) conjugado con el derivado cumarínico 7-amino-4-trifluorometil-cumarina (AFC). Dicho conjugado no tiene capacidad fluorescente, pero cuando es roto por acción de la caspasa-8 previamente activada, el producto resultante emite fluorescencia.

Reactivos:

- Tampón de ensayo a pH 7,5, conteniendo HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0,1%, DTT 5 mM y glicerol 1%

- Ac-IETD-AFC 10 mM en DMO

Método:

La mezcla reactiva contenía:

- 50 µg de proteína
- 10 µl de sustrato
- Tampón de ensayo hasta completar 1.000 µl

Para cuantificar la actividad de la caspasa-8 se incubó la mezcla en un baño termostático a 37°C realizándose lecturas de la fluorescencia emitida a 15, 30 y 45 minutos. Los incrementos de fluorescencia correspondientes a los tres intervalos de tiempo estudiados eran lineales, expresándose el resultado en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por minuto y mg de proteína.

$$\text{UAF/min/mg prot} = (\text{UAT}_{45} - \text{UAT}_0)/\text{min reacción/mg proteína}$$

3.5.3. Tratamiento estadístico

Para la expresión de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (E.E.M.).

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó el test de análisis de varianza (ANOVA). Además, en aquellos grupos donde aparecían diferencias significativas, se realizaba posteriormente el test de Newman-

Keuls. Los estudios de regresión se llevaron a cabo por el método de los mínimos cuadrados.

Para el tratamiento de los datos y para el análisis estadístico de los datos se utilizó un programa Statistica 4.9 para Windows (Statsoft, Tulsa, USA), mientras que, para su representación gráfica se utilizó Excel 2000 para Windows (Microsoft Redmon USA).

4 RESULTADOS

4.1. Efectos de la NAC sobre la supervivencia en conejos infectados con el virus de la RHD

El peso de los animales era similar en ambos grupos experimentales al comienzo de nuestro estudio; tampoco se apreciaron diferencias significativas tras los 7 días de tratamiento (Tabla 1).

	Peso corporal (Kg)	
	Día 0	Día 7
RHD	2,27 ± 0,01	2,39 ± 0,02
RHD + NAC	2,24 ± 0,02	2,34 ± 0,02

Tabla 1: Evolución del peso corporal en los 7 días de tratamiento en los distintos periodos y grupos estudiados (n=24).

Para los estudios de supervivencia se emplearon 20 conejos. La mitad recibieron una inyección i.p. de NAC o del mismo volumen de SSF durante 7 días, el séptimo día a todos los animales se les administró 2×10^4 unidades hemoaglutinantes del virus de la RHD por vía i.m. y se les dejó morir espontáneamente. En la Figura 1 se recoge el porcentaje de animales vivos a lo largo del tiempo en ambos grupos de estudio. Como se observa en la Figura 1, a las 24 hpi, el porcentaje de animales vivos en ambos grupos es del 100%; sin embargo, a las 36 hpi se observan marcadas diferencias entre los dos grupos: así, mientras que en el grupo RHD la supervivencia fue del 33%, en el

grupo RHD + NAC fue del 90% en el mismo periodo y a las 48 hpi estos valores fueron del 17% y del 45%, respectivamente. Solo un animal no tratado y dos tratados con NAC sobrevivieron más de 72 h. Nuestros resultados indican, por tanto, que aunque la administración de la NAC en los animales infectados no evita la muerte de la mayor parte de los animales, es capaz de aumentar de forma significativa el tiempo de supervivencia.

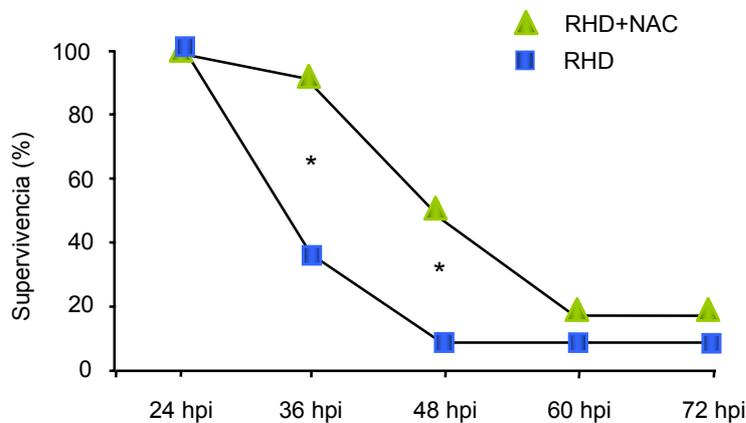


Figura 1: Porcentaje de animales vivos en los distintos periodos y grupos estudiados ($n = 3-20$).

4.2. Efectos de la NAC sobre la anatomía e histología hepática en conejos infectados con el virus de la RHD

En las necropsias el hígado mostraba una apariencia pálida, consistencia friable, con una marcada delimitación de los lobulillos hepáticos y en ocasiones hemorragias puntiformes (Imagen 2).

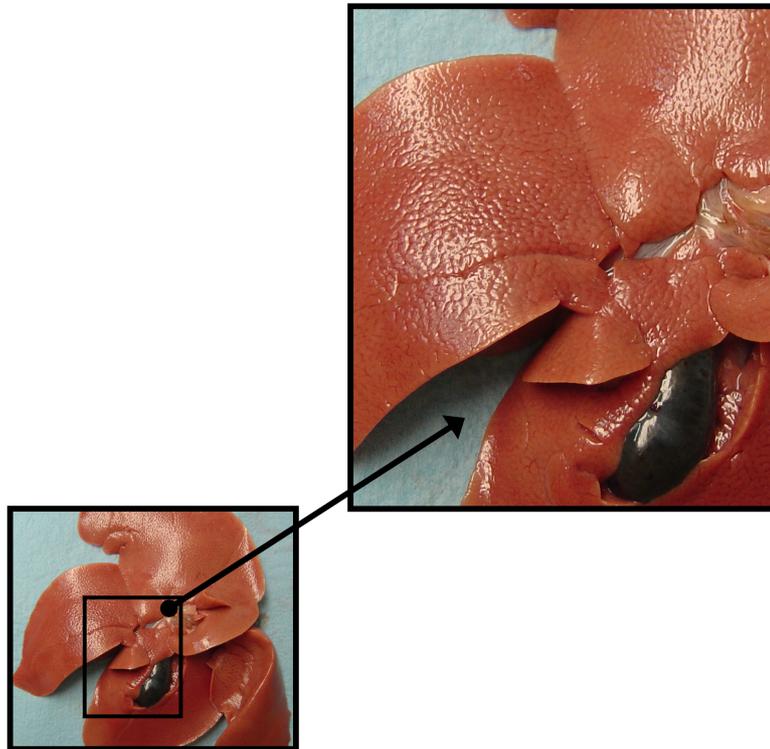


Imagen 2: Aspecto del hígado en los animales infectados con el virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos.

El examen histológico al microscopio óptico de las biopsias hepáticas de animales pertenecientes al grupo control demostró un aspecto normal del tejido (Imagen 3). A las 24 hpi, en los animales infectados sin tratamiento antioxidante, se observa una modificación de la estructura hepática, con numerosos hepatocitos sin núcleo y un infiltrado inflamatorio presente en numerosas zonas. En este mismo período, los hígados de los animales infectados tratados con el antioxidante poseen prácticamente una apariencia normal (Imágenes 4 y 5).

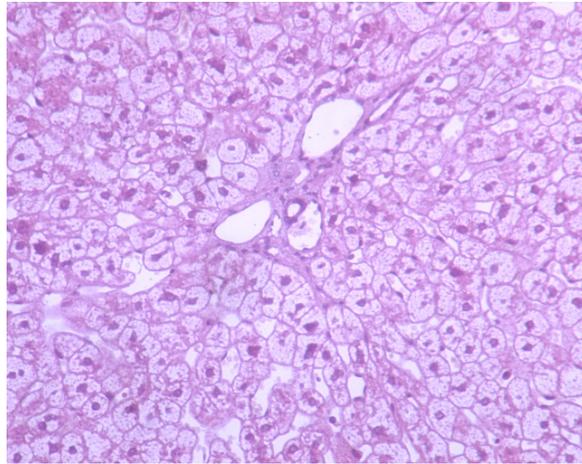


Imagen 3: Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo control. Tinción PAP contrastada con hematoxilina. Aumentos 200x.

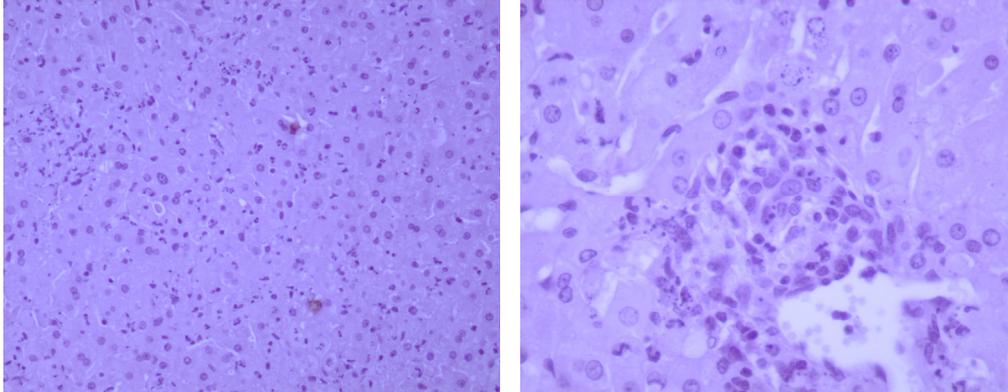


Imagen 4: Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo RHD a las 24 hpi. Tinción H-E. Aumentos 200x y 400x.

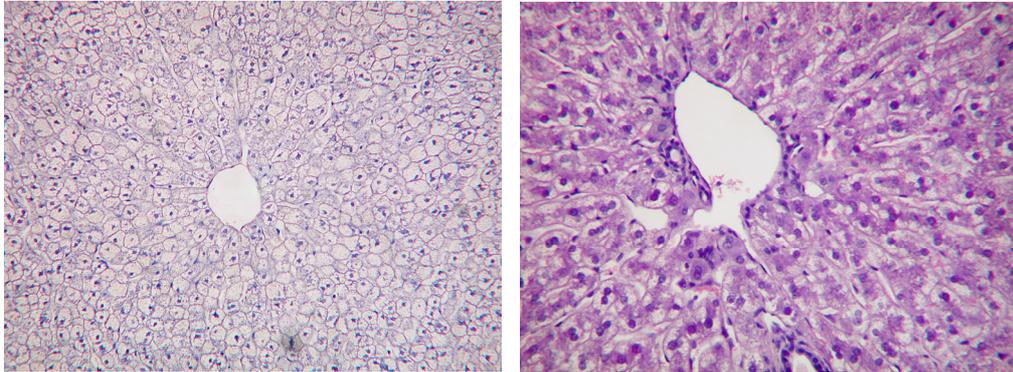


Imagen 5: Hallazgos histológicos del hígado de conejos pertenecientes al grupo RHD+NAC a las 24 hpi. Tinción H-E. Aumentos 100x y 200x.

Entre las 36 y 48 hpi, se observaron múltiples áreas de necrosis asociadas con hemorragias e infiltración de neutrófilos así como una gran vacuolización del citoplasma. También fue un hallazgo común la picnosis y cariorrexis de las células necróticas. Debido a la disociación de los hepatocitos, las láminas hepáticas se hacen discontinuas e irregulares, con neutrófilos y células de Kupffer rodeando con frecuencia a los hepatocitos dañados y en algunas áreas, se observaron pequeños focos de necrosis hepática. A menudo se presentaban microtrombos intrasinusoidales y, de forma ocasional, se observaron cuerpos acidófilos. El daño de la arquitectura hepática resulta menos evidente en los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC (Imágenes 6 y 7).

En los animales que sobrevivieron a la infección se detecta la presencia de seudolóbulos por la marcada fibrosis existente tras la recuperación espontánea de la funcionalidad hepática (Imagen 8).

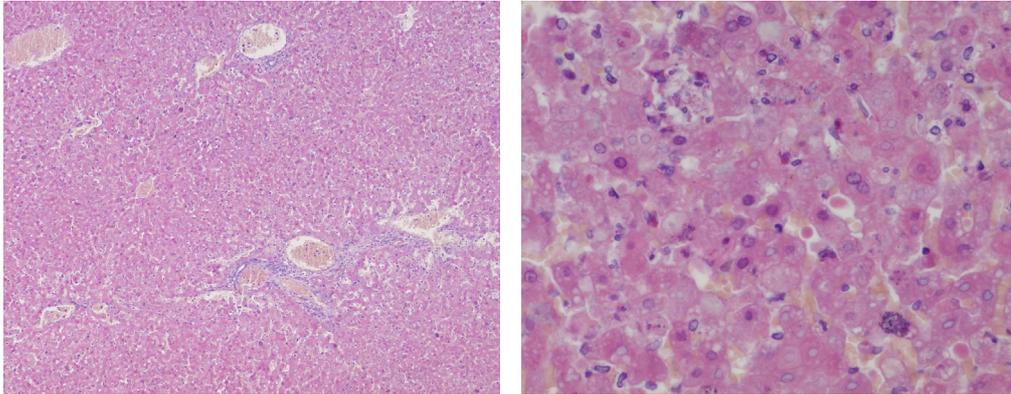


Imagen 6: Hallazgos histológicos de los animales pertenecientes al grupo RHD entre las 36 y 48 hpi. Tinción H-E. Aumentos 10x y 400x.

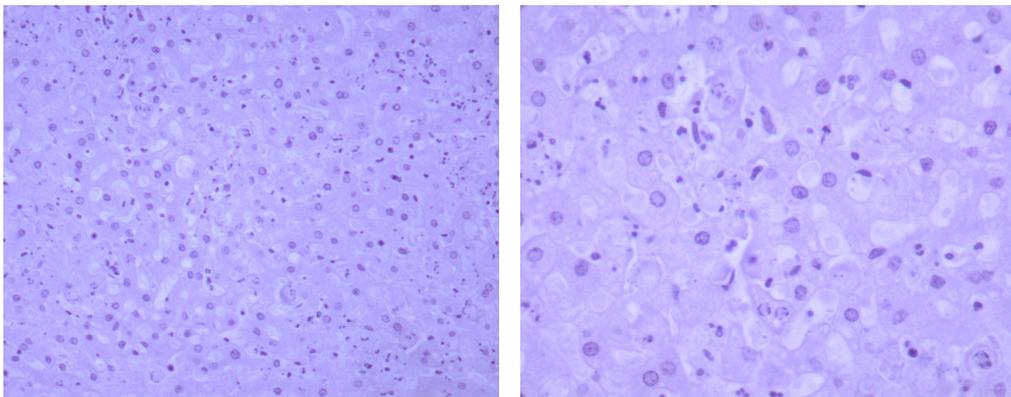


Imagen 7: Hallazgos histológicos de los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC entre las 36 y 48 hpi. Tinción H-E. Aumentos 200x y 400x.

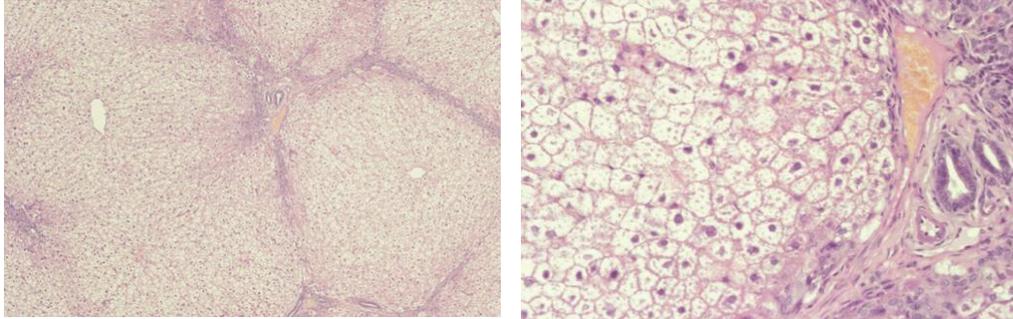


Imagen 8: Hallazgos histológicos de los animales supervivientes al virus de la RHD. Tinción H-E. Aumentos 10x y 100x.

El examen histológico mediante microscopía electrónica nos indica que en los periodos iniciales de la enfermedad, el hígado de los conejos infectados no presenta cambios ultraestructurales apreciándose una imagen similar a la encontrada en los animales control. Sin embargo, a partir de las 36 hpi, en los hepatocitos localizados en las proximidades de un foco inflamatorio, se aprecia una intensa vacuolización del citoplasma así como la presencia de cuerpos autofágicos, numerosas gotas de lípidos e hinchamiento de las mitocondrias. También en los animales infectados se aprecia en todos los casos una intensa degeneración del retículo endoplasmático rugoso (RER).

La principal diferencia que se detecta mediante microscopía electrónica, entre los grupos de conejos RHD y RHD+NAC, se observan en el núcleo que muestra una marcada agregación de la cromatina en los animales pertenecientes al grupo RHD, mientras que, el núcleo de los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC tiene una apariencia similar a la de un animal del grupo control (Imagen 8).

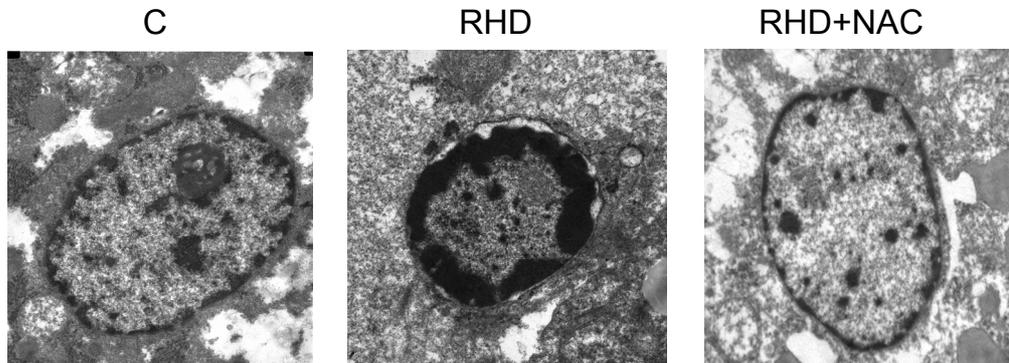


Imagen 9: Aspecto del núcleo de hepatocitos de los distintos grupos estudiados entre las 36 y 48 hpi. Aumentos 8.000x.

La presencia del VP60, principal antígeno vírico, se puso de manifiesto por inmunofluorescencia desde las 12 hpi; si bien en este periodo temprano se detectó tan solo en algún hepatocito aislado (Imagen 9). A las 24 hpi, ya se puede apreciar en más de un 25% de los hepatocitos (Imagen 10) y en los periodos más avanzados de la infección (36 a 48 hpi) entre el 50 y 70% de las células fueron positivas al antígeno vírico (Imagen 11).

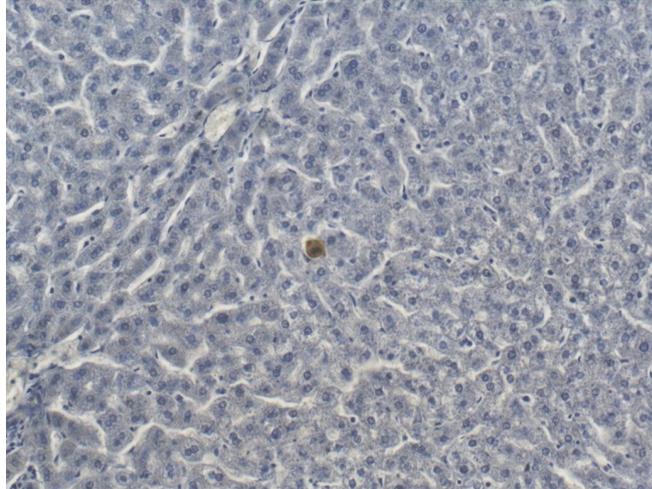


Imagen 10: Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD a las 12 hpi. Tinción PAP contrastada con hematoxilina. Aumentos 100x.

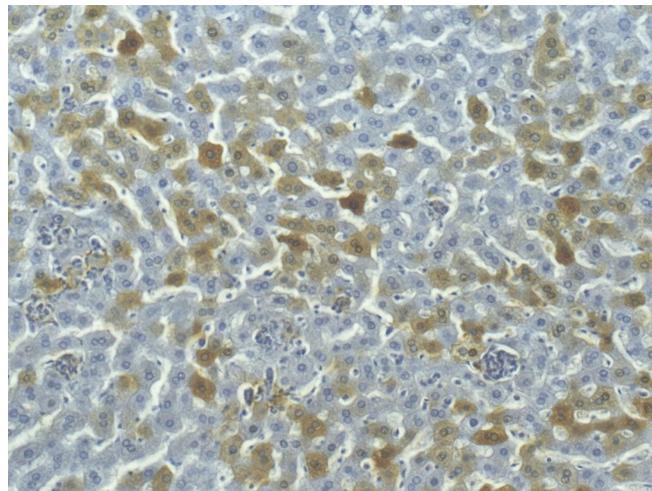


Imagen 11: Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD a las 24 hpi. Tinción PAP contrastada con hematoxilina. Aumentos 100x.

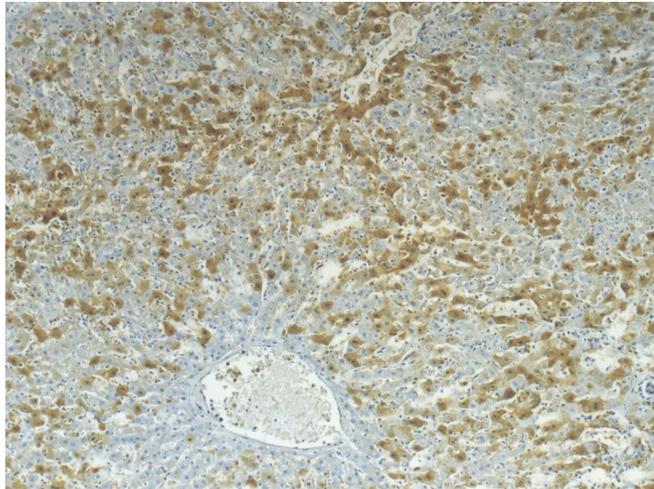


Imagen 12: Detección inmunohistoquímica del antígeno VP60 en el hígado de los conejos infectados con el virus de la RHD entre las 36 y 48 hpi. Tinción PAP contrastada con hematoxilina. Aumentos 100x.

Con el fin de poner de manifiesto la presencia de células en apoptosis, se determinó por inmunohistoquímica la expresión hepática de la caspasa 3. En los conejos pertenecientes al grupo RHD se puede observar un elevado número de hepatocitos positivos a la tinción. Por el contrario, en los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC, las células positivas se limitan fundamentalmente a las áreas periportales y solo un escaso número de células individualizadas en otras regiones del acino hepático (Imagen 12). A las 36 hpi, existen diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ya que el porcentaje de células positivas en los animales pertenecientes al grupo RHD fue de $34,7 \pm 6,6$ frente a $12,1 \pm 3,2$ en el grupo RHD+NAC. En conejos

pertenecientes al grupo control no se observaron células positivas a la caspasa 3.

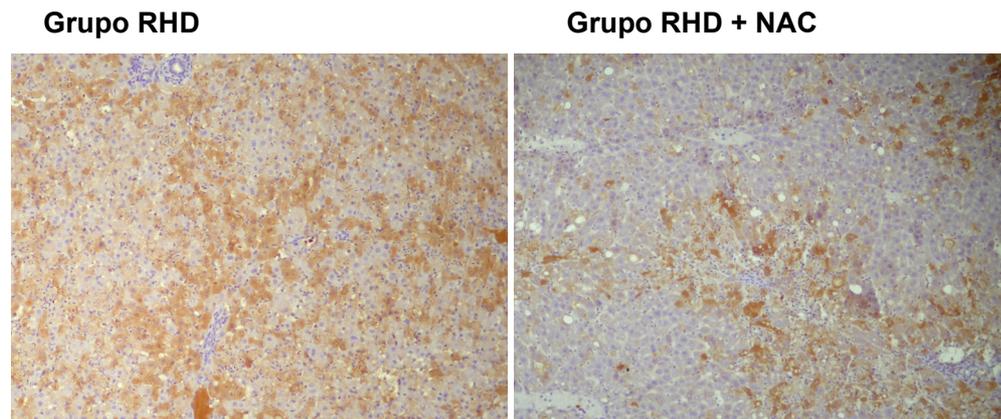


Imagen 13: Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de la caspasa 3 entre las 36 y 48 hpi. Aumentos 10x.

4.3. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático en conejos infectados con el virus de la RHD

En la Tabla 2 se muestra la evolución de los parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático analizados en los animales infectados con el virus de la RHD con y sin tratamiento antioxidante. Elos periodos anteriores a las 36 hpi, la mayor parte de los parámetros analizados fueron similares en ambos grupos experimentales.

Las actividades plasmáticas de la ALT y de la AST se incrementaron de forma marcada a partir de las 36 hpi, siendo este aumento mucho más

manifiesto en los animales sin tratamiento antioxidante; las actividades ALT y AST alcanzaron pues los valores más elevados entre las 36 y las 48 hpi, apreciándose además diferencias significativas entre el grupo tratado con el antioxidante respecto a los animales pertenecientes al grupo RHD.

En relación con las actividades plasmáticas de la γ -GT y LDH, se observa un aumento desde las 24 hpi aunque no llega a ser significativo hasta las 36 hpi; a partir de este momento, los valores fueron significativamente diferentes con respecto a los periodos basales. Aunque los aumentos fueron más marcados en el grupo de conejos infectados sin tratamiento antioxidante, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas con respecto a los conejos del grupo RHD+NAC (Tabla 2).

Las concentraciones de BR total en plasma se incrementan notablemente a partir de las 24 hpi en los animales sin tratamiento antioxidante llegando a valores un 55% superior a los de nivel basal; además, se aprecian ya desde dicho periodo diferencias significativas no solo en relación con el periodo basal sino también con respecto al grupo RHD. Las concentraciones de BR continúan subiendo hasta alcanzar los niveles máximos en los periodos más avanzados de la infección manteniéndose las diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

Las concentraciones de glucosa experimentan a partir de las 24 hpi una disminución gradual que llega a ser significativa entre las 36 y 48 hpi en los animales del grupo RHD en relación con sus niveles basales.

	Basal		12 hpi		24 hpi		36 hpi		48 hpi	
	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC
ALT (U/L)	87 ± 7	54 ± 6	81 ± 8	72 ± 3	87 ± 15	69 ± 9	585 ± 294*	184 ± 99**	1.768 ± 129*	821 ± 305**
AST (U/L)	24 ± 3	14 ± 3	13 ± 2	23 ± 11	80 ± 30	33 ± 9	780 ± 272*	65 ± 18**	2.875 ± 1.821*	508 ± 292**
GGT (U/L)	6 ± 1	4 ± 1	11 ± 0,3	7 ± 2	35 ± 29	7 ± 1	55 ± 19*	42 ± 27*	102 ± 25*	55 ± 20*
LDH (U/L)	124 ± 28	71 ± 13	83 ± 12	99 ± 15	229 ± 87	135 ± 28	1056 ± 272*	732 ± 283*	1.570 ± 673*	1.283 ± 805*
BR (mg/dl)	0,60 ± 0,14	0,57 ± 0,14	0,83 ± 0,38	0,63 ± 0,21	1,33 ± 0,35*	0,67 ± 0,15#	1,39 ± 0,34*	0,79 ± 0,15#	2,33 ± 0,33*	1,1 ± 0,33**
GLU (mg/dl)	99 ± 6	92 ± 7	108 ± 13	130 ± 4	110 ± 7	113 ± 11	90 ± 12	93 ± 7	57 ± 12*	77 ± 14

Tabla 2 . Parámetros plasmáticos en los distintos periodos y grupos estudiados . Valores medios ± E.E.M. de 8 a 13 animales.
*P<0,05 con respecto al periodo basal; #P<0,05 con respecto al grupo RHD

4.4. Efectos de la NAC sobre el estrés oxidativo hepático en conejos infectados con el virus de la RHD

En la Tabla 3 y en la Figura 2, incluidas en esta sección, se muestran los parámetros hepáticos analizados en los animales sacrificados a las 12, 24, 36 y 48 hpi en los grupos RHD y RHD + NAC y su comparación con el grupo control.

Las concentraciones hepáticas del GSH y GSSG fueron determinadas mediante fluorimetría. La concentración hepática de GSH se mantiene próxima a los niveles del grupo control hasta las 24 hpi para disminuir en los periodos posteriores alcanzando, en el periodo 48 hpi, valores un 50% menores que las de los animales control en los dos grupos de animales infectados.

En la Figura 2 se observa la relación existente entre la forma oxidada y reducida del glutatión (GSSG/GSH) en hígado, uno de los más importantes marcadores de estrés oxidativo. Dicha relación se eleva significativamente a partir del periodo de 36 hpi en ambos grupos experimentales en relación con los animales control; si bien este incremento fue significativamente menor en animales tratados con NAC (-40%). A las 48 hpi, las diferencias entre ambos grupos experimentales se mantienen alcanzando, en este momento, un valor un 45% más elevado en el grupo RHD en relación con el grupo RHD+NAC.

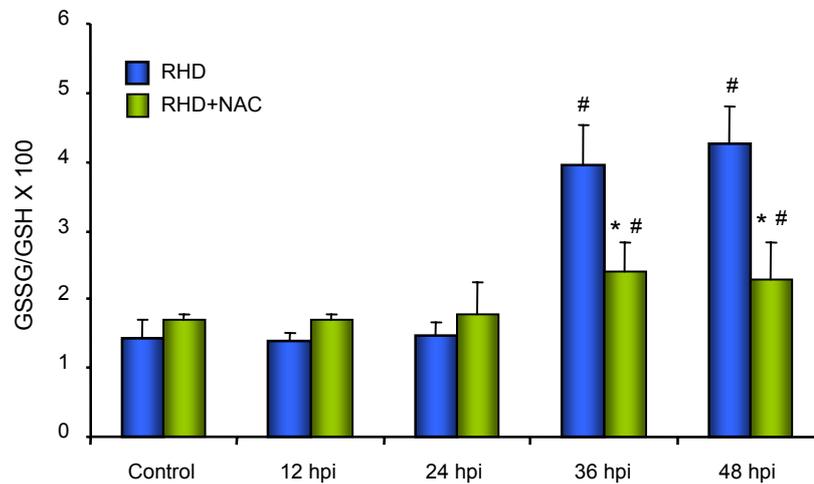


Figura 2: Relación hepática GSSG/GSH en los distintos periodos y grupos estudiados. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. * $P < 0,05$ con respecto al grupo control; # $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

La actividad GPx en los grupos de animales infectados se mantiene similar a los valores de los animales control hasta las 24 hpi; en este periodo, se aprecia una disminución en los animales pertenecientes al grupo RHD del 30% con respecto a los animales control y unas diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo RHD+NAC que se mantienen en los posteriores periodos estudiados.

	Control		12 hpi		24 hpi		36 hpi		48 hpi	
	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC	RHD	RHD+NAC
GSH (nmol/gh)	6,65 ± 0,38	7,90 ± 1,63	7,42 ± 1,48	7,94 ± 0,4	7,14 ± 1,3	7,85 ± 0,62	3,90 ± 0,51*	4,51 ± 1,04*	3,27 ± 0,17*	3,27 ± 0,22*
GSSG (nmol/gh)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,25 ± 0,01#	0,17 ± 0,03##	0,26 ± 0,01#	0,18 ± 0,04##
(GSSG/GSH) x100	1,43 ± 0,29	1,70 ± 0,10	1,40 ± 0,10	1,70 ± 0,10	1,78 ± 0,48	1,40 ± 0,10	3,95 ± 0,58*	2,39 ± 0,42##	4,25 ± 0,56*	2,30 ± 0,51##
GPx (nmol/min.mgprot)	171 ± 4	174 ± 11	161 ± 10	169 ± 6	102 ± 0,10*	159 ± 5#	77 ± 2*	99 ± 7##	76 ± 12*	83 ± 0,75*
GR (nmol/min.mgprot)	96 ± 5	99 ± 0,7	98 ± 0	105 ± 6	65 ± 7*	76 ± 10*	57 ± 11*	67 ± 6*	65 ± 11*	73 ± 13*
GST (nmol/min.mgprot)	4.854 ± 379	4.735 ± 615	4.530 ± 110	4.540 ± 770	3.810 ± 590	4.045 ± 355	3.485 ± 362*	3.422 ± 330*	2.950 ± 191*	3.163 ± 116*

Tabla 3 . Parámetros hepáticos en los distintos periodos y grupos estudiados. Valores medios ± E.E.M. de 8 a 13 animales.
*P<0,05 con respecto al periodo basal; #P<0,05 con respecto al grupo RHD

Las actividades GR y GST muestran una disminución gradual desde las primeras hpi, si bien no es hasta las 36 hpi, cuando se alcanzaron valores estadísticamente significativos. Esta actividad fue aproximadamente un 40% menor en los animales pertenecientes al grupo RHD a las 48 hpi, mientras que en los animales del grupo RHD+NAC fue del 30% en el mismo periodo de estudio pero sin llegar a alcanzar diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

4.5. Efectos de la NAC sobre la expresión y actividad hepática de marcadores apoptóticos en conejos infectados con el virus de la RHD

Para evaluar los efectos del tratamiento de la NAC sobre marcadores de apoptosis, se determinó la expresión de la proteína Fas-L, Bcl-2, Bax, Cit-c y PARP mediante *Western blot*.

Como puede observarse en la Figura 3, la expresión de la proteína de membrana Fas-L se encuentra incrementada de forma significativa en relación con los animales control ya desde las 12 hpi, en los dos grupos de conejos infectados. Esta significativa activación de la expresión de FasL se mantiene con valores similares en todos los periodos de estudio y en ambos grupos experimentales.

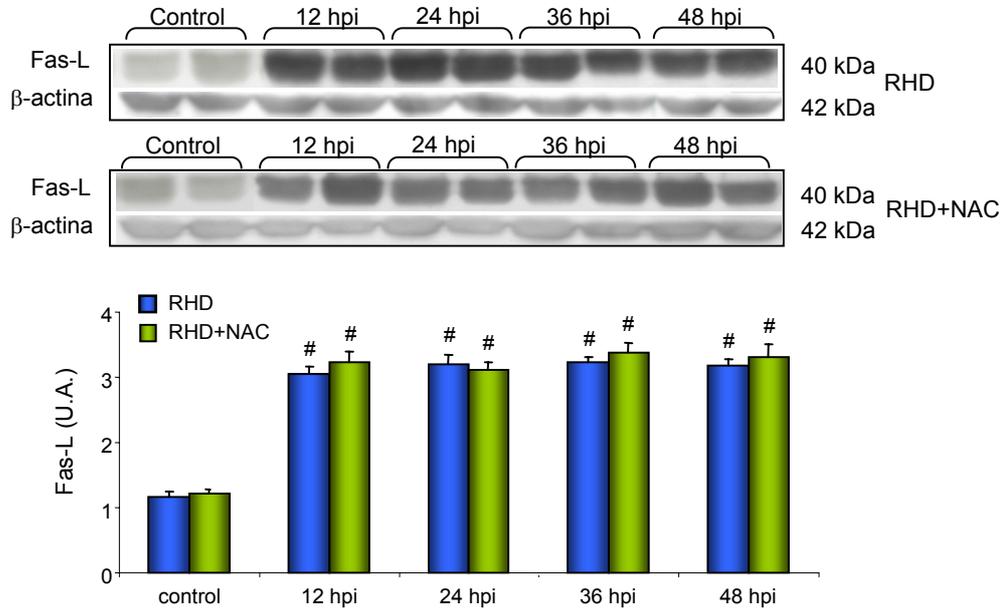


Figura 3: Expresión hepática de Fas-L en los distintos periodos y grupos estudiados. La imagen superior muestra el Western blot representativo de cada grupo experimental. La imagen inferior muestra la representación en U.A. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. $^{\#}P < 0,05$ con respecto al grupo control.

La familia de proteínas Bcl-2 son importantes reguladores de la apoptosis. Estas proteínas se localizan principalmente en la membrana mitocondrial y regulan la apoptosis en parte por controlar la liberación del Cit-c al citosol. Los miembros de esta familia pueden clasificarse en proteínas proapoptóticas, dentro de la cual podemos incluir a Bax y antiapoptóticas, entre las que se encuentra Bcl-2.

El estudio de la concentración de la proteína proapoptótica Bax mediante *Western blot* (Figura 4), pone de manifiesto que el virus de la RHD

provoca un aumento de su expresión a las 36 y 48 hpi; dicha expresión se redujo con el tratamiento antioxidante de forma significativa en esos mismos periodos.

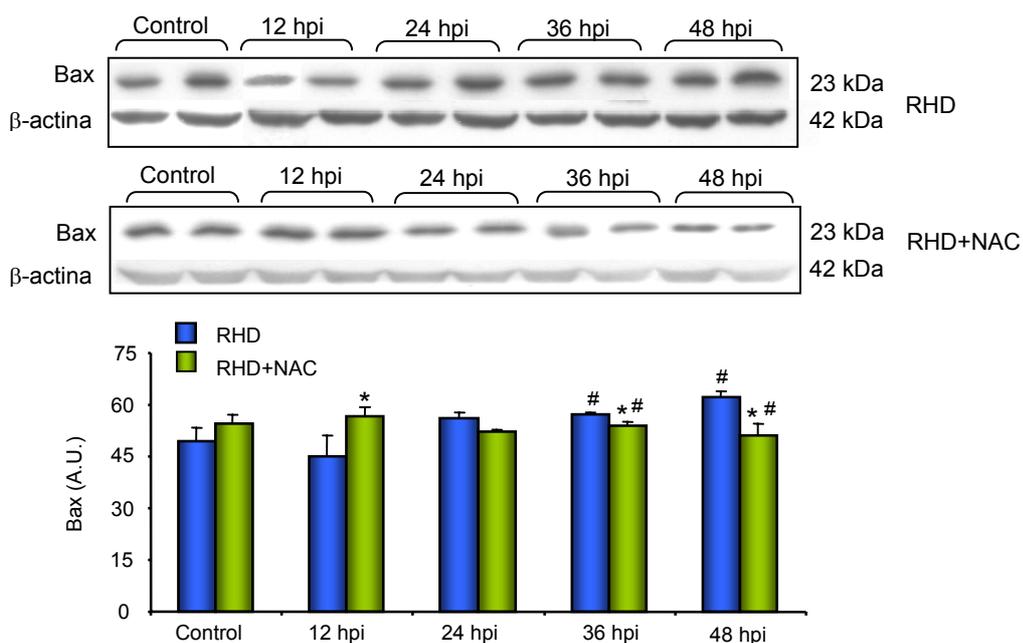


Figura 4: Expresión hepática de Bax en los distintos periodos y grupos estudiados. La imagen superior muestra el Western blot representativo de cada grupo experimental. La imagen inferior muestra la representación en U.A. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. # $P < 0,05$ con respecto al grupo control; * $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

Como se observa en la Figura 5 la proteína antiapoptótica Bcl-2 experimenta un significativo incremento a las 12 hpi siendo mucho más marcado en los animales tratados con el antioxidante (+30%) en relación con los animales no tratados y alcanzando en este periodo diferencias significativas

entre ambos grupos experimentales. A partir de este momento se produce una disminución en la expresión de dicha proteína hasta que prácticamente llega a desaparecer a las 48 hpi, en ambos grupos experimentales.

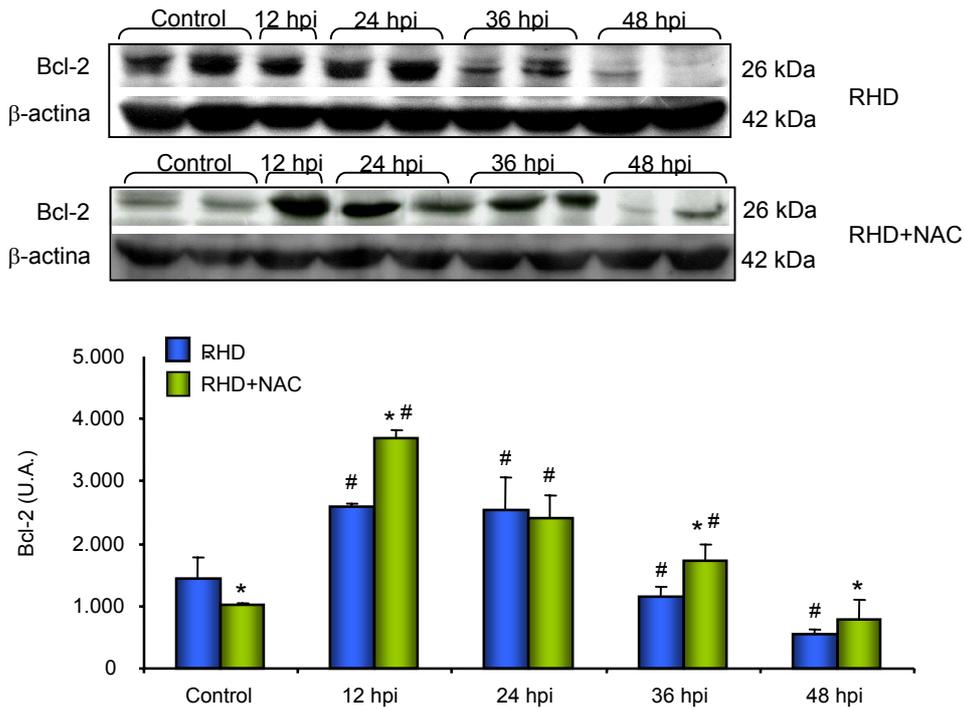


Figura 5: Expresión hepática de Bcl-2 en los distintos periodos y grupos estudiados. La imagen superior muestra el Western blot representativo de cada grupo experimental. La imagen inferior muestra la representación en U.A. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. # $P < 0,05$ con respecto al grupo control; * $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

La relación Bax/Bcl-2 es un importante indicador de la susceptibilidad de la célula a desencadenar el proceso de apoptosis (Yang y Korsmeyer, 1996). Como se puede observar en la Figura 6, en los primeros periodos de

estudio (12 y 24 hpi) se produce una disminución significativa de la relación en ambos grupos experimentales con respecto al periodo control. Sin embargo, a las 36 hpi, si bien en los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC se mantiene similar al grupo control, en el caso de los animales que no reciben tratamiento la relación entre ambas proteínas aumenta, debido al aumento de la expresión de la proteína proapoptótica que se produce en este grupo experimental, existiendo desde este momento diferencias significativas entre el grupo tratado y no tratado con el antioxidante. A las 48 hpi, estas diferencias son más marcadas de forma tal que la relación Bax/Bcl-2, en los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC, es 3 veces menor que la de los conejos del grupo RHD.

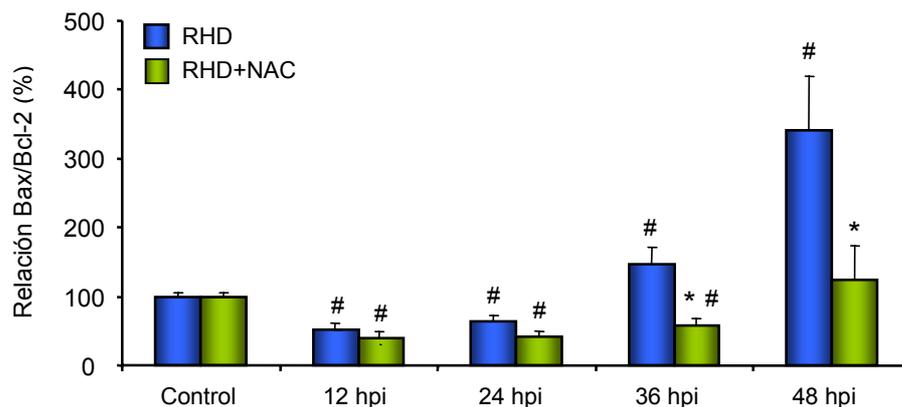


Figura 6: Relación Bax/Bcl-2 en los distintos periodos y grupos estudiados. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. [#] $P < 0,05$ con respecto al grupo control; ^{*} $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

Como se observa en la Figura 7, el virus de la RHD indujo un incremento significativo en la concentración citosólica del Cit-c, lo que implica

una salida del mismo desde la mitocondria. La administración de NAC disminuye significativamente dicho incremento en todos los periodos de estudio exceptuando a las 48 hpi. A las 24 hpi se alcanzaron unos valores un 35% más bajos en relación con el mismo periodo de estudio en los animales no tratados con el antioxidante, lo que nos indica un efecto protector de la NAC sobre la integridad mitocondrial.

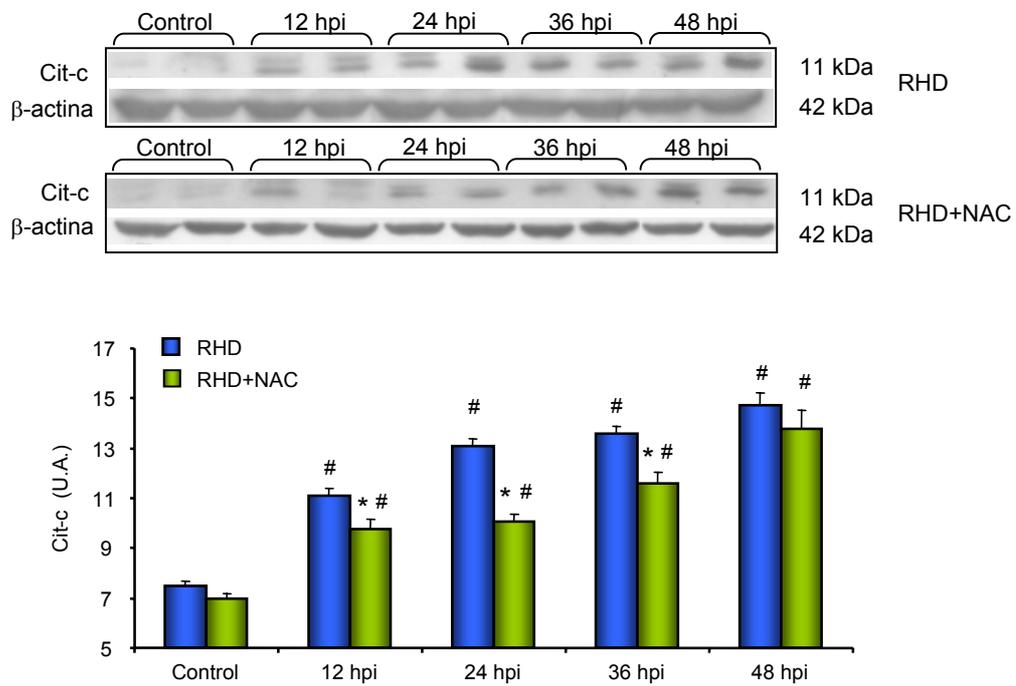


Figura 7: Expresión hepática del Cit-c en los distintos periodos y grupos estudiados. La imagen superior muestra el Western blot representativo de cada grupo experimental. La imagen inferior muestra la representación en U.A. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. [#] $P < 0,05$ con respecto al grupo control; ^{*} $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

La expresión de la enzima nuclear PARP se puede observar en la Figura 8. En los periodos de 36 y 48 hpi se produce la proteólisis de PARP como se pone de manifiesto por la aparición del fragmento de 85 κ Da en los animales pertenecientes al grupo RHD. Por otro lado, los animales tratados con la NAC muestran una reducción significativa de la ruptura de la enzima.

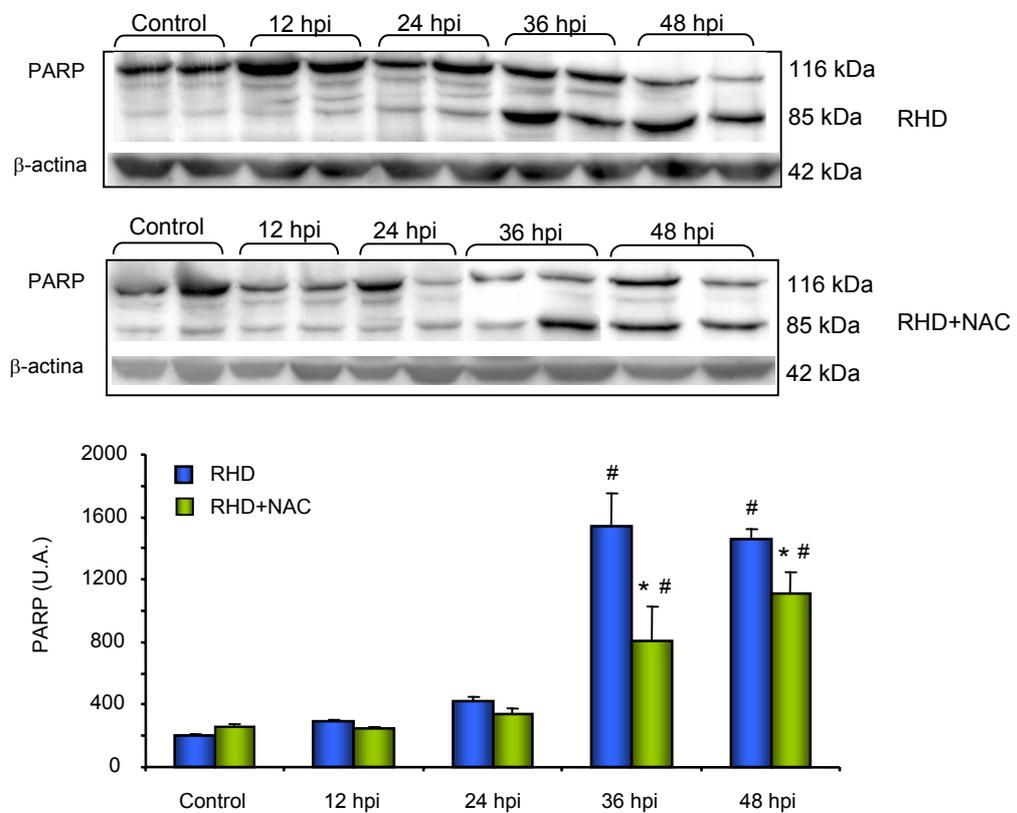


Figura 8: Expresión hepática de PARP en los distintos periodos y grupos estudiados. La imagen superior muestra el Western blot representativo de cada grupo experimental. La imagen inferior muestra la representación en U.A. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. * $P < 0,05$ con respecto al grupo control; # $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

4.6. Efectos de la NAC sobre la fragmentación del ADN en el hígado de conejos infectados con el virus de la RHD

Una de las características bioquímicas asociadas a la apoptosis es la pérdida de integridad del ADN mediante su fragmentación por la acción de una endonucleasa. Por ello, y con el fin de poner de manifiesto la existencia o no de apoptosis en nuestro modelo animal de FHF, determinamos en primer lugar la fragmentación del ADN ya que es una de las técnicas más empleadas para la detección de la apoptosis de un modo cualitativo (Imagen 14). Esta ruptura se produce a nivel internucleosomal de modo que los fragmentos de ADN que se originan tienen una longitud múltiple de 180-200 pb.

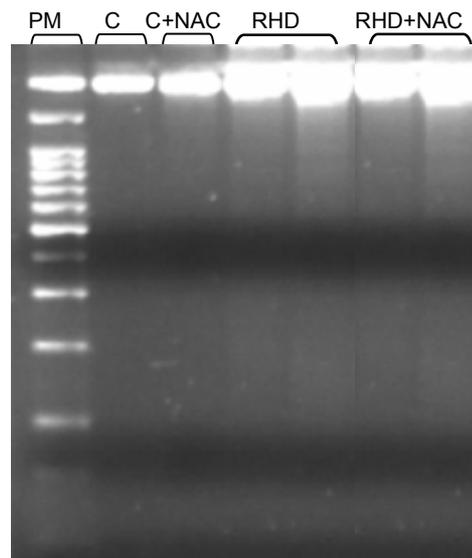


Imagen 14: Electroforesis de ADN hepático en gel de agarosa en los distintos grupos experimentales entre las 36 y 48 hpi.

Como era de esperar no observamos evidencias de apoptosis en los animales pertenecientes al grupo control (Imagen 14). Sin embargo, en los animales del grupo RHD resultó evidente la fragmentación del ADN que, prácticamente, no fue detectable en el grupo RHD+NAC.

4.7. Efectos de la NAC sobre la actividad hepática caspasa-3 y -8 en conejos infectados con el virus de la RHD

En la Figura 9 podemos observar la cuantificación de la actividad caspasa-3 mediante fluorimetría. Detectamos un incremento significativo desde las 36 hpi y 48 hpi en ambos grupos experimentales si bien, en el grupo tratado con NAC los valores resultaron significativamente menores.

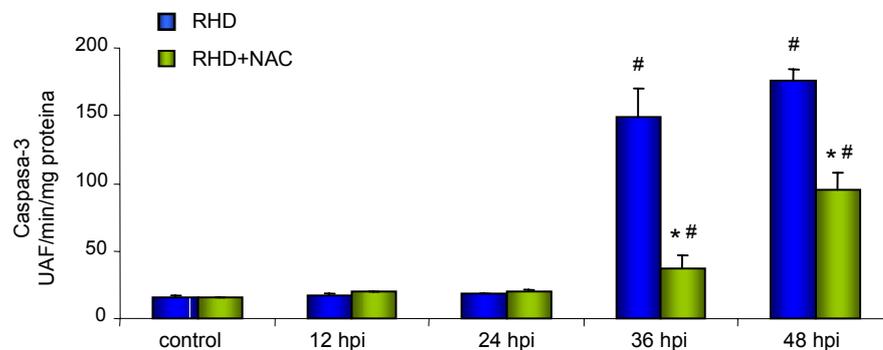


Figura 9: Actividad hepática de la caspasa-3 en los distintos periodos y grupos estudiados. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. [#] $P < 0,05$ con respecto al grupo control; ^{*} $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

Los resultados mostrados hasta el momento muestran una clara activación de muchos de los parámetros indicativos de la vía intrínseca de la apoptosis en los animales infectados con el virus de la RHD, y que el tratamiento con la NAC inhibe prácticamente la activación de la mayor parte de los marcadores analizados.

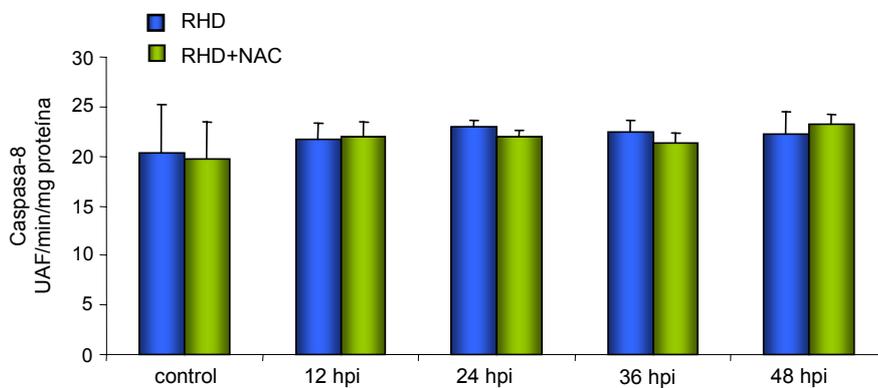


Figura 10: Actividad hepática de la Caspasa-8 en los distintos periodos y grupos estudiados. Valores medios \pm E.E.M. de 2-12 conejos. [#] $P < 0,05$ con respecto al grupo control; ^{*} $P < 0,05$ con respecto al grupo RHD.

En nuestro modelo de FHF no observamos ninguna modificación significativa en la actividad caspasa-8 ni entre periodos ni entre grupos de tratamiento; si bien, en los animales infectados no tratados se puede observar un ligero incremento en su expresión respecto a los no tratados con NAC entre las 24 y las 36 hpi (Figura 10).

5 DISCUSIÓN

5.1. Efectos de la NAC sobre la supervivencia de los conejos infectados con el virus de la RHD

El virus de la RHD es un miembro de la familia *Caliciviridae* que provoca, tanto en conejos domésticos como silvestres, una enfermedad fatal que fue descrita por primera vez en China en 1984 (Liu y cols., 1984). Esta enfermedad se caracteriza por una grave necrosis hepática con una evolución muy rápida que provoca la muerte entre las 48 y las 72 horas tras la infección en el 90% de los casos (Park y cols., 1995; Alonso y cols., 1998). Hallazgos clínicos, cambios en la bioquímica sanguínea así como en la PI confirman que la RHD es un modelo óptimo para el estudio del FHF (Tuñon y cols., 2003; Bélanger y Butterworth, 2005).

El FHF es un proceso que progresa rápidamente y tiene unos índices de mortalidad muy altos a pesar de los grandes avances que se han conseguido en su tratamiento (Williams, 1996; O'Grady, 2000). Sin embargo, el trasplante hepático sigue siendo hasta la fecha el único tratamiento curativo, pero éste se ve muy limitado por la escasez de órganos y por la necesidad de inmunosupresores durante toda la vida. Además, numerosos pacientes mueren mientras esperan el trasplante (Stockmann, 2000). Por ello, es muy importante alargar la vida de estos pacientes así como tratar de mejorar las condiciones neurológicas y bioquímicas de los mismos para poder disponer de un mayor tiempo de actuación.

La NAC ha sido empleada en la clínica desde hace aproximadamente 45 años principalmente por sus propiedades antioxidantes. En los casos de FHF provocados por dosis altas de paracetamol, se utiliza con frecuencia la

NAC; de hecho, se ha constatado una evidente mejoría en diversos parámetros tales como la incidencia de edema cerebral, el fallo renal, la hipotensión así como un mayor índice de supervivencia de los pacientes que reciben el tratamiento con el antioxidante frente al grupo de pacientes que no lo reciben (Keasy y cols., 1991) y una reducción de la mortalidad en pacientes afectados de FHF (Harrison y cols., 1990). También mejora la supervivencia en cerdos sometidos a un proceso de isquemia hepática (Fukuzawa, 1995).

Existen distintas teorías que intentan explicar los efectos de la NAC sobre el daño hepático agudo; una de ellas indica que mejora la oxigenación de los tejidos, una complicación casi siempre presente en el FHF (Harrison y cols., 1991). Otro posible mecanismo de acción es mejorar la circulación sanguínea regional o recuperar las defensas antioxidantes (Devlin y cols., 1997) y corregir la acidosis de los tejidos al mejorar la microcirculación (Spies y cols., 1994).

Nuestros resultados confirman, en el modelo vírico de FHF, que la administración de NAC produce un alargamiento en la supervivencia de los animales infectados por el virus de la RHD que reciben tratamiento antioxidante con respecto a los que no lo reciben. En concreto, es a las 36 hpi donde se aprecian los resultados más significativos puesto que la supervivencia de los animales pertenecientes al grupo RHD en este periodo es del 33% frente a un 91% de los animales pertenecientes al grupo RHD+NAC. Estos resultados son muy importantes no solo porque la supervivencia en sí misma es mayor (sobrevivieron dos conejos del grupo RHD+NAC respecto a uno tan solo del grupo RHD) sino porque al retrasar el momento de la muerte en la mayoría de los conejos aporta un tiempo extra que puede ser

fundamental tanto para la obtención de un donante adecuado para realizar un trasplante o para que el propio hígado se recupere de forma espontánea.

5.2. Efectos de la NAC sobre la anatomía e histología hepática en conejos infectados con el virus de la RHD

Los animales infectados con el virus de la RHD presentaban claros síntomas de la enfermedad, observándose disnea respiratoria, anorexia, opistótonos, postración así como síntomas neurológicos (convulsiones, ataxia, parálisis de miembros posteriores) que progresaban rápidamente a un estado de coma y muerte cerebral en las fases más terminales lo que determinaba la muerte por FHF.

La necropsia de los animales infectados por el virus de la RHD mostraba la presencia de trombos en los principales vasos sanguíneos, más frecuentemente en la arteria pulmonar, suprahepática así como en ramas de la arteria aorta. Los órganos más afectados a nivel macroscópico eran sin duda el hígado y el pulmón; apreciándose en este último numerosas hemorragias. En la tráquea se observa un contenido espumoso sanguinolento y el hígado adquiere una consistencia friable y en ocasiones presenta zonas con hemorragias puntiformes. Todos nuestros hallazgos coinciden con los descritos con anterioridad por diversos autores (Capucci y cols., 1991; Ramiro-Ibañez y cols., 1999; Mikami y cols., 1999).

Desde el punto de vista histológico, la extensa necrosis coagulativa es un hallazgo clásico que aparece en el FHF (Rahman y Hodgson, 2000). La

RHD en conejos adultos es una enfermedad aguda y letal, y se considera como principal causa de muerte las múltiples y difusas zonas de necrosis y la CID en el hígado (Xu y Chen, 1989; Marcato y cols., 1991; Plassiart y cols., 1992). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo en los que se apreciaron en las muestras histológicas amplias zonas de necrosis asociadas con hemorragias e infiltrado inflamatorio (Tuñón y cols., 2003). También detectamos la presencia de microtrombos en pequeños vasos sanguíneos característicos de la CID. La CID ha sido extensamente descrita en distintos órganos de conejos fallecidos por el virus de la RHD (Marcato y cols., 1991; Fuchs y Weissenböck 1992; Ueda y cols., 1992). Algunos autores atribuyen la CID a la intervención secundaria de endotoxinas bacterianas tras la penetración del virus en los hepatocitos (Marcato y cols., 1988; Purcell y Ticehurst 1988). La NAC atenúa los daños observados mediante microscopía óptica; lo que puede ser debido a que logra recuperar el equilibrio entre estrés oxidativo y defensas antioxidantes que se ve alterado en el FHF.

Los hallazgos histológicos, en los animales que sobreviven a la enfermedad, confirman una clara recuperación del hígado alcanzando prácticamente una apariencia normal con la excepción de la existencia de abundante tejido fibrótico dividiendo al hígado en una especie de seudolóbulos.

En las muestras de los animales infectados no tratados se observan tanto células normales como apoptóticas en base a sus modificaciones hepáticas estructurales y en la condensación de la cromatina en el núcleo. Se observa asimismo una vacuolización del citoplasma de los hepatocitos situados en las proximidades de los focos inflamatorios así como el

hinchamiento de las mitocondrias con pérdida de las crestas mitocondriales y una menor densidad en la matriz mitocondrial lo cual puede ser indicativo de la presencia de apoptosis. Estos resultados coinciden con los obtenidos en conejos infectados con el virus de la RHD de 4 semanas de edad (Ferreira y cols., 2004) y con la presencia de células apoptóticas en muestras hepáticas de ratas a las que se les induce un FHF apreciándose la ultraestructura típica de agregación y condensación de la cromatina, cavidades en el núcleo y condensación del citoplasma con aumento del tamaño de las mitocondrias (Liu y cols., 2007).

Los resultados de inmunohistoquímica confirman la presencia del virus de la RHD en el tejido hepático ya a las 12 hpi; si bien en este momento su presencia se limita a un número pequeño de hepatocitos localizados en las áreas centroacinarias que incluso puede pasar inadvertido. A las 24 hpi el número de hepatocitos infectados es de aproximadamente el 25-30%, y alcanza a las 48 hpi a más de un 70% de hepatocitos; resultados que fueron similares a los obtenidos previamente en distintos estudios (Jung y cols., 2000; Prieto y cols., 2000).

5.3. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros plasmáticos en conejos infectados con el virus de la RHD

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que aproximadamente el 90% de los conejos mueren espontáneamente en un rango de tiempo definido, entre las 36 y las 48 hpi, con signos bioquímicos de FHF progresivo y coma. El daño hepático se hace evidente por los incrementos

significativos en las actividades de las transaminasas y de la bilirrubina que mostraron los animales infectados. Estas enzimas se localizan en los hepatocitos y en condiciones fisiológicas no son difundidas fuera de la célula; ahora bien, cuando el hepatocito es dañado y la membrana plasmática se rompe, se liberan al medio extracelular pudiendo detectarse niveles anormales en plasma. Las actividades AST y ALT se emplearon como indicativas del grado de daño hepático (Abboud, 2007; Alipour y cols., 2007). Unos niveles elevados de ALT se relacionan con procesos inflamatorios en el hígado (Schmitz y cols., 2006). Los niveles de ALT y AST se encuentran también incrementados en pacientes afectados de FHF (Doria y cols., 2007; Eisenbach y cols., 2007).

En nuestro estudio los conejos infectados tratados con la NAC se reduce de forma muy significativa la actividad de las diversas enzimas hepáticas que se ven incrementadas en el FHF indicando el efecto protector del compuesto sobre el daño hepático producido por el virus, lo que confirma otros resultados descritos previamente en los que la NAC consigue reducir los niveles de las transaminasas hepáticas en distintos modelos de daño hepático (Ronis y cols., 2005; Alipour y cols., 2007; Tahan y cols., 2007).

La disminución en las concentraciones de glucosa que detectamos en el grupo de animales infectados sin tratamiento y la alteración en su regulación podrían ser el resultado de un fallo tanto en la gluconeogénesis como en la depuración de la insulina en el hígado dañado (Sielaff y cols., 1995). Aunque la hipoglucemia también se produce en diferentes modelos animales de FHF en perro, cerdo y conejo (Blitzer y cols., 1978; Takada y cols., 2003), no es un resultado repetitivo y de hecho en muchos modelos animales la glucemia

apenas se modifica, lo cual parece ser una consecuencia de una gluconeogénesis compensadora del riñón y/o la inhibición de su captación por órganos periféricos (Eguchi y cols., 1996; Arai y cols., 2001). La corrección de los niveles de glucosa es un tratamiento que se realiza de forma rutinaria ante un caso de FHF y en nuestros resultados los animales tratados con NAC presentaron valores de glucemia significativamente superiores que los animales sin tratar.

5.4. Efectos de la NAC sobre diversos parámetros hepáticos en conejos infectados con el virus de la RHD

El hígado es altamente sensible a los mecanismos que se desencadenan durante el shock circulatorio, la CID, el trasplante hepático o cualquier proceso quirúrgico donde este órgano se encuentre involucrado. Durante estas condiciones patológicas pueden formarse EROs que ocasionan daños en diversas funciones celulares puesto que, por lo general, tienen la capacidad de unirse a lipoproteínas, ácidos nucleicos y proteínas modificando su estructura normal. De hecho, durante la respuesta inflamatoria aguda, la activación de los neutrófilos induce un daño en los tejidos por la producción y liberación de EROs y proteínas citotóxicas al líquido extracelular (Kettle y Winterbourn., 1997). Además las EROs pueden dañar directamente la mitocondria provocando un incremento de la permeabilidad mitocondrial lo que puede desencadenar tanto un proceso de muerte celular por apoptosis como necrosis. La decisión de que se produzca necrosis o apoptosis parece depender de la concentración celular de ATP (Leist y Nicotera, 1997).

Durante este proceso y en determinadas enfermedades hepáticas se produce un incremento en la generación de EROs que pueden llegar a superar las defensas antioxidantes del organismo y en consecuencia instaurar el denominado estrés oxidativo, lo que puede suponer un daño en los diferentes órganos y tejidos, entre ellos el hígado (Jung y Henke, 1996). Cuando las EROs comienzan a acumularse, los hepatocitos ponen en marcha sus mecanismos de defensa a través de varias enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, etc. (Meister y Anderson, 1983; Reddy y cols., 2004). Nuestros resultados ponen de manifiesto que en nuestro modelo de FHF la actividad de las principales enzimas antioxidantes disminuyen de forma significativa y que esta disminución es más acusada en los periodos finales de la infección como ya habíamos descrito en estudios previos (Sánchez-Campos y cols., 2004). Si bien la NAC mejora los resultados obtenidos, en ningún caso, consiguen alcanzar significación estadística con respecto a los obtenidos en el grupo de animales no tratados.

El GSH, principal antioxidante endógeno no enzimático, también juega un papel importante en la eliminación de las EROs al convertirse en GSSG a través de una reacción catalizada por la GPx, que protege la célula de los efectos dañinos de la mayoría de EROs, hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno (Michiels y cols., 1994). Este tripéptido está presente en el hígado en altas concentraciones (Hammond y cols., 2001) y tiene una gran importancia en la medida en que es la fuente de este tiol para muchos otros tejidos, siendo el origen del 90% del GSH circulante (Ji y cols., 1998). El glutatión es transportado desde el citosol, donde tiene lugar su síntesis, hasta la mitocondria donde actúa como sustrato antioxidante. La existencia de

alteraciones en la membrana mitocondrial puede disminuir el transporte de glutatión desde el citosol a la mitocondria (Krahenbuhl y cols., 1995). Dado que la mitocondria es el lugar principal donde se producen los RL, si existe alteración de la membrana y depleción del glutatión mitocondrial, se puede incrementar la producción de EROs facilitando así el desarrollo de estrés oxidativo. La depleción del glutatión origina una disminución de la capacidad antioxidante de los tejidos y es indicativa de un daño postisquémico (Casini y cols., 1987; Pompella y cols., 1988). Este proceso se asocia al desarrollo de enfermedades graves como intoxicaciones, diabetes, sepsis, procesos inflamatorios del pulmón, enfermedades coronarias y hepáticas, cáncer, pancreatitis y estados de inmunodeficiencia (Exner y cols., 2000; Arman y cols., 2001; Pastore y cols., 2003).

Nuestros datos ponen claramente en evidencia que el FHF inducido por el virus de la RHD cursa tanto con depleción del glutatión como con un incremento significativo en la relación GSSG/GSH. La relación GSSG/GSH es un índice muy útil para determinar el estrés oxidativo tanto en tejidos como en fluidos biológicos (Sies, 1999) coincidiendo con resultados que indican que la marcada disminución del glutatión intracelular conlleva a una mayor susceptibilidad de las células a ser dañadas por agentes citotóxicos en otras situaciones patológicas (Chen y Waxman, 1994).

Además, en nuestro modelo de FHF también se produce una marcada reducción en la actividad de las principales enzimas involucradas en la resistencia contra el estrés oxidativo como son la GPx, GRT y la GST (Sathyasaikumar y cols., 2007). Todo ello pone de manifiesto la importancia

que tiene el estrés oxidativo en esta patología y los efectos beneficiosos que se podrían obtener de su disminución.

La NAC es un compuesto tiólico que contiene un grupo sulfidrilo; favorece la síntesis de GSH, principalmente cuando la demanda está incrementada, como sucede durante el estrés oxidativo, o durante ciertos procesos patológicos (Cetinkaya y cols., 2005). La NAC estimula la síntesis de glutatión aumentando la actividad de la GST (De Vries y De Flora; 1993). La NAC es un potente antioxidante que favorece la eliminación de las EROs si bien es cierto que reacciona mejor con el ácido hipocloroso y con el radical hidroxilo que con el peróxido de hidrógeno y con el radical superóxido (Aruoma y cols., 1989). Existen numerosos estudios en los que se indica que el tratamiento con NAC mejora los niveles de GSH hepático en diferentes situaciones tales como el envejecimiento (Morrison y cols., 2005), diversos mecanismos de isquemia y reperfusión (Nagasaki y cols., 1998; Sener y cols., 2003, Sehirli y cols., 2003; Weinbroum 2005), tratamiento con etanol (Ronis y cols., 2005) y alta radiación (Mansour y cols., 2008) entre otros.

En nuestro estudio, sin embargo, el pretratamiento con NAC no se tradujo en un aumento significativo en los niveles de GSH y en la actividad de la GST lo que puede ser debido a que la administración del antioxidante se realizó en los periodos anteriores a la infección en los no existía una mayor demanda de glutatión. Además, nuestros estudios se realizaron desde las 12 hasta las 48 hpi, periodo de tiempo superior a las aproximadamente 8 horas en las que se ha establecido la vida media en plasma de la NAC (Burgunder y cols., 1989; Cotgreave 1987; Helbling y cols., 1996). Ahora bien, si hemos comprobado una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales en

la relación GSSG/GSH en los periodos finales de la enfermedad debido a que la NAC evita el aumento de la concentración del glutatión oxidado y pone de manifiesto, por tanto, la existencia de un menor estrés oxidativo en el grupo de conejos tratados con la NAC.

El incremento en el estrés oxidativo induce la apoptosis de hepatocitos y contribuye de forma importante a la patofisiología del FHF (Togo y cols., 2004; Eichhorst, 2005). Numerosos estudios relacionan el estrés oxidativo con la apoptosis. Se ha comprobado en cultivos celulares de HepG2 que una exposición a cadmio provoca la generación de EROs lo que desencadena un proceso de apoptosis en las mismas (Oh y Lim, 2006). Del mismo modo la exposición a H₂O₂ y FeSO₄ en ratas adultas provoca la apoptosis de miocitos ventriculares a través del camino dependiente de la mitocondria (Aoki y cols., 2002).

Por otra parte, la concentración de GSH en los tejidos es un importante factor en la protección contra la apoptosis (Masella y cols., 2005; Cazanave y cols., 2007), de forma que su depleción se ve frecuentemente acompañada de esta forma de muerte celular programada. Durante las fases más tempranas de la apoptosis las células tienden a exportar su GSH produciéndose un descenso importante de los niveles celulares de glutatión (Kaplowitz., 2000). Por ello, la NAC al estimular la síntesis de glutatión y mejorar los indicadores del estrés oxidativo, podría ejercer un efecto protector en la muerte celular por apoptosis principalmente a nivel mitocondrial.

5.5. Efectos de la NAC sobre marcadores de apoptosis en el hígado de conejos infectados con el virus de la RHD

El FHF se presenta por un desequilibrio entre la muerte y la regeneración hepatocelular (Thomson y Arthur, 1999). Por regla general se reconocen dos tipos principales de mecanismos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (Wyllie y cols., 1980; Riordan y Williams, 2003). La necrosis es una muerte celular incontrolada, a menudo es el resultado de un daño imprevisto y grave que conlleva la lisis celular y se acompaña de una respuesta inflamatoria. Por otro lado la apoptosis o muerte celular programada, es una muerte meticulosa, ordenada que conlleva la activación de numerosos genes y responde a estímulos tanto fisiológicos como patológicos. Si bien ciertos autores (Park y cols., 1995) describen el tipo de destrucción hepática en la RHD como típica de una necrosis, otros autores sugieren que la patología de la RHD es debida al proceso de apoptosis (Alonso y cols., 1998; Jung y cols., 2000; Ramiro-Ibañez y cols., 1999). Por ello parece probable que la anulación de esta vía llevaría a una mayor supervivencia de las células infectadas pudiendo prevenirse o alargar la supervivencia en este proceso.

Nuestros resultados indican la presencia en el tejido hepático de ambos tipos de muerte celular; confirmando, por tanto que en el FHF se encuentran implicados ambos procesos. Si bien, por los resultados que hemos obtenido hasta el momento, la muerte celular por apoptosis parece ser más manifiesta que la necrosis; sobre todo, teniendo en cuenta que las células apoptóticas son eliminadas por los fagocitos rápidamente y eso conlleva que con frecuencia se pueda infravalorar con la mayor parte de las técnicas al uso.

En nuestro modelo se observa una marcada fragmentación del ADN hepático así como la presencia de numerosas células apoptóticas características visualizadas mediante microscopía electrónica en las que se puede apreciar una marcada condensación de la cromatina así como una vacuolización del citoplasma, resultado que era de esperar dado que las EROs, presentes en nuestro modelo de FHF, causan daños a nivel del ADN e inducen citotoxicidad. Nuestros resultados revelan que la NAC, al incrementar las defensas antioxidantes endógenas entre otras posibles razones, reduce la fragmentación del ADN hasta niveles similares a los de un animal control. Dichos resultados coinciden con diversos estudios que demuestran que la NAC reduce los daños al ADN (Santra y cols., 2007; Mansour y cols., 2008).

Además, para confirmar que en el tejido hepático se produce apoptosis analizamos tanto la actividad como la expresión por inmunohistoquímica de la principal caspasa ejecutora de la apoptosis, la caspasa-3. De todas las caspasas, la caspasa-3 ha sido caracterizada como la más directamente vinculada a la apoptosis. Perteneciente a una familia de proteínas que se activa en cascada y que se expresa durante la apoptosis. La expresión inmunohistoquímica de la caspasa-3 pone de manifiesto *in situ* el número de células que experimentan apoptosis.

En las secciones de hígado pertenecientes al grupo RHD se observaron numerosas células positivas a caspasa-3 distribuidas por todo el parénquima hepático. Sin embargo, en el hígado de los animales tratados con la NAC las células positivas que se observan se sitúan principalmente en las zonas periportales, siendo el número de células positivas significativamente menor en relación con el grupo anterior. La NAC reduce el número de hepatocitos

apoptóticos al disminuir la activación de la caspasa-3. De igual modo la actividad de la caspasa-3 muestra un incremento marcado desde las 36 hpi en los conejos infectados obteniéndose unos valores significativamente menores en los conejos tratados con el antioxidante, coincidiendo con lo descrito en otros modelos animales de FHF (Wang y cols., 2007).

La activación de la caspasa-3 puede desencadenarse por distintas señales que involucran tanto receptores intra como extracelulares. Entre las muchas sustancias tóxicas que pueden desencadenar este proceso se encuentran las EROs que se producen en la mayoría de los tejidos en situaciones de isquemia, entre ellos en el hígado (Hiranuma y cols., 2007; Santra y cols., 2007). Estas sustancias pueden actuar bien a través de los receptores de membrana como el TNF y Fas, o bien dañando directamente la mitocondria, pudiendo desencadenar respectivamente, las denominadas vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. La decisión de que se produzca una u otra en muchos casos dependerá de la concentración celular de ATP (Leist y Nicotera, 1997).

En la vía extrínseca, la unión de diferentes ligandos como TNF y Fas, a sus receptores desencadena una cascada de reacciones que tendrá como consecuencia final la activación de caspasas efectoras y la muerte de la célula. En nuestro modelo hemos detectado una importante expresión del receptor Fas-L desde las etapas más tempranas de la enfermedad; de hecho ya a las 12 hpi se produce una estimulación muy marcada del mismo manteniéndose en estos niveles a lo largo del estudio sin que apreciáramos diferencias significativas ni entre los distintos periodos de estudio ni tras el tratamiento antioxidante.

Aunque no está totalmente aclarada la implicación de Fas-L en la patogénesis del FHF, se ha indicado que los pacientes afectados de FHF presentan unos niveles muy elevados del mismo (Mita y cols., 2005), al igual que en diversos modelos animales de daño hepático (Galle y cols., 1995; Zhang y cols., 2000). En nuestro modelo habíamos observado en estudios previos un incremento significativo en los niveles de TNF- α a partir de las 36 hpi (Sanchez-Campos y cols., 2004). Parece ser que Fas favorece la disminución del GSH hepático, debido a una salida del mismo de las células incrementando a su vez la concentración del GSSG posiblemente debido a la formación de EROs (Van den Dobbsteven y cols., 1996; Ding y cols., 2004). Un incremento en los niveles basales del GSH hepático previene la activación de Fas y por tanto la apoptosis (Cazanave y cols., 2007); en nuestro estudio, a pesar de que la NAC aumenta los niveles de GSH lo hace de forma insuficiente para inhibir el receptor Fas. Una vez expresado el ligando Fas, se une a su receptor transmembrana desencadenando una cascada de reacciones entre las que se encuentran la activación de caspasas iniciadoras como la caspasa-8 que tendrá como consecuencia final la activación por proteólisis de caspasas ejecutoras o efectoras tales como la caspasa-3 o -7.

En nuestro estudio si bien no encontramos diferencias significativas en la actividad caspasa-8 ni con el tratamiento ni con respecto a los animales control si observamos un ligero aumento de la misma tras la infección vírica. De hecho, los hepatocitos son considerados células en las que un incremento por pequeño que sea en la actividad de la caspasa-8 puede ser suficiente para inducir la apoptosis (Perez y cols., 2005). Todo ello nos sugiere que la activación de la vía extrínseca de la apoptosis podría actuar en nuestro modelo más bien a través de las diferentes vías de las proteínas kinasas activadas por

mitógenos (MAPK) que se encuentran activadas en numerosos procesos víricos como son la influenza, hepatitis C y otros (Sumbayev y Yasinka, 2006; Takeda y cols., 2008).

En la vía intrínseca de la apoptosis la mitocondria ejerce un papel clave; es la llave que coordina los centros específicos tanto de señales intrínsecas como extrínsecas de la apoptosis y experimenta marcados cambios morfológicos y bioquímicos durante esta muerte celular (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). La regulación de la apoptosis en esta vía es debida a la familia de Bcl-2; esta familia incluye miembros antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-X_L o Bcl-w y miembros proapoptóticos, como Bax, Bid o Bak.

Bcl-2 actúa previniendo la muerte celular, mientras que Bax, que forma heterodímeros con Bcl-2, parece acelerar las señales de muerte celular (Oltvai y cols., 1993) y la relación existente entre el miembro antiapoptótico Bcl-2 y el proapoptótico Bax determina la susceptibilidad de la célula a que se desencadene la apoptosis (Yang y Korsmeyer, 1996). En nuestro modelo de FHF se produce un incremento en la expresión de Bax mientras que, por el contrario, la de Bcl-2 se reduce significativamente a las 36 y 48 hpi en conejos no tratados con el antioxidante. El tratamiento con NAC logra prevenir significativamente estos cambios de forma que la relación existente entre Bax/Bcl-2 se mantiene prácticamente inalterada durante la infección experimental. La NAC atenúa la disminución de la expresión de la proteína Bcl-2 y el incremento de la proteína Bax inducida por la infección vírica, indicando el efecto antiapoptótico que la NAC ejerce a este nivel.

Una depleción en los niveles de ATP puede provocar la traslocación de Bax desde el citosol a la membrana mitocondrial externa por mecanismos que

no están totalmente esclarecidos. La traslocación de Bax provoca una disfunción de la mitocondria que origina un cambio en la permeabilidad del poro mitocondrial lo que incita la liberación al citosol de ciertas proteínas mitocondriales localizadas en el espacio intermembrana, como son el Cit-c, el factor inductor de apoptosis (AIF) o la endonucleasa G. En nuestro estudio, observamos un aumento en la expresión del Cit-c en el citosol en los animales infectados lo que respalda la implicación de la vía intrínseca en el mecanismo de la apoptosis en nuestro modelo animal. La NAC retrasa el aumento en la expresión de Cit-c hasta periodos posteriores de la infección, lo que sugiere el efecto protección del antioxidante. De hecho, se ha sugerido que el nivel sérico del Cit-c podría ser usado como un posible marcador del FHF en el hombre (Sakaida y cols., 2005).

Dentro de la mitocondria, en la cadena de transporte electrónico, el Cit-c se encuentra generando energía necesaria para la vida de la célula. Fuera de la mitocondria el mismo Cit-c es un activador de la apoptosis, puesto que se une con un cofactor específico conocido como Apaf-1 y la procaspasa-9 en presencia de dATP formando un complejo llamado apoptosoma. La procaspasa-9 sufre autoproteólisis, se vuelve activa y activa a su vez a otras caspasas como la caspasa-3 (Pandey y cols., 2000; Renatus y cols., 2001).

El AIF y la endonucleasa G una vez liberados pueden ser traslocados al núcleo y pueden participar en la fragmentación del ADN como se ha puesto de manifiesto en gran variedad de líneas celulares (Daugas y cols., 2000; van Loo y cols., 2001; Widlak y Garrard, 2005). AIF parece ser el responsable de la condensación de la cromatina y de la ruptura del ADN en fragmentos de peso molecular elevado (50-300 kb) (Susin y cols., 1999); en cambio, la

endonucleasa G parece ser la responsable de la ruptura del ADN en unidades oligonucleosomales responsables de la escalera del ADN en los geles de agarosa (Zhang y cols., 2003; Widlak y Garrard, 2005).

La caspasa-3 también se ve involucrada en la fragmentación del ADN puesto que activa la endonucleasa encargada de la fragmentación del ADN denominada CAD. Esta enzima se encuentra normalmente en el citoplasma de forma inactiva, por efecto del inhibidor ICAD que posee sitios de corte por caspasa-3. Durante el proceso de apoptosis, ICAD es degradado por la caspasa-3 y esto libera y permite la activación de la nucleasa CAD, que realiza su función sobre el núcleo de la célula. (Nagata, 2000).

Otros procesos se encuentran en asociación con las CAD para acelerar la apoptosis como, por ejemplo, la inactivación de enzimas implicadas en la reparación del ADN. El enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa o PARP, fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP está implicada en la reparación del DNA dañado, y funciona catalizando la síntesis de poli(ADP-ribosa), que se une a las cadenas rotas de ADN y modifica a las proteínas nucleares (Soldani y Scovassi, 2002). Esta capacidad de reparar las lesiones de ADN desaparece por efecto de las caspasas. La caspasa-3 es responsable de la ruptura de PARP, lo que provoca la aparición de un fragmento de 85-KDa que indica que la célula está sufriendo apoptosis.

En nuestro modelo se produce una significativa proteólisis de PARP puesta de manifiesto por la presencia de un fragmento de 85-KDa en el núcleo de las células hepáticas de los animales infectados a las 36 y 48 hpi lo que confirma a su vez la activación detectada de la caspasa-3; por el contrario, los animales tratados con el antioxidante muestran una menor proteólisis hepática

de PARP lo que se manifiesta en una menor activación de la caspasa-3 como ya se indicó anteriormente.

Todos nuestros resultados ponen pues de manifiesto que la NAC bloquea la apoptosis de un modo similar a como lo hacen algunos inhibidores de las caspasas (McGowan y cols., 1996; Chen y cols., 2005; Santra y cols., 2007). La NAC evita la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, previniendo la salida del Cit-c de la mitocondria al citosol, inhibiendo la fragmentación del ADN así como disminuyendo la activación de la caspasa-3 (Bajt y cols., 2006; Kin y cols., 2007; Wang y cols., 2007). Por ello, podría ser considerada no solo un excelente antídoto en los casos de FHF inducido por intoxicación por paracetamol, sino en otros procesos graves de FHF inducidos por agentes víricos.

6 CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Los resultados del presente estudio confirman que el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo induce en estos animales un fallo hepático fulminante, con características clínicas y bioquímicas que permiten considerar la infección experimental como un modelo animal idóneo de este síndrome en humanos.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La N-acetilcisteína alarga de forma significativa el tiempo de supervivencia de los conejos con fallo hepático fulminante inducido por la infección experimental con el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, lo que se traduce en un aumento de la ventana terapéutica para su resolución. Este efecto se produce sin que el antioxidante inhiba la infectividad del virus.

CONCLUSIÓN TERCERA

La N-acetilcisteína disminuye la oxidación del tripéptido glutatión en el hígado lo que conduce a una disminución de la relación existente entre las formas oxidada y reducida del mismo, que sugiere un papel protector frente al estrés oxidativo producido por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. El efecto antioxidante de la N-acetilcisteína puede jugar un papel en la inhibición de la apoptosis y en el aumento de supervivencia de los animales con fallo hepático fulminante tratados.

CONCLUSIÓN CUARTA

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo activa de forma significativa tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca de la apoptosis. De hecho, induce de forma significativa la expresión del receptor del ligando Fas desde las etapas más tempranas de la enfermedad e incrementa la expresión de la proteína proapoptótica Bax, la salida de citocromo-c de la mitocondria al citosol y la ruptura de la caspasa-3. La activación de la muerte celular por apoptosis se confirma por la presencia de fragmentación del ADN en gel de agarosa, la condensación de la cromatina del hepatocito y la marcada activación de la expresión inmunohistoquímica de la caspasa-3 en el parénquima hepático.

CONCLUSIÓN QUINTA

La administración de N-acetilcisteína a los conejos con fallo hepático fulminante no modifica significativamente la activación del ligando Fas, uno de los principales mediadores de la vía extrínseca de la apoptosis. Una posible causa de la falta de protección del antioxidante frente a dicha activación pudiera ser que la dosis utilizada del fármaco haya sido insuficiente para revertir la gran activación que produce el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo sobre dicho intermediario y/o que las vías de las quininas activadas por mitógenos sean predominantes en nuestro modelo animal de fallo hepático fulminante.

CONCLUSIÓN SEXTA

La N-acetilcisteína reduce la apoptosis en el fallo hepático fulminante producido en los conejos infectados por el virus de la enfermedad hemorrágica. Mejora la relación entre marcadores antiapoptóticos y proapoptóticos en beneficio de los primeros lo que evita la liberación del citocromo-c de la mitocondria al citosol, la activación de la caspasa-3, y la ruptura proteolítica de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa marcadores de la vía intrínseca de la apoptosis que se activan tras el daño mitocondrial. Esta acción antiapoptótica probablemente esté relacionada con la reducción del estrés oxidativo inducida por el antioxidante lo que implicaría un menor daño de diversos orgánulos que como la mitocondria regula la liberación y expresión de distintos mediadores de esta vía de la apoptosis.

CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos confirman el efecto protector de la N-acetilcisteína frente a las alteraciones oxidativas y la apoptosis en el modelo de fallo hepático fulminante inducido por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. El aumento significativo del tiempo de supervivencia de los conejos infectados tratados con el antioxidante puede ser vital para la resolución natural o terapéutica de dicho síndrome.

Dado que el fallo hepático fulminante está asociado con un alto riesgo de resultados fatales y que el trasplante ortotópico del hígado no siempre está disponible en el momento adecuado, la inhibición del estrés oxidativo y/o la intervención directa sobre las vías de la apoptosis pueden ser dianas moleculares para el uso terapéutico de antioxidantes que como la N-acetilcisteína contribuyen al soporte temporal en espera del trasplante o de que el hígado se regenere de forma espontánea.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abboud G y Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Drug Saf* 2007; 30: 277-294.
- Acharya SK, Panda SK, Saxena A, Gupta SD. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 473-479.
- Alipour M, Omri A, Smith MG, Suntres ZE. Prophylactic effect of liposomal N-acetylcysteine against LPS-induced liver injuries. *J Endotoxin Res* 2007; 13: 297-304.
- Almasio PL, Hughes RD, Williams R. Characterization of the molecular forms of fibronectin in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 2000; 6: 1340-1345.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
- Alonso C, Oviedo JM, Martín-Alonso JM, Díaz E, Boga JA, Parra F. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 1998; 143: 321-332.
- Anderson ME y Meister A. Inhibition of gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5029-5032.
- Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang SN, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178: 1541-1554.
- Andus T, Bauer J, Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991; 13: 364-375.

- Antonsson B y Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256: 50-57.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11615-11623.
- Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery of c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 10244-10250.
- Arai K, Lee K, Berthiaume F, Tompkins RG, Yarmush ML. Intrahepatic amino acid and glucose metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model. *Hepatology* 2001; 34: 360-371.
- Argüello JL, Llanos A, Pérez-Ordoño LI. Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Med Vet* 1988; 5: 645-650.
- Arman M, Rehnsfeldt A, Carlsson M, Hamrin E. Indications of change in life perspective among women with breast cancer admitted to complementary care. *Eur J Cancer Care* 2001; 10: 192-200.
- Armendariz-Borunda J, Katai H, Jones CM, Seyer JM, Kang AH, Raghow R. Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl₄ treatment. *Lab Invest* 1993; 69: 283-294.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-597.

- Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G, Ferran C. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 535-543.
- Assy N, Gefen H, Schlesinger S, Hussein O. The beneficial effect of N-acetylcysteine and Ciprofloxacin therapy on the outcome of ischemic fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3507-3510.
- Assy N y Minuk Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997; 26: 945-952.
- Atilasoy E y Berk PD. Fulminant hepatic failure: pathophysiology, treatment, and survival. *Annu Rev Med* 1995; 46: 181-191.
- Bajt ML, Cover C, Lemasters JJ, Jaeschke H. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicol Sci* 2006; 94: 217-225.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
- Baier JE, Neumann HA, Moeller T, Kissler M, Borchardt D, Ricken D. Radiation protection through cytokine release by N-acetylcysteine. *Strahlenther Onkol* 1996; 172: 91-98.
- Ballatori N, Jacob R, Boyer JL. Intrabiliary glutathione hydrolysis. A source of glutamate in bile. *J Biol Chem* 1986; 261: 7860-7865.

- Basile A y Jones E. Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1997; 25: 1303-1305.
- Bélanger M y Butterworth F. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metabolic Brain Disease* 2005; 20: 409-423.
- Belghiti J, Sommacale D, Dondéro F, Zinzindohoué F, Sauvanet A, Durand F. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *HPB (Oxford)* 2004; 6: 83-87.
- Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem* 2005; 280: 19012-19020.
- Bernal B. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United Kingdom. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 227-237.
- Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA, Wright PE. A trial of antioxidants and N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* 1997; 112: 164-172.
- Bernuau J. Acute liver failure: avoidance of deleterious cofactors and early specific medical therapy for the liver are better than late intensive care for the brain. *J Hepatol* 2004; 41: 152-155.
- Bernuau J y Durand F. Fulminating and subfulminating hepatic failure, emergency of prevention. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: 387-390.
- Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 97-106.

- Bihari D, Gimson A, Waterson M, Williams R. Tissue hypoxia during fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 1985; 13: 1034-1039.
- Bihari D, Gimson A, Williams R. Cardiovascular, pulmonary and renal complications of fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 119-128.
- Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transplant* 2000; 6: 32-40.
- Blei AT. Cerebral edema and intracranial hypertension in acute liver failure: distinct aspects of the same problem. *Hepatology* 1991; 13: 376-379.
- Blei AT. The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 2005; 47: 71-77.
- Blei AT. Brain edema in acute liver failure. *Crit Care Clin* 2008; 24: 99-114.
- Blei AT, Omary R, Butterworth RF. Animal models of hepatic encephalopathy. En: *Animal Models of Neurological Disease*. Boulton AA, Baker GB, Vutterworth AF, eds., Neuromethods Clifton: Humana. 1992; pp: 183-222.
- Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, Weise V, Kopin IJ, Walters I, Teychenne PF, Goodman DG, Berk PD. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978; 74: 664-671.
- Boelsterli UA, Zimmerman HJ, Kretz-Rommel A. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25: 207-235.

- Booy EP, Johar D, Kadkhoda K, Bay GH, Los M. The immune system, involvement in neurodegenerative diseases, ageing and cancer. *Curr Med Chem-Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2005; 4: 349-352.
- Boudjema K, Iderne A, Lutun P, Altieri M, Wolf P, Tempé JD, Jaeck D. Fulminating and subfulminating hepatitis. Surgical aspects in management and therapeutic prospects. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; 21: 412-422.
- Bray GP, Tredger JH, Williams R. S-adenosylmethionine protects against acetaminophen hepatotoxicity in two mouse models. *Hepatology* 1992; 15: 297-301.
- Burgunder JM, Varriale A, Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 127-131.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273-278.
- Capucci L, Scicluna MT, Lavazza A. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech* 1991; 10: 347-370.
- Caraceni P y Vanthiel DH. Acute liver failure. *Lancet* 1995; 345: 163-169.
- Carman JA, Garner MG, Catton MG, Thomas S, Westbury HA, Cannon RM, Collins BJ, Tribe IG. Viral haemorrhagic disease of rabbits and human health. *Epidemiol Infect* 1998; 121: 409-418.

- Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1624-1629.
- Casini AF, Mallaro E, Pompella A, Ferrari M, Comporti M. Lipid peroxidation, protein tiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 3689-3695.
- Castro M y Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome. *Clin Chest Med* 1996; 17: 35-48.
- Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, Lettéron P, Feldmann G, El-Benna J, Fromenty B, Robin MA, Pessayre D. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* 2007; 46: 858-868.
- Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206: 131-139.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Chandra S y Mehendale HM. Nutritional modulation of final outcome of hepatotoxic injury by energy substrates: an hypothesis for the mechanism. *Med Hypotheses* 1996; 46: 261-268.
- Chang HY y Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 821-846.

- Chen G y Waxman DJ. Role of cellular glutathione and glutathione-S-transferase in the expression of alkylating agent cytotoxicity in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1079-1087.
- Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandina D₂ and J₂ induced apoptosis in human leukaemia cell via activation of the caspasa 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochem et Biophys* 2005; 1743: 291-304.
- Chen Z y Ding YT. Functional evaluation of a new bioartificial liver system *in vitro* and *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1312-1316.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.
- Clemmensen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999; 29: 648-653.
- Colell A, García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodes J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondrial and mitoplast from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* 1997; 26: 699-708.
- Corcoran GB y Wong BK. Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine *in vivo*: studies with N-acetyl-D-cysteine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 54-61.

- Córdoba J. Tratamiento de la encefalopatía hepática. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25: 7-14.
- Córdoba J, Crespín J, Gottstein J, Blei A. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portocaval anastomosis. *Gastroenterology* 1999; 116: 686-693.
- Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 205-227.
- Cotgreave I, Eklund A, Larsson K, Moldeus PW. No penetration of orally administered N-acetylcysteine into bronchoalveolar lavage fluid. *Eur J Respir Dis* 1987; 70: 73-77.
- Cotgreave I, Moldeus P, Schuppe I. The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 13-26.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000; 14: 729-739.
- De Caro L, Ghizzi A, Costa R. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneim Forsch* 1989; 39: 382-385.
- De Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi G, De Flora A. *In vivo* effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1735-1745.

- De Vries N y De Flora S. N-acetyl-L-cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 17: 270- 277.
- De la Mata M, Meager A, Rolando N, Daniels HM, Nouri-Aria KT, Goka AK, Eddleston AL, Alexander GJ, Williams R. Tumor necrosis factor production in fulminant hepatic failure: relation to aetiology and superimposed microbial infection. *Clin Exp Immunol* 1990; 82: 479-484.
- DeLeve LD y Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 251-266.
- DeLeve LD y Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991; 52: 287-305.
- Demirkol O, Adams C, Ercal N. Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 8151-8154.
- Dempsey RJ y Kindt GW. Experimental acute hepatic encephalopathy: relationship of pathological cerebral vasodilation to increased intracranial pressure. *Neurosurgery* 1982; 10: 737-741.
- Deneke U y Rittersdorf W. Evaluation of the refluquant GPT (ALT) reagent carries with Reflotron. *Clin Chemi* 1984; 30: 1009.
- Devlin J, Ellis AE, McPeake J, Heaton N, Wendon JA, Williams R. N-acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. *Crit Care Med* 1997; 25: 236-242.
- Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol* (DOI 10,1007/s00280-007-0597-2).

- Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and *in vivo* levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1052-1058.
- Dickinson DA y Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002a; 64: 1019-1026.
- Dickinson DA y Forman HJ. Glutathione in defense and signalling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 2002b; 973: 488-504.
- Ding WX, Ni HM, DiFrancesca D, Stolz DB, Yin XM. Bid-dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology* 2004; 40: 403-413.
- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997; 71: 9923-9930.
- Doggrell SA. Suramin: potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13: 1361-1363.
- Doria C, Nicotra G, D'Antona GM, Travali S, Messina A, Marino I, Gruttadauria G. Prognostic index of acute hepato-cellular damage. *Ann Ital Chir* 2007; 78: 169-176.
- Duff JP, Chasey D, Munro R, Wooldridge M. European brown hare syndrome in England. *Vet Rec* 1994; 134: 669-673.
- Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 337-343.

- Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, Rozga J. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology* 1996; 24: 1452-1459.
- Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, Middleton Y, Demetriou AA, Rozga J. Loss and recovery of liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *J Surg Res* 1997; 72: 112-122.
- Eichhorst ST. Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9: 83-99.
- Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Merle U. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1711-1714.
- Escorsell A, Mas A, de la Mata M. Spanish Group for the Study of Acute Liver Failure. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007; 13: 1389-1395.
- Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112: 610-616.
- Feranchak AP, Tyson RW, Narkewicz MR, Karrer FM, Sokol RJ. Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver Transpl Surg* 1998; 4: 469-476.
- Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006; 313: 1581-1582.

- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol induced defect. *Am J Physiol* 1997; 273: 7-17.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJR, Águas AP. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 2004; 76: 83-94.
- Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A, Trebeden H, Jaffray P, Malassagne B, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001; 33: 1173-1180.
- Filipponi F, Boggi U, Meacci L, Burchielli S, Vistoli F, Bellini R, Prota C, Colizzi L, Kusmic C, Campani D, Gneri C, Trivella MG, Mosca F. A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery* 1999; 125: 448-455.
- Filipponi F, Fabbri LP, Marsili M, Falcini F, Benassai C, Nucera M, Romagnoli P. A new surgical model of acute liver failure in the pig: experimental procedure and analysis of liver injury. *Eur Surg Res* 1991; 23: 58-64.
- Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4865-4872.
- Frank PG y Lisanti MP. Caveolin-1 and liver regeneration: role in proliferation and lipogenesis. *Cell Cycle* 2007; 6: 115-116.

- Fruhauf NR, Oldhafer KJ, Westermann S, Sotiropoulos GC, Kaiser GM. Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *J Invest Surg* 2004; 17: 163-171.
- Fuchs A y Weissenböck H. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *J Com Pathol* 1992; 107: 103-113.
- Fukueda M, Ishizaki N, Hamada N, Kadono J, Kaieda M, Nakamura N, Komokata T, Sakata R. Porcine model of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure. *Transplantation* 2006; 82: 1312-1318.
- Fukuzawa K, Emre S, Senyuz O, Acarli K, Schwartz ME, Millar CM. N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation* 1995; 59: 6-9.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182: 1223-1230.
- Gao Y, Mu N, Xu XP, Wang Y. Porcine acute liver failure model established by two-phase surgery and treated with hollow fiber bioartificial liver support system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5468-5474.
- Gecelter GR y Comer GM. Nutritional support during liver failure. *Crit Care Clin* 1995; 11: 675-683.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11: 337-345.

- Gohil K, Viguie C, Stenby BB, Brooks GA, Packer L. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 1988; 64: 115-119.
- González-Mangado N y Morera Prat J. Cell oxidative processes and antioxidant mucoactive drugs. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 407-410.
- Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, Westbury HA. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus: use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res* 1997; 47: 7-17.
- Grabhorn E, Richter A, Burdelski M, Rogiers X, Ganschow R. Neonatal hemochromatosis: long-term experience with favorable outcome. *Pediatrics* 2006; 118: 2060-2065.
- Green DR y Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- Gregory S y Kelly ND. Clinical application of N-acetylcysteine. *Alternat Medic Review* 1998; 2: 114-127.
- Gregus Z, Madhu C, Klaassen CD. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen *in vivo*: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 91-99.
- Guicciardi ME y Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033.

- Guntzler WA y Floké L. Glutathione peroxidase. En: *Handbook of Methods for oxygen radical research*. Ed. R.A. Greenmald. CRC Press. Boca Ratón. 1985 pp. 285-290.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Hammond CL, Lee TK, Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 2001; 34: 946-954.
- Harrison P, Keays R, Bray G, Alexander G, Williams R. Improved outcome in paracetamol-induced FHF following late administration of *N*-acetylcysteine. *Lancet* 1990; 335: 1572-1573.
- Harrison PM, Wendon JA, Gimson AES, Alexander GJM, Williams R. Improvement by acetylcysteine of haemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991; 324: 1852-1857.
- Hashemi M y Krocak TJ. Apoptosis and Autoimmune Disease. *Curr Med Chem-Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2005; 4: 429-437.
- Hashimoto K, Minagawa H, Yanagi Y. Caspase-dependent apoptosis in fulminant hepatic failure induced by herpes simplex virus in mice. *J Hepatol* 2003; 39: 773-778.
- He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 423-425.

- Helbling B, Von Overbeck J, Lauterburg BH. Decreased release of glutathione into the systemic circulation of patients with HIV infection. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 38-44.
- Hiranuma S, Ito K, Noda Y, Ozasa H, Koike Y, Horikawa S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2167-2172.
- Hissin PJ y Hill R. A fluorimetric method for determination of oxidised and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-226.
- Hoffer E, Baum Y, Tabak A, Taitelman U. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 1996; 84: 7-12.
- Hoofnagle JH, Carithers RL, Shapiro C, Ascher N. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 1995; 21: 240-252.
- Horvitz HR y Shaham S. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 1996; 10: 578-591.
- Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 2004; 134: 149-152.
- Huang CS, Moore WR, Meister A. On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2464-2468.

- Inoue M, Arias IM, Popper H, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA. Pathology of reactive oxygen species: bridging basic science and clinical medicine. En: *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, NY 1992; pp: 443-454.
- Issels RD y Nagele A. Promotion of cystine uptake, increase of glutathione biosynthesis, and modulation of glutathione status by S-2-(3-aminopropylamino)ethyl phosphorothioic acid (WR-2721) in Chinese hamster cells. *Cancer Res* 1989; 49: 2082-2086.
- Itinose AM, Sakuno ML, Bracht A. Metabolic effects of acetaminophen. Studies in the isolated perfused rat liver. *Cell Biochem Funct* 1989; 7: 263-273.
- Jacob RA y Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 985-990.
- Jalan R. Acute liver failure: current management and future prospects. *J Hepatol* 2005; 42: 115-23.
- Jalan R y Haynes P. Hepatic encephalopathy and ascites. *Lancet* 1997; 350: 1309-1315.
- Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, Bejma J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 102-117.
- Jung JY, Lee BJ, Tai JH, Park JH, Lee YS. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J Comp Pathol* 2000; 123: 135-140.
- Jung K, Henke W. Development changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 613-617.

- Kaita KD, Assy N, Gauthier T, Zhang M, Meyers AF, Minuk GY. The beneficial effects of ciprofloxacin on survival and hepatic regenerative activity in a rat model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1998; 27: 533-536.
- Kannan K y Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Phatophysiology* 2000; 7: 153-167.
- Kanno S, Ishikawsa M, Takayanagi M, Sasaki K. Potentation of acetaminophen hepatotoxicity by doxapram in mouse cultured hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 446-550.
- Kao LW, Kirk MA, Furbee RB, Mehta NH, Skinner JR, Brizendine EJ. What is the rate of adverse events after oral N-acetylcysteine administered by the intravenous route to patients with suspected acetaminophen poisoning?. *Ann Emerg Med* 2003; 42: 741-750.
- Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000; 32: 29-47.
- Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000; 47: 167-175.
- Kaya H, Koc A, Sogut S, Duru M, Yilmaz HR, Uz E, Durgut R. The protective effect of N-acetylcysteine against cyclosporine A-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 15-20.
- Keasy R, Harrison PM, Wendon JA, Forbes A, Gove C, Alexander GJ, Williams R. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *BMJ* 1991; 26: 1026-1029.
- Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3: 114-127.

- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 279-290.
- Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Kettle AJ y Winterbourn CC. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Report* 1997; 3: 3-15.
- Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. Acute liver failure: a review. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 239-258.
- Kiechle FL y Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002; 326: 27-45.
- Kim KM, Kim YM, Park M, Park K, Chang HK, Park TK, Chung HH, Kang CY. A broad-spectrum caspase inhibitor blocks concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Immunol* 2000; 97: 221-233.
- Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappaB translocation and TNFalpha release. *Shock* (en prensa).
- Kjaergard L, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *Jama* 2003; 289: 217-222.

- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria, a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-1326.
- Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59: 1693-1700.
- Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22: 607-612.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 2: 1463-1467.
- Kuthan H y Ullrich V. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* 1982; 126: 583-588.
- Ladurner R, Hochleitner B, Schneeberger S, Barnas U, Krismer A, Kleinsasser A, Offner F, Königsrainer I, Margreiter R, Königsrainer A. Extended liver resection and hepatic ischemia in pigs: a new, potentially reversible model to induce acute liver failure and study artificial liver support systems. *Eur Surg Res* 2005; 37: 365-369.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

- Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* 1995; 22: 1661-1665.
- Larsen FS, Hansen BA, Ejlersen E, Knudsen GM, Tygstrup N, Secher NH. Functional loss of cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 1995b; 23: 212-217.
- Larsen FS, Olsen KS, Ejlersen E, Hansen BA, Paulson OB, Knudsen GM. Cerebral blood flow autoregulation and transcranial doppler ultrasonography in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1995a; 22: 730-736.
- Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effects of N-acetylcysteine. *Chest* 1996; 109: 163-166.
- Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H. Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response oxidative to oxidative stress. *J Clin Invest* 1984; 73: 124-133.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005; 118: 265-267.
- Lee WM. Acute liver failure. *New Engl J Med* 1993; 324: 273-275.
- Lee WM. Medical management of acute liver failure. En: Lee WM, Williams R, editors. *Acute Liver Failure* 1^a ed. Cambridge University Press, Cambridge. 1997; pp:115-131.

- Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbrunch T, Spengler U. Anti-apoptotic function of gelsolin in Fas antibody-induced liver failure *in vivo*. *Am J Pathol* 2006; 168: 778-785.
- Leist M y Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 1-9.
- Liang TJ, Jeffers L, Reddy RK, Silva MO, Cheinquer H, Findor A, De Medina M, Yarbough PO, Reyes GR, Schiff ER. Fulminant or subfulminant non-A, non-B viral hepatitis: the role of hepatitis C and E viruses. *Gastroenterology* 1993; 2: 556-562.
- Lieber CS, Casini A, de Carli LM, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol induced liver injury in the baboon. *Hepatology* 1990; 11: 165-172.
- Lindenboim L, Yuan J, Stein R. Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene* 2000; 19: 1783-1793.
- Liu LM, Zhang JX, Luo J, Guo HX, Deng H, Chen JY, Sun SL. A role of cell apoptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced nonlethal liver injury in D: -galactosamine (D: -GalN)-sensitized rats. *Dig Dis Sci* 2007; doi: 10.1007/s10620-007-9994-y.
- Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Quian NH. A new viral disease in rabbits. *Animal Hus Vet Med* 1984; 16: 253-255.
- Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies, integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
- Lomaestro BM y Malone CM. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 1263-1273.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall AJ. Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 1999; 13: 1169-1183.
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 95-116.
- Machlin LJ y Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1: 441-445.
- Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, Tanaka K, Shimizu T, Matsuo K, Nagashima Y, Shimada H. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res* 2005; 127: 171-176.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?. *Hepatology* 2006; 43: 31-44.
- Mann FC. Studies in the physiology of the liver: I. Technique and general effects of removal. *Am J Med Sci* 1921; 161: 37-42.
- Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 773-780.
- Marcato PS, Benazz IC, Vecchi G, Della Salda L. L'epatite necrotica infettiva del coniglio. Profilo patogenico di una nova malattia hemorrágica. *Riv Conigliocultura* 1988; 25: 59-64.

- Marcato PS, Benazz IC, Vecchi G, Galeotti M. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare síndrome. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 1991; 10: 371-392.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 15: 206-210.
- Mas A y Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 1997; 349: 1081-1085.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel Mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577-586.
- Master S, Gottstein J, Blei AT. Changes of brain water and cerebral blood flow in a hyperammonemic model of brain edema. *Hepatology* 1998; 28: 335-689.
- Mates JM, Pérez-Gomez C, Nuñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- Mayberg TS y Lam AM. Jugular bulb oximetry for the monitoring of cerebral blood flow and metabolism. *Neurosurg Clin N Am* 1996; 7: 755-765.
- Mayoral R, Fernández-Martínez A, Roy R, Boscá L, Martín-Sanz P. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 2007; 46: 813-822.
- McCarthy M y Wilkinson ML. Hepatology: Recent Advances. *BMJ* 1999; 318: 1256-1259.

- McGowan AJ, Fernandes RS, Samali A, Cotter TG. Antioxidants and apoptosis. *Bioche Soc Trans* 1996; 24: 229-233.
- McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 221-227.
- McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Regulation of cell volume in health and disease. *N Eng J Med* 1995; 333: 1260-1264.
- Meister A y Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-760.
- Metselaar HJ, Hesselink EJ, de Rave S, ten Kate FJ, Lameris JS, Groenland TH, Reuvers CB, Weimar W, Terpstra OT, Schalm SW. Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation. *Lancet* 1990; II: 1156-1157.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit haemorrhagic disease virus molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 1991; 184: 664-676.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Ramacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu, Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1994; 17: 235-248.
- Mikami O, Park JH, Kimura T, Ochii K, Itakura C. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 1999; 66: 237-242.
- Misra I y Griffith OW. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 18: 313-329.

- Mita A, Hashikura Y, Tagawa Y, Nakayama J, Kawakubo M, Miyagawa S. Expression of Fas ligand by hepatic macrophages in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2551-2559.
- Mizock BA y Falk JL. Lactic acidosis in critical illness. *Crit Care Med* 1992; 20: 80-93.
- Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50: 31-42.
- Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Takahashi S, Matsuo K, Tomaru Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Shimada H. Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 352-359.
- Morrison JP, Coleman MC, Aunan ES, Walsh SA, Spitz DR, Kregel KC. Thiol supplementation in aged animals alters antioxidant enzyme activity after heat stress. *J Appl Physiol* 2005; 99: 2271-2277.
- Moumen A, Leraci A, Patané S, Solé C, Comella JX, Dono R, Maina F. Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology* 2007; 45: 1210-1217.
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; 2: 72-74.

- Nagasaki H, Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Baek Y, Yamaguchi M, Kumada K. Efficacy of preconditioning with N-acetylcysteine against reperfusion injury after prolonged cold ischemia in rat liver in which glutathione had been reduced by buthionine sulfoximine. *Eur J Surg* 1998; 164: 139-146.
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000; 256: 12-18.
- Nakamura H, Masutani H, Yodoi, J. Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 455-464.
- Nakata K, Kawase M, Ogino S, Kinoshita C, Murata H, Sakaue T, Ogata K, Ohmori S. Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. *Mech Ageing Dev* 1996; 90: 195-207.
- Nakazawa K, Ijima H, Fukuda J, Sakiyama R, Yamashita Y, Shimada M, Shirabe K, Tsujita E, Sugimachi K, Funatsu K. Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *Int J Artif Organs* 2002; 25: 51-60.
- Navasa M, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Riera JR, Bañares R, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Portal hypertension in acute liver failure. *Gut* 1992; 33: 965-968.
- Newmeyer D D y Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; 112: 480-490.
- Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 2000; 6: 21-31.

- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 219-234.
- Nourjah P, Ahmad SR, Karwoski C, Willy M. Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15: 398-405.
- Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.
- Oertel M y Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 61-74.
- O'Grady JG. Acute liver failure. En: *Comprehensive Clinical Hepatology*. O'Grady JG, Lake JR, Howdle PD, eds. London, England: Mosby-Yearbook Inc 2000; pp: 1-30.
- O'Grady JG. Acute Liver Failure. *Postgrad Med J* 2005; 81: 148-154.
- O'Grady JG. Modern management of acute liver failure. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 291-303.
- O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 439-445.
- O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342: 273-275.

- O'Grady JG y Williams R. Acute liver failure. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1989; 3: 75-89.
- Oh SH y Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212: 212-223.
- Ohlinger RF, Hass B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ. Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J Virol* 1990; 64: 3331-3336.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
- Oltvai ZN y Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79: 189-192.
- Ookhtens M y Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cysteine. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 313-329.
- Orlowski M y Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67: 1248-1255.
- Palet T y Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1745.
- Pan HY, Hou GQ, Tong YX. Effects of N-acetylcysteine on serum IL-18 level in sever hepatitis patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 656-659.

- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 2000; 19: 4310-4322.
- Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompilla A. Glutathione catabolism as a synthetase. *Protein Exp Purif* 2002; 13: 268-276.
- Papaevangelou G, Tassopoulos N, Roumeliotou-Karayannis A, Richardson C. Etiology of fulminant viral hepatitis in Greece. *Hepatology* 1984; 4: 369-372.
- Park JH, Lee Y, Itakura C. Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit hemorrhagic disease. *Lab Anim Sci* 1995; 45: 445-449.
- Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidants enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997; 27: 363-370.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003, 333: 19-39.
- Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 824-829.
- Peinado J, Florindo J, García-Alfonso C, Martínez-Galisteo E, Llobell A, López-Barea J. Metals are directly involved in the redox interconversion of *Sacharomyces cerevisiae* glutathione reductase. *Molec Cell Biochem* 1991; 101: 175-187.

- Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2005; 43: 324-332.
- Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin A, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol* 1999; 31: 760-770.
- Pinto MC, Mata AM, Lopez-Barea J. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys* 1984; 228: 1-12.
- Plassiart G, Guelfi JF, Ganieri JP, Wang B, André-Fontaine G, Wyers M. Haematological parameters and visceral lesions relationship in rabbit viral haemorrhagic disease. *J Vet Med* 1992; 39: 443-453.
- Pompella A, Romani A, Fulceri R, Benedetti A, Comporti M. 4-Hidroxy-nonenal and other lipid peroxidation products are formed in mouse liver following intoxication with allyl alcohol. *Bioch et Biophys Acta* 1988; 961: 293-298.
- Pratt S e Ioannides C. Mechanism of the protective action of N-acetylcysteine and methionine against paracetamol toxicity in the hamster. *Arch Toxicol* 1985; 57: 173-177.
- Previs JN, Schina M, Hayes PC. The management of acute liver failure. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 405-418.

- Prieto JM, Fernández F, Álvarez V, Espi A, García Marín JF, Álvarez M, Martín JM, Parra F. Immunohistochemical localization of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 2000; 68: 181-187.
- Purcell RH y Ticehurst JR. Enterically-transmitted non-A non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. En: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R Liss NY 1988; 131-137.
- Rahman TM y Hodgson HJF. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 145-157.
- Rahman TM, Selden AC, Hodgson JF. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg Res* 2002; 106: 264-272.
- Ramalingaswami V y Purcell RH. Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1988; 1: 571-573
- Ramiro-Ibañez F, Martín-Alonso JM, García Palencia P, Parra F, Alonso C. Macrophage tropismo of rabbit haemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 1999; 60: 21-28.
- Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 2004; 368: 15-20.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-1430.
- Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 2001; 7: 314-319.
- Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008; 111: 3322-3330.

Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14250-14255.

Ring-Larsen H y Palazzo U. Renal failure in fulminant hepatic failure and terminal cirrhosis: a comparison between incidence, type and prognosis. *Gut* 1981; 22: 585-591.

Riordan SM y Williams R. Fulminant hepatic failure. *Clin Liver Dis* 2000; 4: 25-45.

Riordan SM y Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 203-215.

Rolando N, Gimson A, Wade J, Philpott-Howard J, Casewell M, Williams R. Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure. *Hepatology* 1993; 17: 196-201.

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000; 32: 734-739.

Ronis MJ, Butura A, Sampey BP, Shankar K, Prior RL, Korourian S, Albano E, Ingelman-Sundberg M, Petersen DR, Badger TM. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 619-630.

- Rosell JM, Argüello JL, Badiola JI, Cuervo L. Enfermedad hemorrágica vírica. En: *Enfermedades del Conejo*. Tomo II. Ed. Mundi Prensa 2002; pp 331-343.
- Rosser BG y Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-275.
- Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S, Hayashi N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2047-2055.
- Sakaida I, Kimura T, Yamasaki T, Fukumoto Y, Watanabe K, Aoyama M, Okita K. Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans. *J Gastroenterol* 2005; 40: 179-185.
- Sambrook J y Russell D. Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. En: *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. Sambrook J, Russell D. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 2001; pp: 5.1-5.86.
- Sánchez-Campos S, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 2004; 144: 215-222.
- Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 146-155.

- Sarnstrand B, Tunek A, Sjodin K, Hallberg A. Effects of N-acetylcysteine stereoisomers on oxygen-induced lung injury in rats. *Chem Biol Interact* 1995; 94: 157-164.
- Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, Murthy ChR, Dutta Gupta A, Senthilkumaran B, Reddanna P. Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res* 2007; 32: 517-524.
- Schmitz V, Dombrowski F, Prieto J, Qian C, Diehl L, Knolle P, Sauerbruch T, Caselmann WH, Spengler U, Leifeld L. Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure. *Hepatology* 2006; 44: 430-439.
- Schneider F, Lutun P, Boudjema K, Wolf P, Tempé JD. *In vivo* evidence of enhanced guanylyl cyclase activation during the hyperdynamic circulation of acute liver failure. *Hepatology* 1994; 19: 38-44.
- Schwartzman RA y Cidlowski LA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993; 14: 133-151.
- Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dülger G. Protective effects of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in rat. *J Nephrol* 2003; 16: 75-80.
- Sen S, Rose C, Ytrebo LM, Davies NA, Nedredal GI, Drevland SS, Kjønnø M, Prinzen FW, Hodges SJ, Deutz NE, Williams R, Butterworth RF, Revhaug A, Jalan R. Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: a randomized study. *Crit Care Med* 2006; 34: 158-164.

- Sener G, Tosun O, Sehirli AÓ, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoglu-Dülder G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003; 72: 2707-2717.
- Sergi C, Adam S, Kahl P, Otto HF. Study of the malformation of ductal plate of the liver in Meckel syndrome and review of other syndromes presenting with this anomaly. *Pediatr Dev Pathol* 2000; 3: 568-583.
- Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N, Blesa S, Martinez-Losa M, Cortijo J, Estrela JM, Morcillo EJ, Bulbena O. *In vivo* antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1037-1048.
- Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10663-10668.
- Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS, Cerra FB. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1995; 21: 796-804.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 916-921.
- Sies H, Batoli GM, Burk RF, Waydhas C. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drugs oxidation, and in selenium deficiency. *Eur J Biochem* 1978; 89: 113-118.
- Sjödin K, Nilsson E, Hallberg A, Tunek A. Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the acetylation and consequences for the oral bioavailability. *Biochem Pharmacol* 1989; 42: 13-26.

- Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
- Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanism in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc* 1987; 46: 1-12.
- Sloviter RS. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 19-24.
- Soldani C y Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 2002; 7: 321-328.
- Spies CD, Reinhart K, Witt I, Meier-Hellmann A, Hannemann L, Bredle DL, Schaffartzik W. Influence of *N*-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective, randomised, double-blind study. *Crit Care Med* 1994; 2: 1738-1746.
- Stadlbauer V, Davies NA, Sen S, Jalan R. Artificial liver support systems in the management of complications of cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 96-109.
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabelled antibody enzyme method of immunohisto-chemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex horseradish-D peroxidase anti-horseradish-D peroxidase and it use in the identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 315-333.
- Stockmann HB, Hiemstra CA, Meijer R, Marquet RL, IJzermans JN. Acute liver failure attenuates hyperacute xenograft rejection. *Transplant Proc* 2000; 32: 1114-1115.

- Strauss G, Hansen BA, Kirkegaard P, Rasmussen A, Hjortrup A, Larsen FS. Liver function, cerebral blood flow autoregulation and hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1997a; 25: 837-839.
- Strauss G, Hansen BA, Knudsen GM, Larsen FS. Hyperventilation restores autoregulation in patients with acute liver failure. *J Hepatol* 1997b; 28: 199-203.
- Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000; 119: 446-460.
- Strom S y Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 568-571.
- Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-565.
- Sumbayev VV y Yasinska IM. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand J Immunol* 2006; 63: 391-400.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.

- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3348-3354.
- Takada Y, Ishiguro S, Fukunaga K. Large-animal models of fulminant hepatic failure. *J Artif Organs* 2003; 6: 9-13.
- Takeda K, Noguchi T, Naguro I, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 199-225.
- Tenenbein M. Hypersensitivity-like reactions to N-acetylcysteine. *Vet Hum Toxicol* 1984; 26: 3-5.
- Terada T y Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995; 146: 67-74.
- Terblanche J y Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 770-774.
- Thomson RK y Arthur MJ. Mechanisms of liver cell damage and repair. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 949-955.
- Thornberry NA y Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Togo S, Kubota T, Matsuo K, Shimizu T, Momiyama N, Takeda K, Tanaka K, Endo I, Sekido H, Shimada H. Mechanisms of liver failure after hepatectomy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105: 658-663.

- Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, Streetz K, Licato L, Manns MP, Tiegs G. Concanavalina A- induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology* 1998; 114: 1035-1045.
- Trey C y Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970; 3: 282-298.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443.
- Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, García-Ferreras J, Álvarez M, Jorquera F, González-Gallego J. Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 272-278.
- Turrens JF, Alexander A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 229: 104-111.
- Tygstrup N y Ranek L. Fulminant hepatic failure. *Clin Gastroenterol* 1981; 10: 191-208.
- Tygstrup N y Ranek L. Assesment of prognosis in fulminant hepatic failure. *Sem Liv Dis* 1986; 6: 129-137.
- Ueda K, Park JH, Ochiaie K, Itakura C. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Japn J Vet Res* 1992; 40: 133-141.

- Valla D, Flejou JF, Lebrec D, Bernuau J, Rueff B, Salzman JL, Benhamou JP. Portal hypertension and ascites in acute hepatitis: clinical, hemodynamic and histological correlations. *Hepatology* 1989; 10: 482-487.
- Van den Dobbsteven DJ, Nobel SI, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AFG. Rapid and specific efflux of reduced GSH during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* 1996; 271: 15420-15427.
- Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenameele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 2001; 8: 1136-1142.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 130-139.
- Vink KL, Schuurman W, Van Gansewinkei R. Direct spectrophotometry of bilirubin in serum of the newborn, with use of caffeine reagent. *Clin Chem* 1988; 34: 67-70.
- Wang H, Xu DX, Lu JW, Zhao L, Zhang C, Wei W. N-acetylcysteine attenuates lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1803-1809.

- Wang YM, Feng GH, Huang F, Li Y, Zhao GZ. Tumor necrosis factor-alpha, caspase-3 expression and hepatocyte apoptosis in fulminanting hepatic failure. *Zhonghua nei ke za zhi* 2003; 42: 566-567.
- Webber EM, Bruix J, Pierce Rh, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28: 1226-1234.
- Weinbroum AA. N-acetyl-L-cysteine mitigates aortic tone injury following liver ischemia-reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 509-515.
- Weisshaar D, Gossrau E, Faderl B. Normal ranges of alpha-HBDH, LDH, AP, and as measured with substrate-optimized test charges. *Med Welt* 1975; 26: 387-392.
- Wendon JA y Ellis AJ. Circulatory derangements, monitoring, and mangement. Heart, kidney and brain. En: *Acute Liver Failure*. Lee WM, Williams R eds. Cambridge University Press, Cambridge. 1997; pp:132-143.
- Werner W, Rey HG, Wielinger Z. Determination of the activity of key enzymes in the human adipose tissue. *Analyt Chem* 1970; 252: 224-227.
- Whitehouse LW, Wong LT, Paul CJ, Pakuts A, Solomonraj G. Postabsorption antidotal effects of N-acetylcysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 431-437.
- Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 2005; 94: 1078-1087.

- Williams R. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 343-348.
- Williams R. Clasification and clinical syndromes of acute liver failure. En: *Acute Liver Failure*. Lee WM, Williams R eds. Cambridge University Press, Cambridge. 1997; pp: 1-9.
- Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DCS. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 4053-4056.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movements of bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1281-1292.
- Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 424-431.
- Wyllie A, Kerr J, Currie A. Cell death: the significance apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- Xu ZJ y Chen WX. Viral haemorrhagic disease in rabbits. A review. *Vet Res Comm* 1989; 13: 205-212.
- Yang J y Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: a discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- Ytrebo LM, Korvald C, Nedredal GI, Elvenes OP, Nielsen Grymyr OJ, Revhaug A. N-acetylcysteine increases cerebral perfusion pressure in pigs with fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2001; 29: 1989-1995.

- Ytrebo LM, Nedredal GI, Langbakk B, Revhaug A. An experimental large animal model for the assessment of bioartificial liver support systems in fulminant hepatic failure. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1077-1088.
- Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, Dean NM. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 862-867.
- Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, Lou D, Wells JM, Olivares-Villagómez D, Van Kaer L, Wang X, Xu M. Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15782-15787.
- Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42: 513-520.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549-11556.

