

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS ALCOHOL Y
ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS EN LA
REGENERACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR EL
MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATECTOMÍA
PARCIAL.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA VERÓNICA LÓPEZ VALENCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ

MÉXICO, DF.

MARZO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

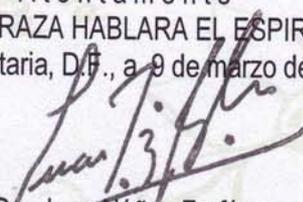
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de diciembre del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS de la alumna **LÓPEZ VALENCIA MARÍA VERÓNICA** con número de cuenta **79075033** y número de expediente **3921076**, con la tesis titulada: "**Participación de las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas en la regeneración hepática inducida por el modelo experimental de hepatectomía parcial**", bajo la dirección del Dr. **Rolando E. Hernández Muñoz**.

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Vocal:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Vocal:	Dr. Gabriel Gutiérrez-Ospina
Vocal:	Dr. Edgardo Escamilla Marván
Secretario:	Dr. Rolando Hernández Muñoz
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Suplente:	Dra. Marina Macías Silva

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de marzo del 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos y un enorme reconocimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y a la **Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)** por el apoyo económico que me brindaron desde el inicio de mi trabajo como estudiante de doctorado.

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Dra. Marina Macias Silva

Al Dr. **Rolando E. Hernández Muñoz** le agradezco infinitamente la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio, y haber tenido la paciencia de guiarme durante el desarrollo de este trabajo. Gracias a él este trabajo llegó hasta el final.

Agradezco al **Instituto de Fisiología Celular (IFC)** por el apoyo que brinda a todos los estudiantes que ingresan a él para llevar a cabo sus trabajos de investigación.

Para Arturo: mi inseparable y fiel compañero, por que ahora como siempre ha compartido conmigo lo mejor de su vida sin importar que tan difícil ha sido el camino que hemos recorrido juntos. Su amor incondicional, su comprensión, su gusto por la vida, su tenacidad por conseguir lo que se propone, su entereza y claridad en momentos difíciles, su bondad y alegría al compartir, y su infinita confianza en mí, han permitido que el esfuerzo que hicimos juntos para realizar este trabajo por fin nos de su fruto, un fruto exquisito que compartimos con nuestros hijos. Para él dedico este trabajo con todo mi amor.

Para mis hijos César y Coral: por que ellos han sido mi alegría, mi motor y mi guía. Su entereza y madurez me han dado el ejemplo a seguir cuando he creído no poder seguir adelante.

A mis padres: por que me dieron la vida y con ella la oportunidad de luchar para alcanzar y tener lo que ahora tengo.

A mi hermana: por ser mi mejor amiga y confidente, por que el amor que nos brinda a mis hijos y a mí es siempre infinito y sin condiciones. Además de estar siempre presente en el momento justo.

A mi tía: por que siempre está ahí cuando la necesito sin esperar nada a cambio, por que su amor sencillo y puro nos inunda a todos.

EL HOMBRE NADA PUEDE APRENDER SINO EN

VIRTUD DE LO QUE YA SABE.

ARISTOTELES (384-322 A. de C.)

TODO LO COMPLEJO PUEDE DIVIDIRSE EN

PARTES SIMPLES.

RENE DESCARTES (1596 – 1650)

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Involvement of alcohol and aldehyde dehydrogenase activities on hepatic retinoid metabolism and its possible participation in the progression of rat liver regeneration

Verónica López-Valencia, Pablo Rangel, Sandra Rodríguez, Rolando Hernández-Muñoz*

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México 04510, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2006

Accepted 20 October 2006

Keywords:

Liver proliferation

Retinol

Cellular retinol-binding protein

(CRBP)

4-Methylpyrazole

Retinol/retinal ratio

ABSTRACT

Liver alcohol dehydrogenase (ADH) activity is decreased towards exogenous substrates after partial hepatectomy (PH), probably due to putative endogenous substrates acting as ADH inhibitors. Hence, retinoids could be suitable candidates as such endogenous substrates. Therefore, cytosolic ADH kinetic analysis using several substrates, liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH) activities, retinal and retinol content, as well as expression of proteins for ADH and CRBP1 (a retinol carrier protein) were determined in liver samples, at two stages of liver regeneration (one- or two-thirds PH). The effect of inhibiting *in vivo* liver ADH by 4-methylpyrazole (4-MP) was also evaluated after 70%-PH. With 70%-PH, *in vitro* ADH activity towards exogenous alcohols and aldehydes was diminished, but retinol oxidation was increased and retinal reduction was decreased. These activities that be due to the participation of an ADH type which did not correlate with the amount of immunoreactive ADH protein. Cytosolic and mitochondrial ALDH activities oxidized actively retinal, whereas retinol and CRBP-1 expression were reduced in these animals. With 30%-PH, these changes were less evident and sometimes opposite to those found with 70%-PH. In addition, retinol readily inhibited ADH-mediated ethanol oxidation. Interestingly, *in vivo* 4-MP administration inhibited ADH activity in a dose-dependent manner correlating with a progressive inhibition of liver regeneration. In conclusion, PH-induced inhibition of ADH (mainly type I) seems to be related to ADH-mediated retinoid metabolism during liver proliferation. Thus, results suggest a role of ADH in retinoid metabolism, which is apparently required during rat liver regeneration.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The regenerating rat liver induced by partial hepatectomy (PH) is a useful proliferative *in vivo* model that allows for the assessment of the metabolic activity of dividing and quiescent cells [1,2]. Interestingly, this experimental model of liver regeneration is highly sensitive to acute and chronic ethanol, which inhibits DNA synthesis in PH-induced rat regenerating

liver and in cultured hepatocytes [3–6]. In addition, one consequence of ethanol intoxication is a reduction in retinoic acid (RA) levels. Indeed, reduced RA synthesis could possibly result from ethanol-induced competitive inhibition of retinol oxidation, catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH), thereby contributing to the adverse retinol/ethanol drug interaction observed after *in vivo* ethanol intoxication [7]. This could be important because RA is involved in regulating gene expression

* Corresponding author. Tel.: +52 55 622 5666; fax: +52 55 622 5611.

E-mail address: rhermand@ifc.unam.mx (R. Hernández-Muñoz).

0006-2952/\$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2006.10.021

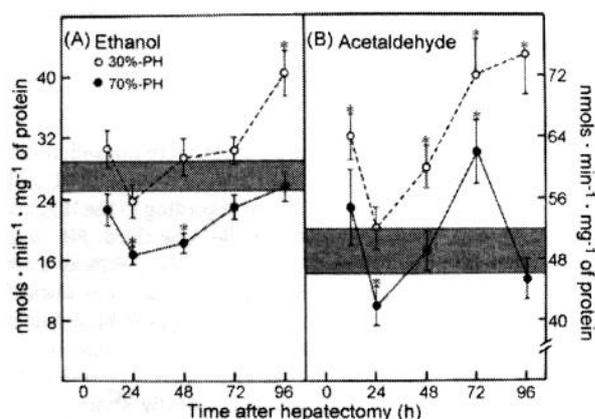


Fig. 1 – Liver ADH activity towards ethanol and acetaldehyde in rats subjected to 30- or 70%-PH. Results are the mean \pm S.E.M. of five individual determinations for each experimental point, of animals subjected to 30%-PH (empty symbols) or to 70%-PH (solid symbols). In panel (A) cytosolic ADH was tested against ethanol (20 mmol/L); whereas in panel (B) acetaldehyde (1 mmol/L) was the substrate. Shaded bars in both panels represent the control range of ADH activity for the substrates tested. Statistical significance was considered at $p < 0.01$ vs. the control (sham-operated) group.

1 mL/mL of a mobile phase consisting of 0.5 mM ammonium acetate, methanol, and acetonitrile (25:65:10 v/v/v) as solvent A, and acetonitrile alone as solvent B. A/B gradients were determined as described by Molotkov et al. [28]. Retinol was detected at 328 nm and RA at 350 nm.

2.6. Estimation of retinaldehyde through enzymatic reduction of retinol

Retinal present in the cytosolic fraction was converted into retinol *in vitro*, using purified liver horse ADH. For this, 200 μ g of cytosolic protein were incubated with 0.3 mmol/L NADH in presence of excess horse liver ADH (PBS, pH 7.5). An internal standard of all-*trans*-retinal (50 μ g) was included and its reduction to retinol was spectrophotometrically recorded (at 328 nm) in each sample. After 20 min incubation, the additional amount of retinol quantified by HPLC was considered as the net content of retinaldehyde.

2.7. Western blot analysis

Cytosolic samples (50 μ g) were normalized for protein concentration and Western blot analysis. Samples were applied to a 10% SDS-PAGE; thereafter, proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose filters for 2 h at a constant current of 330 mA/cm², and non-specific sites were blocked by overnight (4 °C) incubation with phosphate-buffered saline containing 5% fat-free milk. Membranes were probed with goat monoclonal anti-CRBP-I, or with anti-ADH type I (diluted 1:300 with PBS) overnight and the filters were incubated with anti-goat-HRP antibody. Rabbit anti-mouse β -actin antibody

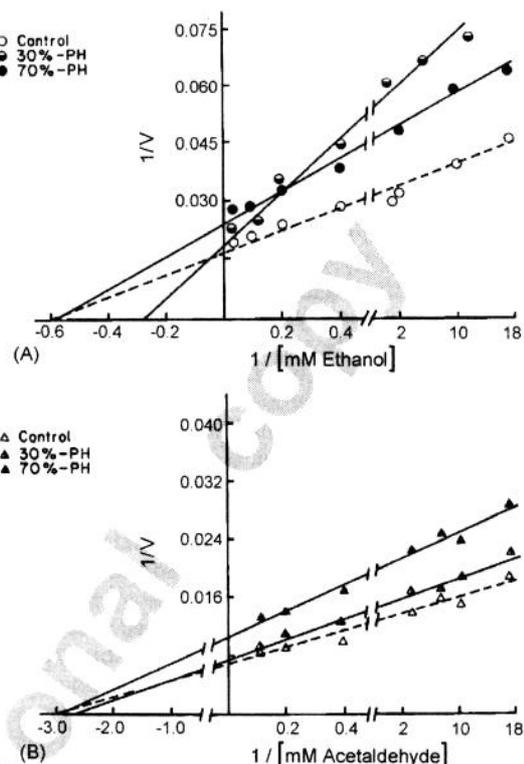


Fig. 2 – Lineweaver-Burk plot analysis of ADH activity towards ethanol and acetaldehyde in control and PH rats. Representative plots resulting from the mean \pm S.E. of five individual determinations for each experimental point. Symbols at the top of the figure: control (empty), and animals subjected to 30%-PH (empty/solid), or to 70%-PH (solid symbols), 24 h after PH. The V (rate) is expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein. Note the non-competitive-like inhibition presented by preparations from 70%-PH animals, and that corresponding to competitive inhibition in 30%-PH rats.

(Calbiochem, La Jolla, San Diego) was used as primary antibody to control the amount of protein loaded on each lane. Proteins in the nitrocellulose membranes were detected using the ECL method and densitometrically quantified.

2.8. Calculations and statistics

Kinetic parameters were calculated by means of the non-linear Enzfitter program (1989). Statistical significance of the differences was assessed by two-way ANOVA and by the Newman Keuls' test.

3. Results

We compared ADH activity towards ethanol oxidation and acetaldehyde reduction, under optimal enzymatic conditions, in remnant liver, during two stages of liver proliferation (Fig. 1). Cytosolic ADH activity showed a significantly lower

Table 1 – Apparent cytosolic ADH kinetic constants towards ethanol and acetaldehyde as substrates in animals subjected to 30- or 70%-PH

Time after surgery	Treatment			
	Ethanol		Acetaldehyde	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Controls	0.09 ± 0.02	47.4 ± 2.4	0.012 ± 0.004	110.3 ± 12.1
Rats with 30%-PH				
12 h	0.17 ± 0.05	51.9 ± 3.2	0.034 ± 0.009*	144.1 ± 10.1*
24 h	0.62 ± 0.16*	40.4 ± 3.9	0.018 ± 0.002	94.5 ± 7.6
48 h	0.75 ± 0.23*	49.7 ± 3.3	0.030 ± 0.006*	135.1 ± 12.1
72 h	0.65 ± 0.14*	51.6 ± 4.6	0.016 ± 0.003	162.1 ± 17.8*
96 h	0.11 ± 0.02	67.0 ± 8.1*	0.080 ± 0.040	218.3 ± 28.4*
Rats with 70%-PH				
12 h	0.22 ± 0.06	53.4 ± 4.4	0.032 ± 0.007	129.5 ± 7.8
24 h	0.11 ± 0.03	36.4 ± 2.9*	0.014 ± 0.003	91.7 ± 8.2
48 h	0.10 ± 0.03	38.5 ± 3.5*	0.011 ± 0.003	83.9 ± 9.3*
72 h	0.09 ± 0.03	43.5 ± 3.5	0.010 ± 0.002	109.5 ± 14.2
96 h	0.07 ± 0.02	47.7 ± 4.8	0.028 ± 0.006	107.5 ± 12.2

Results are expressed as mean ± S.E. of five individual determinations per experimental group for K_m (mM) and V_{max} (nmol min⁻¹ mg⁻¹ of protein) values. Statistics: * $p < 0.01$ as compared to control rats.

capacity to oxidize ethanol (10 mmol/L) during the first 48 h after surgery, as compared with controls, returning to normal 3 days after PH (Fig. 1). In contrast, remnant livers of 30%-PH animals showed no significant modifications of ADH activity (first 72 h after PH), but cytosolic ethanol oxidation was increased thereafter (Fig. 1). Aldehyde reduction (1 mmol/L acetaldehyde) by ADH diminished significantly at 24 h after 70%-PH, and readily augmented at 72 h after surgery (Fig. 1). Interestingly, in 30%-PH animals, ADH reduced acetaldehyde to ethanol, similarly as in 70%-PH, but closer to the higher magnitude (Fig. 1). A classical Michaelis–Menten kinetic analysis revealed an apparently non-competitive inhibition of liver cytosolic ADH activity when animals were subjected to 70%-PH (24 h after surgery) with either ethanol or acetaldehyde as substrates (Fig. 2). In rats subjected to 30%-PH, no significant changes were recorded in ADH activity when tested towards acetaldehyde reduction, but this enzyme seemed to be competitively inhibited to oxidize ethanol, showing an increased K_m value (Fig. 2; Table 1).

In animals subjected to 30%-PH, the K_m of liver ADH towards ethanol oxidation progressively increased, and reached normal values 4 days after surgery. The V_{max} values for ethanol did not change significantly until the fourth day post-PH, when a clear increase in this parameter was observed (Table 1). Interestingly, an opposite pattern of ADH kinetics was recorded in liver from 70%-PH rats. For instance, while the K_m for ethanol oxidation remained practically unchanged, the V_{max} decreased until 48 h after surgery and normalized thereafter (Table 1). Regarding ADH activity in reducing acetaldehyde [24], the K_m was transiently lowered, whereas V_{max} for acetaldehyde reduction progressively increased and remained high until 4 days after 30%-PH (Table 1). In animals with 70%-PH, the V_{max} for acetaldehyde reduction was only significantly decreased at 48 h post-surgery, whereas the K_m values were not significantly modified (Table 1). Optimal pH (9.5–10.0) and kinetic parameters for ADH towards NAD⁺ (0.32 mM; plots not shown) showed similar values in both, control and PH rats (12–48 h after surgery). In addition,

substrate utilization was always inhibited by 4-MP, ruling out the participation of ALDH activity (not shown).

The quantification of immunoreactive ADH protein in cytosolic fractions from experimental animals (Fig. 3) revealed that, in 30% PH, there was an early but not significant decrease in the level of ADH protein (12 h after PH); however, the amount of ADH protein increased progressively thereafter,

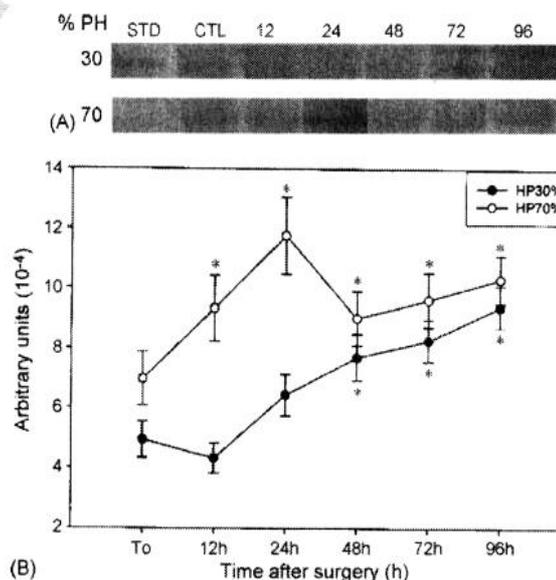


Fig. 3 – Western blot analysis of immunoreactive ADH protein in liver cytosol of control and PH rats. In panel (A) representative analysis by Western blot of ADH protein in control animals and in 30- or 70%-PH rats. In the upper part of this panel, time after surgery is indicated in hours. The respective quantification by densitometric analysis of the Western blot assays is depicted in panel (B); Ctl: control group; Std: the standard used was purified ADH from horse liver. Statistical significance: * $p < 0.01$ vs. the control (sham-operated; time zero) group.

peaking at 96 h after PH. Contrastingly, after 70%-PH, liver levels of ADH protein increased early after surgery peaking at 24 h. Although levels of immunoreactive ADH decreased thereafter, values remained higher in livers after 70%-PH, as compared with control rats. Therefore, there was no correlation between ADH activity and the liver amount of ADH protein in hepatectomized animals (Fig. 3).

Fig. 4 shows cytosolic ADH activity towards retinol oxidation (with NAD⁺), as well as to retinal reduction (in the presence of NADH). After 30%-PH, oxidation of 70 μ M retinol was practically unaffected, except for a slight but significant decrease (48 h); in addition, reduction of 25 μ M retinal diminished at 24 and 72 h after surgery (Fig. 4). In contrast, 70%-PH elicited a progressive increase of ADH-mediated oxidation of retinol, peaking at later times (72–96 h), and accompanied by a constant reduction of retinal, as compared with controls and 30%-PH rats (Fig. 4). Both, retinol oxidation and retinal reduction were strongly inhibited by addition of 4-MP, an inhibitor of liver ADH. For instance, 0.5–2 mM of 4-MP inhibited *in vitro* retinol oxidation in control (up to 60% of inhibition) and in 70%-PH (up to 65% of inhibition) cytosolic samples. Interestingly, cytosolic ADH from 30%-PH animals was even more susceptible to be diminished by the presence of 0.5–2 mM 4-MP (up to 85% of inhibition). Similar data were obtained when considering reduction of retinal, since *in vitro* 4-MP was capable of inhibiting this apparently ADH-mediated reaction by 50–65%.

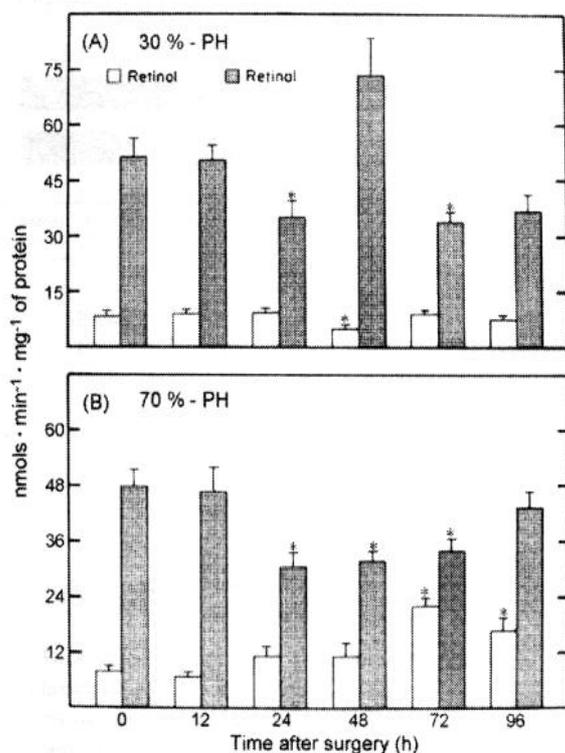


Fig. 4 – Retinol and retinal metabolism by 4-methylpyrazole-sensitive ADH from liver cytosol of control and PH rats. Results are the mean \pm S.E.M. of five individual determinations for each experimental point, of animals subjected to 30%-PH (panel A) or to 70%-PH (panel B). Statistics as indicated in Fig. 1.

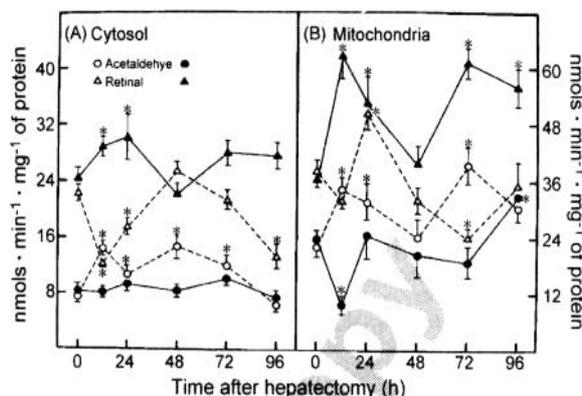


Fig. 5 – Cytosolic and mitochondrial NAD⁺-dependent ALDH activity towards acetaldehyde and retinaldehyde in control and PH rats. Results are the mean \pm S.E.M. of five individual determinations for each experimental point, concerning oxidation of 70 μ M acetaldehyde or 70 μ M retinal. Controls correspond to time zero, and 30- or 70%-PH to open and solid symbols, respectively. Symbols for the substrates at the top of panel (A). Statistics as indicated in Fig. 1.

Retinaldehyde (retinal) is known to act as substrate for several ALDH isozymes. Therefore, the role of cytosolic and mitochondrial ALDHs in oxidizing retinal and acetaldehyde was explored (Fig. 5). In control livers, when tested with acetaldehyde (70 μ M), cytosolic ALDH had low enzymatic activity, but this activity increased three-fold when using 70 μ M retinal as substrate (Fig. 5A). Rats subjected to 30%-PH (empty symbols) showed increased cytosolic acetaldehyde oxidation as compared with controls (12–72 h post-PH). The effect of 30%-PH on retinal oxidation was opposite, since cytosolic ALDH oxidized less retinal after it (Fig. 5A). In the case of 70%-PH, cytosolic oxidation of acetaldehyde remained practically unchanged, whereas that of retinal was only slightly increased early after 70%-PH (Fig. 5B). Control mitochondrial ALDH oxidized acetaldehyde and retinal more actively than cytosolic ALDH (Fig. 5B). The 30%-PH rats showed enhanced mitochondrial oxidation of acetaldehyde along the times tested; however, mitochondrial oxidation of retinal did not increase, except at 24 h (Fig. 5B). In contrast, enhanced oxidation of retinal and acetaldehyde was found in liver mitochondria from 70%-PH rats (Fig. 5B).

The levels of free retinol and retinoic acid, as well as those of retinal, enzymatically converted to retinol, were quantified by HPLC. In controls, cytosolic levels of free retinal were higher than those of retinol (Fig. 6), while RA could not be detected. After 30%-PH, liver retinol levels diminished at early stages (12 h), gradually increased, and normalized thereafter, while the amount of retinal decreased continuously after 30%-PH (Fig. 6A). In animals subjected to 70%-PH, retinol always decreased, while an early enhancement of retinal levels (12 h after PH) was noted, which normalized and increased again (4 days post-PH; Fig. 6A). Hence, changes in liver retinoid levels clearly depended on the magnitude of the PH, with the 30%- and 70%-PH showing opposite patterns (Fig. 6A).

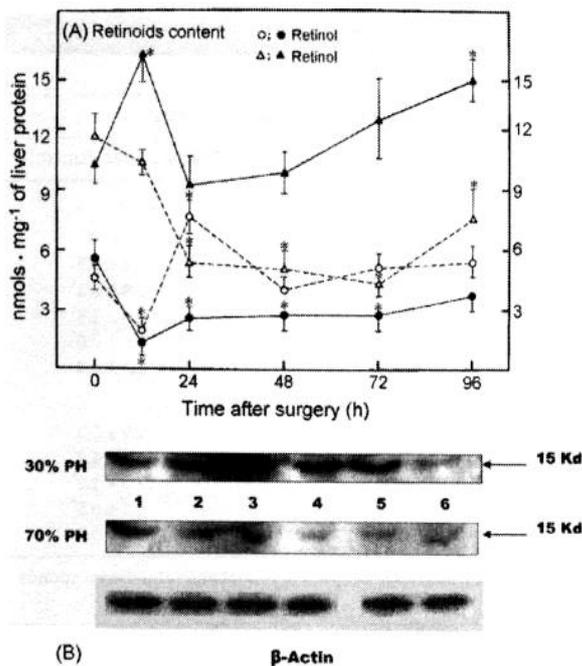


Fig. 6 – Liver cytosolic content of retinoids and Western blot analysis of immunoreactive CRBP-I in control and PH rats. Results are the mean \pm S.E.M. of five individual determinations for each experimental point (panel A): controls (time zero), animals subjected to 30- or 70%-PH, symbols for the quantified retinoids, and statistical significance, similar to Fig. 4. In panel B, representative analyses by Western blot of cellular retinal-binding protein-I and β -actin (control for protein load) for the following conditions: (1) control animals; (2) 12 h; (3) 24 h; (4) 48 h; (5) 72 h; (6) 96 h after in animals subjected to PH of either 30 or 70% of the liver mass. Results of the densitometric analysis for panel (B) are shown in Table 3.

We looked for a relationship among free retinoids (retinol plus retinal), retinol/retinal ratio, and the activity of TK, a reliable marker of cell proliferation. Total retinoids were only significantly diminished during 48–72 h after 30%-PH. The retinol/retinal ratio in controls (0.46 ± 0.05) decreased in early stages and increased significantly thereafter (from 24 to 72 h post-PH; Table 2) in animals subjected to 30%-PH. In the case of 70%-PH, the retinol/retinal ratio was markedly lower during all post-PH times tested (Table 2). Maximum DNA synthesis was observed 48 h after 30%-PH, whereas the peak of DNA synthesis was much higher and occurred at 24 h in rats with 70%-PH (Table 2). In any case, DNA synthesis was practically normalized 96 h after surgery (Table 2). In 30%-PH, lower retinoid content, increased retinol/retinal ratio, increased DNA synthesis (Table 2) and mitosis (not shown) were apparently associated, this was not observed after 70%-PH. Hence, accelerated cell proliferation seems to be associated to decreased retinol levels during the first 96 h after PH (Table 2).

The amount of cytosolic immunoreactive CRBP-I was measured and we found, in 30%-PH animals, an early and significant enhancement in CRBP-I concentration that peaked

at 24 h after surgery, progressively returned to normal the range at 3 days after PH, and significantly decreased at 96 h post-PH (Fig. 6B; Table 3). When compared with levels of retinol in remnant livers after 70%-PH, the CRBP-I protein was not significantly modified during the first 24 h after surgery, but it markedly diminished thereafter (Fig. 6B; Table 3). Again, an opposite pattern of CRBP-I expression was found depending on the magnitude of the PH.

Fig. 7 is a Dixon plot showing that increasing ethanol concentrations (from 0.01 up to 25 mM) are able to inhibit ADH-mediated retinol oxidation. In controls, retinol oxidation was competitively inhibited by ethanol with an apparent K_i of 90 μ M, which was quite similar to that found after 70%-PH (K_i of 130 μ M). Unexpectedly, the inhibitory effect of ethanol on cytosolic ADH-mediated oxidation of retinol, in preparations obtained from 30%-PH rats, occurred rather in a non-competitive manner. A very high ethanol K_i value (1.06 mM) was required, in these animals to achieve an inhibition of retinol oxidation.

Since, after PH (mainly with 70%), the cytosolic ADH activity showed a differential management of the substrates tested, including retinoids, we looked for the effect of inhibiting liver ADH activity *in vivo* on the rate of liver regeneration. For this, a set of animals subjected to 70%-PH received 4-MP at a dose ranging from 25 to 200 mg/kg, b.w., and the respective PH controls received saline solution (0.9% NaCl). As shown in Fig. 8, 70%-PH animals injected with 4-MP presented a dose-dependent *in vivo* inhibition of ADH, reaching maximal inhibition of ADH activity (79% of inhibition as compared with controls) when 200 mg/kg of 4-MP were administered. In addition, a similar percentage of inhibition of ADH activity was reached in sham-operated rats receiving 200 mg/kg of 4-MP (Fig. 8). Whereas control animals (sham-operated) did not show alterations in the mitotic index, TK activity (Fig. 8), nor structural alterations (not shown), 4-MP drastically altered parameters indicative of cell proliferation in 70%-PH rats. Here, decreased mitotic index and TK activities were found in a dose-dependent manner after administration of 4-MP; however, reduction of liver regeneration rate was more abrupt after higher 4-MP dosing than that found in the inhibitory effect of 4-MP on liver ADH activity (Fig. 8).

4. Discussion

Liver regeneration must undergo changes in major metabolic pathways in order to achieve DNA replication, cell division, and restitution of the liver mass [1,2]. This process is well known to be highly susceptible to inhibition by ethanol. ADH constitutes a major pathway for ethanol oxidation, but also possesses broad substrate specificity, including dehydrogenation of steroids [29] and ω -oxidation of fatty acids [30]. Based on previous and current results, we believe that liver ADH activity plays a role in controlling PH-induced rat liver regeneration. For instance, the 70%-PH-induced decrease in ADH activity towards ethanol is prevented by administering alcohol to hepatectomized rats [15], and liver levels of ADH protein are remarkably increased in PH rats (Fig. 3), which would explain the enhanced ethanol oxidation found in the regenerating rat liver [14]. Altogether, this has led us to

Table 2 – Cytosolic content of retinoids, their ratio and thymidine kinase activity in animals subjected to 30- or 70%-PH

Time after surgery	Treatment			
	Retinoids		Activity of thymidine kinase	
	Retinol + retinal	Retinol/retinal	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ of protein	Times above controls
Controls	16.1 ± 2.0	0.46 ± 0.05	0.18 ± 0.04	-
Rats with 30%-PH				
12 h	12.4 ± 2.3	0.19 ± 0.03 [*]	0.25 ± 0.04	1.4 ± 0.2
24 h	13.1 ± 1.6	1.43 ± 0.17 [*]	0.68 ± 0.11 [*]	3.8 ± 0.6 [*]
48 h	9.1 ± 1.6 [*]	0.82 ± 0.13 [*]	1.55 ± 0.27 [*]	8.6 ± 1.5 [*]
72 h	9.5 ± 1.5 [*]	1.16 ± 0.17 [*]	0.47 ± 0.10 [*]	2.6 ± 0.6 [*]
96 h	13.0 ± 2.1	0.71 ± 0.13	0.31 ± 0.05	1.7 ± 0.3
Rats with 70%-PH				
12 h	17.2 ± 4.3	0.08 ± 0.02 [*]	0.28 ± 0.04	1.5 ± 0.3
24 h	11.8 ± 2.2	0.28 ± 0.05 [*]	4.68 ± 0.84 [*]	26.0 ± 4.7 [*]
48 h	12.6 ± 2.1	0.29 ± 0.05 [*]	1.32 ± 0.21 [*]	7.3 ± 1.2 [*]
72 h	15.2 ± 3.0	0.23 ± 0.04 [*]	0.77 ± 0.09 [*]	4.3 ± 0.5 [*]
96 h	18.3 ± 2.6	0.26 ± 0.04 [*]	0.35 ± 0.06	1.9 ± 0.3

The results are expressed as mean ± S.E. of five individual determinations per experimental group. The sum of retinol and retinal corresponds to nmol mg⁻¹ of cytosolic protein. Statistics: ^{*}p < 0.01 as compared to control rats.

speculate that ADH and, probably, ALDH could be actively using endogenous substrates involved in PH-induced rat liver regeneration. Hence, the present study focused on retinoid metabolism by regenerating livers, and assessed whether retinoids are endogenous substrates for these enzymes, leading to RA synthesis, which is known to play a significant role in development and cell differentiation [31].

Data presented here clearly show that after 70%-PH, ADH activity towards ethanol and acetaldehyde decreased, while in rats with 30%-PH ADH it diminished only slightly (Fig. 1).

Table 3 – Densitometric analysis of Western blots for CRBP-I and its relationship with liver retinol content in animals subjected to 30- or 70%-PH

Time	Treatment	
	Liver cytosolic CRBP-I	Liver retinal
	Times over control	nmol mg ⁻¹ of protein
Controls	1.00 ± 0.08	5.1 ± 0.8
With 30%-PH		
12 h	2.21 ± 0.20 [*]	2.0 ± 0.6 [*]
24 h	2.35 ± 0.23 [*]	7.7 ± 0.9
48 h	1.53 ± 0.12 [*]	4.1 ± 0.6
72 h	1.52 ± 0.14 [*]	5.1 ± 0.8
96 h	0.49 ± 0.05 [*]	5.4 ± 0.8
With 70%-PH		
12 h	1.14 ± 0.10	1.4 ± 0.6 [*]
24 h	1.22 ± 0.12	2.6 ± 0.6 [*]
48 h	0.32 ± 0.04 [*]	2.8 ± 0.7 [*]
72 h	0.73 ± 0.09 [*]	2.8 ± 0.7 [*]
96 h	0.88 ± 0.11	3.8 ± 0.8

Results are the mean ± S.E. of three individual Western blot analyses such as that shown in Fig. 6B, once corrected by the amount of β-actin used as control for protein load. Results are expressed as times above the control, which corresponded to 15.3 × 10³ arbitrary units. The content of liver retinol was taken from Fig. 6A. Statistics: ^{*}p < 0.01 as compared to control rats.

Interestingly, 70%-PH induced a non-competitive-like inhibition of ADH towards alcohols and aldehydes, while a competitive-like inhibition was found with 30%-PH (Fig. 2; Table 1), pointing towards a threshold of lost liver mass that affects ADH activity; additionally, a clear discrepancy between ADH activity towards the substrates used and the quantified ADH amount (Fig. 3) was also noted. Expression of ADH-I mRNA substantially increases at early stages in the regenerating liver [32], which disagrees with its decreased activity towards exogenous alcohols, suggesting a probable participation of ADH during liver proliferation. Although a relationship between ADH activity and cell proliferation is unknown, this

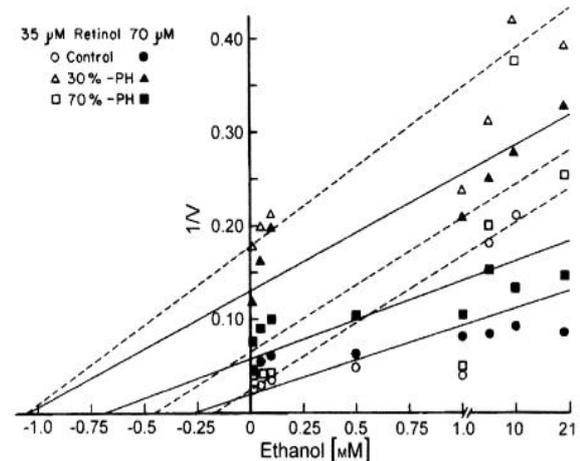


Fig. 7 – Dixon plot analysis of ethanol-induced inhibition of ADH activity towards retinol in control and PH rats. Representative plots resulting of the mean ± S.E. of five individual determinations for each experimental point. Symbols at the top of the figure: control (empty-solid circles), and animals subjected to 30%-PH (empty-solid triangles) or 70%-PH (empty-solid squares), 24 h after PH. ADH activities were determined in the presence of Tween-80, as the vehicle for retinol.

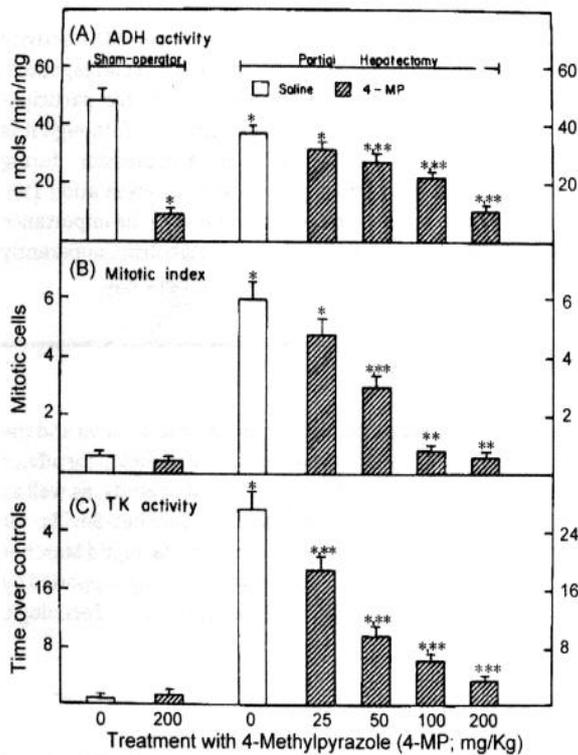


Fig. 8 – Effects of the administration of increasing doses of 4-MP to 70%-PH rats on liver ADH activity and parameters indicative of cell proliferation. Results are the mean \pm S.E. of five animals for each experimental group (24 h after treatments). Surgical status and treatments are indicated by the symbols at the top of panel (A). In panel (C), thymidine kinase (TK) activity in controls was of $0.26 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of cytosolic protein. Statistical significance as follows: * $p < 0.01$ vs. the control (sham-operated), and ** $p < 0.01$ against the 70%-PH groups.

enzyme has been associated to metabolic characteristics of tumoral tissues [33], similarly to ALDHs, which are related to chemically induced rat hepatomas [34]. In addition, expression of Adh-1 encoding class I ADH in several organs [35] has been suggested to participate during developmental and tissue-specific expression of other genes [36]. Therefore, ADH and/or ALDH could play a role in the control of cell proliferation, at least under specific experimental conditions. All these considerations argue in favor of our postulate that ADH is involved in the management of important endogenous substrates in the regenerating rat liver.

Why could retinoids (mainly retinol and retinal) be suitable candidates as putative endogenous substrates for ADH activity? In this regard, oral administration of 4-methylpyrazole induces a 9–10-fold decrease in RA synthesis from retinol in mice, suggesting the involvement ADH in RA synthesis [37]; however, additional oxidoreductases, other than the cytosolic NAD⁺-dependent ADH, could be involved in retinol/retinal interconversion [38–40]. Here, our results show that the cytosolic fraction from normal rat liver possessed *in vitro* a discrete capacity for oxidizing retinol in the presence of NAD⁺, while it efficiently reduced retinal in the presence of NADH, as

coenzyme (Fig. 4). Both reactions were inhibited by 4-methylpyrazole (not shown), suggesting a participation of liver ADH class I in the increase of retinal levels in the regenerating liver, mainly after 70%-PH. However, retinol oxidation has been attributed to a cytosolic retinol dehydrogenase activity, which is identical to a medium-chain ADH (class IV ADH) but is practically absent in the adult liver [31]; thus, ADH-I could play a key role in liver retinoid metabolism after PH.

The retinal conversion into RA is performed by some ALDH isozymes that are active using retinal and many other aldehydes [41,42]. ALDH-I functions as a retinal dehydrogenase, overlapping roles in RA synthesis with other enzymes [43]. In our conditions, cytosolic and mitochondrial rates for retinal oxidation were higher than those for acetaldehyde, mitochondrial oxidation of retinal being even more effective (Fig. 5). The magnitude of PH affected cytosolic and mitochondrial oxidation of retinal differentially, compared with that of acetaldehyde (Fig. 5), evidencing a threshold to increase retinal oxidation by the remnant liver. With 70%-PH, ADH- and ALDH-mediated retinoid metabolism seemed to result in a net conversion of retinol into RA. Therefore, retinoid metabolism appears to be efficiently regulated by these enzymatic pathways, and a low free retinol content in the liver and a decreased retinol/retinal ratio could be requisites for the progression of liver proliferation (Fig. 6A; Table 2).

Although retinol may enter target cells via hydrophobic interactions with the plasma membrane or by fluid-phase endocytosis, evidence indicates that retinol is bound to specific carrier proteins, namely CRBPs [8]. The CRBP-I has the function of concentrating retinol at sites where RA is eventually needed, restricting its access to enzymes capable of recognizing the retinol/retinol binding protein “cassette” [8,44]. Thus, holo-CRBP will transfer retinol to enzymes capable of oxidizing it, depending on the cell redox state [45]. Moreover, CRBP-I can also protect cells against amphipathic properties of free retinoids [16]. Our results agree with the aforementioned, showing changes in liver CRBP-I expression that correspond to the liver content of retinol and retinal, and dependent on the magnitude of the remnant liver (Fig. 6B; Table 3). This exquisite regulation of retinol metabolism to RA by the proliferating liver relies on the absence of detectable RA, which is strictly regulated, avoiding RA-induced cell toxicity [16].

In the same context, PH-induced rat liver regeneration is a process highly sensitive to the inhibitory action of a single ethanol administration to these animals, as previously mentioned. Synthesis of retinoic acid is reduced probably due to competitive inhibition of retinol oxidation exerted by ethanol through ADH, as shown *in vitro* [46], rather than being due to an ethanol-induced increase of retinoic acid degradation [7]. Indeed, after alcohol ingestion, tissue ethanol concentration largely exceeds that reported for retinol that is expected to be in the micromolar range [47]; from here, it has been proposed that competitive inhibition by ethanol for retinol oxidation by ADH isoenzymes can potentially block RA synthesis and cause fetal alcohol syndrome [46,48]. Our results strongly agree with this, leading to the suggestion that ethanol oxidation, mediated by cytosolic ADH, can be involved in the ethanol-induced inhibition of rat liver regeneration [3–6]. In

agreement with this statement are the data presented here, which clearly show that after 70%-PH, *in vitro* ADH activity towards ethanol and acetaldehyde decreased, whereas, after 30%-PH, ADH activity only diminished early after surgery (Fig. 1), indicating a relationship between the lost liver mass and ADH activity (Fig. 2; Table 1).

The expression of ADH-I mRNA substantially increased in the regenerating liver, as soon as 36 h after PH [32]. In agreement with these results, we found that the level of liver ADH protein is maintained higher along the regenerative process induced by PH, as assessed by Western blot analysis (Fig. 3). Hence, the present results clearly reflect a discrepancy between enhanced ADH expression and its lower activity found in the rat regenerating liver. The Adh-1 encoding class I ADH is highly expressed in the liver and, at lower levels, in kidney, stomach, and intestine [35]. However, the mechanisms controlling the developmental and tissue-specific expression of Adh-1 are not known [36]. The 4-MP, considered a specific inhibitor of ADH [49,50], inhibits ADH activity *in vivo* and *in vitro*, and blocks many ethanol-induced effects on liver metabolism [51,52]. However, high 4-MP concentrations can also diminish microsomal ethanol oxidation by inhibiting the activity of cytochrome P-4502E1 [53]. *In vivo* administration of 4-MP induced a surprising dose-dependent inhibition of the mitotic index and of the rate of DNA synthesis (TK activity) in the remnant liver, when administered to rats subjected to 70%-PH (Fig. 8). Therefore, these results provide relevance to the discrepancy between ADH protein amount and activity when liver ADH was competitively inhibited *in vivo* (by 4-MP) in the proliferating rat liver induced by PH. The rationale for inhibiting *in vivo* liver type I ADH in animals subjected to 70%-PH was based on our speculation that this is enzyme could use important substrates required for the progression of liver regeneration (i.e., retinoids). Thus, competitive inhibition elicited by 4-MP would blunt ADH activity for any endogenous compound occurring at the onset of PH-induced rat liver regeneration. Data obtained in the present study (Fig. 8) support our hypothesis.

What importance could the ADH-mediated metabolism of retinoids in the regenerating rat liver have? In fact, more than 80% of the total Vitamin A in the whole body is stored in the cytoplasm of hepatic stellate cells, as retinyl esters in lipid droplets [54]. Recently, it has been suggested that hepatic stellate cells play a major role during progression of PH-induced liver regeneration, when they become activated by adhering to proliferating hepatocytes [55], an event that occurred with a remarkable loss of cytoplasmic storage of retinol droplets and the appearance of α -smooth muscle actin, probably as part of the role of hepatic stellate cells of restoring normal sinusoidal structure in the proliferating liver [55]. Although we do not know the meaning of decreasing retinol during rat liver regeneration, we could suggest that hepatocyte ADH and ALDH activity towards retinoid metabolism participates in these interesting interactions among liver cells.

In conclusion, to our knowledge, this is the first report showing that there is a correlation between ADH activity and progression of PH-induced liver compensatory growth. The nature of the "physiological" ADH substrates involved in the regulation of liver regeneration remains unknown but, after

70%-PH, proliferating liver cells display lower ADH activity towards ethanol and acetaldehyde, which could correspond to a non-competitive inhibition, probably due to the participation of increased substrates, such as retinoids. Although it is known that retinoic acid regulates gene expression during development, regeneration, growth and differentiation [10], this seems to be also the first report addressing the importance of ADH-mediated changes in retinoid metabolism, apparently required during PH-induced rat liver regeneration.

Acknowledgments

We thank J.A. Suárez-Cuenca, MD, Dr. M. Macías-Silva and the members of her laboratory staff, and Dr. M. Cancino for advice on the methodology employed in the present study, as well as Dr. J.A. Morales-González and M.S. L. Sanchez-Sevilla for technical assistance. The editorial aid from Ms. Ingrid Mascher is greatly acknowledged. This study was partially supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-45352).

REFERENCES

- [1] Fausto N, Webber EM. Control of liver growth. *Crit Rev Eukar Gene Express* 1993;3:117–35.
- [2] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60–6.
- [3] Leevy CM, Chen T. Ethanol inhibition of liver regeneration. *Gastroenterology* 1979;77:1151–3.
- [4] Duguay L, Coutu D, Hetu C, Joly JG. Inhibition of liver regeneration by chronic alcohol administration. *Gut* 1982;23:8–13.
- [5] Akerman PA, Cote PM, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby G, et al. Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor alpha. *Hepatology* 1993;17:1066–73.
- [6] Gutiérrez-Salinas J, Aranda-Fraustro A, Paredes-Díaz R, Hernández-Muñoz R. Sucrose administration to partially hepatectomized rats: a possible model to study ethanol-induced inhibition of liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:1007–16.
- [7] Molotkov A, Duester G. Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 2002;277:22553–7.
- [8] De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991;5:2924–33.
- [9] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841–50.
- [10] White JA, Guo Y-D, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu KE, et al. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 1996;271:29922–7.
- [11] Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating Vitamin A function. *Eur J Biochem* 2000;267:4315–24.
- [12] Seitz HK, Xu Y, Simanowski UA, Osswald B. Effect of age and gender on *in vivo* ethanol elimination, hepatic alcohol dehydrogenase activity, and NAD⁺ availability in F344 rats. *Res Exp Med (Berlin)* 1992;192:205–12.
- [13] Pösö H, Pösö AR. Ethanol elimination in regenerating rat liver: the roles of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde. *Acta Chem Scand B* 1979;33:249–55.

- [14] Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, Hernández-Muñoz R. Pharmacokinetics of the ethanol bioavailability in the regenerating rat liver induced by partial hepatectomy. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1557–63.
- [15] Gutiérrez-Salinas J, Miranda-Garduño L, Trejo-Izquierdo E, Díaz-Muñoz M, Vidrio S, Morales-González JA, et al. Redox state and energy metabolism during liver regeneration. Alterations produced by acute ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1831–9.
- [16] Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 1996;10:993–1001.
- [17] Omori M, Muto Y, Nagao T. Cellular retinoid-binding proteins in regenerating rat liver: demonstration of a novel cellular retinoid-binding protein. *J Lipid Res* 1981;22:899–904.
- [18] De Luca LM, Brugh M, Silverman-Jones CS. Retinyl palmitate, retinyl phosphate, and dolichoyl phosphate of post-nuclear membrane fraction from hepatoma, host liver, and regenerating liver: marginal Vitamin A status hepatoma tissue. *Cancer Res* 1984;44:224–32.
- [19] Tanaka Y, Funaki N, Mak KM, Kim C, Lieber CS. Effects of ethanol and hepatic Vitamin A on the proliferation of lipocytes in regenerating rat liver. *J Hepatol* 1991;12:344–50.
- [20] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186–202.
- [21] Aguilar-Delfin I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology* 1996;24:657–62.
- [22] Julià P, Farrés J, Parés X. Characterization of three isoenzymes of rat dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1987;162:179–89.
- [23] Ambroziak W, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 1991;266:13011–8.
- [24] Parés X, Julià P. Isoenzymes of alcohol dehydrogenase in retinoid metabolism. *Meth Enzymol* 1990;189:436–41.
- [25] Sauer H, Willmanns W. Thymidine kinase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, editors. *Methods of enzymatic analysis*, vol.3. Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie Publishers; 1983. p. 468–73.
- [26] Trejo-Solis C, Chagoya de Sanchez V, Aranda-Fraustro A, Sanchez-Sevilla L, Gomez-Ruiz C, Hernandez-Munoz R. Inhibitory effect of Vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Lab Invest* 2003;83:1669–79.
- [27] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:267–77.
- [28] Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farrés J, et al. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5337–42.
- [29] Okuda K, Takigawa N. Rat liver 5- β -cholestane-3 α , 7 α -, 12 α -, 26-tetrol dehydrogenase as a liver alcohol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1970;22:141–8.
- [30] Björkhem I. On the role of alcohol dehydrogenase in ω -oxidation of fatty acids. *Eur J Biochem* 1972;30:441–51.
- [31] Boleda MD, Saubi N, Farrés J, Parés X. Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, ω -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch Biochem Biophys* 1993;307:85–90.
- [32] Milland J, Tsykin A, Thomas T, Aldred AR, Cole T, Schreiber G. Gene expression in regenerating and acute-phase rat liver. *Am J Physiol* 1990;259:G340–7.
- [33] Cederbaum AI, Rubin E. Kinetic properties of alcohol dehydrogenase in hepatocellular carcinoma and normal tissues of rat. *Cancer Res* 1976;36:2274–7.
- [34] Harvey WK, Lindahl R. Activity of various aldehyde-metabolizing enzymes in chemically induced rat hepatomas. *Biochem Pharmacol* 1982;31:1153–5.
- [35] Bosron WF, Li TK. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenase and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 1986;6:502–10.
- [36] Lin Z, Edenberg HJ, Carr LG. A novel negative element in the promoter of the mouse alcohol dehydrogenase gene ADH-1. *J Biol Chem* 1993;268:10260–7.
- [37] Collins MD, Eckhoff C, Chahoud, Nau H. 4-Methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-trans-retinoic acid in the mouse. *Arch Toxicol* 1992;66:652–9.
- [38] Posch KC, Boerman MHE, Burns RD, Napoli JL. Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis. *Biochemistry* 1991;30:6224–30.
- [39] Kim CI, Leo MA, Lieber CS. Retinol forms retinoic acid via retinal. *Arch Biochem Biophys* 1992;294:388–93.
- [40] Napoli JL, Posch KC, Burns RD. Microsomal retinal synthesis: retinol vs. holo-CRBP as substrate and evaluation of NADP, NAD and NADPH as cofactors. *Biochim Biophys Acta* 1992;1120:183–6.
- [41] Dockham PA, Lee MO, Sladek NE. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem Pharmacol* 1992;43:2453–69.
- [42] Chen M, Achkar C, Gudas LJ. Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Mol Pharmacol* 1994;46:88–96.
- [43] Duester G. Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from Vitamin A in the mouse embryo. *J Nutr* 1998;128:459S–62S.
- [44] Chai X, Boerman MHE, Zhai Y, Napoli JL. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 1995;270:3900–4.
- [45] Boerman MHE, Napoli JL. Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem* 1996;271:5610–6.
- [46] Duester G. A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:568–72.
- [47] Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J* 1993;7:317–27.
- [48] Pullarkat RK. Hypothesis: prenatal ethanol-induced birth defects and retinoic acid. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:565–7.
- [49] Takagi T, Alderman J, Gellert J, Lieber CS. Assessment of the role of non-ADH ethanol oxidation in vivo and in hepatocytes from deermice. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3601–6.
- [50] Kera Y, Ohbora Y, Komura S. The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Biochem Pharmacol* 1988;37:3633–8.
- [51] Oratz M, Rothschild MA, Schreiber SS. Alcohol, amino acids, and albumin synthesis. III. Effects of ethanol, acetaldehyde, and 4-methylpyrazole. *Gastroenterology* 1978;74:672–6.
- [52] Lamb RG, Koch JC, Snyder JW, Huband SM, Bush SR. An in vitro model of ethanol-dependent liver cell injury. *Hepatology* 1994;19:174–82.

- [53] Wu DF, Clejan L, Potter B, Cederbaum AI. Rapid decrease of cytochrome P-450IIE1 in primary hepatocyte culture and its maintenance by added 4-methylpyrazole. *Hepatology* 1990;12:1379-89.
- [54] Zou ZZ, Ekataksin Y, Wake K. Zonal and regional differences identified by precision mapping of Vitamin A-storing lipid droplets of the hepatic stellate cells in pig liver: a novel concept of addressing the intralobular area of heterogeneity. *Hepatology* 1998;27:1098-108.
- [55] Mabuchi A, Mullaney I, Sheard PW, Hessian PA, Mallard BL, Tawadrous MN, et al. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2004;40:910-6.

Author's personal copy

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
1. RESUMEN	20-23
2. ANTECEDENTES	24-32
- ANATOMIA DEL HIGADO NORMAL	
- FUNDAMENTACION DE LA ANATOMIA SEGMENTARIA DEL HIGADO	
- FISIOLOGIA DEL HIGADO	
3. ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)	32-46
- CARACTERISTICAS DE LA ADH	
- FISIOLOGIA DE LA ADH	
4. ALDEHIDO DESHIDROGENASA (ALDH)	46-52
- CARACTERISTICAS DE LA ALDH	
- FISIOLÓGIA DE LA ALDH	
5. RETINOIDES	52-61
- CARACTERISTICAS DE LOS RETINOIDES	
- FISIOLOGIA DE LOS RETINOIDES	
6. REGENERACION HEPATICA	61-64
- CARACTERISTICAS	
7. JUSTIFICACION	65-66
8. HIPOTESIS	67
9. OBJETIVOS	67-68
10. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	68-72
11. RESULTADOS	72-78
12. DISCUSION	79-83
13. CONCLUSIONES	84
14. PERSPECTIVAS	85
15. FIGURAS	86-95
16. REFERENCIAS CITADAS	96-107

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
MEOS	Sistema microsomal de oxidación
NAD	Nicotinamina adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido forma reducida
4-MP	4-metilpirazola
AR	Acido retinico
E7.5	Estadio de desarrollo embriológico 7.5
P-450	citocromo P-450
ROS	Especies oxígeno reactivas
RBP	Proteína plasmática de unión a retinol
CRBP	Proteína celular de unión a retinol
CRABP	Proteína celular de unión al ácido retinico
RAR y RXR	Receptores de ácido retinico
mRNA	RNA mensajero
HGF	Factor de crecimiento hepático
TGF	Factor de crecimiento transformante
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Kcat	Constante catalítica
Km	Constante de Michaelis
Vmax	Velocidad máxima
EDTA	Acido etilendinitriltetraacético, sal disódica
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
SDS	Dodecil sulfato sódico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos
HP	Hepatectomía parcial
SCAD	Alcohol deshidrogenasa de cadena corta
All-trans	Todo-trans

RESUMEN

El metabolismo de los retinoides es un evento clave en múltiples mecanismos fisiológicos relacionados con vías de señalización y transcripción de genes, proliferación y diferenciación celular, carcinogénesis y regeneración tisular entre otros.

Las diferentes etapas involucradas en el metabolismo de los retinoides están reguladas por enzimas pertenecientes a diferentes familias, en las que se encuentran la familia de las enzimas alcohol deshidrogenasas (ADH) y la familia de las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDH), cuyos miembros poseen una amplia afinidad por diversos sustratos entre los que se encuentran el etanol y los retinoides.

Estas enzimas forman parte de uno de los sistemas de desintoxicación de alcoholes exógenos y endógenos más importantes localizados en el hígado, pero su participación funcional dentro del organismo como se mencionó brevemente, no se limita a este proceso; por el contrario, ambas familias de enzimas se han relacionado con una gama amplia de procesos fisiológicos en los que también están involucrados los retinoides.

Muchos de los trabajos que se realizan con tejido hepático, son con la finalidad de demostrar la relación que existe entre las enzimas ADH y ALDH en su función como sistemas de desintoxicación alcohólica. Sin embargo, también se trabaja para investigar si dicha relación no está limitada única y exclusivamente a esa función. Diferentes grupos de investigación se han enfocado al estudio de la actividad de ambas enzimas, y su coparticipación en el metabolismo de los retinoides, en diversos eventos fisiológicos y tejidos celulares.

Dentro de estos eventos fisiológicos, la regeneración observada en el hígado como consecuencia de una hepatectomía parcial es un modelo experimental frecuentemente utilizado para estudiar los mecanismos que regulan la proliferación celular in vivo. El modelo clásico de hepatectomía parcial, está basado en la eliminación de hasta un 70% del tejido que forma el hígado en los animales experimentales (94); sin embargo, otras variantes de este modelo también suelen ser utilizadas como la resección del 30% y 90% (95-98). El tiempo promedio que tarda el hígado en regenerar de manera total el tejido perdido en animales hepatectomizados (ratas) al 70% se da entre 5-10 días posteriores a la cirugía (6, 90). En el humano se ha observado que después de sufrir una pérdida del tejido hepático como consecuencia de algún tipo de trauma, infección, etc., la recuperación se da de manera total.

Ahora bien, la regeneración observada en el hígado como respuesta a la pérdida parcial del tejido por diversas causas, es un evento fisiológico cuyos mecanismos no se han logrado descifrar totalmente. Sin embargo, si se sabe que es un fenómeno regulado donde se desencadena la liberación de una gran cantidad de factores responsables de iniciar y promover la regeneración. Dentro de estos factores se incluyen mitógenos, comitógenos, factores de crecimiento, inhibidores de la proliferación celular, etc., que inducen la síntesis de ADN, evento crucial en la regeneración hepática y en cualquier otro mecanismo de proliferación celular. En esta síntesis de ADN mediada por mecanismos responsables del metabolismo de compuestos fundamentales en este proceso de regeneración; podrían estar involucrados los retinoides y las enzimas ADH y ALDH, que podrían regular sus niveles a través de intervenir en su metabolismo.

En este trabajo, los resultados obtenidos muestran cambios en la actividad de la enzima ADH metabolizando distintos sustratos en animales hepatectomizados 70%; observamos un incremento en la actividad de la enzima metabolizando retinol y una disminución en la oxidación de etanol (in Vitro), esto podría corresponder a un tipo de inhibición no competitiva. Por su parte, la actividad de ALDH muestra un patrón semejante metabolizando acetaldehído y retinal, eventos que no se observan en los animales hepatectomizados 30%. Los cambios en la cantidad de proteína de ADH y de proteína de unión a retinol (CRBP-1) detectados en las muestras de HP 70%, además de cambios importantes en el contenido de retinoides libres o totales (no esterificados) muestran la posible participación de estas enzimas en el metabolismo de retinoides hacia la síntesis de ácido retinóico (AR) durante la regeneración hepática.

La conclusión a la que llegamos a partir de los resultados obtenidos en este trabajo es que después de una hepatectomía parcial (70%), las células hepáticas en estado proliferativo presentan una baja actividad metabolizando etanol y acetaldehído (inhibición no competitiva) evento probablemente relacionado con el incremento en la utilización de importantes sustratos endógenos por parte de la enzima, que en nuestro caso en particular suponemos son los retinoides. Estos resultados llevaron a suponer que durante la regeneración hepática existe una estrecha relación de cooperación metabólica entre los retinoides y las enzimas ADH y ALDH para poder llegar de manera adecuada al final requerido.

ABSTRACT

The retinoid metabolism is an important event in multiple physiological mechanisms related to signaling pathways, gene transcription, proliferation and cell differentiation, carcinogenesis, tissue regeneration, among others. The different stages involved in retinoid metabolism are regulated by enzymes belonging to different families, the family of the alcohol dehydrogenase (ADH) and the family of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) whose members possess a wide range of affinity to different substrates like ethanol and retinoids.

These enzymes are part of one of the major liver systems involved in the metabolism of alcohol and of many different toxic compounds and drugs, either endogenous or exogenous. Their functional participation in the overall metabolism as above mentioned shortly, it is not limited to this process; on the contrary, both families have been related with a wide range of physiologic processes where retinoids are also involved.

Many studies focused to the liver physiology have the purpose of showing the relationship that existing among liver ADH and ALDH activities and ethanol elimination. However, other research groups have postulate the idea of show that this relation is not limited exclusively to that function, and have been focused their studies to demonstrate that both enzymes could play a significant role retinoids metabolism during different physiological events. Within these physiological events, the experimental model of partial hepatectomy (PH) is frequently used to study the mechanisms that regulate cellular proliferation *in vivo*. The regeneration observed as a consequence of a partial resection in this model, could give us an example of these relationship between both enzymes and retinoids.

The classic model of PH is based on the elimination up to 70% of the liver tissue in the experimental animals; however, other variants are use (30% and 90%). The time that takes the rat liver to completely recover the 70% lost tissue is given among 5-10 days. In the human, it has also been observed that after suffering a loss of liver tissue as consequence of a trauma, an infection or other events, the liver has the capacity to completely recover.

Now then, the regeneration observed in the liver is a physiological event where the mechanisms have not been fully clarified. However, it is know that the mechanism underlying regeneration is well regulated and perhaps the relationship between retinoids, ADH and ALDH activities, could be responsible for to the synthesis of retinoic acid (RA) an important compound capable of regulating many physiological events.

In this work, our results show changes in the activity of the liver ADH enzyme in the samples obtained from animals subjected to 70% of PH. An increase in retinol oxidation and a decrease of ethanol oxidation was observed, which could correspond to a type of non competitive inhibition of ADH activity. On the other hand, the activity of ALDH shows a similar pattern metabolizing acetaldehyde and retinal; data not observed in animals with 30% of PH. The changes observed in the quantity of ADH and CRBP-1 proteins beside of changes in the content of free retinoids in the 70% HP animals, suggested the possible participation of these enzymes in the retinoids metabolism toward the synthesis of RA during hepatic regeneration.

In conclusion, after a 70% PH the proliferating liver cells display lower ADH activity towards ethanol and acetaldehyde, which could correspond to a non-competitive inhibition, probably due to the participation of increase substrates, such as retinoids. Although it is known that RA regulates many physiological events, this seems to be also the first report addressing the importance of ADH: mediated changes in retinoid metabolism, apparently required during rat liver regeneration.

ANTECEDENTES

ANATOMIA DEL HIGADO NORMAL

El hígado es el órgano glandular más grande del cuerpo, y puede llegar a pesar hasta 1400g, incluyendo el peso de la sangre contenida en él. En los humanos consiste de una masa continua de células, dividida en forma incompleta por separaciones de tejido conectivo. Dentro de esta masa celular, las subdivisiones de los conductos biliares y de los vasos hepáticos tienen numerosas conexiones.

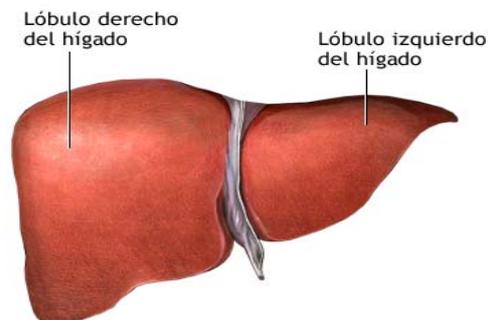
El hígado está situado en la parte superior del abdomen, debajo del diafragma y se mantiene en su posición por:

Vena cava inferior, a la cual está unido a través de las venas supra- hepáticas.

Ligamento redondo del hígado, que reemplaza en el adulto la vena umbilical del feto.

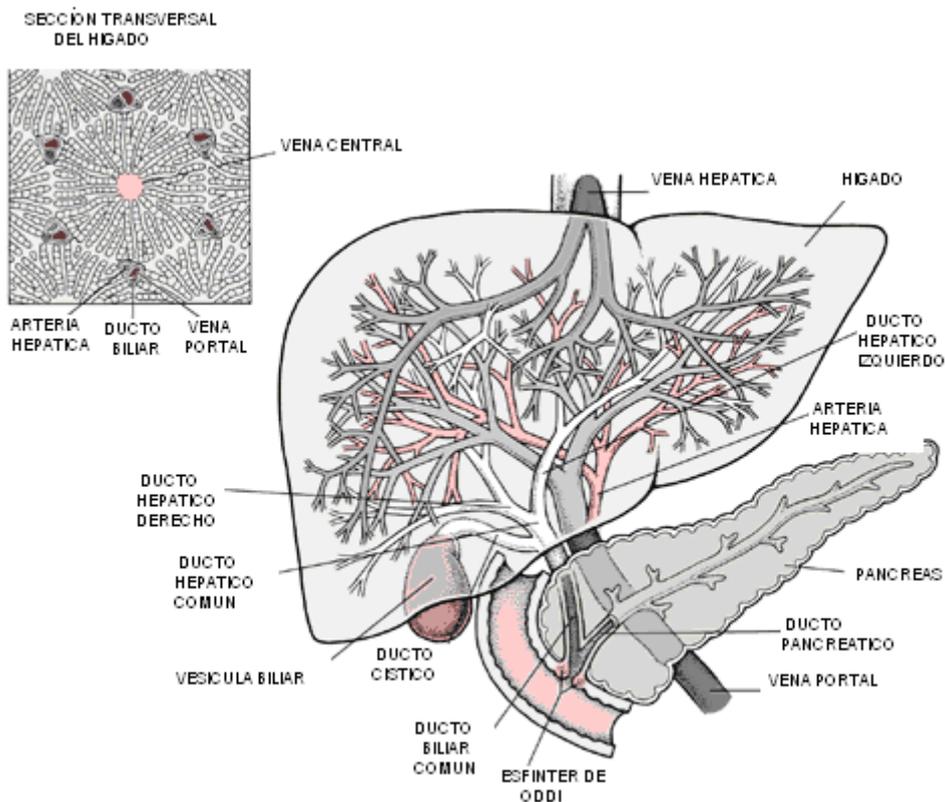
Pliegues peritoneales (peritoneo u omentum gastrohepático: está adherido a la curva inferior del duodeno e hígado).

A pesar de la estructura monolítica del hígado, arbitrariamente se le considera compuesto por lóbulos (un lóbulo es una porción redondeada y saliente de un órgano cualquiera por ejemplo el pulmón, el hígado o el cerebro). En el humano consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo que están divididos por un ligamento llamado ligamento falciforme. El lóbulo derecho comprende cinco sextos y el lóbulo izquierdo un sexto de la masa hepática, existe un tercer lóbulo más pequeño llamado cuadrado.



El hígado junto con los pulmones y el corazón, son órganos que reciben aporte de sangre por dos vías. El hígado recibe la mayor parte de la sangre (85%) por la vena porta que drena casi toda la sangre del intestino. Esto asegura que todo el alimento absorbido vaya directamente al hígado donde puede ser almacenado para su utilización cuando sea necesario. El otro 15% lo recibe de las arterias hepáticas. Este segundo suministro de sangre también es importante porque la sangre arterial está muy oxigenada y es la que lo nutre, a diferencia de la sangre venosa que llega a través de la vena porta.

Los segmentos del hígado se definen como las regiones servidas por una subdivisión de la vena porta, de la arteria hepática y del conducto hepático común, que viajan juntos a través de toda la masa hepática. Por lo tanto, el lóbulo derecho puede dividirse en segmento anterior y posterior y el lóbulo izquierdo, en medio y lateral; este último a su vez, puede subdividirse en superior e inferior (1-3).



ANATOMIA DEL HIGADO

FUNDAMENTACION DE LA ANATOMIA SEGMENTARIA DEL HIGADO

Desde el inicio de los estudios anatómicos se distinguió un lóbulo hepático derecho y uno izquierdo cuyos límites están trazados por el ligamento falciforme y el ligamento redondo; estos límites son arbitrarios, pues la arquitectura interna del hígado muestra también una partición del órgano en dos mitades, pero el límite corre desde el borde derecho de la vesícula hasta el borde izquierdo de la vena cava, en la llamada línea vesículo biliar-cava o línea de Seregé Cantlié. Las mitades hepáticas (lóbulos) se dividen en cuatro segmentos cada una. Quienes estudiaron intensivamente la división intra-hepática y pudieron determinar la segmentación sobre la base de la anatomía vascular y biliar fueron Ch. Hjortsjö, H. Elías y Couinaud (4). De acuerdo a esta disposición, se puede decir que existe una mitad hepática derecha y una mitad hepática izquierda.

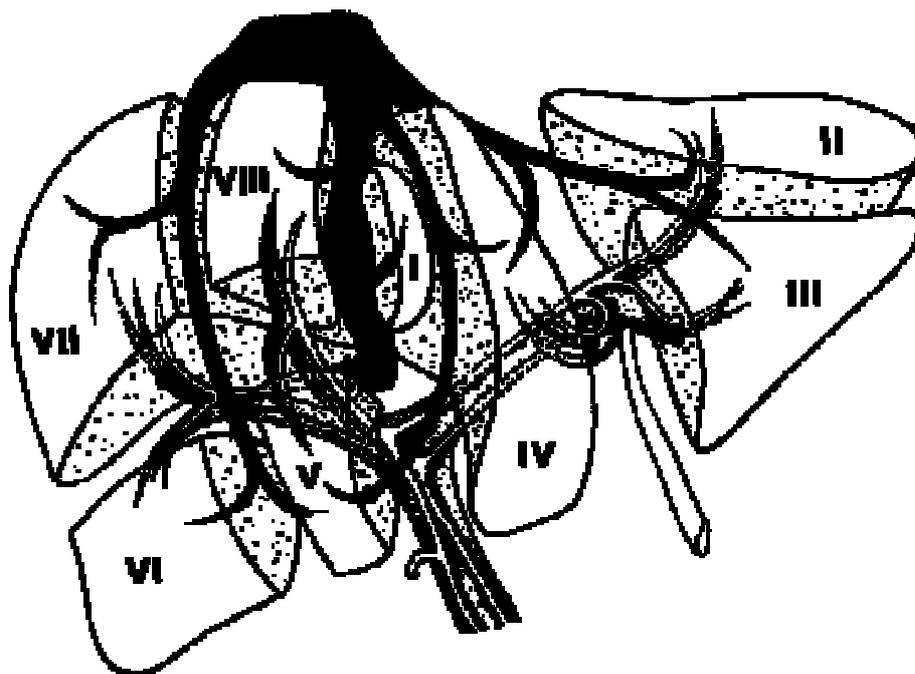
El lóbulo caudado, (segmento I) por su irrigación vascular pertenecería a ambas mitades. La arteria hepática, el conducto hepático y la vena porta (pedículo glissoniano), penetran al hígado por el hilio hepático, dividiéndose inmediatamente en un ángulo que alcanza los 180°, proveyendo de este modo de un pedículo a cada una de las dos mitades hepáticas. Estos pedículos se extienden por una superficie horizontal que divide a las dos mitades hepáticas en un segmento craneal y un segmento caudal respectivamente. Las venas supra-hepáticas determinan una división vertical.

Existen tres grandes venas supra-hepáticas: la vena hepática media o sagital, que discurre por la línea vesícula biliar-cava, formando el eje medio del órgano y las venas hepáticas derecha e izquierda que corren en dirección parasagital por la correspondiente mitad del hígado, dividiéndolas a cada una de ellas en un segmento paramediano y uno lateral. Las venas supra-hepáticas, dividen al hígado en cuatro sectores verticales que a su vez son divididos cada uno de ellos por la superficie de extensión horizontal de las formaciones del hilio en segmento craneal y caudal respectivamente.

De esta manera se originan ocho segmentos, los cuales reciben distintas denominaciones según los distintos autores (4,5).

**TABLA COMPARATIVA DE LA ANATOMIA SEGMENTADA DEL HIGADO
DE ACUERDO A DIFERENTES AUTORES**

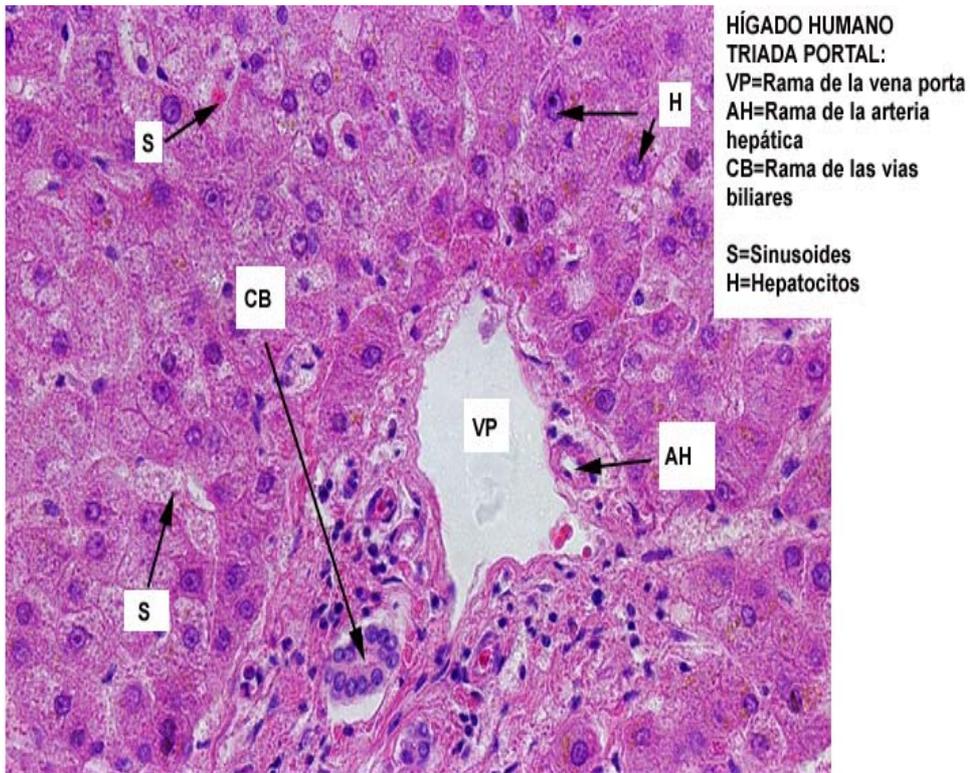
REIFFERSCHIED	COUINAUD	HJORSTJÖ	HEALEY Y SCHROY
SEGM. CRANEOLATERAL DERECHO	VII	DORSOCRANEAL + SEGM. INTERMEDIOCRANEAL	ZONA POSTEROSUPERIOR
SEGM. CAUDOLATERAL DERECHO	VI	DORSOCRANEAL + SEGM. INTERMEDIICAUDAL	ZONA POSTEROINFERIOR
SEGM. CRANEO PARAMED. DERECHO	VIII	SEGM. VENTROCRANEAL	ZONA ANTEROSUPERIOR
SEGM. CAUDO PARAMED. DERECHO	V	SEGM. VENTROCAUDAL	ZONA ANTEROINFERIOR
LOBULO CAUDADO	I	SEGM. DORSAL	LOBULO CAUDADO
SEGM. CRANEO PARAMED. IZQUIERDO	IV	SEGM. CENTRAL	ZONA MEDIA SUPERIOR
SEGM. CRANEO PARAMED. IZQUIERDO (LOBULO CUADRADO)	IV	SEGM. DORSOVENTRAL	ZONA MEDIA INFERIOR
SEGM. CRANEOLATERAL IZQUIERDO	II	SEGM. DORSOLATERAL	ZONA LATEROSUPERIOR
SEGM. CAUDOLATERAL IZQUIERDO	III	SEGM. VENTROLATERAL	ZONA LATEROINFERIOR



División funcional del hígado y los segmentos de acuerdo a la nomenclatura de Couinaud (Reproducción de Bismuth H. Surgical Anatomy and Anatomical Surgery of the Liver. World J. Surg. 6: 6, 1982)

El parénquima (tejido) hepático, está compuesto por células epiteliales (hepatocitos) dispuestas en láminas que se interconectan formando una estructura tridimensional.

El acino del hígado es un conjunto de células que rodean un ducto y pequeñas ramas terminales pequeñas de la vena porta y de la arteria hepática. El acino hepático es la base para diferenciar las distintas zonas dentro del hígado. La zona uno, representa el área de tejido hepático que rodea en forma inmediata al ducto biliar y a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática. La zona tres, comprende el parénquima más alejado de estas estructuras, la región que rodea a la vena central. La zona dos, está formada por el tejido hepático ubicado en las dos zonas anteriores. El área portal o (espacio portal) contiene las pequeñas ramas de la arteria hepática y de la vena porta, un pequeño ducto biliar interlobular y delgados vasos linfáticos. El parénquima hepático que rodea al espacio portal es llamado área periportal.



CORTE TRANSVERSAL DEL HIGADO

Ahora bien, la sangre de las ramas terminales de la vasculatura que sale del área portal a través de la placa limitante, irriga una red compleja de espacios vasculares llamados sinusoides hepáticos los cuales se encuentran acomodados como un sándwich entre las placas adyacentes de las células hepáticas.

El sinusoides hepático, está compuesto de cuatro tipos celulares (la célula endotelial, la célula de Kupffer, la célula de Ito y los hepatocitos).
 Hepatocito: el 60% de las células que constituyen el hígado humano son hepatocitos. Son células poliédricas, de 20 a 30 micrones con núcleos redondos centrales o excéntricos. Los hepatocitos tienen heterogeneidad estructural, que refleja su diversidad funcional; por lo que los hepatocitos en la zona uno difieren de aquellos en la zona tres.

Vena central: La sangre de los sinusoides fluye a la vena central localizada en la periferia del acino hepático. Estos vasos se denominaron originalmente como la vena central, debido a que eran el centro del lóbulo hepático que describió Malpighi.

Los tipos celulares residentes en el hígado (hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas y células endoteliales) interactúan entre sí y con la matriz

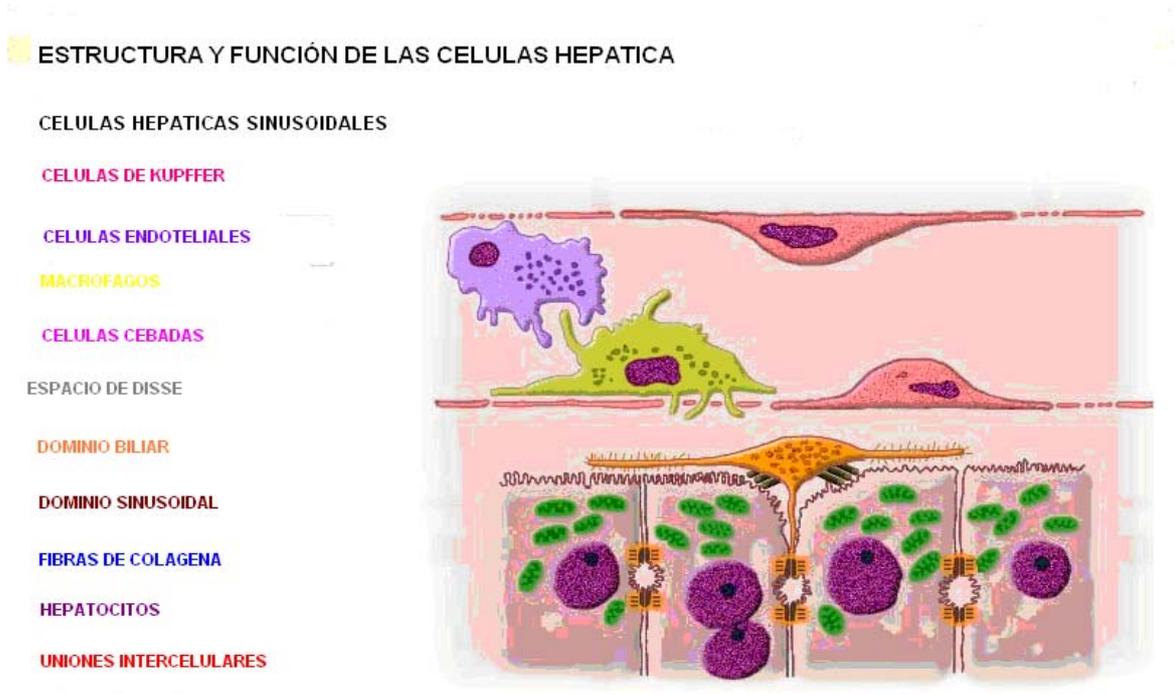
extracelular. Esta interacción permite mantener la estructura hepática normal y el funcionamiento armónico de las células.

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes y se cree que son migratorias ya que no establecen uniones intercelulares con las células vecinas. Se relacionan con las células de revestimiento sinusoidal.

Las células estrelladas (células de Ito) están alrededor del sinusoides y constituyen un tercio de las células no parenquimatosas del hígado; almacenan la Vitamina A (retinoides). En el hígado normal no son proliferativas.

Las células endoteliales poseen receptores que permiten la endocitosis de sustancias como el LDL y ácido hialurónico. También producen mediadores vasoactivos (endotelina-1) y citocinas.

Los hepatocitos son células poligonales de 20-30µm de diámetro, se disponen laminarmente, en una o dos células de espesor. Según su localización dentro del lobulillo, manifiestan diferentes propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas. Además, no solo hacen contacto entre ellas, sino que bordean un espacio (Espacio de Disse) y por esto se dice que el mismo hepatocito tiene distintos dominios dentro de su citoplasma. Viven alrededor de 150 días. En roedores la capacidad regenerativa del hígado post-daño (ya sea por fármacos hepatotóxicos o resección hepática) es alrededor de 75%. Esta capacidad en humanos es mucho menor.



Una característica importante que presenta el hígado, es que bajo condiciones naturales en las cuales el tejido hepático no presenta ningún tipo de anomalía, los hepatocitos que son el tipo celular predominante en este órgano (correspondiendo a un 70% de la población celular total y aproximadamente un 80% del volumen total del hígado) rara vez se replican (6, Clifford 95). El hepatocito, siendo una célula altamente diferenciada, permanece de manera normal en un estado de quiescencia en su etapa de madurez (7,8).

FISIOLOGÍA DEL HÍGADO

El hígado es en algunos aspectos, el órgano más complejo del cuerpo humano. Una de sus principales funciones es descomponer las sustancias tóxicas absorbidas por el intestino o producidas en cualquier parte del organismo, las que elimina como subproductos inoocuos, por la bilis o la sangre. Este órgano, produce casi la mitad del colesterol del organismo; el resto proviene de los alimentos. Un 80% del colesterol producido por el hígado se utiliza para la formación de la bilis. El colesterol es una parte esencial de todas las membranas celulares y es precursor en la producción de ciertas hormonas, como los estrógenos, la testosterona y la adrenalina. Otra de las funciones del hígado es la de sintetizar compuestos importantes como las proteínas, dentro de las que podemos citar como ejemplo los factores de coagulación.

El hígado recibe sangre tanto del intestino como del corazón. Pequeños capilares de la pared intestinal desembocan en la vena porta, la cual penetra en el hígado. Luego, la sangre circula a través de una red de pequeños canales internos, en el interior del hígado, donde se procesan los nutrientes digeridos y cualquier sustancia nociva. La arteria hepática lleva la sangre desde el corazón al hígado y aporta el oxígeno, el colesterol y otras sustancias que esta víscera procesa. Finalmente, la sangre procedente del intestino y la que proviene del corazón se mezclan y circulan nuevamente de vuelta al corazón a través de la vena hepática.

La versatilidad de funciones fisiológicas que posee el hígado, ha permitido a los investigadores abrir una gama casi infinita de temas de estudio relacionados con este órgano. Siendo el principal órgano encargado del almacenamiento y metabolismo de una gran cantidad de compuestos, el hígado es además, el órgano donde se llevan a cabo los principales mecanismos de desintoxicación. Estos mecanismos o rutas metabólicas relacionadas con la desintoxicación de múltiples agentes tóxicos (como el etanol) están regulados y fuertemente ligados a la disponibilidad de energía presente en las células, y al estado de óxido reducción que se genera en ellas (9). Para el caso

del etanol, estas rutas metabólicas son: la vía de las catalasas, el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y la vía de la alcohol y la aldehído deshidrogenasas (ADH y ALDH) (10).

Aún cuando en general las enzimas ADH y ALDH se han caracterizado por su función en la desintoxicación de alcoholes y aldehídos, la complejidad de este sistema enzimático sugiere que pueda estar involucrado en otros y más específicos mecanismos fisiológicos como son: el metabolismo de ácidos grasos así como la oxidación y reducción de una gran variedad de sustratos dentro de los que se encuentran los retinoides (11-13). Esto probablemente se debe a que ambas enzimas pertenecen a familias cuyos miembros presentan una gran variedad de formas, las cuales poseen importantes diferencias importantes tanto en su distribución tisular como en la especificidad de sus sustratos (11).

ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)

Históricamente, la alcohol deshidrogenada (ADH: alcohol NAD⁺oxido-reductasa, EC 1.1.1.1) se ha definido como la principal enzima responsable de la oxidación del etanol (alcohol etílico). El interés que se ha despertado por estudiar esta enzima desde hace aproximadamente tres décadas, está ligado a su participación en el metabolismo del etanol en el humano (14). El etanol se absorbe principalmente en el intestino, de ahí pasa a través de la vena porta hacia el hígado antes de que circule por el resto del cuerpo. Es en el hígado principalmente, donde se lleva a cabo la oxidación y eliminación del etanol presente en el organismo después de ser ingerido; además, del metabolismo de medicamentos y una gran variedad de agentes xenobióticos (15).

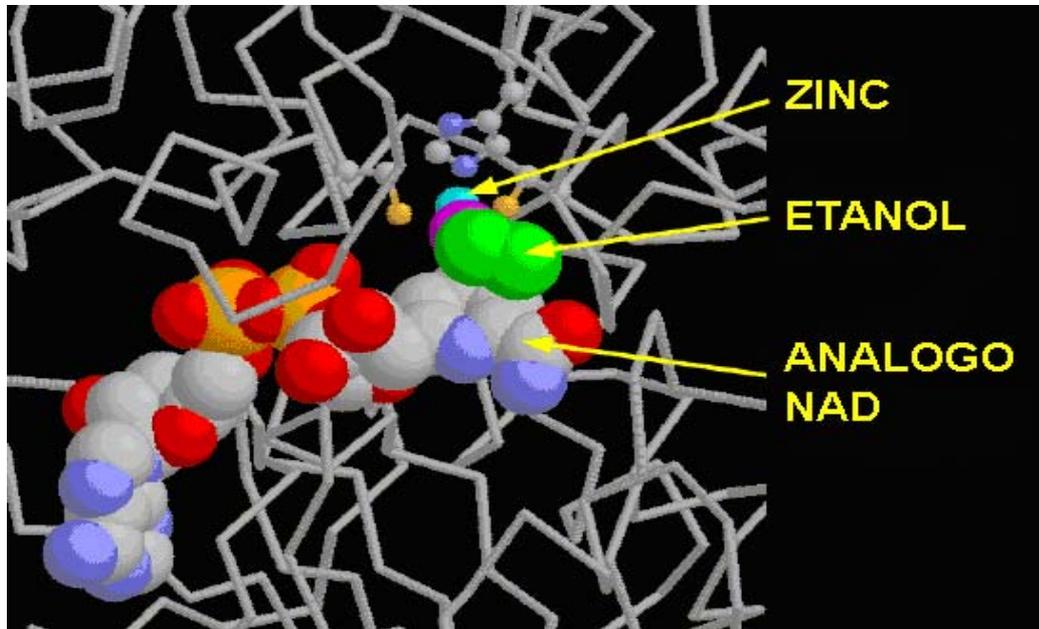


ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA ENZIMA ADH

El conjunto de enzimas que corresponde a las ADHs, está ampliamente distribuido en diversos grupos de organismos vivos, que incluyen miembros de cada uno de los diferentes reinos (16). Este conjunto de enzimas está organizado en tres diferentes familias independientes unas de otras; la primera familia comprende moléculas de cadena corta que no requieren de un ión metálico como cofactor, y que característicamente se presenta en insectos. La segunda familia, está constituida por miembros de cadena de longitud intermedia y larga, con un peso aproximado de 40kDa de peso molecular, son metaloenzimas que requieren de átomos de zinc como cofactor y forman una superfamilia de deshidrogenasas/reductasas, esta familia está presente en todos los vertebrados. Finalmente está la familia de enzimas que utilizan Fe^{+} como cofactor y que están presentes principalmente en organismos unicelulares.

La ADH se caracteriza por catalizar la oxidación de alcoholes hacia sus respectivos aldehídos y cetonas; utiliza NAD^{+} como coenzima para llevar a cabo las reacciones de oxidación que por lo general son reversibles, de ahí que se denominen reacciones de óxido – reducción (17). En términos generales, el sitio activo de la ADH está formado por un centro hidrofóbico en el cual se acomoda el átomo de Zn^{+} , situado entre el dominio catalítico y el sitio de unión del NAD^{+} . El Zn^{+} está unido a los residuos de aminoácidos Cys- 46 y 174 a partir de sus átomos de S, a un átomo de N

de la His-67; y el último de sus cuatro ligandos está unido a un grupo hidroxilo del residuo de Ser-48 (18).



SITIO ACTIVO DE ADH

La oxidación de alcoholes consiste en la eliminación de 2 átomos de hidrógeno de la molécula de alcohol, uno de los cuales es transferido a la posición 4 del anillo nicotinámico del NAD⁺, convirtiéndolo en NADH que es la forma reducida del NAD⁺, y el otro átomo de hidrógeno es liberado como protón al medio.



La capacidad catalítica de la ADH no está limitada a la oxidación de moléculas pequeñas como el etanol, sino que los alcoholes de cadena larga, ramificados o cíclicos, además de algunos esteroides, ácidos grasos y retinoides pueden servir como sustratos para esta enzima.

Como sistema, la ADH constituye un conjunto complejo de enzimas con formas diferentes (8 clases en total en vertebrados), además de presentar una enorme variedad de isoformas. Las diferentes formas de ADH presentes en los mamíferos, se han sido clasificado de acuerdo a sus propiedades cinéticas, movilidad electroforética, sensibilidad a la 4-metilpirazola (4-MP: potente inhibidor de la ADH tiene la capacidad de unirse al sitio activo de la ADH e impedir que otros sustratos se unan a ella. La afinidad de la ADH por la 4-MP es 8,000 veces superior a la del etanol, por lo que compite favorablemente en presencia de este compuesto por unirse a la enzima. Actualmente la 4-MP es utilizada clínicamente como antagonista selectivo de la ADH en el tratamiento de intoxicación grave por etanol y metanol), patrón de expresión génica y por su semejanza e identidad intraclase (19-21).

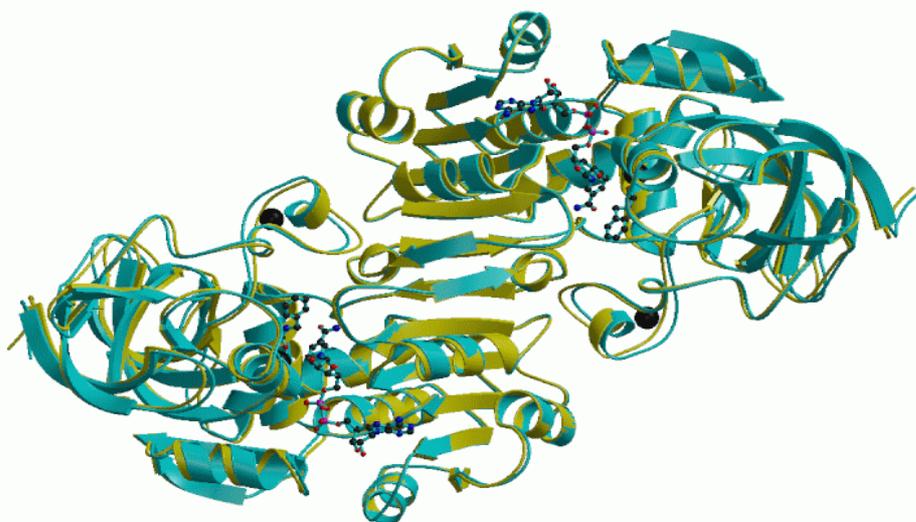
Nomenclatura actual propuesta para las ADH de algunos mamíferos.

ESPECIE	CLASE							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Humano	ADH1A(α) ADH1B(β) ADH1C(γ)	ADH2(π)	ADH3(χ)	ADH4(σ)	ADH5	---	---	---
Rata	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4	---	ADH6		
Ratón	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4A ADH4B	ADH5 A ADH5A			
Caballo	ADH1E ADH1S	---	ADH3	---	---	---	---	---
Pollo	ADH1	---	ADH3	---	---	---	ADH7	---
Rana	ADH1	---	ADH3	---	---	---	---	ADH8

(22-24; Dolney y cols., 2001; Duester y col., 1999; Peralba y cols., 1999)

De las ocho clases de ADH descritas en vertebrados, en los humanos solamente se han encontrado 5 (I, II, III, IV, V), y los productos obtenidos de la transcripción de cada uno de los genes que las codifican, permite presentar un patrón

de identidad respecto a sus secuencias nucleotídicas intraclase estimado en un 90% y el interclase en un 60% (25). Dentro de éstas, la transcripción de ADH-I se regula por tres diferentes genes localizados en el cromosoma 4 y codifican para 3 tipos de subunidades (σ , β y γ). Estas subunidades pueden asociarse para formar homodímeros o heterodímeros de moléculas diméricas.



ESTRUCUTRA DE ADH EN HUMANOS (ALFA)

Lo mismo sucede en el caso de las ratas, aunque en estas últimas se encontró la VI en lugar de la V (23). Las bases del metabolismo del etanol en estos animales, se ha estudiado de manera parcial, aún cuando paradójicamente la rata es el animal más frecuentemente utilizado en estudios experimentales en el laboratorio.

De las cinco clases encontradas en rata, las más estudiadas son: la clase (ADH-I) que es una enzima catódica que se ha conservado a través de las diferentes especies de vertebrados incluyendo a la rata que presenta una analogía con la de humano de un 85% (23). Se expresa principalmente en tejido hepático constituyendo aproximadamente el 1% del contenido total de las proteínas citosólicas es fuertemente inhibida por 4- metilpirazola, y es la principal enzima relacionada con el metabolismo del etanol.

La ADH-2 es una clase de enzima cuya analogía con el humano es de 65% aproximadamente, se observa en el tejido hepático, pero constituye aproximadamente el 2% del total de ADH citosólica en comparación con el aproximadamente 80% de la ADH-1 (26), y está presente en otros tejidos como útero, riñón e intestino. La ADH-4,

es la tercera forma más estudiada y caracterizada, y se localiza principalmente en el estómago (21).

Patrón de expresión de las diferentes clases de ADH en mamíferos

CLASE	PATRÓN DE EXPRESION
ADH1	Principalmente en hígado y también en intestino, riñón, pulmón, glándula adrenal, epidídimo, testículos, útero y ovarios. Ciertas células de la corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo. Expresión de algunos tejidos durante el desarrollo embrionario.
ADH2	Hígado, intestino delgado y piel.
ADH3	Patrón ubicuo, abundante en hígado. Es la ADH con mayor presencia en el cerebro.
ADH4	Piel, ojo, glándula adrenal y en la mucosa de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. No se expresa en hígado. Expresión en varios tejidos durante el desarrollo embrionario incluyendo el cerebro.
ADH5	Tejidos fetales.
ADH6	Elevada expresión en hígado y en menor cantidad en riñón y pulmón.

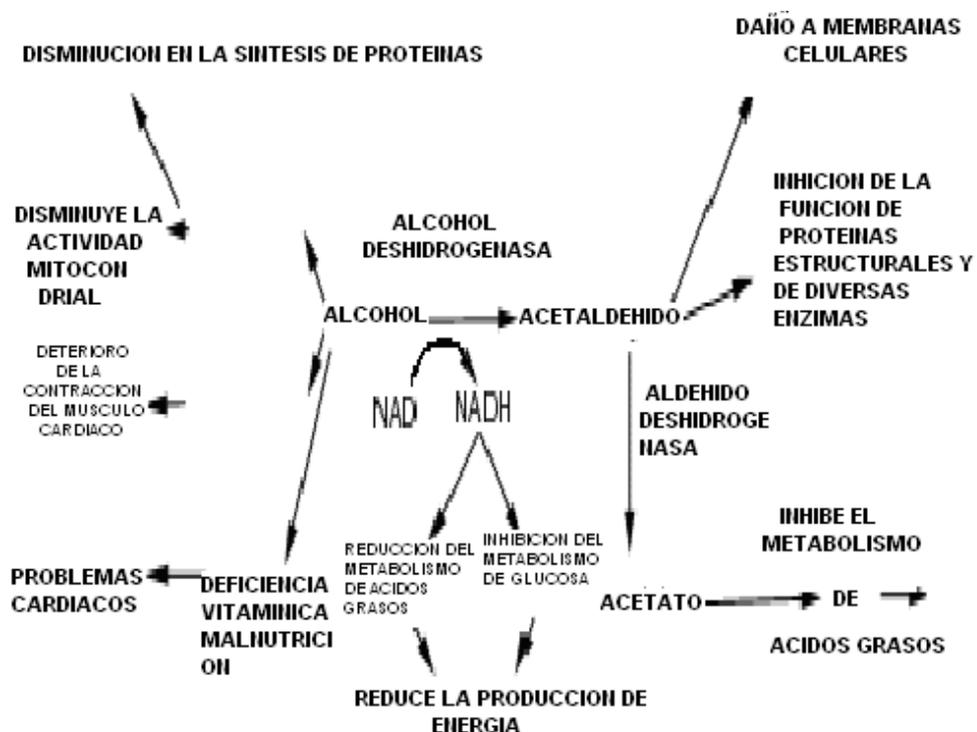
(21,27-29: Ang y cols., 1996-97; Boleda y cols., 1989; Julia y cols., 1987; Parés y Farrés 1995).

FISIOLOGÍA DE LAS ADHs

El consumo de alcohol es una práctica milenaria arraigada en casi todas las culturas ancestrales y sociedades humanas actuales. Debido a que el etanol es una molécula pequeña, soluble en agua y que fácilmente se desplaza a través de la membrana citoplásmica, después de una ingesta de alcohol, la mayoría de los tejidos celulares, si no es que todos se ven invadidos por él, y muchas de las funciones vitales del cuerpo se afectan. El hígado, es el órgano que de manera más severa se ve afectado por efecto de la intoxicación alcohólica. Durante las primeras investigaciones realizadas al respecto, se pensaba que los desordenes ocasionados se debían exclusivamente a problemas nutricionales provocados por la gran cantidad de energía que el etanol aporta (7.1Kcal/g), lo que sustituye en casi la mitad al aporte de energía derivado de la ingesta de alimentos; la deficiencia de ácido fólico y tiamina, entre otros

elementos, son causantes de la malnutrición observada en los individuos con problemas de alcoholismo (30). Los efectos son proporcionales a la concentración y tiempo de ingesta, y son más marcados cuando la concentración etílica está en ascenso; y se potencia cuando se consume con otras drogas como sedantes, opiáceos, antidepresivos, entre otros (136).

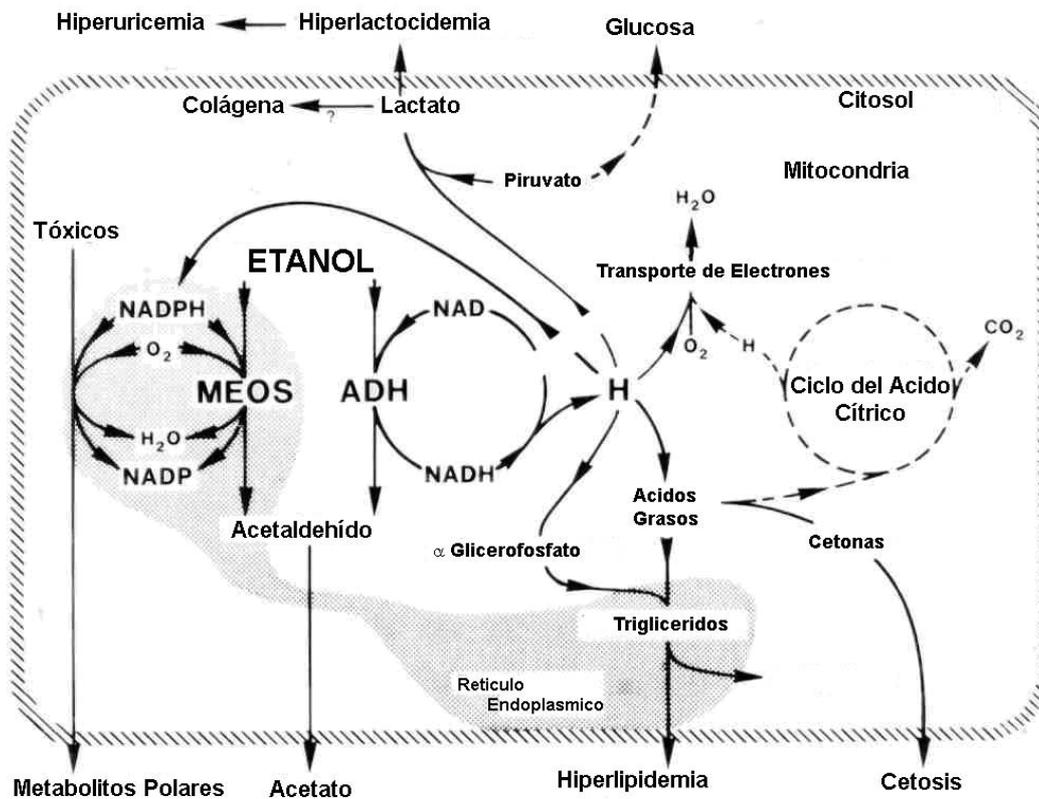
El alcohol produce tolerancia, y a parte de sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), se observan entre muchos otros hipoglucemia, trastornos cardiacos y hepatitis aguda. La intoxicación etílica aguda puede presentarse en tres formas: no complicada (75% de los casos), con agitación motriz (18% de los casos), y coma alcohólico (7% de los casos); estas diferencias se obtienen a partir de la cantidad de alcohol presente en sangre. Así se tiene que con 20-30mg/dl se afecta el control motor fino; entre 50-100mg/dl hay deterioro leve o moderado de las funciones cognitivas; con más del 150mg/dl el 50% de las personas pueden estar muy intoxicadas. Entre 200-300mg/dl se desencadena náusea y vómito entre otros síntomas; 300mg/dl generalmente produce coma; finalmente el rango letal se da entre 400-900mg/dl independientemente de que se sea o no un alcohólico crónico. De la misma forma, la intoxicación crónica y excesiva (de acuerdo a los valores antes mencionados) se asocia a graves trastornos nutricionales, neurológicos y mentales; de hecho se puede decir que no hay órgano que no se vea afectado por el etanol (136).



TRANSTORNOS FISIOLÓGICOS SUFRIDOS COMO CONSECUENCIA DE UNA INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA

Otros de los eventos observados como resultados de la ingesta de alcohol, están asociados con la intoxicación directa del tejido hepático la cual inicia en la zona perivenosa del lóbulo hepático, sin embargo la región donde se lleva a cabo principalmente la oxidación del etanol en el tejido hepático no está determinada. Uno más de los cambios observados durante el metabolismo del etanol es el incremento en el estado de óxido – reducción en el citoplasma celular; (relación NADH/NAD⁺); este cambio desencadena problemas metabólicos como la hiperlactocidemia, que genera acidosis e impide que el riñón excrete de manera adecuada el ácido úrico, provocando consecuentemente un problema de hiperuricemia.

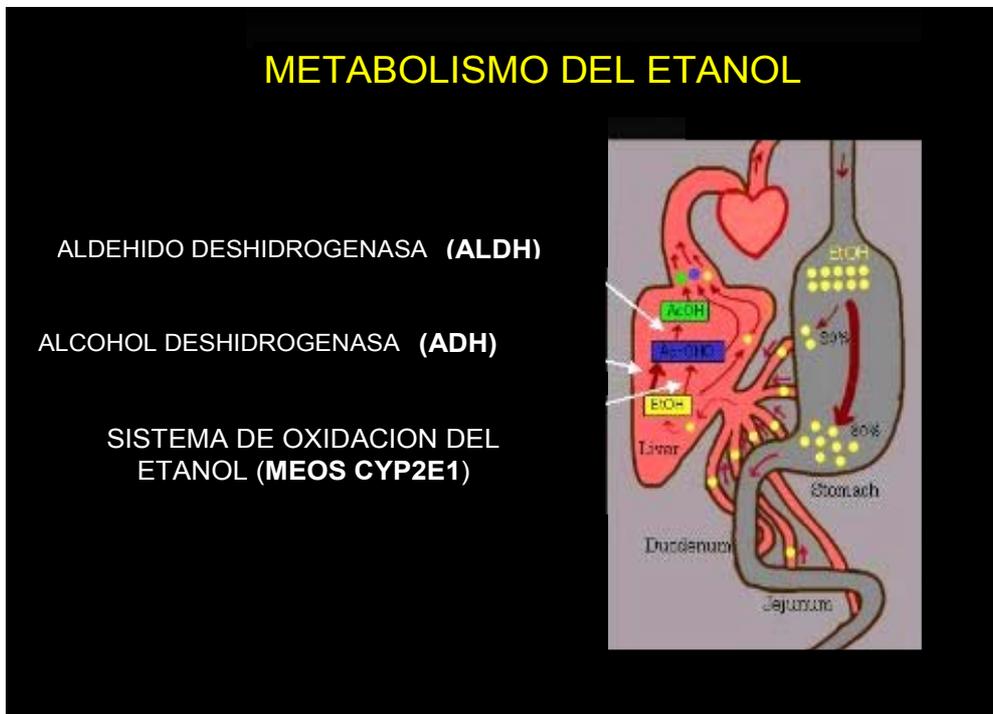
El incremento en la síntesis de ácidos grasos provocada por el exceso de NADH y su subsecuente acumulación, aunada a una baja en la actividad del ciclo de Krebs es otro fenómeno observado después de una ingesta excesiva de alcohol (30).



CAMBIOS METABOLICOS OBSERVADOS DURANTE EL METABOLISMO DEL ETANOL

Cuando en 1910, Batelli y Stern observaron que en extractos de tejidos de diversos animales, se podían llevar a cabo reacciones de oxidación del etanol hacia acetaldehído y ácido acético, se consideró que la oxidación del etanol era una característica normal del metabolismo en los animales. La subsecuente purificación de la ADH a partir de diferentes tejidos animales, de alguna manera confirmaba esta idea (15).

Excepto en los humanos, los animales no necesitan consumir o producir grandes cantidades de alcohol como para justificar la presencia de más de una veintena de enzimas con una gran variedad de isoformas con las cuales se pueden llevar a cabo la oxidación de etanol. De hecho, el porcentaje de etanol presente de manera normal en los tejidos celulares es del orden de 0.1 - 1mM. De ahí que el consumo de etanol por el humano y sus consecuencias fisiológicas haya inducido a muchos investigadores a estudiar de manera extensiva e intensiva los mecanismos de intoxicación alcohólica y su metabolismo (28). Existen diversos mecanismos de eliminación del etanol (MEOS y catalasas), pero el principal mecanismo de desintoxicación etílica, está referido al sistema enzimático compuesto por la ADH hepática, que cataliza la oxidación del etanol hacia acetaldehído en la primera etapa de su eliminación fisiológica (31,32).

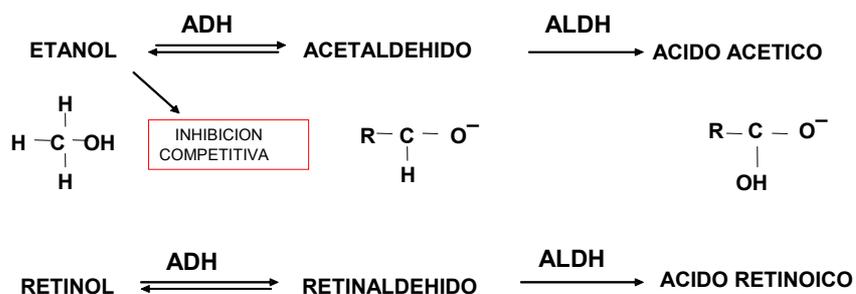


PRINCIPALES VIAS DE DESINTOXICACION ALCOHOLICA

Las diferentes formas moleculares en las que se expresa la ADH, y la capacidad que poseen de metabolizar otros sustratos además del etanol, ha permitido sugerir que este complejo enzimático podría estar involucrado en más de un mecanismo fisiológico; la eliminación de productos de peroxidación, oxidación de ácidos grasos, eliminación de formaldehído, metabolismo de hormonas, y el metabolismo de retinoides son ejemplos de tal versatilidad. Los retinoides son compuestos altamente mitogénicos capaces de inducir de manera directa la proliferación celular en un evento denominado hiperplasia directa.

Debido a que la ADH exhibe una gran actividad metabólica en presencia de retinoides, se ha pensado que muy probablemente esté relacionada con la síntesis de ácido retinóico, ya que es muy activa tanto en la oxidación de retinol como la reducción del retinal. Este aspecto es importante, debido a la participación de estos compuestos en el desarrollo, embriogénesis y proliferación celular (11, 33). No obstante que la enzima posee una multiplicidad de funciones, se reconoce a la ADH como la principal enzima relacionada con el metabolismo del etanol en los mamíferos, lo que ha contribuido a que se lleven a cabo una gran cantidad de estudios fisiológicos, farmacológicos y moleculares, entre muchos otros, referidos hacia dicha enzima (20, 28). Estos estudios han permitido establecer que fue una de las primeras enzimas identificadas relacionadas con el metabolismo de los retinoides. Algunos miembros de la familia de la enzima alcohol deshidrogenasa prefieren al retinol como sustrato sobre el etanol, y su habilidad para oxidar retinol es inhibida competitivamente por niveles altos de etanol.

REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE GENES



DUESTER G. 1998

De las formas de ADH encontradas en el humano, probablemente la ADH-1 contribuya en la producción de todo-trans-retinal que posteriormente será metabolizado hacia todo-trans-ácido retinóico necesario en la regulación génica. Debido a que la deshidrogenación alcohólica es una reacción reversible, la ADH-1 puede también catalizar la reducción de retinal hacia retinol en una reacción NADH dependiente. Sin embargo bajo condiciones fisiológicas, la ADH-1 solo contribuye de manera importante o significativa en la oxidación del retinol.

CUADRO COMPARATIVO DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ALCOHOL DESHIDROGENASAS

Clase	Gen(locus)	Alelo	Estruct./subun.	Sustrato	Distribución
I	ADH-1 ADH-2 ADH-3	ADH1, ADH2*1,2*2,2*3 , ADH3*1,3*2	Homodímeros y heterodímeros: α, β, γ	Alcoholes, ácidos grasos, retinoides.	Hígado: citosol.
II	ADH-4	ADH4	Homodímeros: π	Alcoholes, aldehídos y retinoides entre otros.	Hígado y otros tejidos: citosol.
III	ADH-5	ADH5	Homodímeros: χ	Alcoholes y aldehídos primarios, ácidos grasos.	Patrón ubicuo: citosol, núcleo.
IV	ADH-7	ADH σ	Homodímeros: σ	Alcoholes, aldehídos, ácidos grasos y retinoides entre otros.	Diversos tejidos : principalmente estómago y tejidos oculares :citosol.

La ADH-1 también se expresa de manera abundante en otros tejidos sensibles a los retinoides incluyendo aquellos que se encuentran presentes durante el desarrollo embriológico del humano y otros vertebrados. Los estudios realizados en embriones de ratón utilizando el inhibidor de ADH la 4-metilpirazola, han mostrado que este agente es capaz de inhibir el metabolismo de todo-trans-retinol, dando como resultado niveles bajos de todo-trans-ácido retinóico en el embrión y en el plasma materno. Sin embargo, no se ha demostrado si el efecto inhibidor es sobre la ADH-1 o en alguna otra isoforma.

Las estructuras de la ADH-1 de humano, caballo y del bacalao muestran sitios activos sumamente conservados que pueden reconocer alcoholes de cadena larga. Estudios moleculares del sitio de unión muestran que ADH-1, está diseñada para reconocer y unir perfectamente al todo-trans-retinol no así al 9-cis-retinol.

La ADH-2 es una clase distinta de enzima citosólica que comparte aproximadamente el 60% de similitud en su secuencia con la ADH-1. En humano se ha demostrado que ADH-2 puede catalizar la oxidación de todo-trans-retinol y posiblemente contribuya a la producción de todo-trans-retinal necesario para la síntesis del ácido retinóico. En la rata, la ADH-2 es más activa con 9-cis-retinol ($K_m = 0.47 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$) y posee una actividad relativamente baja con all-trans-retinol ($K_m = 0.009 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$). Sin embargo, la ADH-2 únicamente representa el 2% de la actividad de retinol deshidrogenasa citosólica en el hígado, mientras que la ADH-1 comprende aproximadamente el 80%. En contraste con estos estudios, la ADH-2 de ratón, no posee actividad con todo-trans-retinol y con 9-cis-retinol como sustratos.

La ADH-3 por su parte no parece compartir con los otros miembros de la familia la capacidad de metabolizar etanol y retinol; sin embargo muestra una eficiente capacidad para funcionar como formaldehído deshidrogenasa utilizando al S-hidroximetilglutatión como sustrato (35). Esto sugiere que varias clases de ADH evolucionaron para desempeñar diferentes funciones, y que esta enzima es la única que está presente en todos los organismos vivos incluyendo a las bacterias, plantas y animales (16).

Por otro lado, la ADH-4 ha demostrado ser una de las enzimas más eficientes en catalizar el metabolismo de los retinoides tanto para todo- trans- retinol como 9-cis-retinol contribuyendo de manera importante en la producción de todo-trans-retinal y 9-cis-retinal para la síntesis de ácido retinóico. En humano por ejemplo, la eficiencia catalítica de estas enzimas para oxidar todo-trans-retinol se da de la siguiente manera: isoformas ADH-1 ($K_{cat}/K_m = 0.01 - 0.3 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$), ADH-2 ($K_{cat}/K_m = 0.5 - 0.7 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$), y ADH-4 ($K_{cat}/K_m = 1.9 - 4.5 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$) esta última enzima posee una constante catalítica para el 9-cis retinol de ($K_{cat}/K_m = 13.3 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$) lo que indica que esta enzima prefiere los sustratos cis en contraste con lo observado en ADH-1 que prefiere los sustratos trans.

La estructura terciaria de ADH-4 muestra que, al igual que la ADH-1, posee un sitio activo capaz de unirse a alcoholes de cadena larga, pero además se une de manera más eficiente a otros como son los todo-trans- retinoles, 9-cis retinoles y 11-cis-retinoles. Dentro de los miembros de la familia de la ADH, la ADH-4 es la que parece desempeñar el papel de retinol deshidrogenasa debido a su extraordinaria eficiencia catalítica en la oxidación del retinol (11,36). De acuerdo a diversos estudios

moleculares, se sabe que el sitio de unión de esta enzima es relativamente grande y fácilmente puede unirse al retinol (cuyo peso molecular es de 286.5), lo que indica que el sitio de unión de esta enzima no está diseñado para unirse a sustratos de moléculas simples o de dos átomos de carbono como el etanol (peso molecular de 46da).

Tomando en cuenta el patrón de expresión de la familia de ADH en el ratón, se ha sugerido que la ADH-4 es la única forma que participa en el metabolismo del retinol produciendo ácido retinóico, así como en el metabolismo del etanol durante y después de una intoxicación aguda con etanol durante el desarrollo embriológico del ratón. Por otro lado, el citocromo P-450 parece participar en el metabolismo del etanol en el hígado adulto, pero no parece contribuir en el metabolismo del etanol durante el desarrollo embriológico debido a que su mRNA no es detectable en los estadios E6.5-E8.5. Este hallazgo es importante porque junto con los estudios de la expresión de la ADH, proporciona evidencia de que la ADH-4 puede ser el blanco de acción del etanol en la embriogénesis descrita anteriormente. Sobre las bases de las propiedades enzimáticas de ADH-4, el etanol debe alcanzar niveles altos antes de competir efectivamente con el retinol como sustrato para esta enzima (34,37, 38).

CONSTANTES CINÉTICAS PARA ALGUNAS ISOFORMAS DE ADH

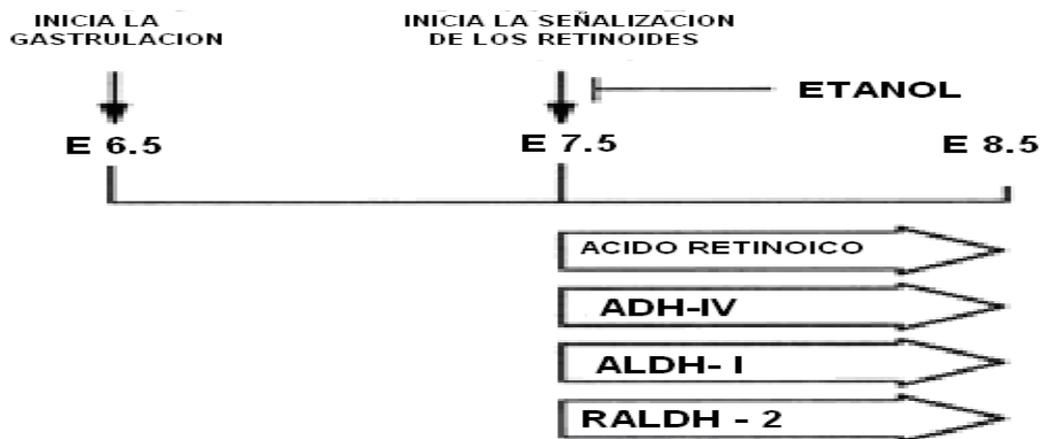
	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4
SUSTRATO	Km (μ m)	Km (μ m)	Km (μ m)	Km (μ m)
Etanol	1.4	34	\pm 2000	2400
Acetaldehído	0.17			ns
Hexanol	0.12			2
Hexanal	0,05			2.4
Todo-trans-retinol (all-trans-retinol)	0.047	0.09		0.008
9-cis-retinol	Actividad no determinada	0.47		0.025
13-cis-retinol	Actividad no determinada			Actividad no detectada
Todo-trans-retinal	0.01			0.008
9-cis-retinal	0.013			0.012
13-cis-retinal	Actividad no determinada			Actividad no detectada

(ns= no saturable con el sustrato)(Boleda, 1993;Crosas, 2000; Farrés, 1994; Juliá 1987). La ADH1 (hepática), presenta una K_i (constante de inhibición) a la pirazola y sus derivados de 0.4 μ M. ADH2 (ubicua), posee una K_i de 78.4mM, finalmente, ADH4 (estómago) posee una K_i para pirazola de 0.56mM.

Los estudios sobre expresión génica anteriormente descritos aportan evidencia de que la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo las dos etapas en la oxidación del retinol hacia ácido retinóico está presente en E7.5 durante el desarrollo embriológico del ratón, etapa en la cual el ácido retinóico se detecta inicialmente. Para esta etapa los tres receptores de ácido retinóico se expresan en numerosos tejidos.

La expresión simultánea de ADH-4, ALDH-I y RALDH-2 en E7.5 cuando el ácido retinóico es inicialmente detectado, proporciona un argumento muy importante y de mucho peso de que estas enzimas están designadas para funcionar en la regulación de la síntesis de ácido retinóico (AR) para que la señalización de retinoides inicie. La intoxicación con etanol durante el desarrollo embriológico puede inducir el síndrome de alcoholismo fetal caracterizado por una alta incidencia de defectos craneofaciales, cardiovasculares y de sistema nervioso central. Algunos de estos defectos probablemente sean causados por una baja sobrevivencia de las células formadoras de la cresta neural después de una intoxicación alcohólica. La habilidad del etanol de reducir el nivel del ácido retinóico durante la E7.5 sugiere que los efectos negativos del tóxico están dados, al menos en parte, por el bloqueo del inicio de la vía de señalización del AR, necesario para la supervivencia celular neurocraneal. Esto probablemente resulte de la inhibición de la síntesis del AR catalizada por la ADH-4 que puede ser el blanco de los efectos destructivos de la intoxicación con etanol durante el desarrollo embriológico del ratón.

Los patrones de expresión espacio-temporal de la enzima ADH-4, y de dos formas de ALDH coinciden con la detección de ácido retinóico al mismo tiempo durante el desarrollo embriológico del ratón (34).



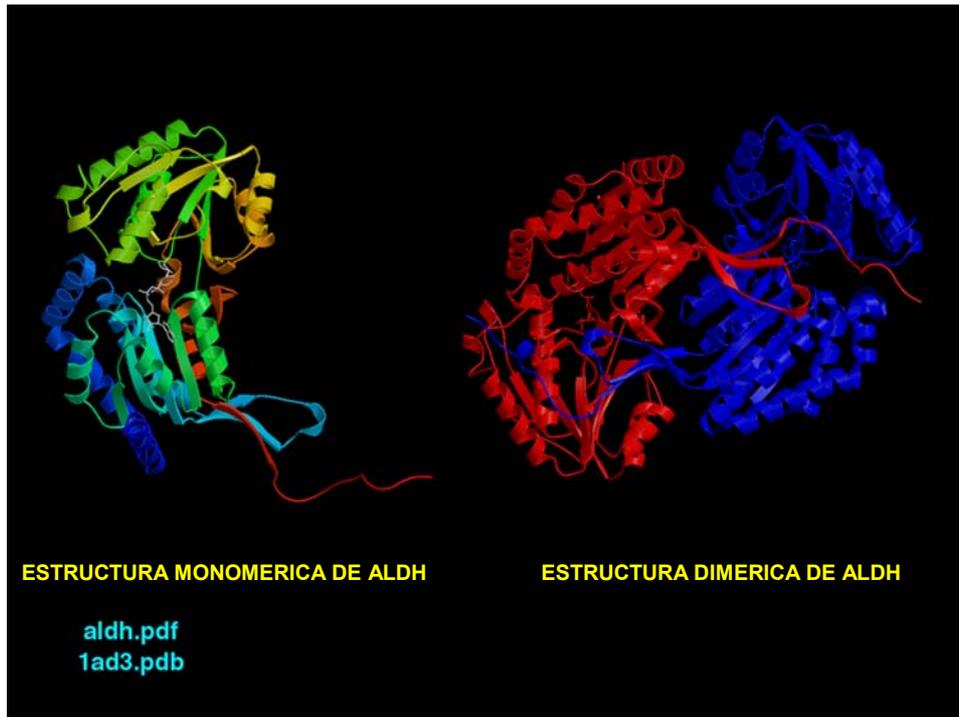
MODELO ESQUEMATICO DEL INICIO DE LA SEÑALIZACION DE (AR) DURANTE EL DESARROLLO EMBRIOLOGICO DEL RATON (Duester G.1998)

Esto sugiere que ciertas formas de ADH y ALDH probablemente participen de manera conjunta en la síntesis de AR durante el desarrollo embriológico del ratón. La intoxicación con concentraciones elevadas de etanol en los embriones de ratón durante la etapa de desarrollo embriológico de 7.5, induce la reducción en los niveles de síntesis de AR. Debido a que en esta etapa no se observa la presencia de otras enzimas relacionadas con el metabolismo de etanol (ADH-1 y P-450), esto indica que la ADH-4 pudiera ser la única enzima disponible en esta etapa para metabolizar el etanol y el retinol.

ALDEHIDO DESHIDROGENASA (ALDH)

La presencia de productos tóxicos generados durante el metabolismo de compuestos tanto endógenos como exógenos en casi todos los órganos y tejidos corporales en los mamíferos, es un fenómeno normalmente observado (39, 40).

Dentro de este grupo, se encuentran los aldehídos como el acetaldehído, cuya reacción de deshidrogenación está catalizada por una variedad de enzimas; algunas de estas enzimas poseen una especificidad limitada en cuanto al tipo de sustrato que prefieren, otras en cambio presentan una gama amplia en cuanto a lo que se refiere a la afinidad por sustratos; a este último grupo pertenece la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH EC 1.2.1.). La enzima se localiza en órganos como el hígado, riñón, estómago y cerebro, además de muchos otros; intracelularmente, su localización está ubicada tanto en citoplasma como en mitocondria (40). La enzima ALDH y sus diferentes isoformas, constituyen un sistema dividido en clases de acuerdo a sus características estructurales (que pueden estar formadas por dímeros o tetrámeros) y catalíticas, además de su localización intracelular (41).



ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE ALDH

Este sistema está formado por cuando menos 8 diferentes clases de enzimas agrupados en diferentes familias con aproximadamente 86 miembros presentes en eucariontes y de estos, 54 observados en animales superiores (42). Ellas son responsables como se mencionó brevemente, no solamente de la oxidación del acetaldehído, sino además de muchos otros compuestos aldehídicos, como las monoaminas, diaminas, poliaminas, además del ácido retinóico y de los aldehídos generados durante eventos de lipoperoxidación de membranas celulares, entre otros (40, 43).

El grado de homologías entre los miembros de cada clase es de aproximadamente 90% y entre las diferentes clases es de aproximadamente 70% (15). En algunos vertebrados como el ratón y el sapo (*Xenopus laevis*), estas enzimas comparten aproximadamente 87% de similitudes en la secuencia de aminoácidos; además, de que su expresión se conserva en la mayoría de los tejidos embrionarios y en algunos durante la etapa adulta, mostrando que están relacionadas con la síntesis de AR. De las 8 clases de ALDH, las más conocidas son: la ALDH clase I, que está constituida por miembros de enzimas cuyas subunidades homotetrámeras poseen afinidad por el retinal y el acetaldehído. La ALDH clase II, posee una estructura tetrámera localizada en la matriz mitocondrial y es la enzima con mayor afinidad por el acetaldehído, mientras que la tercera clase, se compone de diversas isoformas

diméricas, citosólicas con subunidades de 50kDa de peso (15). La ALDH-IV, es dimérica y se localiza en hígado y riñón; su localización intracelular está reservada a mitocondria.

CUADRO COMPARATIVO DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ALDEHIDO DESHIDROGENAS (Rivero –Rosas1997).

Clase	Especie	Gen(locus)	Alelo	Estructura	PMxSubun.	Sustrato	Distribución:tisular y celular
I	Mamíferos,rana, gallina	ALDH-1	ALDH1	Homotetrámera	54kDa	Acetaldehído, retinal.	Diversos tejidos: citosol.
II	Mamíferos	ALDH-2	ADH2*1 ADH2*2	Tetrámera	55kDa	Acetaldehído.	Diversos tejidos: mitocondrias.
III	Mamíferos	ALDH-3	ALDH3	Dímero	50kDa	Dioxinas e hidrocarbónos policíclicos.	Estómago, pulmón e hígado: citosol, mitocondrias y microsomas.
IV	Mamíferos	ALDH-4	ALDH4	Dímero	50kDa	Benzaldehído, aldehídos alifáticos.	Hígado y riñón: mitocondrias.
?	Mamíferos	ALDH-5	?	?	?	?	Tejidos fetales.
?	Mamíferos	ALDH-6	?	?	?	?	Glándulas salivales.
?	Mamíferos	ALDH-7	?	?	?	?	Riñón y pulmón.
?	Mamíferos	ALDH-8	?	?	?	?	Glándula parotida.

En humanos, se han identificado diferentes isoformas de ALDH, obtenidas de diversos tejidos (25, 42- 45). La ALDH-1 observada en humano, presenta diferentes formas ortólogas en varias clases de mamíferos y se denominan de acuerdo al grupo al que pertenecen; en el ratón se denomina ALHD-2 y en la rata RALDH1. Entre las funciones que se han detectado en la ALDH-1 citosólica encontrada en humano, es su capacidad de oxidar retinal hacia AR; además de que se sabe que posee una importante función en tejidos oculares como la córnea y el lente (19). En el humano esta enzima comparte un 70% de similitud con la ALDH-1 y se encuentra en el tejido ventral de la retina (19).

FISIOLOGÍA DE LAS ALDHs

Debido a la multiplicidad de isoformas encontradas en la familia de las ALDHs, y como se mencionó brevemente en párrafos anteriores, entre las múltiples funciones desempeñadas por este sistema de enzimas, se encuentra su capacidad para metabolizar una gran variedad de compuestos aldehídicos generados a partir del metabolismo de compuestos tanto endógenos como exógenos, entre los que se encuentran los aminoácidos, aminas, ácidos grasos, etc. (39, 41). No obstante, que algunos aldehídos como aquellos utilizados en mecanismos fisiológicos relacionados con la visión (13-cis-retinal) son benéficos, la mayoría de los aldehídos generados provocan efectos deletéreos en el organismo, incluyendo citotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis entre muchos otros (46).

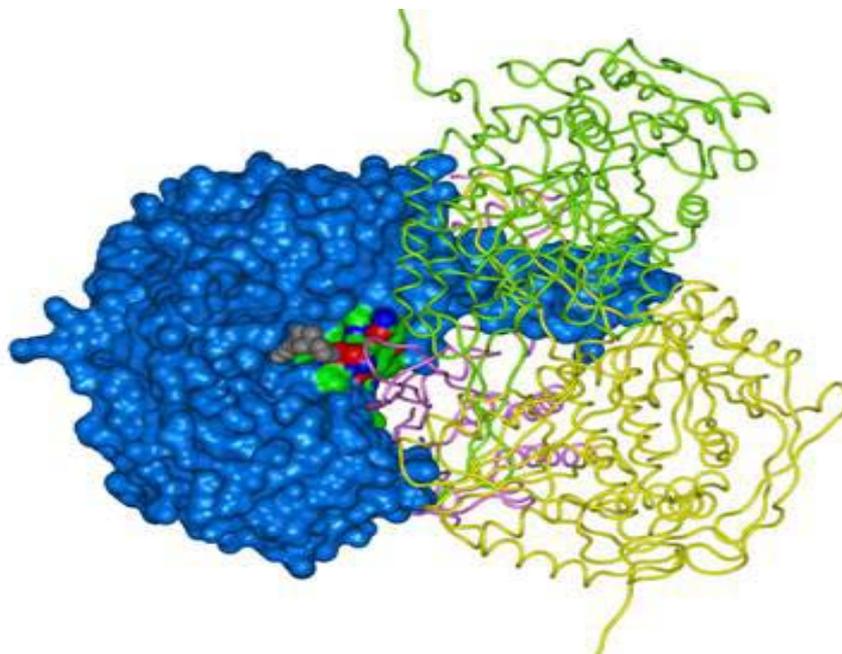
El acetaldehído, principal metabolito generado durante la primera etapa del catabolismo del etanol en el tejido hepático, es una molécula altamente reactiva que posee la capacidad de unirse a otras moléculas principalmente proteínas, y formar compuestos altamente tóxicos denominados aductos (47, 48).

En este sentido, la mayor parte de los efectos tóxicos asociados con la ingesta de etanol son atribuidos a la formación del acetaldehído, y a la subsecuente inactivación de las moléculas a las que se une (48). Aproximadamente el 90% del acetaldehído así formado, es metabolizado principalmente por el sistema ALDH que convierte al acetaldehído en acetato en una reacción de oxidación que requiere NAD^+ como coenzima y, que como en el caso de la ADH, la reacción es bidireccional.



El mecanismo de reacción inicia con la entrada de la coenzima (NAD^+) al sitio catalítico de la enzima y una subsecuente ionización de un grupo tiol de una cisteína

facilita la entrada del acetaldehído. La formación de un producto intermediario (tiohemiacetal) y una oportuna deshidrogenación del mismo dan lugar a la formación de un grupo acilo, el cual es liberado en presencia de una molécula de agua en forma de ácido (15).



SITIO ACTIVO DE ALDH

Ahora bien, de las diferentes clases que conforman al sistema ALDH, cada una posee sus propias características de acuerdo a la función o funciones que desarrollen. Por ejemplo, la ALDH-1 posee una elevada afinidad por el retinal (forma activa de vitamina A) y sus diferentes formas (tanto para el todo-trans-retinal como para el 9-cis-retinal) el cual es oxidado y transformado en AR (hacia todo-trans y 9-cis-ácido retinóico), en una reacción NAD-dependiente con más o menos la misma eficiencia (15, 19, 39). También se sabe que en algunos animales vertebrados como en el ratón y el sapo la expresión de la ALDH-1 se conserva durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta, en ciertos tejidos entre los que se encuentra la retina, que está asociada con la síntesis de ácido retinóico en tejidos oculares.

La estructura terciaria de la ALDH-1 muestra que posee un sitio activo que puede fácilmente ligar o acomodar a los todo-trans-retinales; lo que la hace parecer como una enzima de suma importancia en la síntesis de AR (todo-trans- AR), el cual está relacionado con la regulación de la expresión génica en una gran variedad de tejidos (19). Además, de que la ALDH-1 parece ser la principal enzima responsable en la oxidación del retinal, otra actividad catalítica que se ha observado, es su capacidad

para producir los ligandos necesarios (por ejemplo: RAR α , β y γ) para estimular la diferenciación de células tumorales HL-60 hacia un estado final de diferenciación como granulocitos (39).

La participación de la ALDH-1 en procesos carcinogénicos, es otro fenómeno que se ha observado. La utilización terapéutica de productos anticancerígenos como la ciclosporina, ha llevado a muchos investigadores a estudiar el papel que juega la ALDH-1 en este proceso. Se ha determinado que el mecanismo fisiológico de desintoxicación de los productos metabólicos (4-hidroxiciclofosfamida/aldofosfamida) de este agente, es catalizado por esta enzima; cuando los niveles de 4-hidroxiciclofosfamida/aldofosfamida en sangre alcanzan niveles farmacológicos (160 μ M), la enzima es capaz de metabolizar aproximadamente el 80% de dichos productos (49).

La ALDH-2 (localizada en mitocondria), juega un papel preponderante en el proceso de biotransformación de la nitroglicerina in vivo en tejidos dependientes de relajación como el músculo cardíaco; la enzima cataliza la conversión de la nitroglicerina hacia 1,2-gliceril dinitrato y nitrito, induciendo la producción de especies oxígeno reactivas (ROS) que a su vez inhiben la actividad enzimática de ALDH-2; la utilización de agentes antioxidantes en estas circunstancias, reduce la cantidad de "ROS" (especies oxígeno reactivas) y restablece la actividad de la enzima (50). Esta enzima también se expresa en el embrión y en los órganos reproductores del ratón adulto, así como en el embrión del pollo. También se ha observado que en animales carentes de esta enzima, durante el desarrollo embrionario mueren y muestran una deficiencia total de AR, proporcionando evidencia genética de que ALDH-2 participa en la síntesis de AR durante el desarrollo embriológico y el crecimiento (51).

La ALDH-3, por su parte está relacionada con tejidos oculares como la córnea, y se sabe que cataliza eficientemente la oxidación de compuestos peroxi-aldehídicos de cadena media presentes en este tejido; esto es consistente con la idea de que ALDH-3 participa en mecanismos de defensa contra el efecto de los rayos de luz ultravioleta (52, 53).

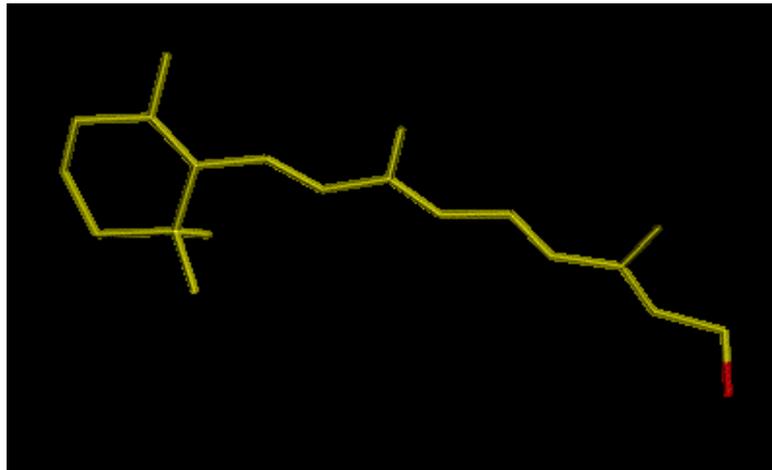
SUSTRATOS FISIOLÓGICOS Y VÍAS METABÓLICAS EN LAS QUE ESTÁN IMPLICADAS LAS ALDH (Rivero –Rosas1997).

SUSTRATO	ALDH	PROCESO METABÓLICO
Acetaldehído.	ALDH1, ALDH2 y ALDH3	Metabolismo del ETOH.
Formaldehído.	ALDH1, ALDH2 y ALDH3	Desintoxicación de formaldehído.
Todo-trans-retinal. (all-trans-retinal)	ALDH1 y ALDH3	Metabolismo del ácido retinóico.
9-cis-retinal.	ALDH1, ALDH2 y ALDH3	Metabolismo del ácido retinóico.
13-cis- retinal.	ALDH1	Metabolismo del ácido retinóico.
5-hidroxiindol-acetaldehído.	ALDH1 y ALDH2	Metabolismo de la serotonina.
3-hidroxifenil-acetaldehído.	ALDH1, ALDH2 y ALDH3	Catabolismo de la dopamina.
γ-aminobutiraldehído.	ALDH3	Síntesis de GABA.
Imidazolacetaldehído.	ALDH1, ALDH2 y ALDH3	Catabolismo de la histidina.
Aldehídos de: espermina, cadaverina. Monoaldehídos de: espermidina.	ALDH3	Catabolismo de poliaminas y diaminas.

Desde hace más de un siglo, se ha desarrollado un interés creciente por conocer y entender cada vez más que en el tejido hepático existe un inmenso repertorio de eventos involucrados en la regulación del ciclo celular, el cual ha generado que durante la última década los investigadores se enfoquen de una manera más intensa a estudiar la habilidad que tiene el hígado para regenerarse (6).

RETINOIDES

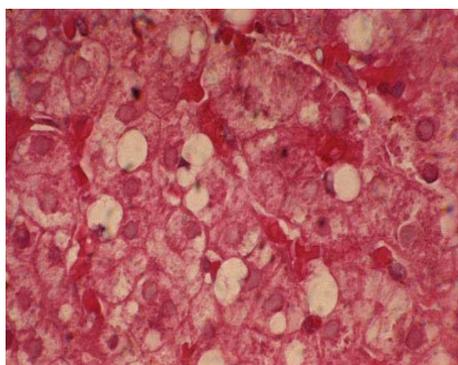
A partir de que se escribiera un capítulo sobre “biosíntesis, absorción y metabolismo hepático del retinol” (forma activa de la vitamina A) en la primera edición del tratado sobre retinoides escrito en 1984 por Michael B. Sporn y cols. (54) la información disponible sobre esta área se ha incrementado considerablemente.



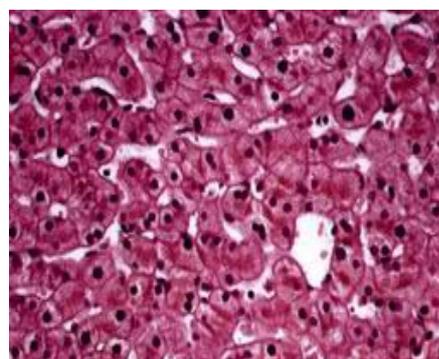
**MOLÉCULA DE VITAMINA A
(RETINOL)**

El descubrimiento de los mecanismos de almacenamiento y desplazamiento del retinol, la descripción de nuevas enzimas involucradas en su metabolismo, los hallazgos de la participación de las proteínas de unión a retinoides dirigiendo el metabolismo de éstos; el conocimiento de cómo el AR y sus metabolitos son sintetizados, y cómo los niveles de AR son regulados y mantenidos por las células, son campos de estudio intenso. Así mismo, el conocimiento del transporte tanto intracelular como extracelularmente hacia los sitios de acción donde es esencial para la regulación de la expresión génica, son eventos que motivan a los investigadores a continuar con sus investigaciones en este campo (54).

El almacenamiento y metabolismo de los retinoides, se lleva a cabo en el hígado en dos diferentes tipos celulares: las células esteladas (también llamadas células de Ito) y las células del parénquima (hepatocitos) (55-57).



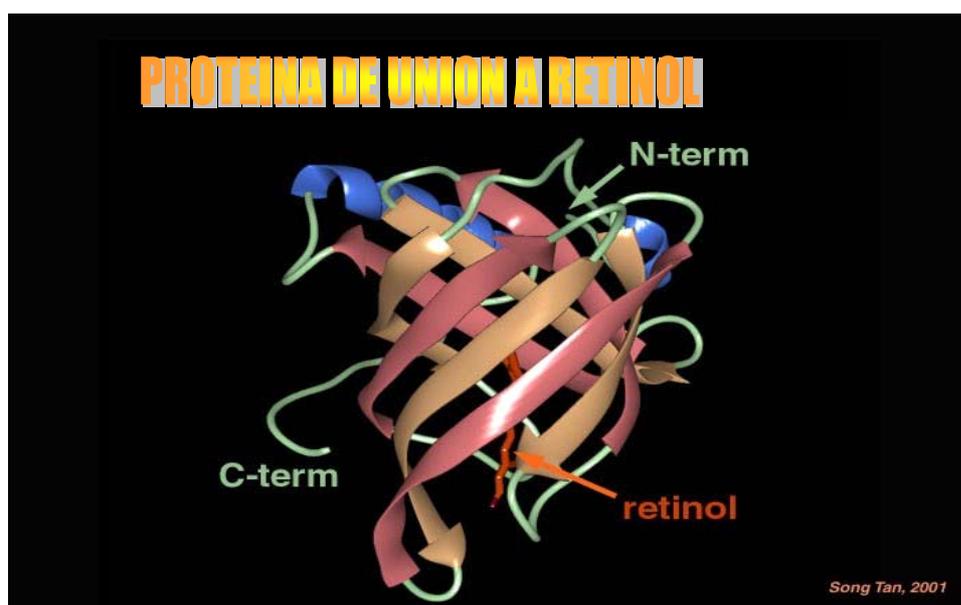
CÉLULAS DE ITO



HEPATOCITOS

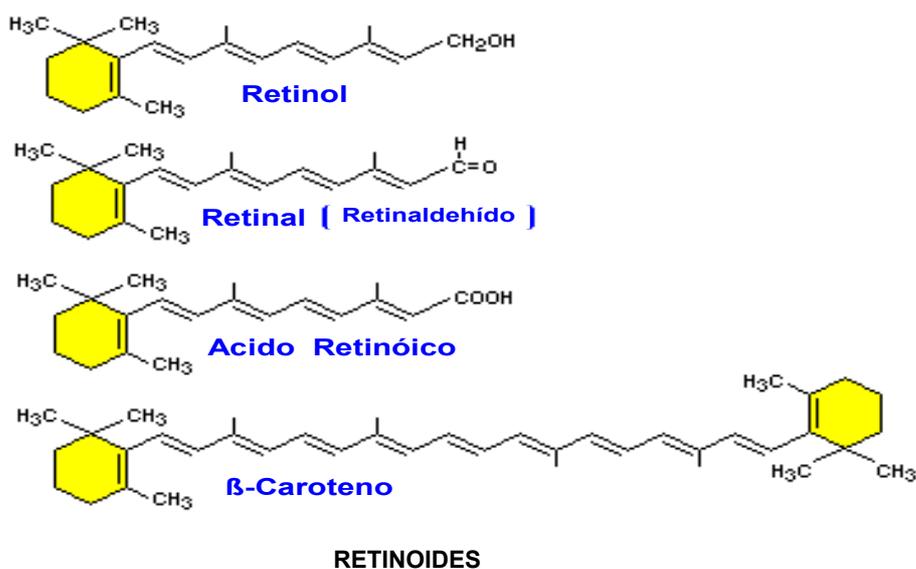
El retinil ester (uno de los primeros productos obtenidos de la hidrólisis de los carotenoides en su vía de transformación hacia AR), es tomado por las células del parénquima y transferido a las células estelares para su almacenamiento. El almacenamiento y metabolismo del retinil ester en el hígado inicia con una reacción hidrolítica para formar retinol, y una esterificación subsecuente para dar lugar a ésteres de ácidos grasos de cadena larga (58).

El transporte del retinol a partir de los retinoides almacenados en el hígado hacia los tejidos sensibles a la vitamina A, se lleva a cabo con la ayuda de la proteína de unión a retinoides (RBP en plasma o CRBP en célula) (59- 61). Esta proteína se aisló por primera vez en 1968, y a partir de entonces ha sido ampliamente estudiada; su secreción es un proceso perfectamente regulado por factores localizados en el retículo endoplásmico, pero el contenido y la disposición de retinoides en la célula es el factor crítico en dicho fenómeno (62). La molécula está formada por una cadena polipeptídica simple, con aproximadamente 182 aminoácidos y tres puentes disulfuro, con un peso aproximado de 21,000 Da, y tienen un sitio catalítico para permitir la unión de una molécula de todo--trans-retinol. La proteína RBP de humano, comparte una homología con la de rata de aproximadamente 86%, esta última posee 183 residuos de aminoácidos (63, 64).



ESQUEMA DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RETINOL (RBP)

La síntesis de los retinoides se lleva a cabo a partir del β -caroteno, que es el precursor de la vitamina A; A partir de este se obtienen dos moléculas de retinol; la oxidación posterior del retinol se lleva a cabo por acción de una oxidasa (ADH) que convierte al retinol en retinal, el cual se transforma a su vez en AR, por la enzima ALDH (19, 3,7 43, 51, 65).



FISIOLOGÍA DE LOS RETINOIDES

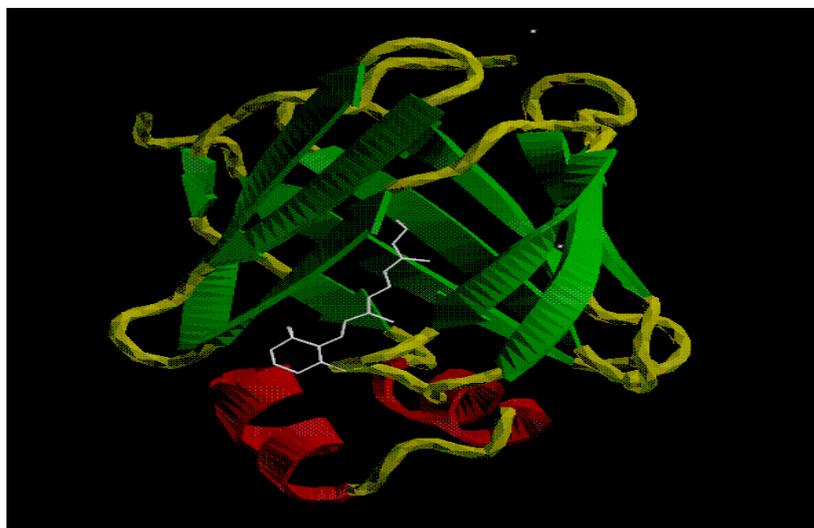
La vitamina A y sus derivados se requieren en diferentes procesos de la vida incluyendo el desarrollo de la visión, reproducción, metabolismo, diferenciación, hematopoyesis, desarrollo óseo y el patrón de desarrollo embriológico (59, 60, 66).

Desde hace varias décadas, se sabe que los retinoides poseen un potente efecto antiproliferativo y son muy efectivos en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades incluyendo el cáncer, además de su participación en la visión (75). Los mecanismos a partir de los cuales los retinoides desempeñan esta variedad de efectos, reside en su capacidad de regular la expresión génica en sitios específicos de aquellos tejidos que son blanco de los retinoides en el cuerpo.

En los años 70 -80s se sugirió por primera vez que la regulación génica inducida por los retinoides era muy similar a lo que sucedía con las hormonas, lo que sugería que los mecanismos de acción de los retinoides eran por analogía similares a

los que se observaba con los esteroides, y que estos mecanismos eran mediados por receptores (67- 69).

Como se mencionó anteriormente, en ese tiempo se descubrió la proteína de unión al AR CRABP (celular retinoic acid- binding protein). La caracterización inicial y el análisis bioquímico de CRABP, instó a los investigadores a seguir buscando, y lo que encontraron fueron dos diferentes tipos de receptores para AR, RAR y RXR; ambos responden a todo-trans-RA aunque posean ciertas diferencias en sus secuencias, pero únicamente RXR responde a 9-cis-ácido retinóico. La identificación de estos dos sistemas y sus diferentes isoformas, ha permitido desarrollar modelos que ayudan a explicar la vía de señalización de los retinoides (70, 71).



RECEPTOR (RAR) UNIDO AL ACIDO RETINOICO

La identificación de estos dos sistemas de receptores para el AR (RAR y RXR) y dos distintos ligandos (todo-trans-AR y 9-cis-AR) ha permitido a los investigadores proponer diferentes vías de señalización del ácido retinóico. De acuerdo a esto, se puede decir que el AR puede actuar tanto en forma parácrina como autócrina; ya sea introduciéndose directamente a la célula desde el torrente sanguíneo, o como producto del metabolismo del retinol vía alcohol y aldehído deshidrogenasas y ligado a su proteína de unión; también la expresión de las proteínas de unión es modulada positivamente por este compuesto (129, 130). De hecho algunas isoformas de ADH (por ejemplo la expresión en humanos del gen ADH3; ó durante la embriogénesis en ratones la expresión del gen Adh-1) pueden ser inducidas positivamente de acuerdo a la cantidad de AR presente en los tejidos donde se expresen (137)

El entendimiento sobre los mecanismos celulares de acción de los retinoides sigue siendo un problema central en el estudio biológico y bioquímico de estos compuestos. En los últimos 10 años el conocimiento a este respecto ha crecido y se ha transformado considerablemente de tal manera, que se ha avanzado en el entendimiento del control que tienen los retinoides sobre la expresión de genes específicos (19, 38, 72).

Aún cuando la fisiología del retinol y sus metabolitos inmediatos permanece como uno de los problemas de nutrición a estudiar más importantes, se sabe que ciertos aspectos de la regulación de las células inmunológicas, así como aspectos de biología celular relacionados con el control de la diferenciación y el desarrollo, está claramente dominado por la participación de 6 receptores conocidos que pueden unirse a todo-trans y/o a 9-cis-RA pero que poseen una baja afinidad por el retinol (73, 74). Todos estos receptores funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos y su efecto sobre el fenotipo celular (75- 77).

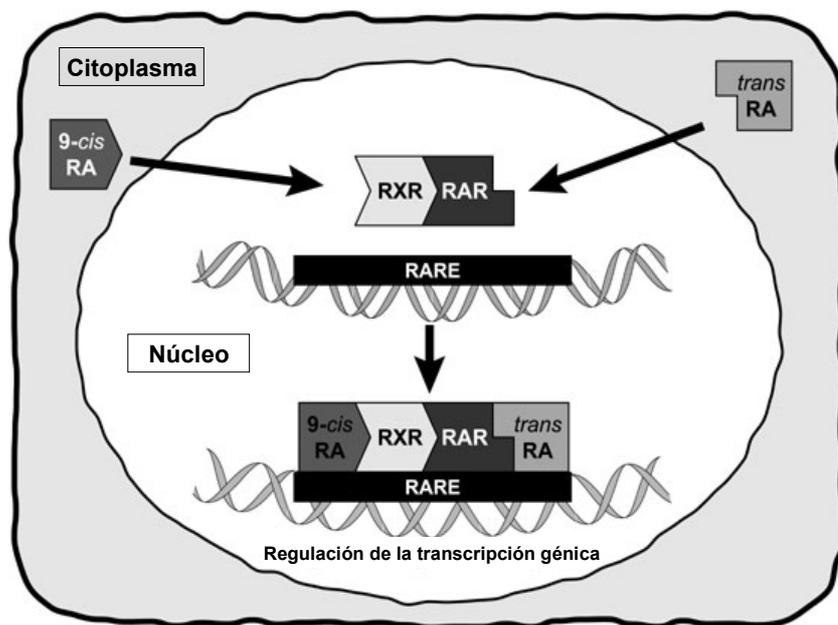


DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA FUNCION DE LOS RECEPTORES DE DE RETINOIDES EN LA REGULACION DE LA TRANSCRIPCIÓN GENICA

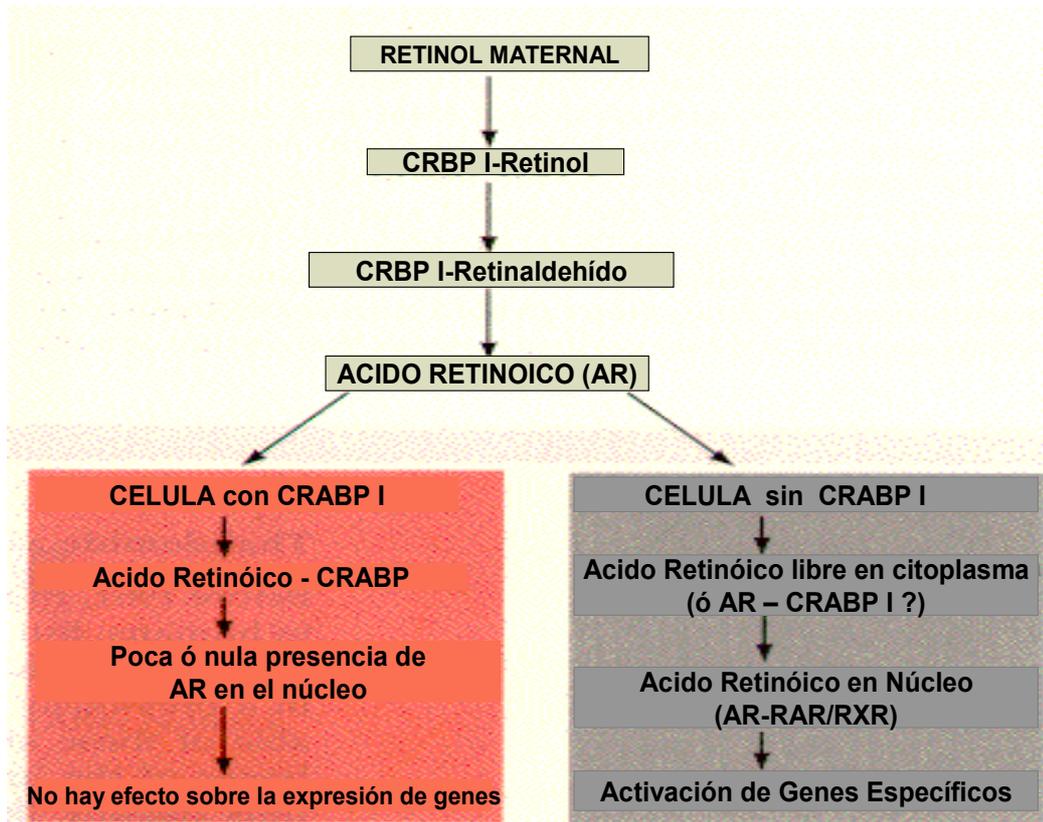
Actualmente se reconoce que debido a su naturaleza esteroidea, los retinoides son mediadores locales involucrados en la proliferación y diferenciación celular entre otras muchas funciones, y probablemente mantengan una estrecha relación o formen parte integral de otros sistemas reguladores autócrinos y parácrinos de células y tejidos. Esta relación se da gracias a la versatilidad que presentan los receptores de

AR de formar complejos con diferentes factores de transcripción además del AR (vitamina D, hormona tiroidea, etc.), y en virtud de su altísima capacidad de formar interacciones específicas proteína-proteína que permiten regular la transcripción de una gran cantidad de genes. En este contexto, los retinoides pueden controlar por ejemplo la expresión de genes involucrados en la síntesis de diversas citocinas y sus receptores, como son algunos factores de crecimiento; además de gran número de oncogenes y sus productos como jun y fos. Algunas de estas interacciones entre retinoides y oncogenes involucran una relación de unión entre proteína- proteína como se mencionó brevemente, entre el receptor de AR y el producto de algún tipo de oncogen (78, 79).

El punto importante que hay que enfatizar es que la función de los retinoides, citocinas, oncogenes y genes supresores no puede ser entendida de manera aislada; todas estas moléculas son la parte central de un sistema regulador unificado, utilizado por las células y tejidos para integrar la información relacionada con su estado de diferenciación y proliferación (78). De esta manera, la multifuncionalidad de las acciones de los retinoides depende del contexto biológico en el cual se encuentren (“No se puede hablar de la actividad general de los retinoides; únicamente se puede considerar su actividad particular definida en un sistema celular en particular”) (54).

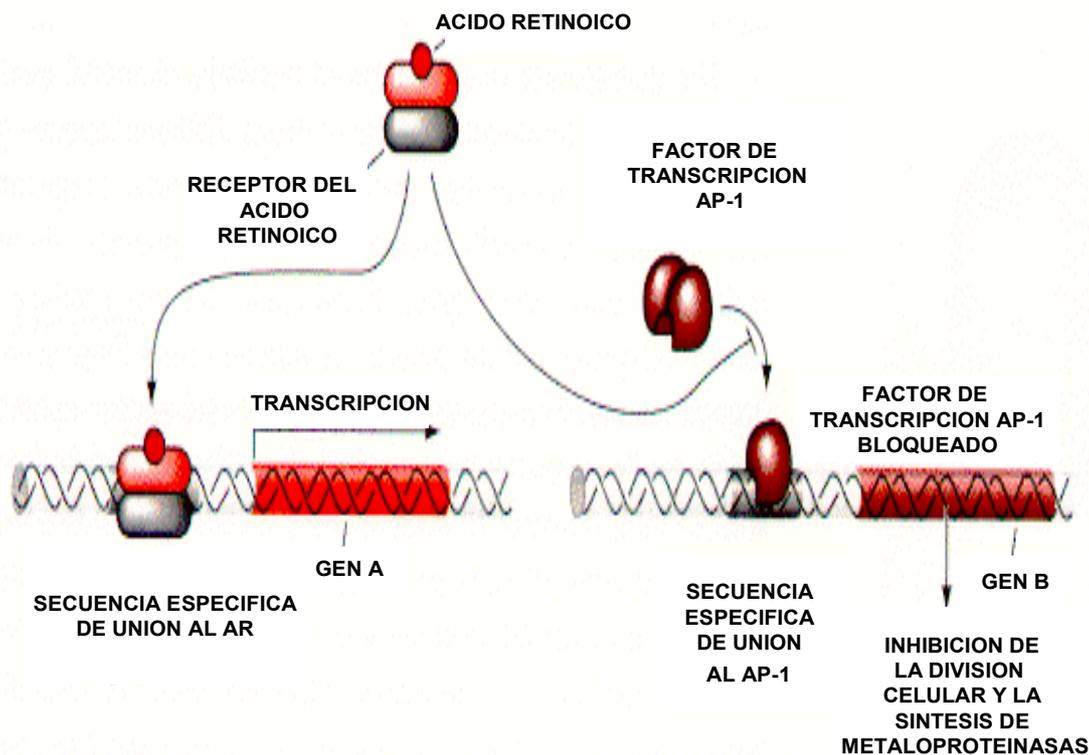
Bajo este contexto, se puede decir que la acción de los retinoides y sus receptores AR (RARs y RXRs) como factores de transcripción dependerá del contexto celular circundante (80). Los retinoides y sus receptores junto con las citocinas y otros compuestos moduladores, deben ser considerados como símbolos de un lenguaje de reconocimiento y comunicación intracelular e intercelular utilizado por las células, y cuyo significado está vinculado o determinado por el ambiente local que las rodea (54, 81).

La idea de que los retinoides realicen algunas de sus acciones a través de la modificación de la actividad o síntesis de factores de crecimiento, o de sus receptores actuando antagónicamente o sinérgicamente empieza a ser aceptada (7, 82). Actualmente, se sabe que los factores de crecimiento no solamente regulan el crecimiento y diferenciación celular, además participan en la síntesis de una variedad de proteínas importantes en la estabilización del fenotipo celular, como proteínas de matriz extracelular, proteasas y sus inhibidores, receptores de integrinas y algunas otras proteínas celulares específicas como son los anticuerpos (84- 87).



Vía Hipotética que resume la relación que existe entre la síntesis del ácido retinoico (AR), las proteínas de unión al ácido retinoico y sus receptores, en el embrión de mamíferos. Si CRABP fuera saturada con AR externo, este sería capaz de penetrar al núcleo uniéndose a sus receptores, alterando la vía normal de señalización y por lo tanto la expresión génica normal (83, Morriss-Kay, 1993.)

Existen diferentes mecanismos por los cuales aparentemente los retinoides pueden controlar la expresión génica. El primer mecanismo está relacionado con el nivel de transcripción génica (de cualquier gen regulado por el AR); el segundo involucra un cambio en la estabilidad o vida media de los mRNA transcritos en respuesta al AR; y finalmente un cambio en la concentración del complejo RAR/unido a su ligando en la etapa de transcripción, puede resultar en un efecto directo o indirecto. Los efectos directos sobre la transcripción generalmente están relacionados con la ausencia de síntesis de proteínas, debido a que es una respuesta inmediata la que se genera; el efecto indirecto o regulación indirecta, se asocia a una respuesta del gen cambiando el nivel de transcripción a tiempos tardíos.

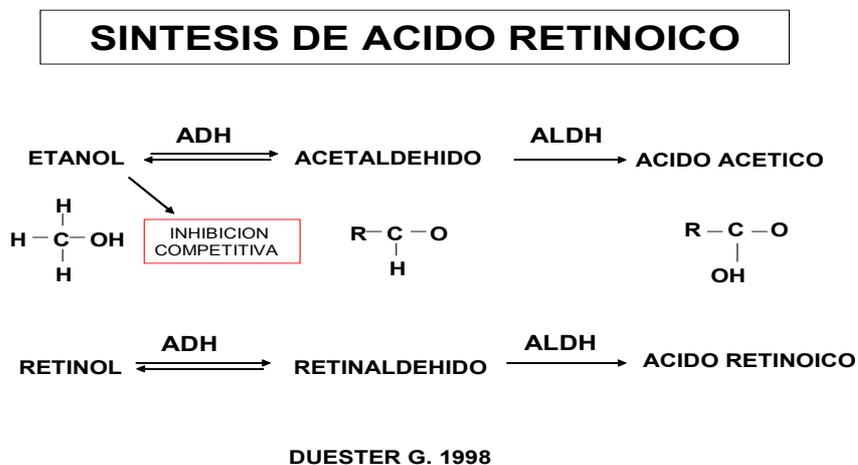


VIA DE SEÑALIZACION DE LOS RECEPTORES DEL ACIDO RETINOICO (RAR y RXR)

Ahora bien para que los retinoides desarrollen sus innumerables e importantes funciones fisiológicas como son la regulación de la expresión génica, crecimiento celular y mitogénesis por mencionar algunas, es necesario que se lleve a cabo el metabolismo de sus precursores (retinol y retinal) con la finalidad de producir el componente activo que es el AR. La vía de conversión de retinol en ácido retinóico depende de un proceso metabólico compuesto por dos etapas, la primera consiste en la oxidación del retinol para formar retinal y la segunda es la oxidación de retinal para dar lugar al AR que actúa como ligando activo, modulando la vía de señalización de los receptores del AR (RAR y RXR) (19, 38, 88, 89).

Aún cuando el proceso bioquímico por medio del cual se sintetiza el AR no está bien definido, numerosos investigadores han establecido que enzimáticamente la vía de conversión es similar a lo que sucede con el etanol. El retinol es el precursor primario en dicha síntesis, la primera etapa parece estar catalizada por la enzima ADH que oxida al retinol para dar lugar al retinal, que a su vez será oxidado en una segunda etapa por la enzima ALDH cuyo producto final será el ácido retinóico. El papel fisiológico de la ADH en la síntesis del AR en la edad adulta no es muy claro; sin embargo, debido a que la enzima posee una alta afinidad por el retinol como sustrato, y se ha observado que tiene una participación muy importante durante la

embriogénesis, se presume que puede ser la enzima responsable de la primera etapa en la formación del ácido retinóico. Como mencioné en capítulos anteriores, debido a que la ADH exhibe una gran actividad metabólica en presencia de retinoides, se ha pensado que muy probablemente esté relacionada con la síntesis de AR, ya que es muy activa tanto en la oxidación de retinol como en la reducción del retinal. Este aspecto es importante debido a la participación de estos compuestos en el desarrollo, embriogénesis y proliferación celular (11, 33).



REGENERACIÓN HEPÁTICA

El interés creciente que ha surgido en los últimos años por reconocer que en el tejido hepático existe un inmenso repertorio de eventos involucrados en la regulación del ciclo celular, ha generado que durante la última década los investigadores se enfoquen de una manera más intensa a estudiar la habilidad que tiene el hígado para regenerarse (6).

La regeneración es la capacidad que presenta un órgano de restituir o reponer el tejido perdido después de sufrir una pérdida parcial o de algún tipo de enfermedad o daño (6). Aunque algunos órganos tienen cierta capacidad para regenerar, el único órgano que verdaderamente desarrolla una hiperplasia y regenera o restituye el tejido celular perdido, es el hígado. Debido a que el hígado presenta esta increíble capacidad regenerativa, durante muchos años un gran número de investigadores se

ha dado a la tarea de esclarecer el mecanismo o los mecanismos por los cuales el tejido hepático lleva a cabo este proceso. Esta capacidad del hígado de reemplazar el tejido perdido por diferentes circunstancias, hace de este órgano el modelo biológico más utilizado para llevar a cabo estudios experimentales sobre los mecanismos fisiológicos que regulan la regeneración. A partir de los resultados que las investigaciones han aportado, es posible decir que si por alguna razón el hígado pierde la mayor parte de su tejido (hasta el 70% de su masa total al efectuarse una hepatectomía parcial), el tejido restante prolifera hasta restituir la masa perdida (hiperplasia compensatoria) y esto lo hace en el transcurso de unos días a pocas semanas (90).

Una característica importante que presenta el hígado es, que bajo condiciones naturales en las cuales el tejido hepático no presenta ningún tipo de anomalía, los hepatocitos que son el tipo celular predominante en este órgano (correspondiendo a un 70% de la población celular total y aproximadamente un 80% del volumen total del hígado) rara vez se replican (8). El hepatocito, siendo una célula altamente diferenciada, permanece de manera normal en un estado de quiescencia en su etapa de madurez (7, 91).

Cuando en el hígado se presentan condiciones que provoquen una pérdida de la masa celular ya sea de manera física, por intoxicación o por algún tipo de daño, el tejido hepático responde iniciando un proceso de replicación. Del estado quiescente que corresponde a la fase (G0) del ciclo celular, los hepatocitos pasan al estado (G1) que es la forma pre-replicativa o interfásica de la célula, la cual es seguida por la fase (S) de síntesis de ADN, para finalmente llegar a la fase (M) mitosis con la correspondiente división celular que completa la secuencia del ciclo celular (92). Los eventos involucrados en la respuesta regenerativa son precisos, complejos y perfectamente regulados (93).

La multiplicidad de factores que están involucrados e interrelacionados dentro del complejo proceso que se lleva a cabo en la regeneración no está regulada por un factor único que actúe como inductor e inhibidor de este proceso regenerativo. Dentro de los factores involucrados se pueden mencionar algunos como son: factores hormonales y de crecimiento; elementos inhibidores, receptores, transductores y moduladores de la expresión genética y del ciclo celular, entre muchos otros.

Cabe mencionar nuevamente, que el hígado es el órgano donde se llevan a cabo los principales mecanismos de síntesis, almacenamiento y degradación de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, retinoides, etc., además de mecanismos de desintoxicación de agentes tóxicos exógenos como el etanol (9).

De manera cotidiana, el hígado sano está sometido a la influencia de una gran cantidad de señales ambientales (ingesta de cierto tipo de alimentos, inflamación sistémica, etc.) capaces de inducir la proliferación de los hepatocitos, que en su estado adulto son células altamente diferenciadas con una capacidad replicativa mínima. Sin embargo, aparentemente el microambiente hepático en un tejido normal es capaz de atenuar o modificar estas señales extracelulares antes de que lleguen a ellos, previniendo o impidiendo que las células respondan a dichas señales, fenómeno que se inhibe durante la regeneración (7).

La regeneración, seguida de una hepatectomía parcial es un modelo experimental muy utilizado para investigar los mecanismos que regulan la proliferación celular in vivo; el modelo clásico de hepatectomía parcial está basado en la eliminación de hasta un 70% del tejido hepático en animales experimentales (94); sin embargo, también se utilizan otras variantes de este modelo, como la resección de 30% y 90% del tejido (95- 98).

El tiempo promedio que tarda el hígado en recuperar su tamaño normal en ratas hepatectomizadas 70%, está entre 5-10 días (6, 90). En el humano, también se ha observado que la restauración hepática se lleva a cabo de manera total, y es un método que permite a pacientes recuperar el tejido perdido por algún tipo de trauma, infecciones, o uso de hepatotoxinas, recuperar el tejido perdido (99-101), y así volver a tener un hígado sano, que es de fundamental importancia para dar una respuesta adecuada a los requerimientos de energía del organismo (7).

Después de casi un siglo de utilizar al hígado como un modelo experimental “in vivo”, para estudiar los mecanismos que regulan la regeneración, hasta el momento no se ha logrado descifrar de manera total el intrincado rompecabezas metabólico y molecular que estructura y hace funcionar a este fenómeno celular (6). Sin embargo, si se sabe que es un fenómeno bien organizado que involucra una enorme cantidad de vías de señalización y agentes inductores que permiten al órgano alcanzar de manera exacta su volumen total (90).

Después de una hepatectomía, el hígado remanente responde tan eficientemente como le es posible para cubrir sus necesidades funcionales con el tejido que posee. Las primeras células hepáticas que responden a las señales liberadas post-hepatectomía son los hepatocitos. Como consecuencia de la proliferación de los hepatocitos, se forman pequeños grupos o colonias de entre 10-14 células carentes de matriz extracelular y sinusoides (102). Cuatro días después de la hepatectomía, las células de Ito envían delicadas prolongaciones celulares entre las colonias de hepatocitos; esta invasión coincide con la activación de genes que codifican para la síntesis de laminina en las células de Ito. La penetración de las

células de Ito entre los hepatocitos, es seguida por una migración de células endoteliales que finalmente restaurarán la vascularización normal de los hepatocitos (102).

La proliferación celular que se desencadena inmediatamente después de una resección, está inducida por la liberación de factores mitogénicos primarios que se rigen por patrones establecidos o modulados por factores de crecimiento y señales de transducción (33). Los mitógenos, están caracterizados como sustancias que estimulan la síntesis de ADN e inducen mitosis en células in vivo y en cultivo; los factores de crecimiento (HGF, TGF- σ , EGF) por su parte regulan estos eventos proveyendo a las células en mitosis señales que estimulan el crecimiento o que inhiben el mismo; además de participar en mecanismos morfogénicos y de angiogénesis (103).

Estos factores de crecimiento, a su vez generan señales intracelulares que activan factores de transcripción génica preexistentes, pero normalmente inactivos (ej. NF-kB, AP1), y que están relacionados con la regulación de las diferentes fases de crecimiento observadas durante la regeneración (82). Bajo este contexto, el hígado se ha convertido como se mencionó brevemente en párrafos anteriores, en un modelo biológico experimental que permite estudiar no solamente los mecanismos de regeneración además, aquellos mecanismos relacionados con cada una de las diferentes funciones de las cuales es responsable este órgano, entre las que se encuentra el metabolismo de agentes tóxicos tanto endógenos como exógenos, compuestos de vital importancia como carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, retinoides, etc.

JUSTIFICACION

La regeneración, observada en el hígado como respuesta a la pérdida de tejido por diversas causas, es un fenómeno fisiológico cuyos mecanismos no se ha logrado descifrar totalmente. Sin embargo, si se sabe que es un fenómeno perfectamente bien regulado donde se desencadena la liberación de una gran cantidad de factores responsables de iniciar y promover la regeneración; dentro de estos factores se incluyen mitógenos, comitógenos, factores de crecimiento, inhibidores, etc., que inducen la síntesis de ADN, evento crucial en la regeneración y en cualquier otro mecanismo de proliferación celular. Esta síntesis de ADN además, está mediada por diversas enzimas responsables del metabolismo de los compuestos necesarios para que se lleve a cabo de manera orquestada todo el proceso.

La familia de la ADH y la familia de la ALDH, cuyos miembros poseen una amplia afinidad por diversos sustratos entre los que se encuentran el etanol y los retinoides, forman parte de uno de los sistemas de desintoxicación alcohólica más importantes localizados en el hígado, pero su participación funcional dentro del organismo no se limita a este proceso. Por el contrario, ambas familias de enzimas se han relacionado con una amplia gama de procesos fisiológicos en los que también están involucrados los retinoides. El metabolismo de los retinoides es un evento sumamente importante en múltiples mecanismos fisiológicos relacionados con vías de señalización y transcripción de genes, proliferación y diferenciación celular, carcinogénesis y regeneración tisular entre otros. Las diferentes etapas involucradas en su metabolismo están reguladas por enzimas pertenecientes a estas dos diferentes familias de enzimas.

Ahora bien, diversos investigadores han observado que el consumo de etanol en animales hepatectomizados, inhibe o retarda la respuesta regenerativa del hígado; se piensa que entre muchas otras causas, la modulación del metabolismo de las poliaminas, mecanismo en el cual aparentemente participan enzimas que podrían estar reguladas por acción de los retinoides. También se ha observado en estos animales, que la actividad enzimática de ADH disminuye en cuanto al metabolismo del etanol se refiere, si se compara con la actividad observada en animales hepatectomizados sin ingesta de etanol.

Cabe mencionar que los retinoides y las enzimas ADH y ALDH, están plenamente relacionados con mecanismos inductores y represores de carcinomas y hematomas. También se ha reconocido clínicamente, que los retinoides pueden actuar como

agentes anticancerígenos en enfermedades hematológicas malignas como la leucemia promielocítica o en problemas más sencillos como el acné.

Ahora bien, aún cuando diversos trabajos cinéticos han mostrado que la actividad de ADH hepática cambia después de realizada una hepatectomía, hasta el momento no se sabe a ciencia cierta cuales son los mecanismos que inducen dicho cambio.

Por este motivo, nosotros proponemos que los cambios observados en la actividad de esta enzima, están relacionados con su posible participación en el metabolismo de compuestos necesarios en la regeneración hepática.

HIPOTESIS

Durante la regeneración hepática, se llevan a cabo una gran cantidad de eventos fisiológicos que permiten al hígado recuperar el tejido perdido; dentro de estos eventos, la síntesis de compuestos involucrados en mecanismos de proliferación y diferenciación celular es muy importante. Debido a su versatilidad funcional, proponemos que los retinoides (específicamente el ácido retinóico), están participando de manera importante en el fenómeno de regeneración; y que las enzimas ADH y ALDH están involucradas en el metabolismo de los precursores, (retinol y retinal) utilizados para la síntesis del ácido retinóico.

OBJETIVO GENERAL

Definir si las enzimas ADH y ALDH están involucradas en el metabolismo de los retinoides durante el proceso de regeneración hepática. Examinar los niveles de expresión de las enzimas ADH y ALDH, así como la variación en el contenido de retinoides durante la regeneración del hígado.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el comportamiento cinético de las enzimas ADH y ALDH en los diferentes estadios de proliferación hepática frente a diversos sustratos.
2. Determinar la distribución subcelular de las enzimas ADH y ALDH de acuerdo a la actividad enzimática observada en las diferentes fracciones subcelulares.
3. Relacionar la actividad de estas enzimas con la presencia y distribución subcelular de sustratos endógenos como los retinoides (retinol y retinal).

4. Cuantificar los niveles hepáticos de retinoides no esterificados en los animales sujetos a una hepatectomía parcial.
5. Determinar la cantidad de CRBP-I (proteína de unión a retinol) presente en el tejido hepático de los animales experimentales a diferentes tiempos post-hepatectomía.
6. Determinar la cantidad de la enzima ADH presente en el tejido hepático de los animales experimentales a diferentes tiempos post-hepatectomía.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1. Material biológico: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar cuyo peso osciló entre 250-270g, se alimentaron ad-libitum con alimento semi - sintético para roedores (PURINA) y agua. Se mantuvieron bajo periodos de luz / oscuridad de 12hrs.

2. Manejo de los animales:

Grupos experimentales:

- a. Animales con hepatectomía al 30% y 70%.
- b. Animales control (Sham).

3. Procedimientos quirúrgicos:

- a. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron entre las 9:00 – 10:00 AM, previa anestesia con éter. La hepatectomía consistió en remover a un grupo de animales 1/3 de hígado (uno de tres lóbulos hepáticos: 30% aprox.) y a otro grupo 2/3 de hígado (dos de tres lóbulos de tejido hepático: 70% aprox.) de acuerdo a lo descrito por Higgins y Anderson (99).
- b. Los animales fueron decapitados (previa anestesia con pentobarbital) a las 12, 24, 48, 72 y 96hrs post – cirugía.

4. Procesamiento del tejido hepático:

- a. Obtención del tejido hepático post – mortem. Peso fresco del tejido.

- b. Homogenización del tejido en un volumen 1:10 en un medio que contenía 0.25mM de sacarosa, buffer Tris 10mM, EDTA 1mM (pH 7.4). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (128).

5. Obtención de fracciones subcelulares:

- a. Para la obtención de las fracciones subcelulares (mitocondrias, citosol, microsomas y membrana plasmática) se utilizó el tejido previamente homogenizado, y las fracciones se separaron de acuerdo al método descrito por Aguilar Delfín et al. (110).
- b. Después de llevarse a cabo la homogenización del tejido obtenido, el producto obtenido, se centrifugó a 1800g/15min. Del sobrenadante se obtuvieron las siguientes fracciones: citosol, microsomas y mitocondrias.
- c. El sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior, se centrifugó nuevamente a 7,500g/15min. De las dos fracciones obtenidas, el sobrenadante se centrifugó a 100,000g/60min y de aquí se obtuvo el citosol y los microsomas. Del precipitado se obtienen las mitocondrias haciendo 2 centrifugaciones a 7500g/15min.

6. Determinación de la actividad enzimática de ADH y ALDH. Se trabajó con cada una de las fracciones subcelulares obtenidas, poniendo especial atención en la fracción citosólica que es donde principalmente se detecta la presencia de ADH; en el caso de ALDH se trabajó tanto en citosol como en mitocondrias.

- a. La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo espectrofotométricamente a 25°C, tomándose para tal efecto el incremento o decremento en la absorbancia a 340nm (relacionado con la oxidación o reducción del NAD⁺), a partir del metabolismo de sustratos específicos como son el etanol, butanol, octanol, acetaldehído y malondialdehído.
- b. Además se utilizaron otros sustratos presentes de manera endógena como son los retinoides (retinal y retinol), en este caso la lectura se tomó a 400nm que es el rango en el cual absorben estos sustratos (una disminución en la lectura se relaciona con la reducción del retinal y un incremento con la oxidación del retinol).

- c. Los ensayos para medir la actividad de ADH utilizando alcoholes y aldehídos diferentes a los retinoides como sustratos, se llevaron a cabo utilizando NAD^+ y NADH como coenzimas a una concentración de 0.32mM y 0.26 mM, respectivamente. Los amortiguadores que se utilizaron: buffer de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.5 para aldehídos y buffer de glicina 0.1M pH 9.7 para alcoholes.
- d. Las lecturas se tomarán a intervalos de dos minutos por espacio de 10 minutos, para cada ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de los sustratos.
- e. Para el caso de los retinoides, los amortiguadores contenían detergente tween -80 al 20% y el sustrato se disolvió previamente en acetona. Todos los reactivos se prepararon en el momento.
- f. La determinación de la actividad de la ALDH se realizó de acuerdo al método descrito por Ambroziak y Pietruszko (40).
- g. La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo espectrofotométricamente a 25°C, tomándose para tal efecto el incremento o decremento en la absorbencia a 340nm de la producción de NADH.
- h. Se utilizó un buffer de pirofosfato de sodio 100mM pH 9.0, 0.5mM de NAD, 1mM de EDTA, y 1mM de acetaldehído como sustrato.

7. Extracción y cuantificación de retinoides.

- a. Se utilizaron 200µl de homogenado total; se mezclaron con 2ml una mezcla metanol/acetona (v/v) que se centrifugaron a 10,000xg por 10 min. a 4°C.
- b. La fase orgánica obtenida se evaporó por completo y se resuspendió con 200ul de una mezcla de dimetilsulfoxido/metanol (v/v).
- c. De las muestras obtenidas, se tomaron una alícuotas que se inyectaron en el HPLC, equipado con una columna C-18 de fase reversa (4.5 x 25mm), a un flujo de 1ml x min., en una fase móvil que consistió de 0.5mM de acetato de amonio, metanol y acetonitrilo (25:65:10 v/v) como solvente A; y como solvente B, se utilizó únicamente acetonitrilo.
- d. El tiempo y magnitud de los gradientes se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Molotkov et al. (37).
- e. La detección de retinol se realizó a 328nm, mientras que el ácido retinóico se detectó a 350nm, utilizando todo-trans- retinol y todo- trans- ácido retinóico como estándares.

- f. La cuantificación de retinal, se llevó a cabo midiendo la reducción de retinol vía actividad enzimática de ADH in vitro.
- g. Para tal efecto se utilizó ADH de hígado de caballo purificada (10 μ g) y 0.3 mM NADH en un amortiguador de fosfato de potasio (pH 7.5); al momento de la reacción de le agregaron 200 μ g de proteína citosólica. A cada muestra, se le agregó un estándar interno de todo- trans-retinal (50 μ g), la transformación de retinal a retinol fue monitoreada espectrofotométricamente por el decremento en absorbencia a 400nm.
- h. Después de 20min., la reacción fue detenida. La diferencia entre la absorbencia obtenida por el estándar y la muestra se tomó como el contenido neto de retinal formado de manera endógena en las muestras de citosol de los grupos experimentales. La identificación y cuantificación del retinol obtenido por este método, se confirmó subsecuentemente por HPLC.

8. Electroforesis e inmunotransferencia: Western – Blot.

- a. Muestras citosólicas (50 μ g) fueron procesadas para su subsecuente utilización en los ensayos de Western-blot. Las muestras se cargaron en un gel al 10% SDS-PAGE; después de llevarse a cabo la electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosas por espacio de dos horas a 330mA/cm². Los epítopes inespecíficos se bloquearon utilizando una mezcla de leche en polvo sin grasa en una concentración de 5% disuelta en amortiguador de fosfatos; la incubación se dejó durante toda la noche a 4°C.
- b. Las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal de cabra Anti-CRBP-1 (proteína de unión a retinol) y uno policlonal para ADH (Santa Cruz) en una dilución 1:300 en PBS, durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-cabra-HRP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra β -actina (Calbiochem, La jolla, San Diego Ca.).
- c. Las proteínas inmunoreactivas, se detectaron utilizando el método de ECL y película fotográfica Kodak; el análisis se realizó por cuantificación densitométrica.

9. Determinación de marcadores de regeneración hepática.

- a. La regeneración hepática se determinó utilizando dos parámetros: 1) actividad de timidin cinasa (TK) evaluada en la fracción citosólica de acuerdo a

la técnica descrita por Sauer y Wilmanns (135); y 2) índice mitótico evaluado utilizando microscopía de luz, reportada según el número de células en mitosis en 10 campos ópticos con un objetivo de 40X.

10. Cálculos y estadística.

- a. Los parámetros cinéticos, se calcularon utilizando el método de non-linear Enzfitter program (1989).
- b. La significancia estadística de las diferencias se realizó por ANOVA y Newman Keuls test.
- c. El análisis de la cantidad de retinoides obtenidos por método de HPLC se llevó a cabo utilizando el programa Scion Image (Scion corporation USA).

RESULTADOS

Efecto de la hepatectomía parcial sobre la actividad enzimática de ADH en hígado.

Trabajos previos de éste laboratorio, determinaron que la HP del 70% induce una inhibición transitoria sobre la actividad de la ADH y el metabolismo del etanol (104). Los resultados obtenidos en este trabajo, nos permiten llevar a cabo una comparación de la actividad de ADH in vitro utilizando como sustratos etanol y acetaldehído, en muestras citosólicas obtenidas de hígados en dos estados de proliferación inducida por HP 30% y 70% (Fig.1). Los animales sometidos a una HP del 70%, mostraron una baja en la actividad enzimática de ADH citosólica sobre etanol (10mmol/L) durante las primeras 48 h posteriores a la cirugía, al comparar con los resultados de los animales control. Esta actividad se normalizó aproximadamente 3 días después de la cirugía (Fig. 1). Por otro lado, en los animales sujetos a una HP 30% no se observaron cambios significativos en la actividad de ADH durante las primeras 72 h posteriores a la cirugía; sin embargo, después de este periodo, si se encontró un aumento significativo en la actividad de ADH sobre etanol (Fig.1).

La reducción de los aldehídos en HP 70% (1mmol/L acetaldehído), presentó una disminución significativa a las 24 h post-cirugía, disminución que fue seguida por un claro incremento de actividad de ADH hacia este sustrato a las 72 h posteriores a la HP (Fig. 1). Aún cuando los valores obtenidos en la reducción del acetaldehído en los animales con HP de un 30% fueron mayores que los observados en animales con una HP del 70%, el patrón de actividad que mostró la ADH fue similar en ambos

casos. Por otro lado, la actividad enzimática de ADH en la fracción citosólica de los animales sujetos a 70% de HP (24 h post-cirugía), cambia en este periodo de tiempo al utilizar cantidades menores de etanol y acetaldehído (acetaldehído en la reacción inversa o de reducción) en los ensayos de actividad in vitro (Fig.2). Al llevar a cabo el análisis cinético de la actividad utilizando el método de Michaelis-Menten, se observó una aparente inhibición de la actividad enzimática que parece ser no competitiva si comparamos los resultados con lo observado en los animales control. Estos resultados podrían explicarse de dos formas: 1) desde un punto de vista catalítico, el sitio activo de la enzima podría estar ocupado por la presencia de un inhibidor y/o este inhibidor podría estar incrementado; y 2) la disminución en la cantidad de enzima; sin embargo, cualquiera que fuera la causa su efecto es temporal pues en tiempos posteriores esto desaparece. En las muestras analizadas provenientes de una HP del 30%, no se detectaron cambios significativos en los parámetros cinéticos de ADH en la reducción del acetaldehído; sin embargo, si se observó una inhibición competitiva en esta variante del modelo cuando se utilizó etanol como sustrato pues la K_m para el etanol se incrementó en el tejido remanente de estos animales (Fig. 2, tabla 1). Esto sugiere que la actividad de la enzima se modifica dependiendo de la magnitud de la pérdida de tejido, permitiendo suponer que la magnitud de la HP induce un patrón diferencial que afecta de manera importante la actividad de la ADH hepática.

Caracterización de la inhibición de la actividad de ADH hepática como resultado de la cantidad de tejido removido.

Los animales sujetos a 30% de HP, presentaron variaciones en la constante cinética (K_m) de ADH para el metabolismo de etanol; la K_m en estos animales incrementó progresivamente, retomando sus valores normales 4 días después de la cirugía; mientras que, la velocidad máxima (V_{max}) no presentó cambios significativos durante las primeras horas; sin embargo, al 4° día post-cirugía se observó un claro incremento en este parámetro (Tabla1). Contrario a lo observado hasta este momento en los animales con HP 30%, los animales expuestos a una remoción mayor de tejido (70%), mostraron un patrón de comportamiento diferente en la actividad de ADH. En este grupo, mientras que la K_m no presentó cambios significativos, la V_{max} disminuyó progresivamente hasta las 48 h post-cirugía retomando sus valores normales después de este tiempo (Tabla 1).

De acuerdo con reportes previos (21), la actividad de ADH hepática es más eficiente reduciendo acetaldehído que oxidando etanol. Con una HP del 30%, los

cambios observados en la reducción de acetaldehído semejan lo observado en la oxidación del etanol, pero en diferente magnitud. La K_m se redujo transitoriamente, mientras que la V_{max} para acetaldehído se incrementó paulatinamente permaneciendo con valores elevados hasta 4 días después de la cirugía (Tabla 1). En los animales con una HP del 70%, la V_{max} para la reducción del acetaldehído vía ADH, decreció significativamente a las 48 h post.-cirugía, mientras que los valores de K_m no se modificaron de manera significativa (Tabla 1). Cabe mencionar que los parámetros cinéticos y los valores de pHs óptimos observados utilizando NAD^+ , mostraron valores semejantes tanto en los controles como en los animales hepatectomizados (12 - 48 h post- cirugía). Los valores de pH óptimo (9.5 – 10.0), y K_m para NAD^+ (0.32mM), coinciden con los valores reportados previamente (21). Aunado a esto, la actividad de la enzima al metabolizar los diferentes sustratos utilizados, se inhibió por la adición de 4-MP, descartando una posible participación de ALDH citosólica en el metabolismo de dichos sustratos.

Ahora bien, la cuantificación de la proteína de ADH en la fracción citosólica de los animales experimentales, por medio de un ensayo de Western- Blot (Fig. 3), permitió observar que muy tempranamente ocurre un decremento de la cantidad de enzima en las muestras de HP 30%, aunque esta disminución no fue significativa. Sin embargo, la cantidad de proteína aumenta de manera progresiva a partir de las 24h, hasta alcanzar un pico máximo a las 96h post-hepatectomía. Respecto a lo observado con una HP del 70%, el patrón cuantitativo determinado es claramente diferente a lo de una HP del 30%; la cantidad de proteína cuantificada en 70% se incrementa notoriamente desde las primeras horas post-hepatectomía, alcanzando un pico máximo a las 24h para después disminuir progresivamente. No obstante, sus valores se mantienen por encima de los cuantificados tanto en el control como en las muestras de HP 30%. Estos resultados, podrían sugerir que no existe una relación entre la cantidad de proteína de ADH cuantificada y la actividad de esta enzima (Fig.3).

Metabolismo de retinol y retinal en animales control y hepatectomizados, vía ADH y ALDH hepáticas.

La actividad de ADH utilizando retinol (70 μ M + NAD^+ 0.32mM) y retinal (25 μ M + $NADH$ 0.26mM) como sustratos después de una HP 30%, permitió ver que la oxidación de retinol no tuvo cambios importantes, excepto por una reducción significativa a las 48h posteriores a la cirugía; por otro lado, la reducción de retinal

mostró una disminución importante a las 24 y 72 h post-HP (Fig. 4). En contraste, las muestras obtenidas de una HP del 70% mostraron un incremento progresivo en la oxidación de retinol vía ADH, siendo mayor hacia las 72 y 96 h posteriores a la cirugía; este incremento estuvo acompañado por un constante decremento en la reducción de retinal, comparado con lo que se observó en HP 30% (Fig. 4). Tanto la oxidación del retinol, como la reducción del retinal estuvieron mediadas por la actividad de ADH citosólica, esto se corroboró al adicionar a los ensayos in vitro con 1mM de 4-MP. La 4-MP produjo una inhibición de la actividad de ADH citosólica hasta de un 60% en los animales control y 65% en los animales con HP 70% cuando el inhibidor se adicionó en concentraciones desde 0.5 hasta 2mM. Sorpresivamente, en animales con una HP del 30% la enzima fue más susceptible de ser inhibida pues se determinó hasta un 85% de inhibición oxidando retinol y de 50 - 65% reduciendo retinal al utilizar las mismas concentraciones de 4-MP que en el modelo de HP 70%.

Por otra parte, se sabe que el retinal es uno de los compuestos utilizados como sustratos por diferentes formas de ALDH (19). En este trabajo, nos enfocamos principalmente en el análisis de la participación de las isoformas hepáticas citosólica y mitocondrial en la síntesis de AR (Fig.5). La actividad de ALDH citosólica de las muestras control, presentó una actividad baja al utilizar acetaldehído como sustrato (70 μ M), mientras que la actividad se incrementó hasta tres veces utilizando retinal (70 μ M) como sustrato (Fig. 5A). En lo que se refiere a la actividad enzimática de ALDH observada en la fracción citosólica obtenida de los animales sujetos a una HP-30% (símbolos vacíos), se observó un incremento en la oxidación del acetaldehído, el cual inicia a las 12 h posteriores a la hepatectomía y se mantiene por arriba de los controles hasta las 72 h post-HP. El efecto de HP- 30% sobre la oxidación del retinal es contrario, ya que la enzima oxida menos retinal a las 12 y 24 h post-HP, comparada con el control y a las 48 h se observó un ligero incremento, el cual aunque no fue significativo, sobrepasó al control. A partir de ese momento, la actividad nuevamente se redujo hasta que a las 96 h el cambio resultó significativo (Fig. 5A). En el caso de HP-70% (símbolos llenos), la oxidación de acetaldehído en la fracción citosólica se mantuvo prácticamente sin cambio; mientras que la oxidación de retinal mostró incrementos significativos a tiempos tempranos post-HP (12 y 24 h) (Fig.5A). A las 48 h, la actividad enzimática cae pero no de manera significativa para luego recuperarse y sobrepasar los valores observados en el control, aunque no llega a alcanzar el valor observado a las 24 h (Fig. 5A).

La actividad de la ALDH en la fracción mitocondrial de las muestras control, mostró una actividad mayor oxidando tanto acetaldehído como retinal que lo que se observó en la fracción citosólica (Fig.5B). En los animales con una HP del 30%, la

oxidación mitocondrial de acetaldehído presentó un incremento considerable durante la mayoría de los tiempos analizados post- cirugía; este efecto no se reflejó en la oxidación de retinal en esta misma fracción, donde solamente a las 24 h post- HP 30% se notó una actividad significativamente superior al control (Fig.5B). En los animales expuestos a una HP-70%, tanto el metabolismo de acetaldehído como el de retinal, mostraron una imagen casi de espejo respecto a los resultados anteriores (Fig.5B).

Niveles de retinoides y su relación con la síntesis de ADN en tejido hepático remanente después de una hepatectomía parcial (30% y 70%).

La cantidad de retinol libre y AR se determinó por el método de HPLC, mientras que el retinal fue transformado enzimáticamente a retinol para después cuantificarse por HPLC. Los resultados obtenidos en los controles, muestran que los niveles citosólicos de retinal siempre superan a los niveles de retinol y no se detectó presencia de AR (Fig.6). En HP-30%, los valores citosólicos de retinal decrecen muy tempranamente (12 h), llegándose a observar un pico mínimo a las 72 h; descenso que se ve superado a las 96 h. posteriores a HP, sin llegar a recuperar en este tiempo el valor observado en el control. Respecto al retinol, a las 12 h los valores cayeron significativamente; sin embargo, a las 24 h se observa un incremento significativo comparado con el control, para después disminuir y alcanzar valores parecidos a los del control (Fig.6). En los animales con HP- 70% los niveles de retinol decrecieron drásticamente a las 12 h, y aunque posterior a este tiempo hubo un ligero incremento, los niveles se mantuvieron muy por debajo de los valores que se detectaron en el control. Este evento, se vio acompañado por un incremento significativo de los niveles de retinal al mismo tiempo que la baja en retinol (12 h post-HP). El valor del retinal cae a las 24 h, pero vuelve a incrementarse nuevamente para alcanzar un valor mayor que el control a las 96 h post- HP, pero menor que el pico cuantificado a las 12 h (Fig. 6A). De manera semejante a los controles, en estos grupos experimentales no se detectó la presencia de AR. De estos resultados se puede inferir, que los cambios observados nuevamente dependen de la magnitud de la pérdida de tejido hepático, y que las variaciones en los niveles de retinoides muestran direcciones opuestas cuando se comparan HP-30% vs HP-70% (Fig. 6A).

De acuerdo a los resultados presentados hasta este momento, se puede apreciar algún tipo de relación entre los retinoides libres (no esterificados) que para el caso denominaremos retinoides totales (la suma de retinol y retinal únicamente), así como la relación entre retinol/retinal, tratando además de correlacionarlos con la síntesis de ADN, representada aquí por la actividad de la enzima timidín cinasa,

utilizada como marcador de la proliferación celular (104). La suma de retinol y retinal, disminuyó significativamente durante los días 2 y 3 post-HP 30%, mientras que la relación retinol/retinal se incrementó significativamente. En los controles, se observó una predominancia del retinal sobre el retinol (0.46 ± 0.05 para la relación retinol/retinal), la cual decreció tempranamente y de manera significativa se incrementó desde las 24 hasta las 72h post-HP (Tabla 2). En el caso de HP-70%, no se observaron cambios significativos en el contenido total de retinoides, pero la relación retinol/retinal se observó de manera constante y claramente disminuida durante todos los tiempos después de HP (Tabla 2).

Haciendo nuevamente referencia en la síntesis de ADN, a partir de la actividad de timidin cinasa, en este caso se observó un máximo de actividad a las 48h post-HP -30%, mientras que el pico máximo en la síntesis de ADN se observó a las 24h post-HP 70% (Tabla 2). Como se esperaba, el estímulo para la síntesis de ADN fue mucho más grande en los hígados de los animales sujetos a una HP -70% (26 veces superior a los controles; a las 24h post-HP) que lo que se observó en los animales con HP 30% (8.6 veces más que los controles; a las 48h post-HP), no obstante la síntesis de DNA alcanzó su nivel normal a las 96h independientemente de la cantidad de tejido perdido (Tabla 2). En HP-30% parece que existe una aparente asociación entre el bajo contenido de retinoides libres, el incremento en la relación retinol/retinal y la máxima síntesis de ADN a las 48 h post-HP (Tabla 2). Sin embargo, esta correlación no está registrada en los animales de 70%-HP donde la relación retinol/retinal (a las 12 h post-HP, tiempo cuando se observa el pico de síntesis de ADN) está muy por debajo de lo observado en el control y la cantidad de retinoides libres no disminuye significativamente (Tabla 2).

Niveles de proteína de unión a retinol (CRBP-1) en el tejido hepático remanente después de una hepatectomía parcial (30% y 70%).

Como consecuencia de la naturaleza hidrofóbica y labilidad de los retinoides, es necesaria la presencia de moléculas que sirvan como chaperonas o protectoras de estos compuestos, evitando que sean degradados antes de ser utilizados. Así se forman productos secundarios reactivos que pudieran provocar daño de manera independiente a las membranas celulares, además de que permitan regular los niveles de retinoides presentes en el organismo. En este trabajo, nos enfocamos en la cuantificación de la proteína celular de unión a retinol (CRBP-1) en la fracción citosólica de nuestros grupos experimentales (Fig.6B y Tabla 3). En los animales

sujetos a una HP 30%, se presentó un incremento significativo en la concentración de CRBP-1, cuantificándose la mayor concentración a las 24 h post-HP. Posteriormente, los niveles de proteína regresaron a su estado normal aproximadamente a los 3 días post-cirugía; sin embargo, después de este periodo (96 h post-HP) se observó una disminución significativa en los niveles de esta proteína (Fig.6B y Tabla 3). Ahora bien, los niveles de retinol en estas muestras de tejido no muestran cambios importantes excepto a las 12 h. En contraste, en una HP del 70% los niveles de retinol disminuyen significativamente desde las primeras horas después de la cirugía; sin embargo, la cantidad de proteína se ve afectada hasta las 48 h posteriores (Fig. 6B y Tabla 3) cuando presenta una considerable disminución cuyos valores estadísticamente significativos.

Si retomamos todos los resultados analizados hasta este momento, y los comparamos con los encontrados sobre la expresión de la proteína CRBP-1 nuevamente observamos que se presenta un patrón inverso u opuesto en cada grupo experimental, y esto al parecer depende claramente de la cantidad de tejido removido (Fig. 6B y Tabla 3).

Ahora bien en la figura 7 se muestra la inhibición de ADH durante la oxidación de retinol, inducida por concentraciones variables de etanol (de 0.01 hasta 25mM). Los controles mostraron una inhibición competitiva de la oxidación de retinol por la presencia de etanol con una K_i (constante de inhibición) de 90 μM ; resultado que fue semejante a lo encontrado en HP-70% (K_i 130 μM). Contrario a este resultado, los muestras de HP-30% presentaron una K_i para etanol muchísimo más elevada que los grupos anteriores (1.06 mM).

DISCUSION

Siendo el principal órgano encargado del almacenamiento y metabolismo de una gran cantidad de compuestos, el hígado es además el sitio donde se llevan a cabo los principales mecanismos de desintoxicación. Aunado a esto, el hígado posee la cualidad de regenerarse, característica que lo ha hecho objeto de estudio desde hace décadas. La regeneración tisular en general y específicamente la regeneración hepática, es un proceso complejo que involucra cambios en importantes vías metabólicas con la finalidad de inducir la replicación del ADN, la división celular y finalmente la recuperación del tejido perdido (92,93). Así pues, siendo el hígado una de las principales rutas de desintoxicación del organismo, cabe mencionar que la regeneración hepática es inhibida de manera muy importante por la ingesta de etanol. Como se sabe la ADH hepática participa en la eliminación u oxidación del etanol, pero no es esta la única función que posee. La ADH presenta un amplio espectro de afinidad por diversos sustratos, dentro de los cuales se pueden mencionar esteroides, ácidos grasos, retinoides, entre muchos otros (112).

Los elementos que dieron fundamento a este trabajo, se tomaron de resultados obtenidos previamente en este laboratorio. A partir de ellos, se pensó que la ADH podría estar participando de manera importante en el control de la proliferación celular durante la regeneración hepática inducida a través una HP en los animales experimentales. Cabe aclarar, que la eliminación de 70% del tejido hepático induce una inhibición de la actividad de ADH utilizando etanol como sustrato, esto se observó al administrarles etanol in vivo a animales sujetos a una HP del 70% (104). También se detectó que la cantidad de proteína de ADH presente estaba incrementada en estos animales, y al administrarles in vivo 4-MP (inhibidor de ADH hepática) la regeneración hepática se inhibió. Todos estos datos, condujeron a suponer que probablemente las enzimas ADH y ALDH podrían estar participando de manera activa en el metabolismo de sustratos endógenos necesarios en el proceso de regeneración; como podrían ser los retinoides (113). Desde esta perspectiva, el trabajo estuvo dirigido específicamente hacia el estudio del metabolismo de los retinoides durante la regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial; y la posible participación de las enzimas ADH y ALDH en la síntesis de AR, compuesto involucrado en el desarrollo embrionario y diferenciación celular entre muchos otros eventos fisiológicos.

Ahora bien, a partir de los datos que exponemos en este trabajo podemos observar de manera clara que después de una HP -70%, la actividad de ADH

metabolizando etanol y acetaldehído decrece significativamente, mientras que en ratas sujetas a una HP -30% los cambios de actividad son diferentes y en menor intensidad a los de HP 70% y se presentan en tiempos diferentes (Fig.1).

Las diferencias metabólicas encontradas en nuestros sujetos experimentales, permiten decir que en los animales sujetos a una HP-70% (24h. post-hepatectomía) se observa una inhibición enzimática no competitiva en el metabolismo de etanol y acetaldehído si comparamos los resultados con lo observado en los animales control. Como mencionamos en la sección de resultados, esto podrían explicarse de dos formas: 1) desde un punto de vista catalítico, el sitio activo de la enzima podría estar ocupado por la presencia de un inhibidor y/o este inhibidor podría estar incrementado; y 2) la disminución en la cantidad de enzima y por lo tanto cabría esperar una disminución en los niveles de actividad; sin embargo, cualquiera que fuera la causa su efecto es temporal pues en tiempos posteriores esto desaparece. Por otro lado, en los animales sujetos a una HP 30%, se presentó una inhibición competitiva (Fig.2 y Tabla 1) esto permitió sugerir que el efecto causado por la HP sobre la actividad de la enzima estará en proporción a la cantidad de tejido perdido. También se observó que la cantidad de enzima presente en los animales con 70% de HP se incrementa; sin embargo, la actividad que muestra la enzima al metabolizar sustratos como el etanol no está en correspondencia con la cantidad de enzima presente (Fig.3). Esta discrepancia, podría deberse a una posible participación de la enzima en el metabolismo de sustratos endógenos necesarios durante la regeneración del tejido perdido. En trabajos ya publicados, se ha mencionado que la expresión de ADH-I mRNA aumenta en el hígado en regeneración inmediatamente después de la cirugía (114), y la expresión en diversos órganos del gen Adh-1 (que codifica para ADH-I) parece estar involucrado en la expresión de otros genes en diversos eventos fisiológicos (118,119).

Además de participar en el metabolismo del etanol, la ADH se ha asociado de manera indirecta con la proliferación de cierto tipo de tejidos tumorales aún cuando se desconoce la relación que existe entre la ADH y los niveles de proliferación celular (120). De la misma forma, se piensa que miembros de la familia de las ALDHs podrían estar involucrados en eventos desencadenados durante el desarrollo de tumores cancerosos pues estas enzimas muestran cambios en su actividad y expresión en hepatomas inducidos en ratas (100). Queda claro que ambas enzimas podrían tener una participación importante en la proliferación celular, por lo menos bajo condiciones experimentales. Todo esto nos mueve a considerar que la idea postulada en este trabajo está bien fundamentada y que aún cuando existe controversia respecto a la participación de las enzimas ADH y ALDH en el

metabolismo de compuestos como los retinoides (retinol y retinal); tratamos de establecer que el metabolismo de los retinoides durante la regeneración hepática es de suma importancia y está mediada por ambas enzimas.

¿Por qué considerar a los retinoides?:

Los retinoides fueron de especial interés debido a su participación en eventos tan importantes como son mitosis, diferenciación celular, desarrollo embrionario y la síntesis de AR involucrado de manera directa en la transcripción de una gran cantidad de genes (11). La síntesis de AR requiere de un proceso constituido por dos etapas; la primera es la oxidación del retinol para dar lugar al retinal (aldehído); la segunda, la conversión del retinal en AR siendo la primera reacción el paso limitante en este proceso (119). En este sentido, es pertinente mencionar que Collins y colaboradores (131), determinaron que la administración oral de 4-MP a ratones provocaba una caída en la síntesis de AR de hasta 9 veces. En este punto, diremos que nosotros encontramos que la fracción citosólica de las muestras de hígado normales, presenta una discreta capacidad de oxidar retinol en presencia de NAD y una mayor capacidad de reducir retinal en presencia de NADH como coenzima (Fig.4). En condiciones de laboratorio, ambas reacciones fueron inhibidas con 1 mM de 4-metilpirazola, sugiriendo la participación de ADH-I en este evento.

Aún cuando la oxidación de retinol se ha atribuido a la actividad de una retinol deshidrogenasa citosólica, que además es idéntica a la ADH-IV, esta enzima se localiza predominantemente en estómago estando ausente del tejido hepático (11). Hasta aquí podemos sugerir que la enzima ADH-I podría estar involucrada en el metabolismo de retinol en el hígado después de una HP.

Ahora bien, como se ha estado mencionando la conversión de retinal en AR está delegada a la acción de las enzimas ALDH y principalmente a la ALDH-1 y se sabe que durante el desarrollo embriológico, algunos miembros de la familia de ALDH están involucrados en la síntesis de AR (120). En este laboratorio, y bajo nuestras condiciones de trabajo encontramos que en las fracciones citosólica y mitocondrial, los valores registrados para la oxidación del retinal fueron mayores que lo que se obtuvo para el acetaldehído y de hecho la fracción mitocondrial mostró mayor eficiencia en este evento (Fig.5). Además, debemos considerar que la cantidad de tejido removido afecta de manera distinta la actividad citosólica y mitocondrial en la oxidación de retinal y acetaldehído siendo la remoción de un 70% de tejido la que más favorezca la oxidación de retinal (Fig.5). Parece ser que en la HP-70%, el metabolismo de retinoides está eficientemente regulado por ambas enzimas dando como resultado la

conversión de estos compuestos en AR; la reducción en el contenido de retinol libre y la disminución en la relación retinol/retinal parecen ser requisitos necesarios en la progresión de la proliferación celular (Fig. 6A, Tabla 2).

Por otro lado, el incremento en la capacidad enzimática de la fracción mitocondrial para oxidar retinal y transformarlo en AR en el hígado en regeneración, permite cuestionar si in vivo el AR se sintetiza en la mitocondria, y si esto es así, ¿cual es el significado que esto tiene durante la regeneración hepática? Independientemente de cual sea la manera en que el retinol llegue hasta las células blanco donde es requerido (a través de interacciones hidrofóbicas con la membrana plasmática o por endocitosis), se sabe que existe un grupo de proteínas a las cuales el retinol se une, y que sirven como moléculas transportadoras; estas proteínas se denominan CRBPs (124). La CRBP-1 tiene como función concentrar o transportar el retinol hasta los sitios donde el AR puede ser necesitado en altas concentraciones, actúan como un mecanismo sensor de los niveles de retinol (124), además de conferir especificidad de síntesis de AR restringiendo el acceso al retinol por enzimas capaces de unirse a él pero cuyo producto final no esté ligado al AR (125). La holo-CRBP transfiere el retinol a enzimas capaces de oxidarlo, como son las formas citosólicas y microsomales de retinol deshidrogenasas, dependiendo del estado de óxido/reducción celular (126). Por otro lado, CRBP-1 también puede proteger a las células contra las propiedades anfipáticas de los retinoides, evitando el posible caos que se generaría con la presencia de retinoides libres sin chaperonas (111).

Con relación a esta fase del trabajo, los resultados que obtuvimos coinciden con lo antes mencionado; la proteína CRBP-1 muestra cambios en su expresión como respuesta al contenido de retinol y retinal presente el hígado remanente (Fig.6B y Tabla 3). Este fenómeno se ve de manera más clara en HP-70%, pues la disminución en la concentración de retinol en la fracción citosólica coincide con una disminución en la cantidad de CRBP-1 cuantificada; mientras que en HP-30%, estos cambios parecen atenuados. Estos datos podrían indicar que existe una regulación bien definida en la transformación de retinol en AR durante la regeneración hepática en rata. Ahora bien, el hecho de que no se detectara AR en el hígado remanente, podría suponer que existe un estricto mecanismo regulador que controla la cantidad de AR requerido y se encarga de eliminar de manera inmediata el exceso de este compuesto, el cual al estar en exceso podría participar en eventos de toxicidad que afectarían de manera directa la proliferación celular (111).

Siguiendo esta línea de investigación, y como se mencionó en párrafos anteriores la regeneración inducida por hepatectomía, es un evento altamente sensible

a la acción del etanol; la síntesis de AR se reduce como consecuencia probable de la inhibición competitiva desencadenada por el etanol durante la oxidación del retinol (132) más que por el hecho de que el etanol pudiera inducir un incremento en la degradación de AR (88). Después de una ingesta de etanol la concentración de este compuesto en los tejidos excede con mucho la cantidad de retinol reportado normalmente (133); de tal manera que como se mencionó en párrafos anteriores puede ser que exista una inhibición competitiva del etanol hacia el retinol durante la oxidación de este último vía ADH bloqueando de manera muy importante la síntesis de AR. Esto explicaría en términos de síntesis de AR el desarrollo del síndrome fetal alcohólico durante el desarrollo embriológico en madres intoxicadas con etanol (132, 134). A este respecto, los resultados que se presentan en este trabajo coinciden claramente con estos postulados. En la HP-70%, la actividad de ADH in vitro metabolizando etanol y acetaldehído decrece significativamente; mientras que en HP-30%, dicha actividad disminuye de manera no significativa (Fig.1). Este evento nuevamente indica una relación entre la cantidad de tejido perdido y la actividad de la enzima (Fig.2, Tabla 1). Además se sabe que durante las primeras horas de regeneración se observa un incremento en la cantidad del ARNm de ADH-I (114).

De acuerdo con esto, en este trabajo encontramos que los niveles de proteína de ADH en animales hepatectomizados en un 70%, se mantiene en niveles superiores a los reportados por el control durante el proceso regenerativo, como lo muestra el análisis del ensayo de Western Blot (Fig.3); y hasta este momento, los resultados expuestos tanto para la actividad de ADH como su expresión muestran una clara discrepancia.

Los datos obtenidos en este trabajo, apoyan de manera enfática nuestra hipótesis de trabajo; y aún cuando desconocemos el significado real de lo que observamos en el hígado en regeneración como la disminución en la cantidad de retinol presente, o el incremento en la cantidad de proteína de ADH; e inclusive la disminución en la actividad de la enzima entre otros aspectos, creemos pertinente proponer que durante la regeneración hepática compuestos endógenos como los retinoides están involucrados de manera importante, y que las enzimas ADH y ALDH llenan los requisitos necesarios para postularse como el mecanismo enzimático capaz de transformar el retinol en AR, producto indispensable en este evento fisiológico.

CONCLUSION

De este trabajo podemos concluir que:

1. Después de una hepatectomía parcial, (HP-70%), las células hepáticas en estado proliferativo presentan una baja actividad de ADH metabolizando etanol y acetaldehído, lo cual de acuerdo con los resultados obtenidos corresponde a una inhibición no competitiva, inhibición que podría estar relacionada con la presencia en el sitio activo de la enzima de un inhibidor; y probablemente también se deba a un incremento importante de sustratos endógenos como podrían ser los retinoides necesarios para el hígado en regeneración y a la participación de las enzimas ADH y ALDH en el metabolismo de estos compuestos.
2. Esto nos permitió proponer, que en la regeneración hepática como en muchos otros fenómenos fisiológicos, la coparticipación de los retinoides y de las enzimas ADH y ALDH podría ser de crucial importancia para llegar de manera perfectamente bien ordenada al final requerido por el organismo.
3. Aún cuando se conoce que el AR regula la expresión de una gran variedad de genes durante el desarrollo embrionario, crecimiento y diferenciación celular, etc. (127), este es el primer trabajo donde se trata de exponer la importancia y posible participación de ADH y ALDH en el metabolismo de los retinoides y los cambios observados durante la regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial.

Finalmente, cabe mencionar que la dificultad para marcar límites funcionales dentro de un complejo biológico cualquiera que sea, disminuye la posibilidad de entender y explicar de manera independiente la importancia fisiológica que cada parte del complejo posee; de tal forma que los componentes o sistemas que conforman dicho complejo deben ser estudiados en el contexto de su interrelación, dando a cada parte la importancia funcional que le corresponde.

El estudio independiente de cualquier sistema, aporta el conocimiento necesario para aclarar solo una pequeña parte de un rompecabezas, pero es con la unión de cada parte como se puede llegar a descubrir lo que hay más allá de la individualidad y entender a ciencia cierta que es lo que el rompecabezas en su totalidad nos quiere decir.

PERSPECTIVAS

Como muchos modelos que se utilizan en las diferentes áreas de investigación, el utilizado en este trabajo nos da mucho para estudiar. El estudio de la relación retinoides- ADH y ALDH en la regeneración apenas comienza, y como lo mencioné en párrafos anteriores este es el primer trabajo que trata de mostrar la importancia fisiológica de estos tres componentes dentro de un sistema. Aún cuando este trabajo terminó, quedaron muchas dudas por aclarar e ideas para llevar a cabo por ejemplo ¿Qué efecto tendrá la administración de retinoides en sus diferentes formas (retinol, retinal y AR) en animales hepatectomizados en 30% y 70%? ¿Qué sucedería si a los animales hepatectomizados se les administra etanol y retinoides? ¿Qué sucedería si se les administra 4-MP y retinoides en sus diferentes formas? Estas son sólo algunas preguntas que nos hicimos durante el desarrollo de este trabajo y que por el momento quedaron sin respuesta. Como podemos ver el futuro de este proyecto es muy amplio podríamos decir que de vida larga.

Tabla 1. Constantes cinéticas de ADH citosólica utilizando etanol y acetaldehído como sustratos en animales sujetos a 30% ó 70% HP.

<i>Tratamiento</i>	<i>Etanol</i>		<i>Acetaldehído</i>	
<i>Tiempo post-hepatectomía</i>	K_m (mM)	V_{max} (min ⁻¹)	K_m (mM)	V_{max} (min ⁻¹)
Controles	0.09 ± 0.02	47.4 ± 2.4	0.012 ± 0.004	110.3 ± 12.1
Ratas con 30% HP				
12 horas	0.17 ± 0.05	51.9 ± 3.2	0.034 ± 0.009*	144.1 ± 10.1*
24 horas	0.62 ± 0.16*	40.4 ± 3.9	0.018 ± 0.002	94.5 ± 7.6
48 horas	0.75 ± 0.23*	49.7 ± 3.3	0.030 ± 0.006*	135.1 ± 12.1
72 horas	0.65 ± 0.14*	51.6 ± 4.6	0.016 ± 0.003	162.1 ± 17.8*
96 horas	0.11 ± 0.02	67.0 ± 8.1*	0.080 ± 0.040	218.3 ± 28.4*
Rats con 70% PH				
12 horas	0.22 ± 0.06	53.4 ± 4.4	0.032 ± 0.007	129.5 ± 7.8
24 horas	0.11 ± 0.03	36.4 ± 2.9*	0.014 ± 0.003	91.7 ± 8.2
48 horas	0.10 ± 0.03	38.5 ± 3.5*	0.011 ± 0.003	83.9 ± 9.3*
72 horas	0.09 ± 0.03	43.5 ± 3.5	0.010 ± 0.002	109.5 ± 14.2
96 horas	0.07 ± 0.02	47.7 ± 4.8	0.028 ± 0.006	107.5 ± 12.2

Los resultados están expresados como el promedio ± ES en una n=5 individuos por grupo experimental. Estadística: *p<0.01 comparada contra el control.

Tabla 2. Contenido y relación de retinoides, y actividad de Timidin en animales sujetos a 30% ó 70% HP.

<i>Tratamiento</i>	<i>Retinoides</i>		<i>Actividad de Timidin cinasa</i>	
<i>Tiempo post-hepatectomía</i>	<i>Retinol + Retinal</i>	<i>Retinol / Retinal</i>	<i>nmols • min⁻¹ • mg⁻¹ of proteína</i>	<i>Veces sobre el control</i>
Controles	16.1 ± 2.0	0.46 ± 0.05	0.18 ± 0.04	-----
Ratas con 30% HP				
12 horas	12.4 ± 2.3	0.19 ± 0.03*	0.25 ± 0.04	1.4 ± 0.2
24 horas	13.1 ± 1.6	1.43 ± 0.17*	0.68 ± 0.11*	3.8 ± 0.6*
48 horas	9.1 ± 1.6*	0.82 ± 0.13*	1.55 ± 0.27*	8.6 ± 1.5*
72 horas	9.5 ± 1.5*	1.16 ± 0.17*	0.47 ± 0.10*	2.6 ± 0.6*
96 horas	13.0 ± 2.1	0.71 ± 0.13	0.31 ± 0.05	1.7 ± 0.3
Ratas con 70% HP				
12 horas	17.2 ± 4.3	0.08 ± 0.02*	0.28 ± 0.04	1.5 ± 0.3
24 horas	11.8 ± 2.2	0.28 ± 0.05*	4.68 ± 0.84*	26.0 ± 4.7*
48 horas	12.6 ± 2.1	0.29 ± 0.05*	1.32 ± 0.21*	7.3 ± 1.2*
72 horas	15.2 ± 3.0	0.23 ± 0.04*	0.77 ± 0.09*	4.3 ± 0.5*
96 horas	18.3 ± 2.6	0.26 ± 0.04*	0.35 ± 0.06	1.9 ± 0.3

Los resultados están expresados como el promedio ± ES de una n=5 individuos por grupo experimental. La suma del contenido de retinol y retinal corresponde a nmols • mg⁻¹ de proteína citosólica. Estadística: *p<0.01 comparada con los controles.

Tabla 3. Análisis densitométrico del Western-blot para CRBP-I y su relación con el contenido de retinol en animales sujetos a 30% ó 70% HP.

<i>Tratamiento</i>	<i>CRBP-I en citosol</i>	<i>Retinol en hígado</i>
<i>Tiempo</i>	<i>Veces sobre el control</i>	<i>(nmols • mg⁻¹ de proteína)</i>
Controles	1.00 ± 0.08	5.1 ± 0.8
Con 30% HP		
12 horas	2.21 ± 0.20*	2.0 ± 0.6*
24 horas	2.35 ± 0.23*	7.7 ± 0.9
48 horas	1.53 ± 0.12*	4.1 ± 0.6
72 horas	1.52 ± 0.14*	5.1 ± 0.8
96 horas	0.49 ± 0.05*	5.4 ± 0.8
Con 70% HP		
12 horas	1.14 ± 0.10	1.4 ± 0.6*
24 horas	1.22 ± 0.12	2.6 ± 0.6*
48 horas	0.32 ± 0.04*	2.8 ± 0.7*
72 horas	0.73 ± 0.09*	2.8 ± 0.7*
96 horas	0.88 ± 0.11	3.8 ± 0.8

Los resultados son el promedio ± ES de tres análisis independientes de Western-blot como se muestra en la Fig. 5B, y utilizando β-actin como marcador de carga. Los resultados están expresados como veces sobre el control, lo que corresponde a 15.3×10^3 unidades arbitrarias. El contenido de retinol en hígado se tomó de la Fig. 5A. Estadística: *p<0.01 comparado con el control.

FIGURA 1.

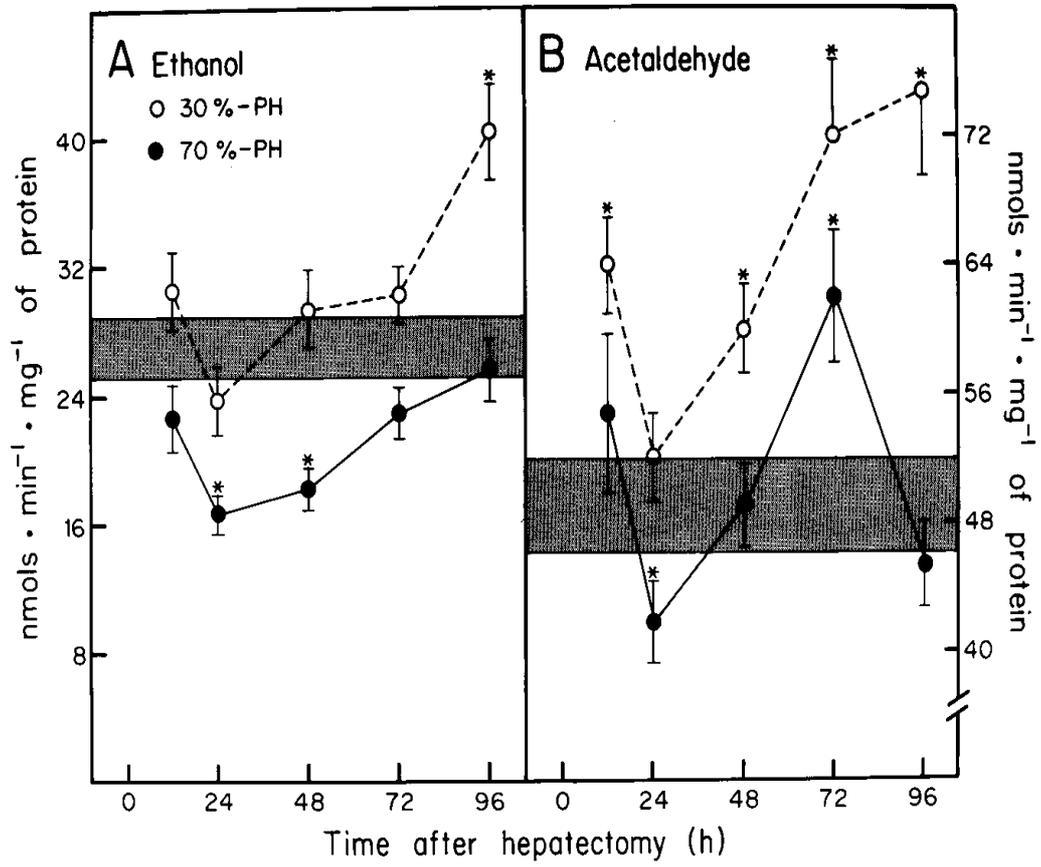


FIGURA 2.

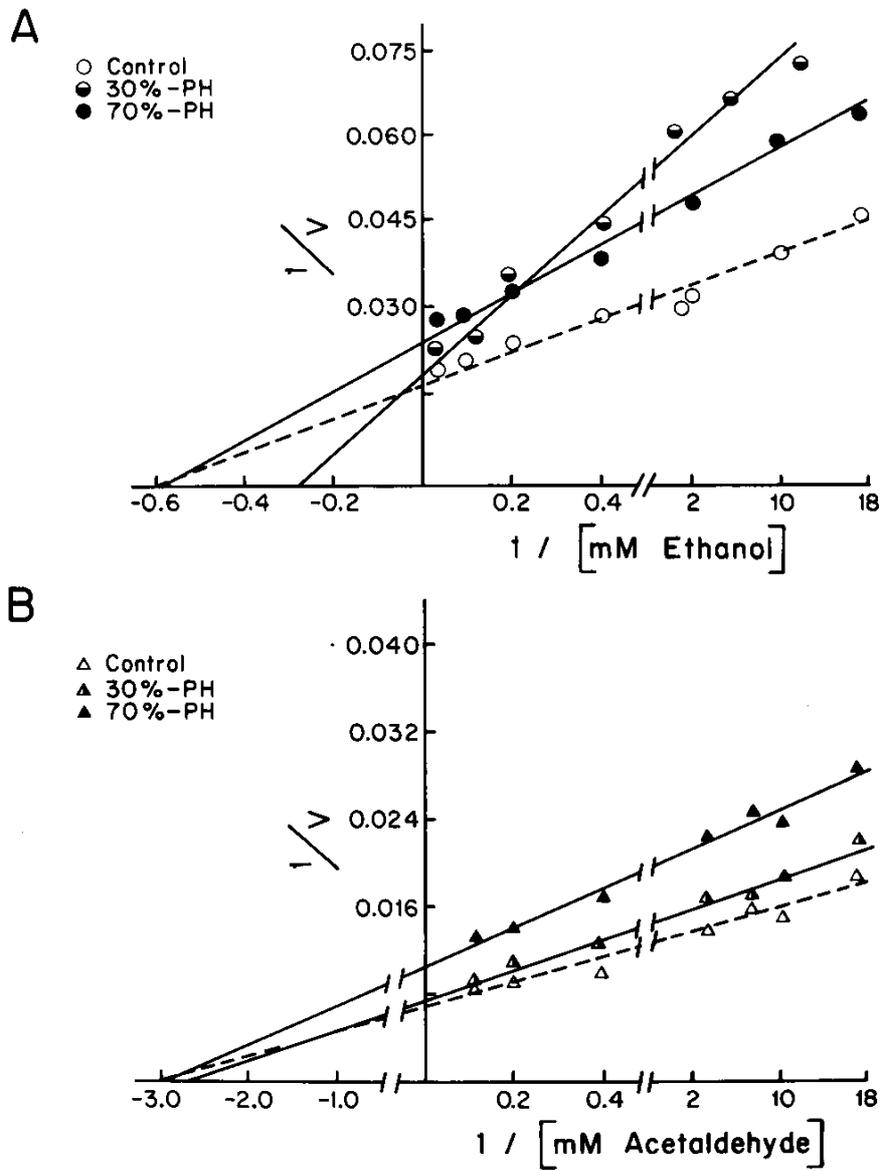


FIGURA 3.

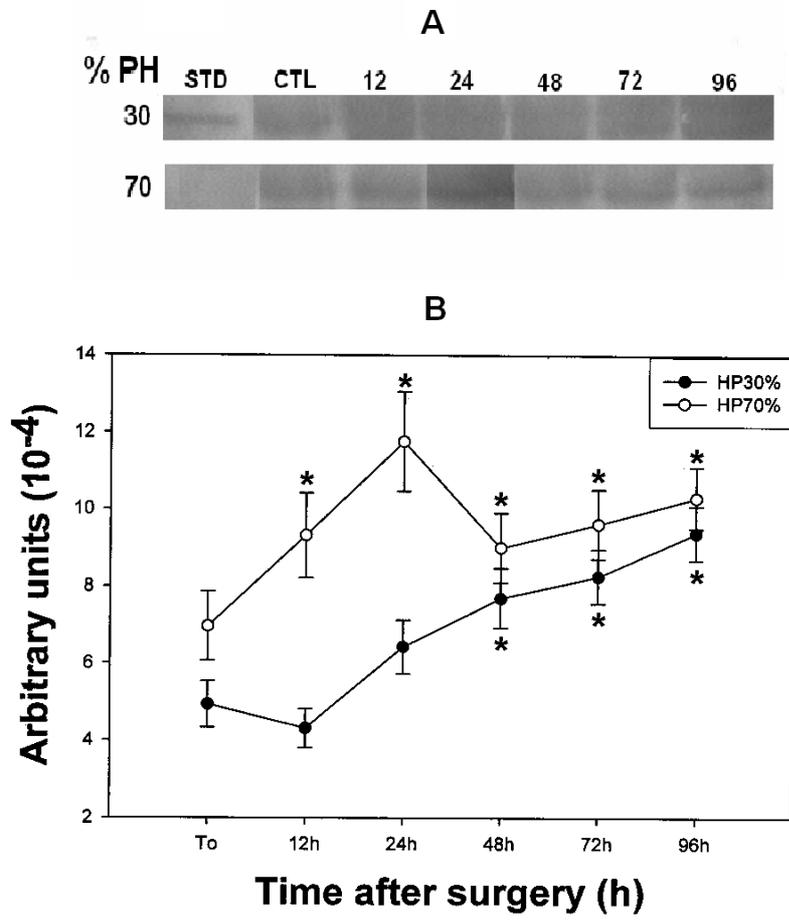


FIGURA 4.

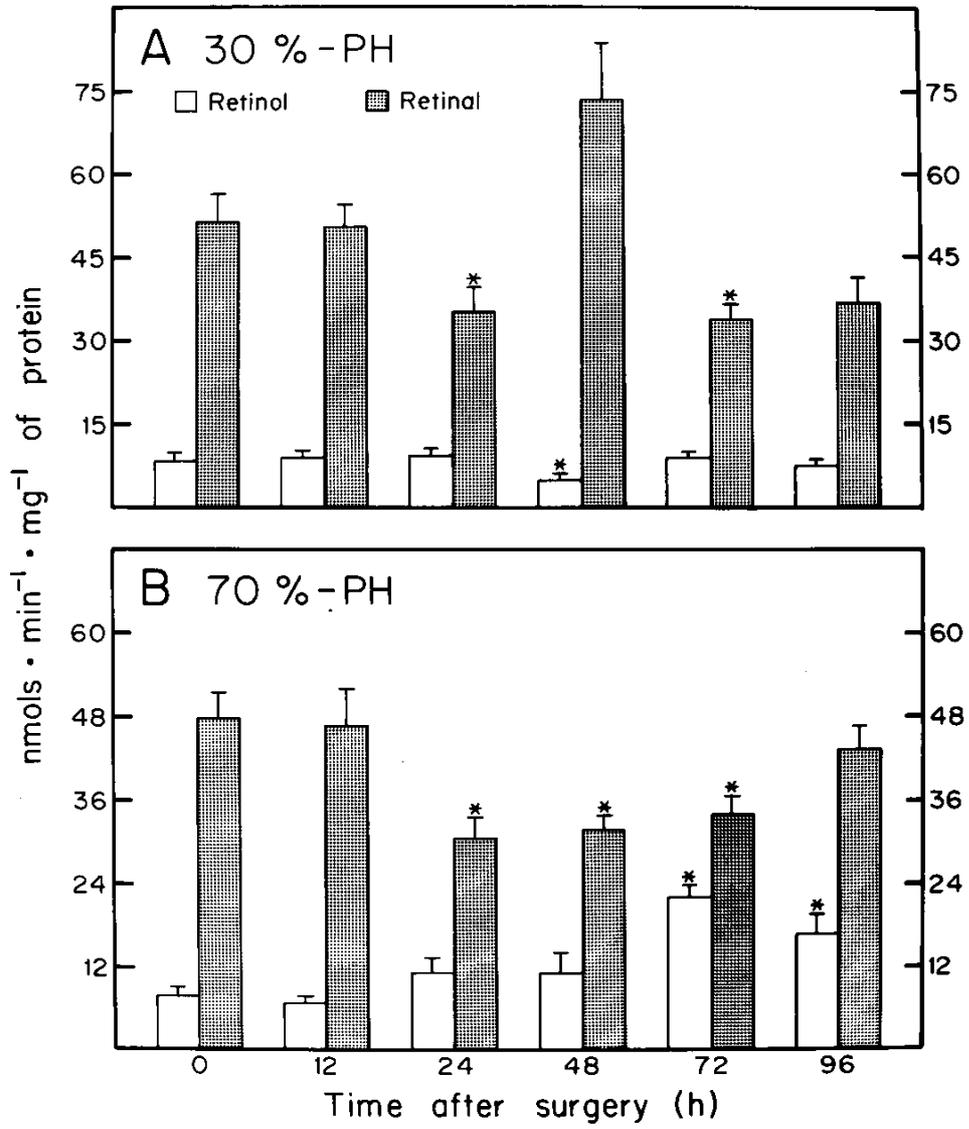


FIGURA 5.

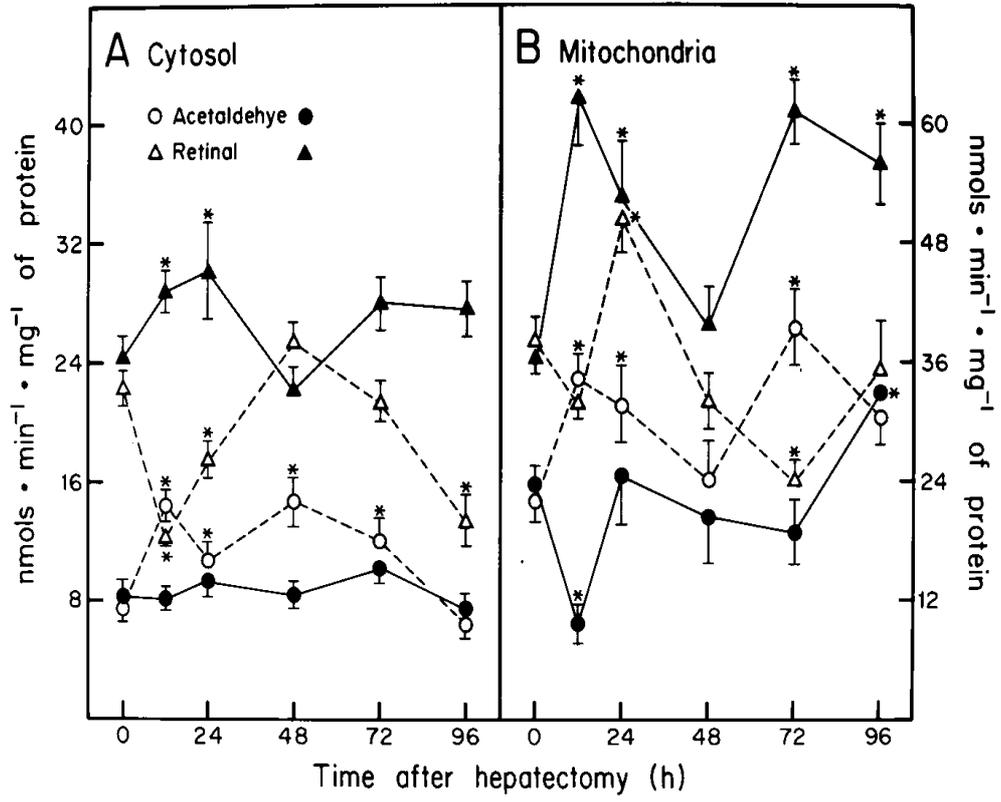
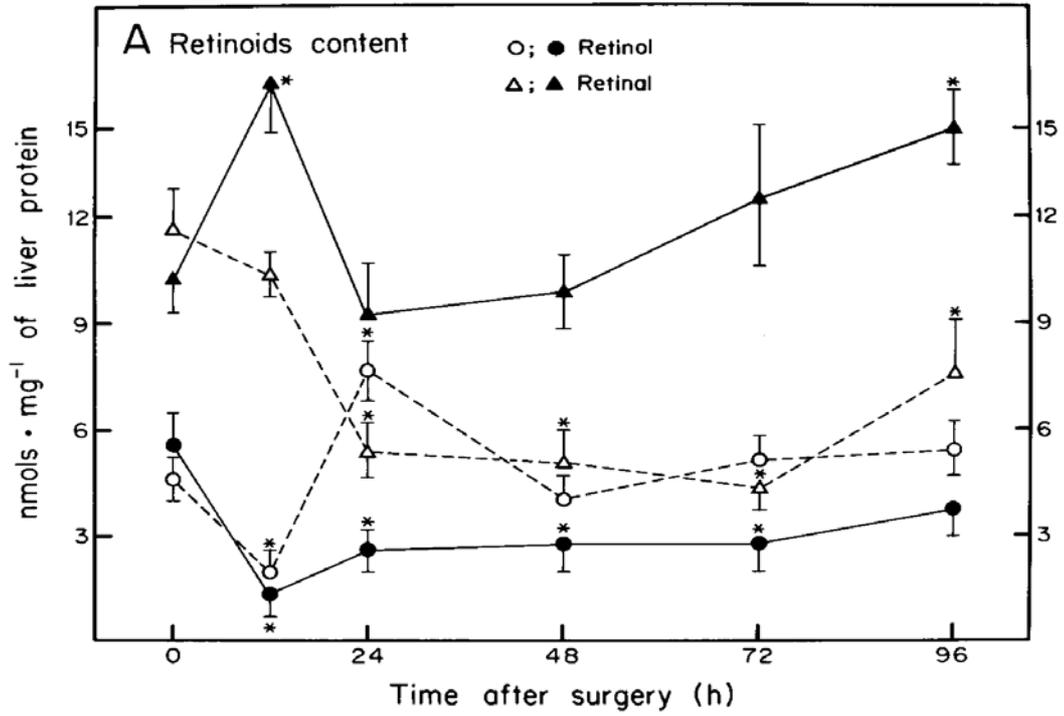


FIGURA 6.



B

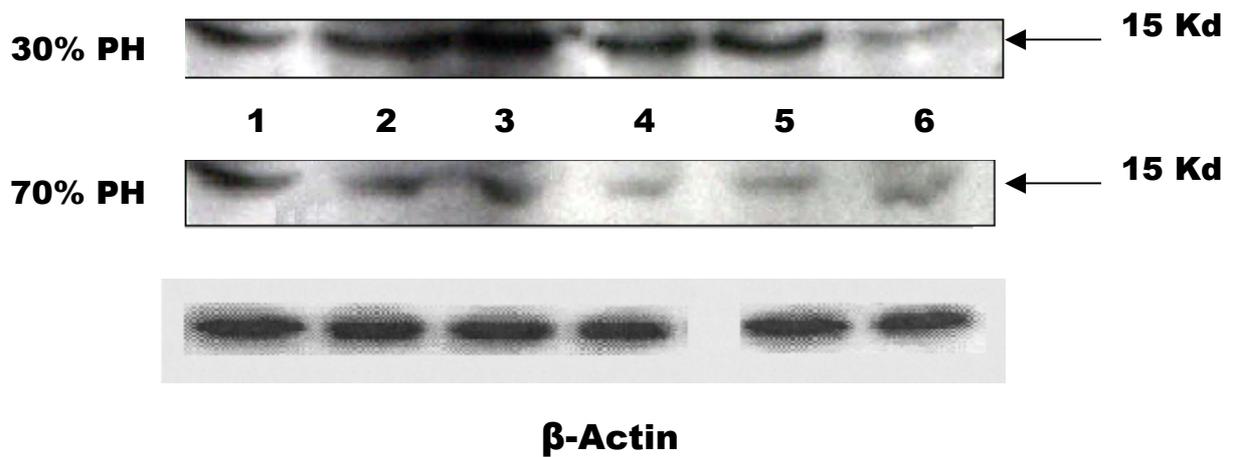
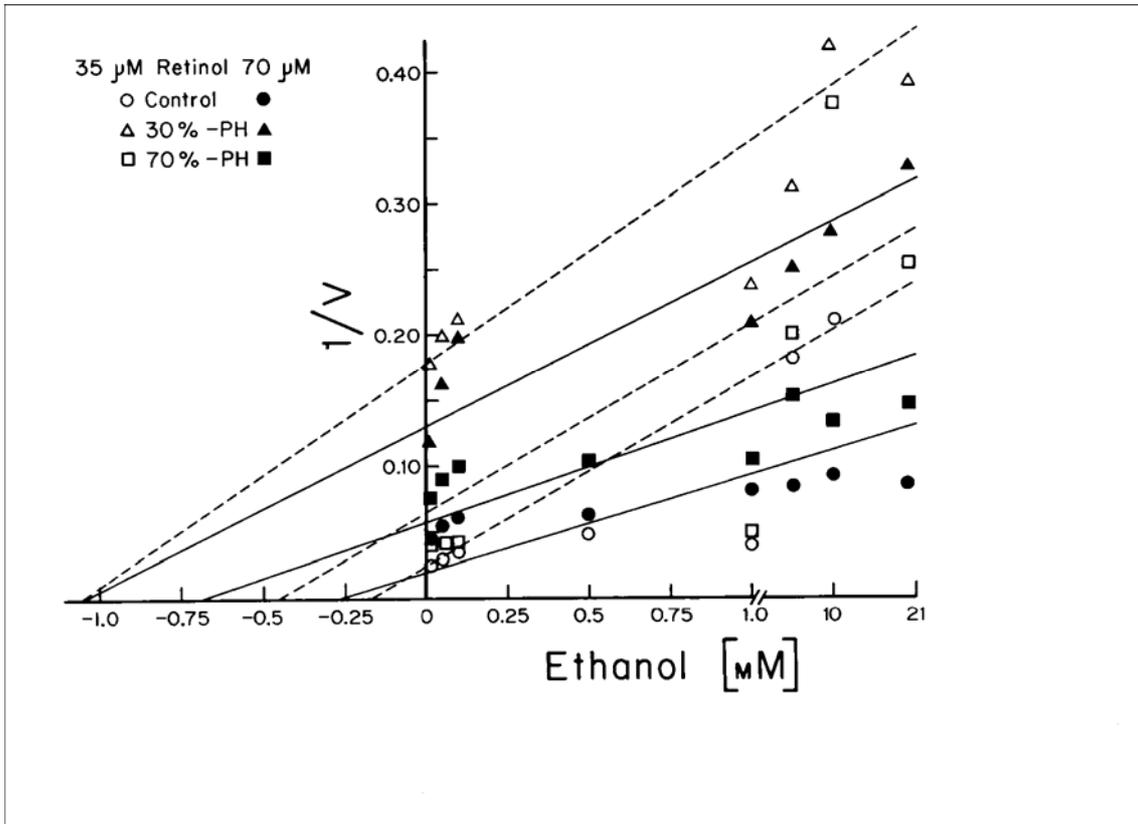


FIGURA 7



REFERENCIAS CITADAS

1. Quiroz F. Anatomía Humana Tomo III. Porrúa.1975.
2. John W. Hole Jr. Human Anatomy and Physiology. 4a. Ed. Wm.C. Brown Publishers.
3. Arias I, Popper H, Schachter D and Shafritz D. The Liver Biology and Pathobiology. Raven Press NY.
4. Surgical anatomy and Anatomical Surgery of the liver. Word J. Surg. 6: 6, 1982. (www. anatomia.tripod.com)
5. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM and Stanton BA. Physiology. 4a. Ed. Mosby.1995.
6. Clifford JS. Liver regeneration [Review].FASEB J. 1396-1400. 1995.
7. Diehl AM and Rai RM. Regulation of signal transduction during liver regeneration. FASEB J. 10: 215- 227. 1996.
8. Rojkind M and Greenwel P. The liver as a bioecological system. In the liver: Biology and Pathobiology (Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D and Schartz D A. 2nd ed. 707-716. Raven Press, New York.1988.
9. Hiroshi M, et al. Role of alcohol-dehydrogenase in rat elimination kinetics. Alcohol and Alcoholism. 1994. 29: 15- 20.
10. Lieber CS and De Carli LM. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system: In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. J. Biol. Chem. 245: 2505- 2512. 1970.
11. Boleda MD, Saubí N, Farrés J and Parés X. Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: Aldehydes of lipid peroxidation, ω -hydroxifatty acids, and retinoids. Arch Biochem and Biophys. 307, No.1:85- 90. 1993.

12. Mezey E and Potter JJ. Separation and partial characterization of multiple forms of rat alcohol dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 225: 787- 794.1983.
13. Hernández-Muñoz R, et al. Human gastric alcohol dehydrogenase: Its inhibition by H₂ – receptor antagonists, and its effect on the bioavailability of ethanol. Alcohol. Clin. Exp. Res.14: 946- 950. 1990.
14. Peré Juliä, Jaume Farrés and Xavier Parés. Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase (tissue distribution and physical and enzymatic properties). Eur. J. Biochem. 162 : 179 – 189. 1987.
15. Riveros-Rosas H, Julián–Sánchez A and Piña E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism. Arch. Med. Res. 28(4): 453-471. 1997.
16. Danielsson O and Jörval H. “Enzymogenesis”: Classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:9247-9251.1992.
17. Dixon M, et al. Enzymes. Longman. 3th. ed.
18. Fersht A. Enzyme structure and mechanism. Freeman and Company. 2nd ed.
19. Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Eur. J. Biochem.; 267:4315-4324. 2000.
20. Danielsson O, et al. Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:4980-4984. 1994.
21. Peré J, et al. Characterization of three isoenzymes of rat dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 162: 179-189. 1987.
22. Dolney DE, et al. Molecular analisis of genetic differences among inbred mouse strains controlling tissue expresión pattern of alcohol dehydrogenase 4. Gene. 267:145-156. 2001.
23. Duester G, et al. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. Biochem. Pharmacol. 58:389-395. 1999.

24. Peralba JM, et al. Amphibian alcohol dehydrogenase. Purification and characterization of classes I and III from *Rana perezi*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 463:343-350. 1999.
25. Shih-Jiun Y, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagus: comparison with the stomach enzyme activities. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17 (2): 376-381. 1993.
26. Popescu G. Analysis of rat cytosolic 9-cis-retinol dehydrogenase activity and enzymatic characterization of rat ADHII. *Biochem. Biophys. Acta.* 1476:43-52. 2000.
27. Ang HL, et al. Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20: 1050-1064. 1996.
28. Boleda M, et al. Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 274 (1):74-81. 1989.
29. Parés X and Farrés J. Organ specific alcohol metabolism: placental chi-ADH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 1047-1055. 1995.
30. Lieber C. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta.* 257: 59-84. 1997.
31. Ling C, et al. Distribution of alcohol dehydrogenase and the low Km form of aldehyde dehydrogenase in isolated perivenous and periportal hepatocytes in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16 (1): 23-29. 1992.
32. Potter JJ, et al. Regulation of rat alcohol dehydrogenase by cyclic AMP in primary hepatocyte culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 321 (2): 329-335. 1995.
33. Columbano A and Hisashi S. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J.* 10 : 1118 – 1128. 1996.
34. Duester G. Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *The Journal of Nutrition.* 128 (2):459-462. 1998.
35. Koivusalo, M. et al. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 257:105. 1989.

36. Connor MJ and Smith MH. Terminal-group oxidation of retinol by mouse epidermis. Inhibition in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 244 (2):489-492. 1987.
37. Molotkov A, et al. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Biochemistry.* 99 (8):5337-5342. 2002.
38. Hwee LA, et al. Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *The Amer. Soc. for Biochem. and Mol. Biol.* 271 (16):9526-9534. 1996.
39. Russo J, et al. 4-(N,N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH1A1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-trans retinal. *BMC Pharmacol.* 2(4). 2002.
40. Ambroziak W and Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 266 (20): 13011-13018. 1991.
41. Arnon R, et al. Molecular biological aspects of alcohol- induced liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19 (1):247-256.1995.
42. Vasiliou V, et al. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes:human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergence evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics.* 9 (4): 421-434. 1999.
43. Min L, et al. cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of rat ortholog, ALDH12. *J. Biol. Chem.* 275 (51):40106-40112. 2000.
44. Sophos NA and Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily. *Chem. Biol. Interact.* 143 (144):5-22. 2003.
45. Yoshida A, et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251 (3):549-557. 1998.
46. Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27 (4-5): 283-335. 1992.
47. Sorrel MF, et al. Evidence that acetaldehyde irreversibly impairs glycoprotein metabolism in liver slices. *Gastroenterology* 73 (5):1138-1141. 1977.

48. Lucas D, et al. Acetaldehyde adducts with haemoglobine: determination of acetaldehyde released from haemoglobine by acid hydrolysis. *Alcohol Alcohol.* 23 (1):23-31. 1988.
49. Dockham P, et al. Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorine. *Drug. Metab. Disp.* 25 (12):1436- 1441. 1997.
50. Sydow K, et al. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* 113 (3):482-489. 2004.
51. Ambroziak W, et al. Metabolism of retinaldehyde and others aldehydes in soluble extracts of human liver and kidney. *J. Biol Chem.* 274 (47):33366-33373. 1999.
52. King G and Holmes RS. Human corneal aldehyde dehydrogenase: purification, kinetic characterization and phenotypic variation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31 (1):49-63. 1993.
53. Zimatkin S and Anichtchik O. Alcohol-Histamine interactions. *Alcohol Alcohol.* 34 (2):141-147. 1999.
54. Michel BS, et al. *The retinoids.* Raven press. 2nd ed. 1994.
55. Blaner WS, et al. Retinoids, retinoid-binding protein, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J. Lipid Res.* 26:1241-1251. 1985.
56. Blomhoff R, et al. Transfer of retinol from parenchymal to stellates cells in liver is mediated by retinol-binding protein. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 85:3455-3458.1987.
57. Hendricks HFJ, et al. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp. Cell Res.* 160:138-149. 1985.
58. Ross AC. Retinol esterification by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 257:2453-2459. 1982.
59. Manja HEM, et al. Cellular retinol-binding protein supported retinoic acid synthesis. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 271 (10):5610-5616. 1996.

60. Jay AW, et al. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *The Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 271 (47):29922-29927. 1996.
61. Xiyun Chai, et al. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270 (8):3900-3904. 1996.
62. Kanai M, et al. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* 47:2025-2044. 1968.
63. Ottonello S, et al. Crystallization and preliminary X-ray data of human plasma retinol-binding protein. *J. Mol. Biol.* 163: 679-681.
64. Rask L, et al. The primary structure of the human retinol-binding protein. *FEBS. Lett.* 104:55-58. 1979.
65. Maria A, Lieber C. Alcohol, vitamin A, and β -carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am. J. Clin. Nut.* 69 (6):1071-1085. 1999.
66. Weiler R, et al. Retinoic acid has light-adaptative effects on horizontal cells in the retina. *Neurobiology.* 95 (12):7139-7144. 1998.
67. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19:209-252. 1985.
68. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240:889-895. 1988.
69. Green S and Chambon P. Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature.* 325:75-78. 1987.
70. Kastner P, et al. Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2700-2704. 1990.
71. Giguère V, et al. Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo. *Mol. Cell. Biol.* 10:2335-2340. 1990.
72. Haselbeck R, et al. Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology.* 138 (7):3035-3041. 1997.

73. Mic FA, et al. Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. PNAS. 100 (12):7135-7140. 2003.
74. Mertz JR, et al. Identification and Characterization of a stereospecific human enzyme that catalyze 9-cis-retinol oxidation. J. Biol. Chem. 272 (18): 11744-11749. 1997.
75. Gilbert SO, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. J. Nat. Cancer Institute. 88 (21): 1550-1559. 1996.
76. Henry M, et al. Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type β gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:5392-5396. 1990.
77. Corcoran J, et al. Retinoic acid receptor β 2 and neurite outgrowth in the adult mouse spinal cord in vitro. J. Cell Sci. 115:3779-3786. 2002.
78. Alberts B, et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 4th ed. 2002.
79. Cox N, et al. Lehninger Principios de bioquímica. Omega. 3a. ed. 2000.
80. Nagpal S, et al. Promoter context- and response element dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. Cell. 70:1007-1019. 1992.
81. Nathan C and Sporn M. Cytokines in context. J. Cell. Biol. 113:981-986. 1991.
82. Taub R. Transcriptional control of liver regeneration. FASEB. 10:413-427. 1996.
83. Morriss-Kay G. Retinoic acid and craniofacial development: molecules and morphogenesis. Bioessays.15(1):9-15.1993.
84. Edwards SA, et al. The transcriptional factor, Egr-1, is rapidly modulated in response to retinoic acid in p19 embryonal carcinoma cells. Dev. Biol. 148:165-173. 1987.
85. Kitabayashi I, et al. Transcriptional regulation of the c-jun gene by retinoic acid and EIA during differentiation of F9 cells. EMBO J. 167-175. 1992.

86. Denker L, et al. Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. *Development*. 110: 343-352. 1990.
87. Ruberte E, et al. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during morphogenesis in mouse embryos. *Development*. 115: 973-989. 1991.
88. Molotkov A and Duester G. Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277 (25):22553-22557. 2002.
89. Tomita K, et al. Regulation of mouse retinol dehydrogenases and retinal dehydrogenases in hepatocyte differentiation. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 38 (1):46-57. 2003.
90. Ankona-Sey Victor. Hepatic Regeneration – Revisiting the Myth of Prometheus. *News Physiol. Sci.* 14: 149-155. 1999.
91. Rojkind M and Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. *Collagen. Rel. Res.* 2: 152- 175. 1982.
92. Michalopoulos GK and De Frances MC. Liver regeneration. *Science*. 276: 60- 66. 1997.
93. Fausto N and Webber EM. Liver regeneration. In the liver: Biology and Pathobiology. Third Ed. (Arias IM, et al.) Raven Press. LTD. New York. 1994.
94. Andiran F, et al. Regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following 70% hepatectomy in rats and the effect of α -tocopherol on cirrhotic regeneration. *J. Surg. Res.* 89:184-188. 2000.
95. Barbason, H. et al. Circadian synchronization in liver regeneration in adult rats: the role played by adrenal hormones. *Cell Tissue Kinet.*; 22:451-460. 1989.
96. Kaibori M, et al. Stimulation of liver regeneration and function after partial hepatectomy in cirrhotic rats by continuous infusion of recombinant human hepatocyte growth factor. *Hepatology*. 27:381-390. 1997.

97. Gaub J Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology*. 4 (5):902-904. 1984.
98. Vic P, et al. Complete liver regeneration in one-stage 90% hepatectomized rats treated with testosterone. *Hepatology*. 2 (2):247-248. 1982.
99. Higgins GM and Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 12:186-202. 1931.
100. Bucher NLR. Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol*. 15:245-300. 1963.
101. Morales-González J, et al. Effects of ethanol administration on hepatocellular ultrastructure of regenerative liver induced by partial hepatectomy. *Diges. Disea. Sci*. 46 (2):360-369. 2001.
102. Martínez-Hernández A and Amenta P. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB.J*. 9:1401-1410. 1995.
103. Fausto N, et al. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*. 9:1527-1536. 1995.
104. Gutiérrez-Salinas J, et al. Redox state and energy metabolism during liver regeneration. *Biochem. Pharmacol*. 58, 1831- 1839. (1999).
105. Hickok NJ, et al. Complete amino acid sequence of human ornithine decarboxylase deduced from complementary DNA. *DNA*. 6:179-187. 1987.
106. Hickok NJ and Uitto J. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression, polyamine levels, and DNA synthetic rates by all-trans-retinoic acid in culture human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol*. 98:327-332. 1992.
107. Harvey WK and Lindahl R. Activity of various aldehyde-metabolizing enzymes in chemically-induced rat hepatomas. *Biochem. Pharmacol*. 31 (6):1153-1155. 1982.
108. Borrow J, et al. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science*. 249:1577-1580. 1990.

109. Pöso H and Pöso AR. Inhibition of RNA and protein síntesis by ethanol in regenerating rat liver: Evidence for transcriptional inhibition of protein síntesis. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 49: 125- 129. 1981.
110. Aguilar–Delfín I, López–Barrera F and Hernández–Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrana in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology.* 24(3):657-662. 1996.
111. Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* 10(9):993-1001. 1996.
112. Bjorkhem I. On the role of alcohol dehydrogenase in omega-oxidation of fatty acids. *Eur J Biochem.* 30(3):441-51. 1972.
113. Morales-González, J.A Gutiérrez-Salinas J. and Hernández-Muñoz R. Pharmacokinetics of the ethanol bioavailability in the regenerating rat liver induced by partial hepatectomy. *Alcohol. Clin. Exper. Res.* 22(7) : 1557-1563. 1998.
114. Milland J, et al. Gene expression in regenerating and acute-phase rat liver. *Am J Physiol.* 259(3 Pt 1):G340-7 1990.
115. Bosron WF and Li TK. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology.* 6(3):502-10. 1986.
116. Lin Z, Edenberg HJ and Carr LG. A novel negative element in the promoter of the mouse alcohol dehydrogenase gene Adh-1. *J Biol Chem.* 15; 268(14):10260-7. 1993.
117. Cederbaum AL and Rubin E. Kinetic properties of alcohol dehydrogenase in hepatocellular carcinoma and normal tissues of rat. *Cancer Res.* 36(7 PT 1):2274-7. 1976.
118. Esterbauer H, Zollner, H and Lang J. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem J.* 228(2):363-73. 1985.

119. Ang HL, et al. Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J Biol Chem.* 271(16):9526-34. 1996.
120. McCaffery P and Drager UC. Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci.* 91(15):7194-7. 1994.
121. Kim CL, Leo MA, Lieber,CS. Retinol forms retinoic acid via retinal. *Arch Biochem Biophys.* 294(2):388-93. 1992.
122. Balkan W, Colbert M, Bock C and Linney E. Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc Natl Acad Sci.* 89(8):3347-51. 1992.
123. Chen M, Achkar, C and Gudas LJ. Enzymatic conversion of retinaldehyde to retinoic acid by cloned murine cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Mol Pharmacol.* 46(1):88-96. 1994.
124. De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* 5(14):2924-33. 1991.
125. Chai X, Boerman MH, Zhai, Y and Napoli JL. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem.* 270(8):3900-4. 1995.
126. Harvey WK and Lindahl R. Activity of various aldehyde-metabolizing enzymes in chemically-induced rat hepatomas. *Biochem Pharmacol.* 31(6):1153-5. 1982.
127. White J A, et al. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 29922-29927. 1996.
128. Lowry OH. *Methods of Enzymology.* 1951.
129. Duester G, et al. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: Implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell Biol.* 11: 1638-1646. 1991.

130. Smith WC, Nakshatri H, Leroy P, Rees J and Chambon P. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO. J.* 10:2223-2230. 1991.
131. Collins MD, Eckhoff C and Chahoud NH. 4-methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-trans-retinoic acid in the mouse. *Arch Toxicol.* 66: 652-659. 1992.
132. Duester G. A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 568-572. 1991.
133. Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.* 7: 317-327. 1993.
134. Pullarkat RK. Hipótesis: Prenatal ethanol-induced birth defects and retinoid acid. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 565-567. 1991.
135. Saber H, Wilmmans W. Thymidine kinase. In *Methods of enzymatic analysis*. Hu Bergmeyer, J Bergmeyer, M Grassl (eds). Deerfield Beach Florida, Verlag Chemie, 1983, pp 468-473.
136. Barranco RF, et al. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. *Intoxicación por drogas de abuso: intoxicación por etanol*.NET.
137. Shean ML, Duester G. The role of alcohol dehydrogenase in retinoic acid homeostasis and fetal alcohol syndrome. *Alcohol Alcohol. Suppl.* 2:51-56. 1993.