

1
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**"CAMBIOS PEROXIDATIVOS EN LAS
MEMBRANAS CELULARES DURANTE LA
REGENERACION HEPATICA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A .

IRMA AGUILAR DELFIN

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

ENERO DE 1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

A mis amigos
A mi familia
A mis maestros
A la Universidad

Muy especialmente

A Enrique, mi lugar de libertad, mi inescapable antorcha y sin duda el mejor amigo jamás contado.

A Lucy, gran cómplice y amiga del alma.

A mis colegas microchips, increíbles hermanos académicos.

Al Dr. Rolando Hernández, magnífico tutor y gran bioquímico, por su generosa confianza y por la libertad para las ideas y experimentos que existe en su laboratorio.

Al Dr. Saúl Villa, constructor de lo importante, ejercitador de mi conciencia, por su cálido apoyo desde siempre.

A Toño Lazcano, maestro inconcebible, biólogo vital, futuro ultrahomenajeado, gran amigo, por todos los asombros que encienden sus palabras.

A Carlos Larralde, mi primer tutor cronológico y mi maestro para siempre.

ÍNDICE

Resumen	5
Antecedentes.....	6
El fenómeno de regeneración hepática	6
Las especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación en sistemas biológicos.....	15
Introducción (Antecedentes directos y objetivos).....	19
Materiales y métodos	21
Resultados	27
Discusión	50
Conclusiones.....	62
Perspectivas	64
Apéndice I	66
Factores séricos en la regeneración hepática.....	66
Apéndice II	68
Especies reactivas de oxígeno	68
Efectos sobre moléculas biológicas	72
Métodos de detección.....	74
Mecanismos antioxidantes.....	75
Efectos peroxidativos del tetracloruro de carbono.....	77
Referencias	78

Viendo, de hecho, que el hígado es no sólo útil, sino una parte necesaria y vital en todos los animales que tienen sangre, no es sino razonable que de sus características deba depender la longitud o la brevedad de la vida.

Aristóteles, *De las partes de los animales.*

Y el alado cazador de Zeus, la curtida águila, vendrá a tí todos los días, convidado importuno, y voraz caerá sobre la carne y la hará jirones, y se cebará con el negro manjar de tus hígados.

Esquilo, *Prometeo encadenado.*

RESUMEN

El hígado de mamíferos es capaz de recuperarse de pérdidas importantes de tejido debido a su capacidad de regeneración. El fenómeno de regeneración hepática, por su relevancia fisiológica, posee importantes implicaciones médicas, y resulta de gran interés en el estudio de procesos biológicos como proliferación y diferenciación. La regeneración hepática se estudia experimentalmente con el modelo de hepatectomía parcial en rata, en el que la recuperación de la masa hepática original se logra entre los 7 y los 14 días y el máximo de replicación de DNA en hepatocitos ocurre a las 24 h post-hepatectomía. Esta respuesta proliferativa sincronizada y dramática requiere de una pérdida de más del 40% de masa hepática para desencadenarse.

En este trabajo se describen los cambios en lipoperoxidación que ocurren en el hígado regenerante. La lipoperoxidación es el proceso de degradación de ácidos grasos poliinsaturados por la reacción con radicales libres de oxígeno. La medición de lipoperoxidación se realizó mediante la cuantificación de dialdehído malónico y dienos conjugados durante las primeras 48 h post-hepatectomía, en homogenado total y en fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial.

Encontramos un aumento en la lipoperoxidación hepática, que alcanza un máximo a las 24 h post-hepatectomía en el homogenado, y regresa a valores normales para las 48 h. El incremento se localiza específicamente en las fracciones de citosol y membrana plasmática.

El incremento localizado de lipoperoxidación no se observa en otros órganos del animal hepatectomizado y ocurre solamente como consecuencia de hepatectomías de más del 40%.

El aumento en lipoperoxidación comparte coincide con la regeneración hepática en su especificidad en el organismo, en el curso temporal y en el umbral de pérdida de tejido necesario para su aparición.

Estas coincidencias sugieren que ambos fenómenos pudieran estar relacionados.

Antecedentes

EL FENÓMENO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado es un órgano esencial para el sostenimiento de la vida en los animales superiores, que aparece en la evolución desde los protocordados, como parte del hepatopáncreas. Tiene a su cargo muchas funciones, desde el metabolismo general de proteínas, carbohidratos y grasas, el almacenamiento de glucógeno, cobre, hierro y vitamina B₁₂, el metabolismo de la hemoglobina, la detoxificación de fármacos y la formación de bilis, hasta la producción de calor corporal, la destrucción de los eritrocitos viejos, la regulación del volumen sanguíneo y la síntesis de factores de coagulación y proteínas del complemento.

Debido a su localización entre el tracto digestivo y el corazón, el hígado recibe sangre arterial por una rama de la aorta abdominal, la arteria hepática, y sangre venosa por la vena porta, en donde convergen las ramas circulatorias que transportan los metabolitos absorbidos a lo largo del tracto digestivo. El circuito de retorno venoso lo establece la vena hepática, que converge en el tronco de la vena cava inferior.

El hígado puede definirse como una masa continua de células epiteliales, los hepatocitos, que se encuentra vascularizada por capilares fenestrados, llamados sinusoides, y al mismo tiempo, permeada por un sistema de canales secretores: los canaliculos biliares.

Los hepatocitos constituyen el 90% de la masa hepática total, pero su contribución al número de núcleos sólo alcanza el 60%, debido a su mayor tamaño en proporción con los otros tipos celulares. La población de células litorales o accesorias representa un 35% del número de núcleos y se compone principalmente de células endoteliales y macrófagos hepáticos (células de Kupffer), con una menor proporción de células almacenadoras de grasa (células de Ito). Las células que forman los canaliculos biliares constituyen el 5% restante (Alison, 1986).

Además de su importancia metabólica y su complejidad estructural, el hígado posee una característica que lo hace particularmente interesante: su capacidad de regeneración. A diferencia de la mayoría de los órganos y estructuras de los vertebrados superiores, el hígado

es capaz de volver a formar partes de su estructura que hayan sido removidas o dañadas, recuperando la función y la arquitectura tisular adecuada.

El estudio de la regeneración hepática, entonces, aporta información importante acerca de los mecanismos de proliferación normal y su relación con el estado diferenciado en animales adultos, así como para el entendimiento de procesos morfogénéticos e interacciones entre distintas poblaciones celulares.

La función hepática puede verse alterada por hepatitis infecciosa, abscesos hepáticos amibianos, sífilis hepática, hidatidosis, cirrosis, isquemia, neoplasias o intoxicación con diversas sustancias, entre las que se encuentran el tetracloruro de carbono, el etanol, drogas citotóxicas, aflatoxinas, fósforo, anestésicos como el halotano, tetraciclinas y cloranfenicol en dosis altas. Sin embargo, estas alteraciones en general no causan daño permanente, debido a la capacidad de regeneración del hígado. Esto pone de manifiesto las importantes implicaciones médicas del fenómeno.

La capacidad de regeneración, sin embargo, sólo se mantiene mientras la organización del órgano permanece intacta, y se ve importantemente disminuida en patologías en las que se pierde la organización normal de la matriz extracelular, como la cirrosis y la fibrosis.

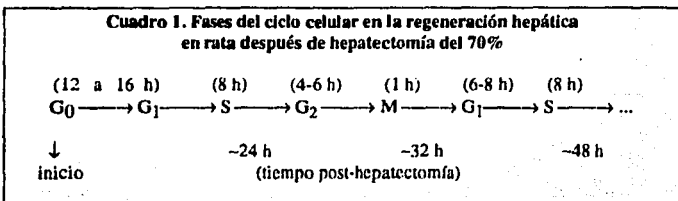
Resultados en animales experimentales y observaciones en el campo de trasplantes muestran que la masa hepática conserva una proporción perfectamente exacta con respecto a la masa corporal. Los hígados transplantados que son pequeños para un determinado paciente crecen hasta alcanzar la proporción adecuada (Francavilla et al, 1993) y por el contrario, hígados que son mayores que el tamaño óptimo para determinado individuo, no crecen y pueden incluso disminuir de tamaño. En casos en los que el hígado del paciente no es removido durante el trasplante, y ambos hígados continúan funcionando, sólo uno de los órganos sobrevive, mientras que el otro se atrofia.

Estas fascinantes observaciones muestran que el equilibrio entre masa hepática y tamaño corporal es dinámico, y que es capaz de recuperarse rápidamente en los casos en los que se ve alterado. La proliferación clonal de unos pocos hepatocitos es capaz de restaurar la masa hepática original aún en pérdidas de hasta el 90%. La pérdida de función hepática aparentemente crea una gran presión selectiva para los hepatocitos intactos, cuya proliferación eventualmente corrige el déficit funcional.

El fenómeno de regeneración hepática ha sido estudiado principalmente con el modelo de hepatectomía parcial en rata, en el que el estímulo regenerativo es la resección quirúrgica de una fracción de la masa hepática.

El hígado de la rata está organizado anatómicamente en varios lóbulos independientes, con irrigación sanguínea propia, lo que permite la remoción independiente de cada uno sin consecuencias para las otras zonas. La operación usual involucra la remoción de los dos lóbulos anteriores, que constituyen aproximadamente el 70% del peso del hígado. La respuesta proliferativa no se desarrolla en la zona adyacente al sitio de corte sino en los relativamente lejanos lóbulos posteriores.

La cinética de proliferación durante la regeneración hepática, inducida por hepatectomía del 70%, ha sido extensamente estudiada y caracterizada en cuanto a los tiempos de inicio de las fases del ciclo celular (Alison, 1986; Leffert et al, 1988). Esta información se resume en el cuadro 1.



En la fase S de la primera ronda de proliferación se alcanzan tasas de incorporación de timidina de entre el 30 y el 40%, y se observan valores de mitosis de entre 3.6 y 4.8%. En el hígado regenerante la mayoría de los hepatocitos se han dividido cuando menos una vez para el período de entre 24 y 35 h post-hepatectomía, y algunos pasan por una segunda y tercera ronda de proliferación.

Conviene notar que esta cinética de proliferación corresponde a la población de hepatocitos o células del parénquima, y es debido a su alta proporción en el órgano, que se manifiesta como la respuesta global. Sin embargo, las células no parenquimatosas del hígado proliferan también, pero el proceso se inicia aproximadamente 24 h después. Las células de los ductos biliares presentan valores de incorporación de timidina de ~20% alrededor de las 48 h post-hepatectomía, y el pico de actividad mitótica en células de Kupffer y endoteliales se presenta a las 48 y 96 h respectivamente (Alison, 1986). Debido a este desfase, durante los primeros 4 días de la regeneración el tejido formado no posee todavía la intrincada arquitectura característica de un hígado normal. De hecho, los cúmulos de nuevos hepatocitos intervienen en la correcta formación de las redes capilares, al desencadenar la diferenciación de los capilares fenestrados conocidos como sinusoides (Antonio Martínez-Hernández, FASEB Conference, 1994).

Dado que el hígado responde tan notablemente a una reducción en su masa, quizá no es sorprendente que la intensidad de la respuesta proliferativa esté controlada con mucha precisión por la proporción de la pérdida.

Con remociones moderadas de masa hepática (~30%) se induce una tasa baja pero constante de síntesis de DNA durante un periodo prolongado, mientras que con las pérdidas más severas se induce un marcado pico de síntesis de DNA seguido por una disminución más o menos constante (Bucher y Swaffield, 1964).

Por otro lado, la respuesta a hepatectomía subtotal (90%) se caracteriza por una extensión de 12 h en la duración del periodo prerreplicativo, pero con los mismos valores de síntesis de DNA y actividad mitótica que en la hepatectomía del 70% (Alison, 1986).

Se ha visto que la cinética de la regeneración hepática puede verse afectada por varios fenómenos, como el envejecimiento, que tiene como consecuencia una respuesta más lenta en donde probablemente una porción de hasta 23% de las células se vuelve incapaz de proliferar (Alison, 1986). También existen cambios debidos a factores ambientales como hábitos de alimentación y luz. Aunque no se reconoce universalmente que existen variaciones circádicas en el proceso de regeneración hepática, éstas están bien establecidas en otros modelos de tejidos proliferativos. Cuando se pone el cuidado suficiente para la aclimatación al horario de luz-oscuridad los resultados son impresionantes: las hepatectomías realizadas en la mañana producen una serie de picos de mitosis con una periodicidad de 24 h (Chessemán et al, 1986). Se ha descubierto también que en el hígado normal de roedores la síntesis de DNA ocurre cerca de la media noche y la mitosis cerca del mediodía (Alison, 1986). Por esta razón, se ha propuesto un fenómeno de sincronización del fenómeno de regeneración hepática debido al componente circádico, tanto para el modelo de hepatectomía parcial como el de intoxicación con tetracloruro de carbono (Paulsen, 1990). En el modelo experimental de regeneración hepática inducida con tetracloruro de carbono, las dosis comúnmente utilizadas del tóxico (de 0.5 a 1 ml por kg de peso) causan hasta un 50% de destrucción de los hepatocitos, y 72 h después todos los núcleos sobrevivientes han sintetizado DNA.

Sin embargo, la fase pre-replicativa en este modelo experimental es mayor que en el modelo de hepatectomía parcial, y la síntesis de DNA se inicia entre 24 y 26 h después de la administración del tóxico, llegando al máximo entre las 36 y las 42 h. La mitosis ocurre entre las 48 y 54 h (Alison, 1986).

En general, el fenómeno de regeneración compensatorio a hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono presenta un retraso en su cinética en comparación con la regeneración por hepatectomía parcial, incluso en la inducción de protooncogenes (Coni et al, 1993). Este retraso quizá se deba a que en este caso se presentan procesos toxicológicos, de necrosis y de inflamación aumentada.

Desde los primeros estudios de regeneración hepática ha existido interés en la actividad metabólica del hígado regenerante, que dadas las condiciones en que funciona, resulta sustancialmente distinto al hígado normal. En primer lugar, ha quedado bien establecido que el organismo de la rata no experimenta una disminución en las funciones hepáticas cuando se le somete a hepatectomía del 70% (Michalopoulos, 1990; Lorenzi et al, 1993). Como la función hepática en este caso está siendo cubierta por el 30% de la masa original del órgano, es de suponer que el tejido remanente se encuentra realizando cuando menos el triple del trabajo metabólico al que está sometido normalmente, sin considerar las actividades de síntesis necesarias para la proliferación.

Se ha descrito un aumento en el potencial de membrana mitocondrial y la síntesis de ATP a las 24 h post-hepatectomía (Nishihira, 1986) que podría estar relacionado con este incremento en la actividad metabólica. También se ha descrito un aumento temprano en la actividad de las vías de glucogenólisis y gluconeogénesis, mientras que la glucólisis se ve disminuida. (Rebecca Taub, FASEB Conference, 1994). Otros cambios incluyen una acumulación importante y transitoria de triglicéridos, incrementos en isozimas fetales (Curtin, 1983), activación de transportadores de aminoácidos (Fowler et al, 1992), etc.

El estudio de la regeneración hepática ha generado mucha información acerca de lo que ocurre en el hígado durante el proceso. En especial se han caracterizado señales moleculares específicas, como factores de crecimiento y patrones de expresión genética, aunque se sabe que el estado hormonal, el control nervioso y los efectos nutricionales tienen también efectos importantes. Entre los genes que aumentan su expresión debido al estímulo de la hepatectomía se encuentran factores transcripcionales (Tewari et al, 1992), sugiriendo que una cascada de activación de genes puede ser responsable de la proliferación. También se han identificado una gran cantidad de factores solubles con efectos hepatotróficos (ver apéndice 1), que pueden activarse por proteasas, entre los cuales el factor de crecimiento de hepatocitos, HGF, parece ser el más importante. Este factor de crecimiento se sintetiza en

respuesta a una molécula, llamada "injurina", liberada por el hígado durante episodios de daño tóxico o quirúrgico (Matsumoto et al, 1992).

Los eventos caracterizados en el modelo de regeneración por hepatectomía del 70% se muestran en el cuadro 2 (basado en Alison, 1986; Leffert et al, 1988; Michalopoulos, 1990; Fausto y Weber, 1993; Horimoto, 1994 y trabajos expuestos en la FASEB Conference, ver referencias).

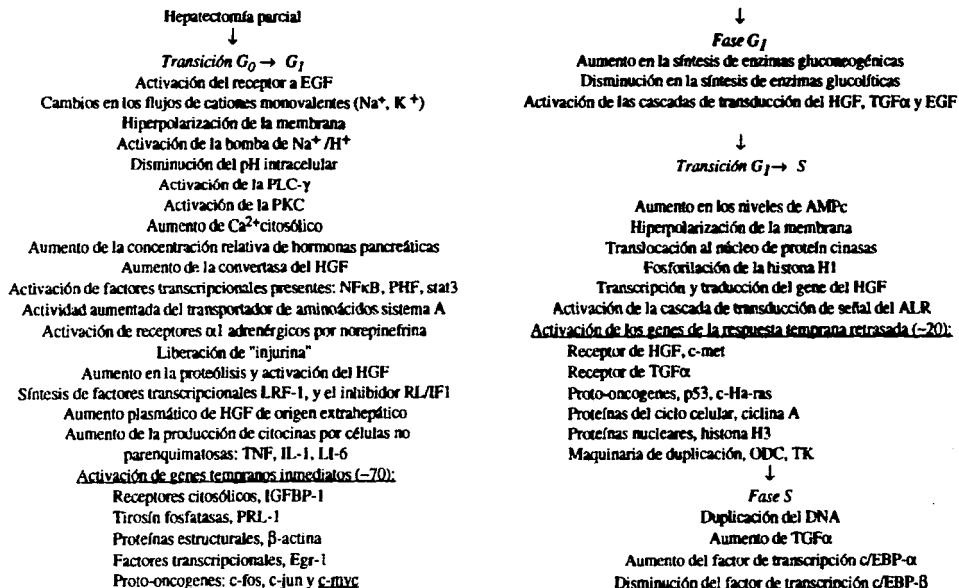
Los datos obtenidos hasta ahora son insuficientes para distinguir si la iniciación de la respuesta se debe a una señal única o a múltiples señales simultáneas. Tampoco se conoce la duración del evento iniciador, o si el final del proceso se debe a la desaparición del estímulo positivo o a la acción de factores inhibidores.

Una pregunta importante que sigue sin ser contestada es si existe un enlace directo entre la demanda funcional y la proliferación celular.

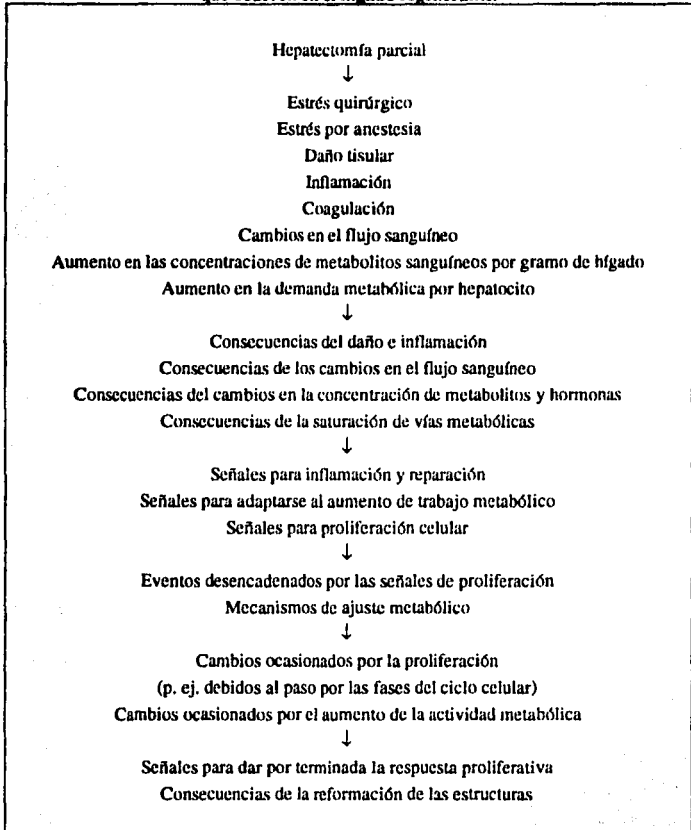
La hepatectomía parcial es un estímulo que desencadena varias respuestas paralelas en el organismo (cuadro 3). Por esta razón, es posible que un evento determinado aparezca durante el tiempo de la regeneración sin estar necesariamente relacionado con el fenómeno proliferativo. Se requiere de un análisis cuidadoso para establecer que el evento observado realmente tiene relevancia en el fenómeno, y si su influencia es directa o indirecta. Esto, aunado a la dificultad para hacer manipulaciones *in vivo*, tiene como consecuencia que se hayan reconocido muy pocos eventos cuya inhibición afecte la regeneración (Koch y Leffert, 1979; Lambotte et al, 1989) o que al ser inducidos la promuevan (Shiota et al, 1994).

Al mismo tiempo, puede haber eventos que pertenezcan a varias de estas categorías, y que constituyan enlaces entre los distintos fenómenos, o entre distintos sistemas celulares y niveles de regulación.

Cuadro 2. Eventos caracterizados durante la regeneración hepática por hepatectomía del 70%



Cuadro 3. Categorías a las que pueden pertenecer los eventos que ocurren en el hígado regenerante.



Antecedentes

LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

El oxígeno empezó a volverse un elemento importante en la atmósfera a partir de que la evolución dió lugar a las cianobacterias fotosintéticas, con lo que se desarrolló una vía metabólica de alta eficiencia, utilizando la energía luminosa para liberar los hidrógenos del agua y formar poder reductor, con la formación de oxígeno molecular. El surgimiento del oxígeno como elemento dominante en la atmósfera le dió a la vida terrestre las características con la que la conocemos actualmente, al abrir la posibilidad de que aparecieran organismos heterótrofos eficientes en el nuevo ambiente: los organismos de respiración aeróbica, y al formar la capa de ozono que disparó un alto nivel de especiación permitiendo la vida fuera del agua. Pero paradójicamente, al surgir esta tremenda ventaja para el desarrollo de la vida, surgió también un peligro inexistente hasta entonces: las especies reactivas de oxígeno como una fuente potencial de daño celular.

Como lo ha expresado Denham Harman: "Pareciera que la vida se originó como resultado de las reacciones de radicales libres, seleccionó estas reacciones para llevar a cabo papeles metabólicos y luego aseguró la evolución empleándolas para permitir la mutación y la muerte." (Harman, 1991).

Esta doble naturaleza de las especies reactivas de oxígeno tiene como consecuencia que estén presentes tanto en fenómenos de daño celular o tisular como de funcionamiento biológico normal. Algunos de los efectos reportados para las especies reactivas de oxígeno y los productos de lipoperoxidación se encuentran enlistados en el cuadro siguiente (cuadro 4). El tipo de efectos obtenidos en general depende de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno que se alcanzan. A concentraciones altas, los efectos que predominan son los de alta reactividad inespecífica y daño general, mientras que a concentraciones moderadas puede esperarse un efecto más selectivo y por lo tanto fisiológico.

Cuadro 4A. Efectos tóxicos de los radicales libres de oxígeno y sus derivados.

Hidroxilación en las bases del DNA y rupturas de cadena sencilla (Farber et al, 1990)

Aberraciones cromosómicas y entrecruzamiento del DNA (Cerutti, 1985)

Descomposición oxidativa de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Younes, 1988)

Inhibición de las enzimas microsomales glucosa 6-fosfatasa, UDP-glucuronil transferasa y citocromo P450 (Younes, 1988).

Inactivación de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Cochrane et al, 1988)

Aumento de la susceptibilidad a proteólisis en la mayoría de las proteínas (Davies, 1987)

Mutaciones, amplificaciones y rearrreglos cromosomales inducidos por el procesamiento y reparación del DNA dañado oxidativamente (Cerutti, 1985)

Liberación de enzimas lisosomales por la destrucción lipoperoxidativa de sus membranas (Younes, 1988)

Disminución del transporte electrónico en mitocondrias y microsomas (Younes, 1988)

Inhibición de la respiración mitocondrial mediante la inhibición directa del complejo de la ATPasa (Cochrane et al, 1988).

Entrecruzamiento de proteínas de membrana (Zs.-Nagy, 1989)

Disminución de la permeabilidad a potasio en membranas (Zs.-Nagy, 1989)

Aumento de la fragilidad osmótica (Benedetti et al, 1979)

Disminución de los niveles intracelulares de NAD (Cerutti, 1985)

Pérdida de capacidad glucolítica y caída de los niveles de ATP debido al efecto sinérgico de la inactivación de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la disminución del NAD (Cochrane et al, 1988).

Aumento del Ca^{2+} y Na^{+} intracelular debido a la caída en los niveles de ATP, ocasionando alteraciones del citoesqueleto, desequilibrio osmótico, activación de proteasas y pérdida de estructura celular (Cochrane et al, 1988)

Cuadro 4B. Algunos efectos biológicos reportados

Activación de la adenilato ciclasa (Baba et al, 1981).

Incremento de la permeabilidad microvascular (Del Maestro, 1984)

Quimiotaxis de fibroblastos y células de fibrosarcoma (Wach et al, 1987)

Biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Bruchhausen et al, 1988)

Quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares y agregación plaquetaria (conferencia Davis)

Inducción de factores transcripcionales: c-fos, c-jun, c-myc, AP-1 y NF- κ B (Crawford et al, 1988; Devary et al, 1991; Schreck et al, 1991, Rao et al, 1993).

Activación de la proteína cinasa C (O Brian et al, 1988).

Aumento en la rigidez de las bicapas lipídicas (I.L.S.-Nagy, 1989).

Activación del factor transcripcional Oxy R, de procariontes, que regula la transcripción de genes inducidos por estrés oxidativo (Storz et al, 1990)

Activación de la transcripción de genes relacionados con el estrés oxidativo en mamíferos, a través de la secuencia ARE (antioxidant response element) (Rushmore et al, 1991).

Estimulación de la expresión del gen de colágena en fibroblastos. (Chojkier et al, 1989; Geesin et al, 1990, Geesin et al, 1991)

Vasodilatación, relajación de músculo liso en pulmones y tracto digestivo, conversión de la señal de excitación sexual en la erección del pene, inhibición de plaquetas, regulación inmune, neurotransmisión en la potenciación a largo plazo. Óxido nítrico, NO. (Koshland, 1992)

Activación de la fosfolipasa A₂ (Goldman, 1992).

Inducción de motilidad hiperactivada y reacción acrosomal en espermatozoides (Aitken y Fisher, 1994)

Aumentos del pH intracelular y el Ca²⁺, y liberación de ácido araquidónico en células amnióticas humanas (Ikebuchi et al, 1991)

Activación de la poli(ADP-ribosa) sintetasa, enzima que modifica factores transcripcionales. (Cerutti, 1985)

Además de reportes individuales de efectos en sistemas biológicos, se han sugerido diversas hipótesis acerca del papel biológico de las especies reactivas de oxígeno (cuadro 5). En general consideran a las especies reactivas de oxígeno como entidades capaces de ejercer efectos específicos y regulados en sistemas biológicos complejos.

Cuadro 5. Teorías sobre el papel biológico de las especies reactivas de oxígeno

Los estados prooxidantes en la célula pueden promover el crecimiento neoplásico de células iniciadas. Es concebible que el mecanismo sea a través de la inducción de un grupo de genes prooxidantes, reminiscentes del sistema SOS en bacterias (Ccrutti, 1985)

El envejecimiento y la muerte son eventos que se deben a la acumulación de daño por radicales libres en las mitocondrias de las células con diferenciación terminal (Miquel, 1989)

Los radicales lipídicos peroxidados son capaces de ejercer control sobre la proliferación celular (Galeotti et al, 1989)

Los estados hiperoxidantes son los responsables de disparar la diferenciación en microorganismos (Hansberg y Aguirre, 1990)

En células altamente proliferativas (como células neoplásicas y fetales) el nivel de mecanismos de defensa antioxidante debe aumentarse para evitar daños genéticos durante la duplicación del DNA (Slater et al, 1990)

Las especies reactivas de oxígeno podrían ser los inductores intracelulares de la respuesta a stress o choque térmico ("heat-shock") (Becker et al, 1991)

Los radicales libres de oxígeno son ampliamente utilizados por las células como segundos mensajeros, en la activación de factores transcripcionales (Schreck y Baeuerle, 1991)

INTRODUCCIÓN

El hígado en regeneración es un sistema biológico cuyas características lo hacen especialmente interesante para el estudio del manejo de las especies reactivas de oxígeno y sus productos de degradación.

Por un lado, es un órgano sometido a gran demanda metabólica, la cual favorece la producción de una mayor proporción de especies reactivas de oxígeno. Y al mismo tiempo, es un tejido proliferativo, en el que aumenta el riesgo de daños oxidantes al material genético. Pero por encima de todo, es un tejido adulto, normal, cuya proliferación es fisiológicamente importante. Esto lo coloca en un sitio privilegiado para probar la hipótesis de que las especies reactivas de oxígeno deben ser evitadas en la división celular, la cual se fundamenta principalmente en datos obtenidos de tejidos neoplásicos.

La solución que tenga el órgano para esta situación puede brindar información importante acerca del significado biológico de las reacciones de radicales libres de oxígeno y la existencia de toxicidad por lipoperoxidación en un modelo en el que la viabilidad celular se infiere directamente de la supervivencia del sujeto experimental.

Las aproximaciones experimentales al fenómeno hasta la fecha no han dado una respuesta clara. Varios grupos independientes han observado un aumento de la lipoperoxidación en el homogenado del hígado regenerante (Ueda et al, 1983; Lambotte et al, 1989; Obata M., 1992). Sin embargo, también se ha reportado que durante la regeneración aumenta la eficiencia microsomal para contender con las especies reactivas de oxígeno (Cockerill et al, 1983; Chessemán et al, 1986; Slater et al, 1990).

Debido a que los reportes no son directamente comparables por el hecho de que las mediciones se realizan en muestras de distinto origen celular, decidimos realizar un

estudio completo de la lipoperoxidación en el hígado regenerante, haciendo observaciones en el homogenado total y en cinco fracciones subcelulares: mitocondria, citosol, microsomas, membrana plasmática y núcleo, a varios tiempos durante las primeras 48 h post-hepatectomía.

Considerando que las especies reactivas de oxígeno y los productos de la lipoperoxidación son tanto consecuencias metabólicas como señales moleculares, es posible que puedan estar actuando como un vínculo entre los ajustes bioquímicos al déficit funcional y los mecanismos de proliferación.

Este trabajo brindará una primera aproximación para observar si existe alguna relación entre la concentración de especies reactivas de oxígeno y el fenómeno de regeneración hepática, que pudiera interpretarse como favorable a esta hipótesis.

MATERIALES Y ANIMALES EXPERIMENTALES

Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de entre 230 y 280 g de peso, de aproximadamente 10-12 semanas de edad, obtenidas del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Tanto antes como después de la hepatectomía fueron alimentadas *ad libitum* con alimento comercial estándar para rata (Lab Diet, Richmond) y agua. Durante su permanencia en el bioterio se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Fueron llevados al laboratorio un día antes de su tratamiento, en donde también estaban bajo el régimen diurno de luz-oscuridad. Se mantuvieron en jaulas limpias, con no más de 4 animales por jaula. Al tiempo de su uso experimental los animales aparecían en buen estado de salud.

Reactivos

Todos los reactivos tuvieron las características de alta pureza requeridas para su uso. El ácido tiobarbitúrico, sacarosa, EGTA (ácido etilenglicol-bis-tetracético), albúmina, Trizma® base, Percoll®, tritón X-100, reactivo de fenol Folin-Ciocalteu, el tetratoxipropano y el luminol, fueron comprados a Sigma Co (St. Louis Missouri, E.U.A.). El tetracloruro de carbono, ácido acético, metanol, cloroformo, éter etílico, acetato de amonio, ciclohexano, cloruro de potasio, ácido cítrico, tartrato de sodio y potasio, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio provinieron de Baker (Xalostoc, México). El pentobarbital sódico (Anestesa®), fué adquirido de Smith Kline, México. El *n*-butanol y la piridina fueron de Mallinckrodt (Paris, Kentucky, E.U.A.).

Soluciones

Las soluciones se prepararon en agua destilada y desionizada, y en general fueron mantenidas a 4° C.

Buffer A (solución de fraccionamiento): Sacarosa 225 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.4, seroalbúmina bovina al 0.2 %, EGTA 0.3 mM.

Buffer B (solución para obtención de membrana plasmática): Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7.5.

Buffer C (solución de incubación de muestras para la reacción del ácido tiobarbitúrico): Tris-HCl 150 mM, pH 7.4

Buffer para aislamiento de núcleos: citrato-tritón 2.5 %-0-14%, citrato al 2.5%-sacarosa 0.88 M, citrato 2.5%-sacarosa 0.25 M.

Solución ácida para la reacción del ácido tiobarbitúrico: ácido acético al 20% v/v, pH 3.5.

Solución para estabilizar el cromóforo en la reacción del ácido tiobarbitúrico: KCl al 1.2% w/v.

Mezcla de reacción para medir quimioluminiscencia preparada al momento de usarse con:

Acetato de amonio 0.5 M pH 10.5, 50 ml.

Cloruro de cobalto CoCl_2 5 mM, 50 μl

Luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) 5 mM en Na_2CO_3 0.1 M pH 10.5, 10 μl

MÉTODOS

Métodos quirúrgicos.

Las cirugías se realizaron bajo anestesia de éter, observando los cuidados necesarios en cuanto a asepsia y hemostasis.

El grupo de animales control se sometió a laparotomía, consistente en una incisión longitudinal del abdomen (~3 cm), exposición y manipulación del hígado y sutura.

La hepatectomía parcial del 70% se realizó de acuerdo con la técnica originalmente descrita (Higgins y Anderson, 1931), ligando primero la base del lóbulo medio, y realizando su remoción quirúrgica, repitiendo el procedimiento de ligadura hemostática y corte con el lóbulo lateral izquierdo.

Las hepatectomías parciales de menos del 70% se realizaron retirando lóbulos específicos:

hepatectomía del 10% : lóbulo central derecho

hepatectomía del 30%, lóbulo lateral izquierdo

hepatectomía del 50%, lóbulos central derecho y lateral izquierdo.

Estos lóbulos fueron seleccionados en base al análisis de su contribución promedio a la masa hepática total y su accesibilidad quirúrgica.

Los animales fueron sacrificados 3, 6, 12, 24 o 48 h después de la cirugía, por medio de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico, y desangrados por decapitación.

Administración aguda de tetracloruro de carbono

Los animales recibieron una dosis de tetracloruro de carbono de 2 ml por kilogramo de peso, administrada por vía intragástrica, en una dilución de 1:4 en aceite vegetal, lo que equivale a un volumen ~2 ml. Los animales control recibieron 2 ml del vehículo (aceite vegetal) por vía intragástrica.

Fraccionamiento subcelular

Inmediatamente después del sacrificio, el hígado se disecó y se lavó varias veces en buffer A. Después se cortó finamente y se colocó en un volumen de 25 ml de buffer A, procesándose inmediatamente en el homogenizador. Del homogenado se tomó una alcuota para las determinaciones y lo demás se sometió a centrifugación diferencial para obtener las fracciones subcelulares.

El protocolo de centrifugación diferencial se realizó en una Centrifuga Sorvall, rotor Sorvall SS34, de 108 mm de radio y una Ultracentrifuga Sorvall, rotor Beckman 50 Ti, de 80.8 mm de radio.

El homogenado se centrifugó a 1,500 g durante 15 min. El precipitado de esta primera fase se utilizó para obtener las fracciones de membrana plasmática y núcleos.

El sobrenadante se centrifugó a 7,000 g durante 15 min y a 12,000 g durante 10 min.

Los precipitados de ambas centrifugaciones, correspondientes a la fracción mitocondrial, se resuspendieron nuevamente en buffer A, lavándolos una vez más a 12,000 g durante 10 min.

El sobrenadante libre de mitocondrias se sometió a una ultracentrifugación a 100,000 g

durante 1 h, para precipitar la fracción microsomal, correspondiente a vesículas del retículo endoplásmico. El sobrenadante obtenido se designó como fracción citosólica.

La fracción de membrana plasmática se preparó mediante una técnica de centrifugación en gradiente de Percoll (Loten y Redshaw-Loten, 1986).

El precipitado proveniente de la centrifugación del homogenado (1,500 g) se resuspendió en 20 ml de buffer B, agregándole Percoll y sacarosa 2 M para alcanzar proporciones volumétricas de 1:0.13: 0.02 respectivamente. Dicha suspensión se centrifugó a 35,000 g durante 20 min. La banda formada cerca de la boca del tubo se colectó cuidadosamente y se resuspendió de nuevo en la mezcla de buffer B-percoll-sacarosa agregándole además CaCl_2 para alcanzar una concentración final de 1.3 M, con el fin de precipitar el DNA.

La fracción nuclear se obtuvo mediante la técnica del ácido cítrico (Reiners y Busch, 1980). El precipitado de la centrifugación a 1,500 g se resuspendió en ácido cítrico al 2.5 %-Tritón X-100 al 0.14%, centrifugando a 1,500 g durante 10 min. Este lavado se repitió una vez más, y el precipitado obtenido se resuspendió en sacarosa 0.25 M-ácido cítrico al 2.5 %, filtrándolo después con gasa para eliminar las fibras de tejido. La fracción nuclear se obtuvo centrifugando esta suspensión a través de un colchón de sacarosa 0.88 M-ácido cítrico al 2.5% a 1,500 g durante 10 min. Los núcleos así obtenidos se lavaron varias veces en buffer A para quitar el exceso de sacarosa, que podría haber interferido con las determinaciones.

La identidad y pureza de las fracciones así obtenidas se comprobó mediante determinaciones de actividades enzimáticas específicas: glucosa-6-fosfatasa, para fracción microsomal; citocromo oxidasa para mitocondria; 5'-nucleotidasa para membrana plasmática; lactato deshidrogenasa para fracción citosólica. En todos los casos, la contaminación con actividades enzimáticas no específicas, se mantuvo por debajo del 10%. La fracción nuclear

se determinó por cuantificación de DNA. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento y las centrifugaciones se realizaron también a 4 °C.

Muestras de otros órganos

Para los experimentos en los que se midieron los niveles de lipoperoxidación en órganos extrahepáticos se realizaron hepatectomías del 70% o laparotomías y se tomaron muestras de hígado, cerebro, mucosa gástrica, pulmón y riñón.

Los órganos se disectaron y homogenizaron de la misma forma que el hígado. De los homogenizados se tomaron alcuotas y el resto se centrifugó a 1,500 g durante 10 min, 12,000 g durante 15 min y 100,000 g durante 60 min descartando los precipitados. El sobrenadante se designó como fracción citosólica.

Todas las muestras se congelaron inmediatamente después de obtenerlas y se mantuvieron congeladas hasta su uso. Dos ciclos de descongelación-congelación fueron el máximo permitido al tiempo de las determinaciones bioquímicas.

Determinación de lipoperoxidación

La lipoperoxidación se determinó mediante dos técnicas independientes: la reacción del ácido tiobarbitúrico para cuantificación del dialdehído malónico y la determinación espectrofotométrica de las dobles ligaduras típicas de dienos conjugados (ver apéndice 2, para la explicación de la teoría implicada en los métodos de detección).

La cuantificación de dialdehído malónico se realizó con la técnica del ácido tiobarbitúrico, medida espectrofotométricamente (Buege y Aust, 1978) con algunas modificaciones al método original (Hernández-Muñoz et al, 1984). Se utilizaron 3 mg de proteína por cada muestra, diluidas en buffer C. Las muestras se incubaron a 37° C durante 30 min, después de lo cual se tomó una alcuota de 0.4 ml y se agregó a un tubo que contenía 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8%, 1.5 ml de ácido acético al 20%, pH 3.5 y 0.5 ml de agua destilada y

se determinó por cuantificación de DNA. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento y las centrifugaciones se realizaron también a 4 °C.

Muestras de otros órganos

Para los experimentos en los que se midieron los niveles de lipoperoxidación en órganos extrahepáticos se realizaron hepatectomías del 70% o laparotomías y se tomaron muestras de hígado, cerebro, mucosa gástrica, pulmón y riñón.

Los órganos se disectaron y homogenizaron de la misma forma que el hígado. De los homogenados se tomaron alcuotas y el resto se centrifugó a 1,500 g durante 10 min, 12,000 g durante 15 min y 100,000 g durante 60 min descartando los precipitados. El sobrenadante se designó como fracción citosólica.

Todas las muestras se congelaron inmediatamente después de obtenerlas y se mantuvieron congeladas hasta su uso. Dos ciclos de descongelación-congelación fueron el máximo permitido al tiempo de las determinaciones bioquímicas.

Determinación de lipoperoxidación

La lipoperoxidación se determinó mediante dos técnicas independientes: la reacción del ácido tiobarbitúrico para cuantificación del dialdehído malónico y la determinación espectrofotométrica de las dobles ligaduras típicas de dienos conjugados (ver apéndice 2, para la explicación de la teoría implicada en los métodos de detección).

La cuantificación de dialdehído malónico se realizó con la técnica del ácido tiobarbitúrico, medida espectrofotométricamente (Buege y Aust, 1978) con algunas modificaciones al método original (Hernández-Muñoz et al, 1984). Se utilizaron 3 mg de proteína por cada muestra, diluidas en buffer C. Las muestras se incubaron a 37° C durante 30 min, después de lo cual se tomó una alcuota de 0.4 ml y se agregó a un tubo que contenía 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8%, 1.5 ml de ácido acético al 20%, pH 3.5 y 0.5 ml de agua destilada y

desionizada. Los tubos se sometieron a ebullición durante 45 min, se enfriaron y se le agregó 1 ml de KCl al 1.2% para estabilizar el color. El cromóforo se extrajo en piridina-butanol 1:15 y se leyó a 532 nm contra un blanco de reactivos.

La concentración equivalente a nmoles de dialdehído malónico se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^2/\text{nmolas}\cdot\text{cm}$, basado tanto en los valores reportados como en una curva patrón realizada con un estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

La determinación de dienos conjugados se realizó conforme a un protocolo bien establecido (Recknagel y Glende, 1984), extrayendo la fracción lipídica de las muestras en 3 ml de solución de Folch (cloroformo-metanol 2:1), evaporando bajo una corriente de nitrógeno para impedir la oxidación y resuspendiendo en ciclohexano para leer espectrofotométricamente la absorbancia a 233 nm contra un blanco de ciclohexano.

Determinación de radicales por quimioluminiscencia

La presencia de especies reactivas de oxígeno se determinó por medio de quimioluminiscencia con luminol, según métodos reportados en la literatura (Cadenas y Sies, 1984). Se usaron 100 μl de una dilución de las muestras a 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 4 ml de la mezcla de reacción (ver soluciones). La determinación se realizó en un contador de centelleo líquido, cuantificando la emisión a 450 nm. Cada muestra se leyó un promedio de 5 veces a intervalos regulares, para determinar en qué momento se alcanzaba el máximo de reacción. Los valores máximos son los que se consideran en los resultados.

Otras determinaciones

Las determinaciones de proteína se hicieron de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al, 1951) en muestras diluidas 1:400. Para determinar la significancia estadística se usó la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

Cinética de lipoperoxidación y radicales libres

Lipoperoxidación en el hígado después de hepatectomía del 70%

Encontramos que los valores basales de lipoperoxidación son afectados por los procedimientos de anestesia y cirugía aplicados a los animales, como ya ha sido reportado (Tsai et al, 1992). Los valores de dialdehído malónico en el homogenado del hígado de un animal intacto son de 2.95 nmolas de dialdehído malónico por mg proteína, mientras que los valores de un animal laparotomizado bajo anestesia de éter y sacrificado por sobredosis de pentobarbital 24 h después aumentan hasta 4.44.

Por esta razón, en cada experimento se incluyeron animales laparotomizados como control de los que eran sometidos a hepatectomía, y es en la comparación entre ambos grupos en donde se observan los cambios que nos interesan.

Los resultados de las determinaciones de dialdehído malónico se muestran en la Tabla 1, y en la Figura 1, en esta última expresados como porcentajes sobre el control. Los resultados de dienos conjugados aparecen en la Tabla 2 y la Figura 2.

En el homogenado total de los hígados provenientes de animales hepatectomizados se observa un aumento en los valores de dialdehído malónico, que se inicia a las 12 h y llega al máximo 24 h post-hepatectomía (-4 veces). A las 48 h ya no se observa ninguna diferencia con los controles.

En las determinaciones de dienos conjugados no se observan diferencias estadísticamente significativas en el homogenado, aunque se advierte una tendencia hacia el comportamiento observado en la concentración de dialdehído malónico.

Localización en fracciones subcelulares

El incremento en la lipoperoxidación se encuentra, interesantemente, distribuido heterogeneamente entre las fracciones subcelulares, estando restringido a las fracciones citosólica y de membrana plasmática.

En el citosol, existe un gran aumento en los valores de dialdehído malónico desde las 6 h post-hepatectomía, que alcanza su máximo a las 12 h con valores de hasta 25 veces los del control, a las 24 h está 5 veces por encima del control y a las 48 h la diferencia con el control se vuelve estadísticamente no significativa. También existe un aumento en los valores de dienos conjugados a las 12 y 24 h post-hepatectomía.

La fracción de membrana plasmática muestra un aumento significativo en dialdehído malónico a las 3 h post-hepatectomía, que deja de apreciarse a las 6 h. A las 12 h existe un aumento considerable (~8 veces), que se mantiene a las 24 y que nuevamente desaparece para volverse estadísticamente no significativo a las 48 h. Los valores de dienos conjugados en la fracción de membrana plasmática, sin embargo, no muestran diferencias significativas con los controles a ninguno de los tiempos observados.

La concentración máxima de dialdehído malónico encontrada en la membrana plasmática es 50% mayor que la del citosol. Sin embargo, dado que la membrana posee valores basales de lipoperoxidación más altos, el incremento con respecto al control es mayor en la fracción citosólica.

En la fracción microsomal, los valores de dialdehído malónico disminuyen de manera estadísticamente significativa a las 6 h post-hepatectomía, y a los demás tiempos no presentan cambios con respecto a los controles. Los valores de dienos conjugados muestran un aumento estadísticamente significativo a las 24 h.

La fracción mitocondrial presenta valores de lipoperoxidación notablemente constantes durante todos los tiempos determinados y no existen diferencias con respecto al grupo control, tanto en las determinaciones de dialdehído malónico como en la cuantificación de dienos conjugados.

La fracción nuclear, por el contrario, muestra una gran dispersión en los valores, y no se observan diferencias estadísticas entre los animales control y los hepatectomizados a ninguno de los tiempos.

Especies reactivas de oxígeno en el hígado después de hepatectomía del 70%

Con la técnica de quimioluminiscencia del luminol para radicales libres, se midió la concentración relativa de especies reactivas de oxígeno en las distintas muestras. Los resultados se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 3.

La concentración de especies reactivas de oxígeno no se encuentra aumentada en el hígado de los animales hepatectomizados, sino que incluso es clara una tendencia general a la disminución.

El homogenado total muestra valores significativamente menores a las 12 h.

Esta disminución parece reflejar la disminución en la fracción citosólica a las 3, 6 y 12 h post-hepatectomía.

La fracción microsomal y la fracción de membrana plasmática presentan valores de quimioluminiscencia disminuídos a las 6 h post-hepatectomía.

En las fracciones nuclear y mitocondrial no se observa ningún cambio.

En conjunto, se observa un aumento en la lipoperoxidación hepática en las primeras 48 h post-hepatectomía, a pesar de que las especies reactivas de oxígeno no se encuentran aumentadas e incluso están disminuídas en el citosol.

Lipoperoxidación en el modelo de regeneración hepática por intoxicación aguda con tetracloruro de carbono.

En animales sometidos al modelo agudo de intoxicación con tetracloruro de carbono se midió la concentración de dialdehído malónico en el homogenado total de hígado y las fracciones subcelulares a tres tiempos después del tratamiento: 24, 48 y 72 h. Los datos se muestran en la Tabla 4 y la Figura 4.

Los valores de lipoperoxidación de los controles son muy similares a los observados en el modelo de hepatectomía parcial.

En los animales tratados con CCl_4 existe un aumento en la lipoperoxidación del homogenado que aparece desde las 24 h, alcanza un máximo a las 48 (~6 veces sobre el control) y desaparece para las 72 h.

Buena parte de este aumento se encuentra localizado también en las fracciones citosólica y de membrana plasmática, aunque se observan aumentos importantes en los valores de las fracciones nuclear y microsomal.

Tanto en la fracción citosólica como en la de membrana plasmática se alcanza un aumento de aproximadamente 7 veces a las 48 h.

En la fracción microsomal hay un ligero aumento (~70%) a las 48 h.

En la fracción nuclear la lipoperoxidación alcanza valores de dialdehído malónico 5 veces superiores al control a las 48 h y sigue aumentada todavía a las 72 h.

Aunque no podemos comparar con certeza las cinéticas de lipoperoxidación en ambos modelos, es posible reconocer un patrón similar con un desfase de 24 h.

Los valores máximos de dialdehído malónico en el homogenado fueron similares en ambos modelos de regeneración (~16 nmol de dialdehído malónico por mg proteína).

En cambio, los valores máximos de lipoperoxidación en la fracción citosólica y membranal del modelo de tetracloruro de carbono fueron claramente menores a los observados en el modelo de hepatectomía.

Por el contrario, los valores de dialdehído malónico en la fracción nuclear fueron significativamente mayores en los animales tratados con CCl_4 que en los hepatectomizados, a pesar de la gran dispersión de estos últimos.

Lipoperoxidación en hepatectomías parciales de distinta magnitud

Se determinó la lipoperoxidación, por concentración de dialdehído malónico, en homogenado total y fracciones subcelulares del hígado de animales a los que se les

practicaron hepatectomías del 10, 30 y 50%. Las determinaciones se realizaron a las 24 h post-hepatectomía. Los resultados se presentan en la Tabla 5 .

Las muestras provenientes de animales con hepatectomía del 10% muestran valores de dialdehído malónico esencialmente idénticos a los de los animales control.

Los hígados de animales que fueron sometidos a hepatectomía del 30% muestran una disminución (-50%) significativa en los valores de dialdehído malónico de la fracción citosólica.

En el homogenado y la fracción citosólica de ratas con hepatectomía del 50%, los valores de dialdehído malónico se incrementan en un 100% en relación a los animales control.

No se encontraron diferencias con el control en ninguna de las demás fracciones subcelulares observadas.

En la Figura 5 se muestran los perfiles de dialdehído malónico en el homogenado, citosol y membrana plasmática de los hígados de animales sometidos a hepatectomía del 10, 30 y 50 y 70%. Es notable que los aumentos en la lipoperoxidación requieren de un umbral de más de 40% de pérdida de masa hepática para presentarse. Estos aumentos se manifiestan solamente en citosol en la hepatectomía del 50%, y en citosol y membrana plasmática en la hepatectomía del 70%.

Especificidad del fenómeno en el organismo

Se midió la concentración de dialdehído malónico en otros órganos del animal hepatectomizado, a las 24 h después de hepatectomía del 70%, con el fin de establecer si el fenómeno de lipoperoxidación aumentada era una respuesta general del organismo a la pérdida de una fracción de un órgano vital o una respuesta órgano-específica. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y Figura 6.

Los valores de lipoperoxidación basal presentan variaciones entre los distintos órganos, con el riñón y el cerebro con valores mayores, después el pulmón y el hígado, y la mucosa

gástrica con los valores más bajos. Estos resultados de lipoperoxidación diferencial por tejido coinciden con reportes en otros modelos experimentales (Dillard y Tappel, 1988).

En el homogenado de los órganos extrahepáticos observados los valores de lipoperoxidación de los animales hepatectomizados no resultaron distintos del control, excepto por un ligero aumento en el riñón, probablemente no significativo ($p \leq 0.1$).

En la fracción citosólica, se observan aumentos en lipoperoxidación debida a la hepatectomía, en el riñón y la mucosa gástrica, con un aumento del 100% en relación al control. Al tiempo de 24 h, el aumento de lipoperoxidación en el citosol del hígado es del 500%.

Tabla 1. VALORES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN FRACCIONES SUBCELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA. La lipoperoxidación fue medida como concentración de productos aldehídicos de ácidos grasos poliinsaturados. Los datos se expresan como equivalentes a nmoles de dialdehído malónico por mg de proteína.

		3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Homogenado	C	3.63 ± 0.54 (4)	3.91 ± 0.73 (4)	3.89 ± 0.64 (10)	4.44 ± 0.37 (7)	5.32 ± 0.98 (6)
	H	3.13 ± 0.59 (8)	7.33 ± 1.38 (10) •	7.73 ± 1.60 (14) •	16.47 ± 3.95 (11) •	3.53 ± 0.45 (9)
Mitocondrias	C	1.36 ± 0.22 (3)	1.13 ± 0.13 (4)	1.02 ± 0.28 (10)	1.24 ± 0.03 (3)	1.20 ± 0.02 (2)
	H	1.10 ± 0.09 (6)	0.90 ± 0.09 (7)	0.98 ± 0.15 (18)	1.20 ± 0.14 (6)	1.33 ± 0.14 (5)
Citosol	C	0.76 ± 0.09 (3)	0.73 ± 0.09 (4)	0.53 ± 0.14 (11)	1.39 ± 0.27 (6)	0.87 ± 0.37 (6)
	H	0.76 ± 0.18 (6)	1.60 ± 0.12 (5) •	12.21 ± 3.35 (18) •	7.94 ± 2.07 (13) •	2.20 ± 0.81 (9)
Microsomas	C	1.77 ± 0.26 (3)	3.91 ± 0.17 (4)	2.45 ± 0.48 (10)	2.29 ± 0.30 (3)	1.77 ± 0.10 (2)
	H	2.01 ± 0.27 (6)	2.79 ± 0.14 (6) •	2.62 ± 0.42 (15)	2.22 ± 0.35 (6)	1.79 ± 0.36 (5)
Membrana	C	2.51 ± 0.55 (5)	2.45 ± 0.45 (3)	2.40 ± 0.57 (9)	3.02 ± 0.47 (7)	2.12 ± 1.01 (5)
	H	4.79 ± 0.98 (5) ◊	2.76 ± 0.76 (9)	18.83 ± 6.94 (17) •	17.47 ± 3.61 (9) •	4.66 ± 1.78 (9)
Núcleos	C	5.45 ± 1.78 (5)	2.64 ± 0.77 (4)	3.93 ± 1.69 (11)	4.11 ± 0.59 (2)	N.D.
	H	7.31 ± 2.50 (8)	5.08 ± 1.88 (7)	11.20 ± 4.88 (18)	4.77 ± 0.97 (3)	N.D.

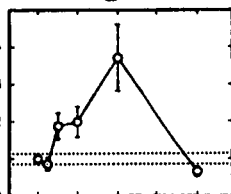
Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

◊ p ≤ 0.10, • p ≤ 0.05, ◐ p ≤ 0.01, ♣ p ≤ 0.005, ♠ p ≤ 0.001; N.D.: no determinado.

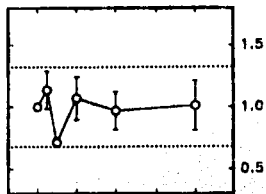
Figura 1. Cinética de la lipoperoxidación, medida por dialdehído malónico, en el homogenado total y fracciones subcelulares del hígado de animales sometidos a hepatectomía del 70%. Los datos están expresados como valores relativos al control, tomando éste como la unidad. El área punteada representa el rango de valores control a todos los tiempos observados, considerándolo como el promedio \pm desviación estándar. Nótese que las escalas varían para cada fracción.

Liperoxidación (veces sobre el control)

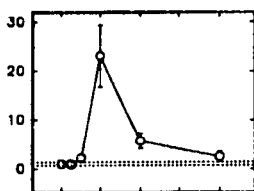
Homogenado



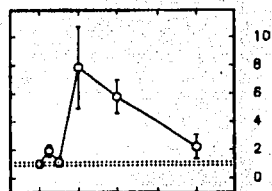
Microsomos



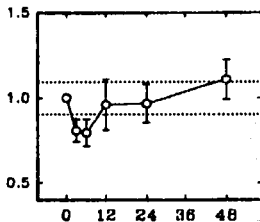
Citosol



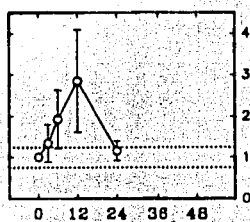
Membrana



Mitocondrias



Núcleos



tiempo post-hepatectomía (horas)

Tabla 2. VALORES DE LIPOPEROXIDACIÓN, MEDIDA POR DIENOS CONJUGADOS EN FRACCIONES SUBCELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA. Los dienos conjugados fueron medidos como densidad óptica a 233 nm de la fracción lipídica de las muestras. Los datos se expresan como unidades de densidad óptica por mg de proteína.

		3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Homogenado	C	0.325 ± 0.119 (3)	0.059 ± 0.110 (2)	0.159 (1)	0.143 ± 0.031 (3)	0.137 (1)
	H	0.163 ± 0.034 (6)	0.099 ± 0.031 (5)	0.288 ± 0.082 (4)	0.176 ± 0.038 (5)	0.164 ± 0.045 (9)
Mitocondrias	C	0.173 ± 0.007 (2)	0.079 ± 0.001 (2)	0.285 ± 0.069 (3)	0.113 ± 0.005 (2)	N.D.
	H	0.134 ± 0.020 (4)	0.078 ± 0.004 (5)	0.212 ± 0.026 (7)	0.169 ± 0.044 (4)	N.D.
Citosol	C	0.143 ± 0.011 (2)	0.032 ± 0.008 (2)	0.078 ± 0.018 (4)	0.085 ± 0.019 (3)	0.058 ± 0.006 (2)
	H	0.144 ± 0.017 (4)	0.047 ± 0.003 (4)	0.210 ± 0.026 (8) •	0.180 ± 0.029 (5) •	0.087 ± 0.018 (5)
Microsomas	C	0.264 ± 0.039 (2)	0.191 ± 0.037 (2)	0.308 ± 0.069 (4)	0.229 ± 0.012 (4)	0.226 ± 0.004 (2)
	H	0.310 ± 0.017 (4)	0.129 ± 0.015 (5)	0.508 ± 0.115 (5)	0.352 ± 0.040 (5) •	0.214 ± 0.030 (5)
Membrana	C	0.448 ± 0.012 (2)	0.447 ± 0.083 (2)	0.096 ± 0.031 (3)	0.137 ± 0.046 (3)	0.132 (1)
	H	0.429 ± 0.090 (3)	0.314 ± 0.023 (4)	0.142 ± 0.030 (8)	0.667 ± 0.305 (3)	0.213 ± 0.019 (5)
Núcleos	C	0.149 ± 0.005 (2)	0.298 ± 0.182 (2)	0.213 ± 0.035 (4)	0.660 ± 0.382 (2)	N.D.
	H	0.178 ± 0.024 (2)	0.221 ± 0.051 (4)	0.229 ± 0.082 (5)	0.181 ± 0.059 (3)	N.D.

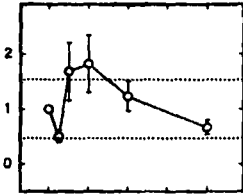
Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

• p ≤ 0.05. N.D.: no determinado.

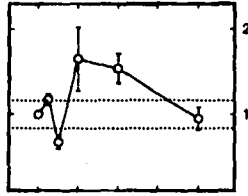
Figura 2. Cinética de la lipoperoxidación, medida por dienos conjugados, en el homogenado total y fracciones subcelulares del hígado de animales sometidos a hepatectomía del 70%. Los datos están expresados como valores relativos al control, tomando éste como la unidad. El área punteada representa el rango de valores control a todos los tiempos observados, considerándolo como el promedio \pm desviación estándar. Nótese que las escalas varían para cada fracción.

Dienos conjugados (veces sobre el control)

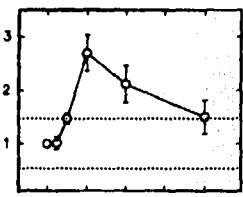
Homogenado



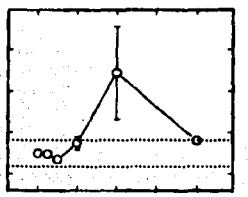
Microsomos



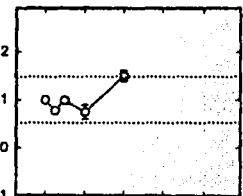
Citosol



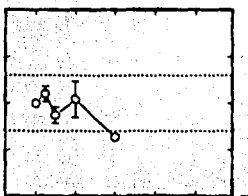
Membrana



Mitocondrias



Núcleos



tiempo post-hepatectomía (horas)

Tabla 3. VALORES DE RADICALES ENDÓGENOS EN FRACCIONES SUBCELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA. Los radicales fueron medidos por quimioluminiscencia con luminol. Los datos se expresan como cpm/ 10⁶.

		3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
Homogenado	C	1.33 ± 0.35 (3)	1.72 ± 0.23 (2)	0.93 ± 0.06 (2)	1.97 ± 0.59 (3)
	H	1.30 ± 0.28 (6)	1.37 ± 0.25 (5)	0.54 ± 0.13 (4) ◊	2.98 ± 0.39 (5)
Mitocondrias	C	0.52 ± 0.11 (2)	0.46 ± 0.00 (2)	0.61 ± 0.05 (2)	0.63 ± 0.00 (2)
	H	0.55 ± 0.04 (4)	0.46 ± 0.02 (5)	0.58 ± 0.03 (5)	0.56 ± 0.04 (4)
Citosol	C	1.27 ± 0.15 (2)	0.89 ± 0.02 (2)	1.38 ± 0.12 (3)	1.48 ± 0.33 (3)
	H	0.88 ± 0.10 (4) ◊	0.50 ± 0.05 (4) ♣	0.71 ± 0.07 (6) ♣	1.19 ± 0.07 (5)
Microsomos	C	0.69 ± 0.04 (2)	0.99 ± 0.05 (2)	0.69 ± 0.02 (2)	1.45 ± 0.51 (2)
	H	0.69 ± 0.05 (4)	0.68 ± 0.03 (5) ♣	0.63 ± 0.05 (4)	1.22 ± 0.19 (4)
Membrana	C	0.54 ± 0.11 (2)	1.13 ± 0.03 (2)	0.83 ± 0.02 (3)	0.87 ± 0.13 (3)
	H	0.49 ± 0.02 (3)	0.95 ± 0.07 (4) ◊	0.56 ± 0.14 (5)	0.79 ± 0.14 (4)
Núcleos	C	0.39 ± 0.04 (2)	0.36 ± 0.02 (2)	0.44 ± 0.00 (2)	0.63 ± 0.01 (2)
	H	0.68 ± 0.19 (3)	0.44 ± 0.01 (4) •	0.46 ± 0.04 (4)	0.59 ± 0.07 (3)

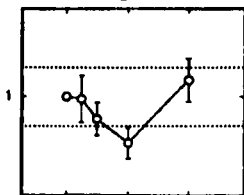
Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

◊ p ≤ 0.10, • p ≤ 0.05, ♣ p ≤ 0.005.

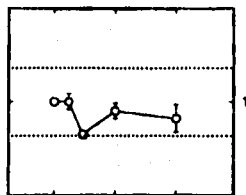
Figura 3. Cinética de los valores de radicales libres medidos por quimioluminiscencia, en el homogenado total y fracciones subcelulares del hígado de animales sometidos a hepatectomía del 70%. Los datos están expresados como valores relativos al control, tomando éste como la unidad. El área punteada representa el rango de valores control a todos los tiempos observados, considerándolo como el promedio \pm desviación estándar. Nótese que las escalas varían para cada fracción.

Quimioluminiscencia (veces sobre el control)

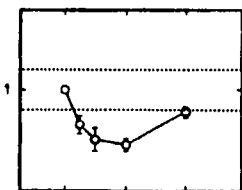
Homogenado



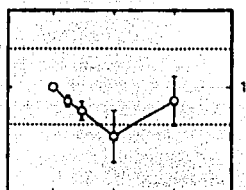
Microsomas



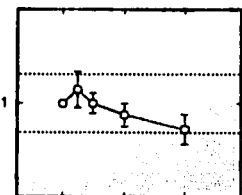
Citosol



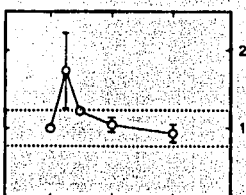
Membrana



Mitocondrias



Núcleos



tiempo post-hepatectomía (horas)

Tabla 4. VALORES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN FRACCIONES SUBCELULARES DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA SUBSECUENTE A INTOXICACIÓN AGUDA CON CCl₄. La lipoperoxidación fue medida como concentración de productos aldehídicos de ácidos grasos poliinsaturados. Los datos se expresan como equivalentes a amoles de dialdehído malónico por mg de proteína. C= control, T= tratada con CCl₄

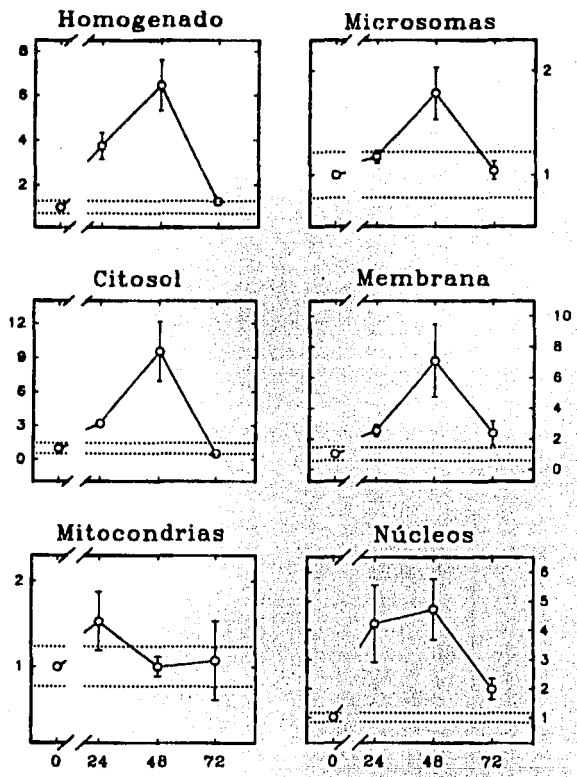
		24 horas	48 horas	72 horas
Homogenado	C	2.68 ± 0.54 (4)	2.59 ± 0.25 (2)	4.59 ± 0.42 (2)
	T	10.06 ± 1.58 (6) ♣	16.79 ± 2.93 (5) ♣	5.93 ± 0.56 (3)
Mitocondrias	C	1.11 ± 0.26 (4)	2.00 ± 0.25 (2)	1.55 ± 0.49 (2)
	T	1.70 ± 0.38 (6)	2.01 ± 0.23 (5)	1.67 ± 0.72 (5)
Citosol	C	1.15 ± 0.29 (4)	0.75 ± 0.48 (2)	2.24 ± 1.44 (2)
	T	3.69 ± 0.72 (5) •	7.17 ± 1.96 (5) •	1.32 ± 0.38 (5)
Microsomas	C	2.86 ± 0.85 (4)	2.16 ± 0.36 (2)	3.74 ± 1.72 (2)
	T	3.36 ± 0.16 (6)	3.85 ± 0.54 (5) •	3.92 ± 0.32 (5)
Membrana	C	2.34 ± 0.30 (4)	0.77 ± 0.13 (2)	1.36 ± 0.74 (2)
	T	5.90 ± 0.79 (4) •	5.46 ± 1.82 (5) •	3.26 ± 1.07 (5)
Núcleos	C	2.32 ± 0.28 (4)	1.76 ± 0.19 (2)	2.62 ± 0.04 (2)
	T	9.81 ± 3.047 (5) •	8.30 ± 1.82 (5) •	5.25 ± 0.94 (5) •

Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

◇ p ≤ 0.10, • p ≤ 0.05, ♣ p ≤ 0.01, ♠ p ≤ 0.005, ▲ p ≤ 0.001.

Figura 4. Cinética de la lipoperoxidación, medida por dialdehído malónico, en el homogenado total y fracciones subcelulares del hígado de animales sometidos a intoxicación aguda con tetracloruro de carbono. Los datos están expresados como valores relativos al control, tomando éste como la unidad. El área punteada representa el rango de valores control a todos los tiempos observados, considerándolo como el promedio \pm desviación estándar. Nótese que las escalas varían para cada fracción.

Liperoxidación (veces sobre el control)



tiempo después del tratamiento (horas)

Tabla 5. VALORES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN FRACCIONES SUBCELULARES HEPÁTICAS A 24 HORAS DESPUES DE HEPATECTOMÍAS DE DISTINTAS MAGNITUDES. La lipoperoxidación fué medida como concentración de productos aldehídicos de ácidos grasos poliinsaturados. Los datos se expresan como equivalentes a nanomoles de dialdehído malónico por mg de proteína. C= control, H= hepatectomizada

	controles	10%	30%	50%	70%
Homogenado	4.82 ± 0.33 (4)	3.75 ± 0.92 (4)	5.43 ± 0.22 (4)	10.06 ± 1.79 (6) •	16.47 ± 3.95 (11) •
Mitocondrias	3.72 ± 0.77 (4)	4.13 ± 0.91 (5)	2.95 ± 0.79 (5)	2.14 ± 0.78 (6)	2.52 ± 0.93 (5)
Citosol	1.38 ± 0.27 (4)	0.77 ± 0.20 (5)	0.66 ± 0.12 (5) •	2.92 ± 0.68 (6) ◊	5.84 ± 1.25 (13) •
Microsomas	6.73 ± 0.47 (4)	5.51 ± 0.90 (5)	6.36 ± 1.10 (5)	5.43 ± 1.00 (6)	6.10 ± 1.52 (5)
Membrana	3.03 ± 0.57 (4)	2.95 ± 0.51 (5)	2.57 ± 0.54 (5)	2.67 ± 0.90 (6)	17.47 ± 3.61 (9) •
Núcleos	3.52 ± 1.21 (4)	3.35 ± 1.18 (5)	2.41 ± 0.64 (5)	4.54 ± 1.20 (6)	4.77 ± 0.97 (3)

Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

◊ p ≤ 0.10, • p ≤ 0.05, ♦ p ≤ 0.01, ♣ p ≤ 0.005.

Figura 5. Cinética de la hiperoxidación, medida por dialdehído malónico, en el homogenado total, citosol y membrana plasmática del hígado de animales sometidos a hepatectomías del 10, 30, 50 y 70%. Las barras oscuras representan los valores del grupo de animales control, sometidos a todas las manipulaciones quirúrgicas y anestésicas excepto la remoción de masa hepática. Los datos están expresados como valores relativos al control, tomando éste como la unidad.

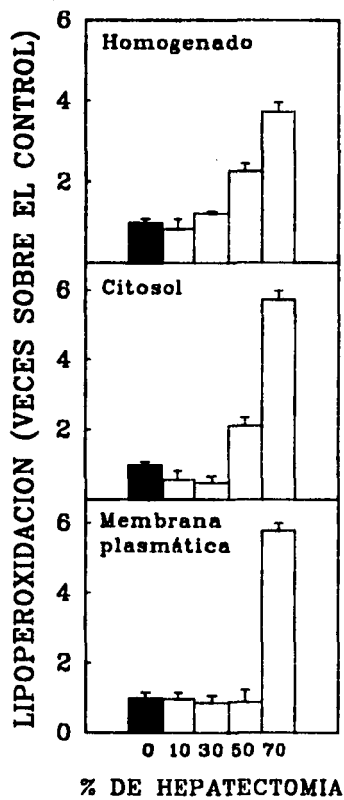


Tabla 6 . VALORES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN HOMOGENADO Y CITOSOL DE DISTINTOS ÓRGANOS 24 HORAS DESPUES DE HEPATECTOMÍA DEL 70%. La lipoperoxidación fué medida como concentración de productos aldehídicos de ácidos grasos poliinsaturados. Los datos se expresan como equivalentes a nmoles de dialdehído malónico por mg de proteína. C= control, H= hepatectomizada

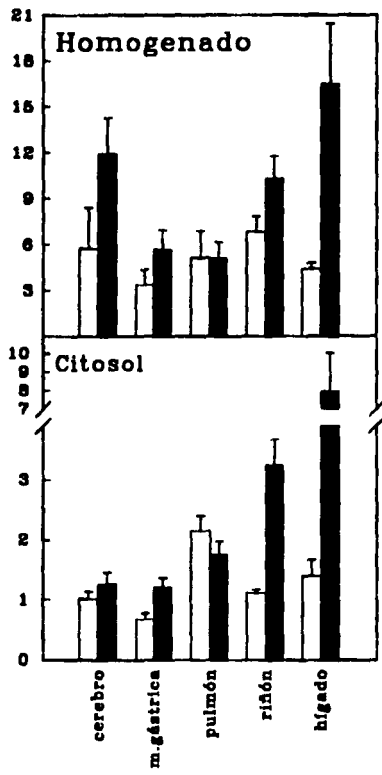
		homogenado	citosol
cerebro	C	5.76 ± 2.63 (5)	1.01 ± 0.12 (5)
	H	11.94 ± 2.33 (8)	1.26 ± 0.19 (8)
mucosa gástrica	C	3.38 ± 1.00 (5)	0.68 ± 0.10 (5)
	H	5.68 ± 1.26 (8)	1.21 ± 0.15 (7) •
pulmón	C	5.13 ± 1.75 (5)	2.15 ± 0.25 (5)
	H	5.11 ± 1.03 (8)	1.75 ± 0.22 (8)
riñón	C	6.82 ± 1.01 (5)	1.11 ± 0.05 (5)
	H	10.30 ± 1.45 (8) ◊	3.24 ± 0.42 (8) •
hígado	C	4.44 ± 0.37 (7)	1.39 ± 0.27 (8)
	H	16.47 ± 3.95 (11)•	5.84 ± 1.25 (13) •

Significancia estadística por prueba de "t" de Student, entre controles y hepatectomizadas:

◊ p ≤ 0.10, • p ≤ 0.05, ♦ p ≤ 0.01, ▲ p ≤ 0.001.

Figura 6. Cinética de la lipoperoxidación, medida por dialdehído malónico, en el homogenado total y fracción citosólica de varios órganos de los animales sometidos a hepatectomía del 70%. Los datos están expresados como nmolas de dialdehído malónico por mg de proteína. Las barras claras representan los valores del grupo de animales control.

Lipoperoxidación (nmolas de DAM/mg proteína)



DISCUSIÓN

Hemos encontrado que existe una lipoperoxidación aumentada durante la regeneración hepática, un fenómeno biológico en el que el órgano no sólo no está dañado, sino que se mantiene funcional y proliferativo. Estos resultados apuntan hacia la disociación de los fenómenos de lipoperoxidación y daño celular o tisular, que también se ha reconocido ya en modelos toxicológicos (Younes, 1988).

Los cambios en lipoperoxidación observados en el hígado después de hepatectomía parcial se inician desde las 3 h post-hepatectomía y alcanzan valores máximos entre las 12 y 24 h, desapareciendo para las 48 h. Estas primeras 24 h coinciden con el periodo de la primera y más dramática ronda de proliferación en el hígado (Bucher y Swaffield, 1964).

En el modelo de regeneración hepática compensatoria a hepatotoxicidad con tetracloruro de carbono existe un retraso en la cinética de lipoperoxidación con respecto al modelo de hepatectomía parcial. Dado que en el modelo de tetracloruro de carbono el máximo de síntesis de DNA se presenta entre las 36 y las 42 h (Alison, 1986), de nuevo se observa un aumento en lipoperoxidación al tiempo en el que ocurre la síntesis de DNA.

Esta coincidencia temporal quizá sugiere que ambos fenómenos pueden estar relacionados.

Si bien los datos de lipoperoxidación medida por dienos conjugados no muestran incrementos tan dramáticos como en las mediciones de dialdehído malónico, es indudable que apoyan la observación de que existe un incremento en la lipoperoxidación debido a la hepatectomía. Dada la diferencia entre los protocolos de ambas determinaciones, (las incubaciones a distintas temperaturas en la determinación de dialdehído malónico, por ejemplo, que no se realizan para medir dienos conjugados), es posible que los datos de cada protocolo nos estén dando información acerca de distintos niveles del fenómeno. Los datos de dienos conjugados quizá están reflejando el nivel de lipoperoxidación presente *in*

vivo, mientras que los valores de dialdehído malónico pueden reflejar además un componente de aldehídos y peróxidos lipídicos generados *in vitro* (Götz et al, 1993). De este modo, podemos postular que existe una lipoperoxidación aumentada en el hígado regenerante, y que además sus lípidos son más susceptibles a la peroxidación *in vitro*, lo que amplifica las diferencias con los animales control.

La lipoperoxidación se comporta de manera independiente entre las distintas fracciones subcelulares. El aumento que se observa en el homogenado se encuentra restringido a las fracciones de citosol y membrana plasmática, tanto en los animales sometidos a hepatectomía parcial como a intoxicación con CCl_4 . La fracción mitocondrial no experimenta diferencias con los controles en ninguno de los tiempos de los dos modelos de regeneración. Los núcleos, en cambio, muestran una tendencia al aumento en el modelo de hepatectomía, que se vuelve una diferencia clara en el modelo de tetracloruro de carbono.

La fracción microsomal presenta una lipoperoxidación aumentada en el modelo de CCl_4 , quizá adjudicable a efectos tardíos del metabolismo del tóxico en el retículo endoplásmico, (ver apéndice 2). Aunque se ha reconocido que la acción lipoperoxidativa de una dosis de CCl_4 llega a un máximo a los 15 min de su administración y vuelve a los niveles normales a los 30 min (Hernández-Muñoz et al, 1984), datos preliminares de quimioluminiscencia en este modelo muestran un claro aumento en el homogenado a las 24 h, adjudicable en buena parte a la fracción microsomal.

En el modelo de hepatectomía no se observa aumento en los valores de dialdehído malónico de microsomas, e incluso existe una disminución a las 6 h. Es posible suponer que el aumento en lipoperoxidación microsomal sea adjudicable a características específicas del modelo de CCl_4 .

En los experimentos de hepatectomías de distinta magnitud encontramos que la lipoperoxidación aumentada no se relaciona linealmente con la cantidad de tejido removido, como ocurre con otros parámetros, tales como la concentración plasmática de insulina, glucagon y tiroxina (Leffert et al, 1975). Más bien parece existir un umbral alrededor del 40% de hepatectomía para que el aumento se manifieste. Este umbral de pérdida de masa hepática coincide con el necesario para desencadenar una respuesta proliferativa energética y sincronizada (Bucher y Swaffield, 1964). Esta coincidencia permite, de nuevo, postular una relación entre los dos fenómenos.

En las mediciones de lipoperoxidación en distintos órganos encontramos que el aumento debido a hepatectomía se manifiesta primordialmente en hígado, y está ausente por completo de cerebro y pulmón, aunque aparecen ligeros cambios en el riñón y la mucosa gástrica.

Se sabe que la hepatectomía parcial desencadena la producción de factores hormonales que han sido implicados en el proceso de regeneración hepática (ver apéndice 2). Sin embargo, estos factores muestran propiedades mitogénicas sobre muchos tipos celulares además de los hepatocitos (Michalopoulos y Zarnegar, 1992) y su presencia en el torrente sanguíneo es capaz de desencadenar respuestas en otros órganos del animal. Por ejemplo, en el riñón de animales hepatectomizados aumenta la expresión de c-Ha-ras y c-myc, seguida por un ligero incremento en la síntesis de DNA (Roesel et al, 1989). También ocurre síntesis de DNA post-hepatectomía en la porción exócrina del páncreas (Rao y Subbarao, 1986).

Es posible identificar una similitud entre la localización en el organismo del fenómeno de lipoperoxidación aumentada y la especificidad de los efectos proliferativos debidos a la hepatectomía parcial. Los cambios mayores ocurren en el hígado, y además se observan aumentos en el riñón, que se sabe responde *in vivo* al estímulo mitogénico de la hepatectomía, y en la mucosa gástrica, cuyas células han demostrado ser estimuladas *in*

in vitro por el HGF (Takahashi et al, 1993). Sin embargo, no se ha encontrado que las células de pulmón o las células nerviosas respondan al estímulo mitogénico del HGF (Rubin et al, 1993) a pesar de que en estos tejidos existe el receptor apropiado (Michalopoulos y Zarnegar, 1992).

Es notable que a pesar de que existe un claro aumento en la lipoperoxidación del hígado, los valores de especies reactivas de oxígeno no reflejan un aumento y sí incluso una disminución. Esto quizá puede interpretarse como evidencia de que existen controles muy eficientes en el hígado en regeneración que impiden la persistencia de moléculas potencialmente tóxicas. La lipoperoxidación observada podría representar el nivel máximo que la célula permite sin ponerse en peligro.

Como la técnica del luminol no permite identificar la especie de oxígeno implicada, es incluso posible que la lipoperoxidación esté siendo causada por una molécula particular, que por alguna razón se encuentra aumentada en el hígado regenerante, aunque el contenido total de especies reactivas de oxígeno sea menor que en el hígado normal. La actividad total de SOD no cambia durante la regeneración hepática (Ueda et al, 1983; Cockerill et al, 1983; Vartanian et al, 1992), pero la catalasa está disminuida (Ueda et al, 1983; Cockerill et al, 1983) y el GSH aumenta, aunque las glutatión S-transferasas permanecen inalteradas y la actividad de glutatión peroxidasa no cambia (Cockerill et al, 1983) o disminuye (Ueda et al, 1983). Es posible, entonces, que el comportamiento de las moléculas antioxidantes durante la regeneración influya de manera diferencial sobre las concentraciones de las distintas especies reactivas de oxígeno.

Sin embargo, también es posible que la disminución observada se deba a factores metodológicos. Quizá las especies reactivas de oxígeno responsables de la lipoperoxidación no se manifiestan en la quimioluminiscencia del luminol, debido a la presencia en las muestras de alguna molécula que impida, por ejemplo, la formación de

aminofalato. Otra posibilidad es que exista un aumento que no registramos, debido a que ocurre en algún punto intermedio entre los tiempos observados.

Nuestros resultados de lipoperoxidación en homogenado total del hígado regenerante están de acuerdo con reportes previos (Ueda et al , 1983; Lambotte et al, 1989; Obata, 1992), con los que coincidimos en encontrar el máximo en los valores de dialdehído malónico alrededor de las 24 h post-hepatectomía.

Este aumento del dialdehído malónico en homogenado de hígado regenerante ha sido observado incluso por los grupos que proponen que la lipoperoxidación debe estar disminuída en el hígado regenerante, ya que se trata de un tejido proliferativo. El primer trabajo en el que se propone esta hipótesis (Wolfson et al, 1956) reporta una disminución en la lipoperoxidación del homogenado hepático a las 48 h post-hepatectomía, que usa para justificar su teoría, aunque también muestra un aumento significativo en los valores de dialdehído malónico a las 10 h. Nosotros observamos una tendencia hacia la disminución en los valores del homogenado a 48 h, pero que ni siquiera es comparable con el aumento presente durante las primeras 24 h.

Las mediciones de lipoperoxidación en microsomas también son congruentes con los hallazgos de otros grupos (Cockerill et al, 1983; Chessemán et al, 1986; Slater et al, 1990), que han observado que la lipoperoxidación microsomal no aumenta debido a la hepatectomía e incluso disminuye. Se ha reportado que existe una menor producción de radical superóxido (Vartanian et al, 1992), probablemente debido a que las actividades de NADPH-citocromo *c* reductasa y citocromo P450 disminuyen (Cockerill et al, 1983; Slater et al, 1990). También se ha reportado que existe un aumento en la cantidad de tocoferol en los microsomas (Ueda et al, 1983; Chessemán et al, 1986; Slater et al, 1990). Este incremento en tocoferol quizá pueda explicar el hecho de que se observen valores disminuídos de dialdehído malónico en microsomas en el modelo de hepatectomía parcial,

aunque los datos de dienos conjugados muestren una tendencia al aumento. Quizá el tocoferol aumentado actúa sobre la propagación del fenómeno lipoperoxidativo, impidiendo la degradación de los dienos conjugados que se han alcanzado a formar. En el modelo de tetracloruro de carbono la acción peroxidativa del tóxico podría estar sobrepasando la capacidad antioxidante del tocoferol, permitiendo la formación de dialdehído malónico.

La fuente de las especies reactivas de oxígeno responsables de la lipoperoxidación observada, es incierta. El retículo endoplásmico quizá puede ser descartado por los numerosas observaciones que le adjudican una producción disminuida de especies reactivas de oxígeno.

Hay reportes de aumentos en la actividad mitocondrial, tanto en la actividad fosforilativa como en el potencial de membrana, a las 24 h post-hepatectomía (Yamaoka et al, 1974; Nishihira et al, 1986; Tsai et al, 1992). Este metabolismo aeróbico aumentado podría ser responsable de una mayor generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, se ha reportado que la producción de radical superóxido en mitocondrias de hígado en regeneración está disminuida (Vartanian et al, 1992) y que las actividades de las SOD mitocondriales están aumentadas (Tsai et al, 1992).

Por otro lado, la cinética de lipoperoxidación en distintas fracciones subcelulares parece sugerir que el aumento se inicia en la membrana plasmática. Datos histológicos del laboratorio han mostrado que el infiltrado de células inflamatorias en el hígado de animales hepatectomizados es ligeramente mayor que el de los animales control (Gutiérrez-Salinas et al, 1994), por lo que es posible que la lipoperoxidación aumentada se produzca por especies reactivas de oxígeno generadas en el proceso inflamatorio. Sin embargo, esta posibilidad se debilita por la ausencia de lipoperoxidación membranal a las 24 h en

hepatectomías del 10, 30 y 50%, las cuales seguramente constituyen un estímulo inflamatorio comparable.

El flujo sanguíneo aumentado como consecuencia de la resección quirúrgica, produce la entrada de una concentración mayor de oxígeno por hepatocito (Yamaoka et al, 1974). Esta tensión de oxígeno aumentada también podría estar relacionada con la lipoperoxidación de la membrana plasmática. ¿Y si esta fuera la fuente se antoja pensar que podría ser una buena manera de explicar el umbral.

Además, las especies reactivas de oxígeno pueden ser producidas por las NADPH oxidasas de membrana. Se han reportado formas del citocromo P450 en la membrana plasmática de los hepatocitos de rata (Defeng y Cederbaum, 1992; Robin et al, 1994). Una en particular, la P450III_{E1}, parece no estar tan bien acoplada como otras isozimas y tiene una elevada actividad de NADPH oxidasa, consume mucho oxígeno y produce superóxido y peróxido de hidrógeno (Defeng y Cederbaum, 1992). Tal vez esta enzima pudiera activarse durante la regeneración y ser la responsable de la lipoperoxidación aumentada.

En la secuencia temporal existe un aumento inicial de dialdehído malónico en la membrana plasmática, que desaparece rápidamente y precede al del citosol. En las hepatectomías de magnitud creciente aparece primero el aumento en citosol. Esto podría indicar que los productos de lipoperoxidación de los fosfolípidos de membrana son removidos y liberados hacia el citosol, donde se acumulan, y sólo se manifiestan localizados en la membrana cuando el mecanismo de remoción se sobrepasa. La fosfolipasa A₂ puede catalizar la remoción de ácidos grasos peroxidados hacia el citosol (Van Kuijk et al, 1987), por lo que quizá tenga relevancia en el fenómeno.

Los parámetros de fluidez de la membrana plasmática del hígado regenerante a las 24 h no pueden explicarse por la relación colesterol/fosfolípidos existente a ese tiempo, por lo que se ha propuesto que deben existir otros componentes membranales que estén actuando

para rigidizar la membrana (Bruscalupi et al, 1980). La lipoperoxidación aumentada que hemos encontrado podría ser la responsable de este efecto.

Ya durante la elaboración de este manuscrito, tuvimos acceso a un reporte en donde se establece que existen influencias circadianas sobre la regeneración hepática (Barbason, 1976). Específicamente, que las cinéticas de regeneración son distintas si las hepatectomías se realizan en la noche o en la mañana. Este hallazgo influye directamente sobre nuestros resultados en el punto de 12 h, en el cual los animales fueron operados en la noche y sacrificados a la mañana siguiente.

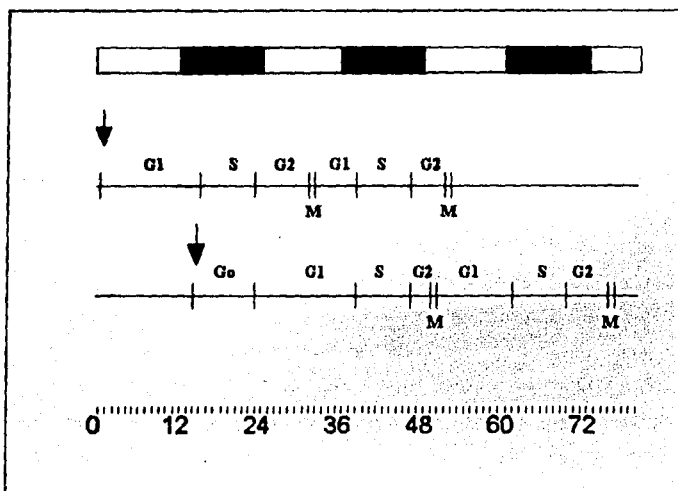
Barbason muestra que la síntesis de DNA ocurre a la medianoche en los hepatocitos, lo que tiene como resultado que en las ratas operadas en la noche exista una extensión de la fase pre-replicativa, con el máximo de síntesis de DNA ocurriendo a las 36 h post-hepatectomía en lugar de a las 24.

De este modo, nuestros resultados de 12 h se refieren a un punto de la secuencia de proliferación que no es directamente comparable con los otros tiempos. Sin embargo, aunque esta situación afecta un punto interesante de la cinética, no descalifica el patrón general del aumento en lipoperoxidación descrito.

La comparación entre las cinéticas de proliferación hepática entre ratas hepatectomizadas en la mañana y en la noche se resume en el cuadro 6. Los ciclos de luz-oscuridad se muestran en la barra superior. El tiempo post-hepatectomía está señalado en la escala inferior.

A pesar de que nuestros animales no fueron mantenidos en las condiciones estrictas de luz-oscuridad que utiliza Barbason para sus hallazgos, es posible que en lo general reflejen el mismo comportamiento. Además, no encontramos influencias circadianas en la lipoperoxidación basal de los animales (los valores de los controles de 12 h son esencialmente idénticos a los de los demás tiempos), lo que nos permite suponer que las

diferencias encontradas en lipoperoxidación sólo pueden ser atribuidas a la hepatectomía, la regeneración hepática o ambas. Consideraremos estas premisas para la discusión siguiente.



Cuadro 6. Influencias circadianas sobre la regeneración hepática.

En el punto de 12 h utilizado, entonces, el hígado ha permanecido en G_0 y se encuentra en la etapa G_1 temprana al tiempo que tomamos la muestra. En cuanto a etapa del ciclo celular, los resultados de 12 h serían más o menos equivalentes a los de 3 h. Si comparamos ambos grupos en relación a los resultados de dialdehído malónico, es claro que existen diferencias importantes entre ambos grupos; aunque a las 3 h existe un aumento significativo en la lipoperoxidación de la membrana plasmática, las demás fracciones mantienen valores similares a los controles, mientras que en el grupo de 12 h, se

manifiesta un aumento desde el homogenado, y las fracciones de membrana plasmática y citosol alcanzan valores máximos con respecto a los controles.

Esta falta de identidad entre muestras tomadas en puntos aproximadamente equivalentes del ciclo celular podría estar indicando que la lipoperoxidación hepática se ve influida por la permanencia en G₀ que ocurre cuando la hepatectomía se realiza en la noche. Quizá los valores aumentados de dialdehído malónico en el punto de 12 h podrían estar indicando que la lipoperoxidación es el producto del metabolismo aumentado del hígado, o es una señal necesaria pero no suficiente para desencadenar la regeneración, y que en cualquiera de los casos se acumula debido al tiempo que las células pasan en G₀.

Algunos de los grupos que han observado el aumento de lipoperoxidación durante la regeneración hepática han tratado de dilucidar mediante manipulaciones farmacológicas si existe una relación entre ambos fenómenos. Con esta estrategia, se han administrado antioxidantes a los animales, encontrando que inhibir la lipoperoxidación mejora las capacidades proliferativas (Ohata, 1992). Sin embargo, debido a razones metodológicas, estos resultados no resultan confiables, ya que las condiciones de administración del antioxidante (1 h antes de la hepatectomía) no son adecuadas para su correcta incorporación a membranas.

En otro estudio con miras a dilucidar la relación entre lipoperoxidación y regeneración hepática, se observó que la administración de SOD inhibe la regeneración, aunque no altera los valores de dialdehído malónico del homogenado, mientras que la indometacina disminuye los valores de ambos parámetros, lo que sugiere una relación entre los fenómenos, aunque la lipoperoxidación parece no ser suficiente para desencadenar la regeneración (Lambotte et al, 1989). Los autores proponen que el nivel al que pueden estar actuando la SOD y la indometacina es en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, ya que la ciclooxigenasa se activa por radicales libres e hidropéroxidos y

se inhibe con indometacina. Este trabajo resulta interesante porque plantea a la lipoperoxidación como un factor causal en el proceso regenerativo.

Nuestros resultados muestran también evidencia de que el aumento en la lipoperoxidación en citosol y membrana plasmática puede estar relacionado con el fenómeno de regeneración hepática. Considerando la probada función de las especies reactivas de oxígeno como mensajeros celulares, y la lógica evolutiva de este papel, nuestro punto de vista también se inclina a considerarlas una señal en el proceso de regeneración hepática. La señal por especies reactivas de oxígeno podría estar actuando en este caso a través de lipoperoxidación en la membrana plasmática y citosol, aunque tal vez también a otros niveles, como activación de factores transcripcionales, por ejemplo.

Encontrar una relación entre la lipoperoxidación y la regeneración hepática permite también, sin embargo, que la lipoperoxidación sea la consecuencia y no la causa. En este caso, podría estar relacionada con fenómenos como la disociación celular y la reformación de estructuras. Se han reportado cambios en las uniones intercelulares ("gap junctions")(Traub et al, 1983), que podrían facilitarse con la lipoperoxidación de la membrana plasmática.

La lipoperoxidación aumentada en los núcleos, notoria en el modelo de tetracloruro de carbono, resulta un hallazgo interesante, que podría tener relevancia con respecto al papel de las especies reactivas de oxígeno como moduladoras de la expresión genética, y eventualmente, como potencialmente cancerígenas (Cerutti, 1985).

Se ha descubierto muy recientemente que el proceso de regeneración hepática tiene dos etapas, una de iniciación (o "priming") y otra de progresión. En la de iniciación se desencadenan fenómenos que vuelven a los hepatocitos susceptibles al estímulo mitogénico de los factores séricos (Webber et al, 1994). La señal de iniciación se desencadena en el hígado incluso con sólo 3 h del estímulo de hepatectomía del 70%. Esto

ha permitido diseñar un modelo experimental en el que puede inducirse la iniciación quirúrgicamente, e interrumpir la señal 3 horas después para detener el proceso antes de que se inicie la progresión (modelo de hepatectomía parcial temporal, Lambotte y Tagliaferri, 1993), lo que permite disociar limpiamente ambas fases, y de este modo diseccionar con cuál de ellas se relaciona un evento particular.

Podría ser revelador analizar el aumento en lipoperoxidación con el modelo de hepatectomía parcial temporal, para establecer si su participación ocurre en la fase de iniciación o de progresión de la regeneración hepática. Se ha sugerido que el fenómeno de iniciación de los hepatocitos puede ser similar a la activación de genes observada en respuesta a estímulos como choque térmico ("heat-shock"), desequilibrios iónicos y cambios en potenciales redox (Fausto y Webber, 1993). Nuestra hipótesis de que existe una señal por especies reactivas de oxígeno en la regeneración hepática se relaciona bien con esta idea.

CONCLUSIONES

Existe una lipoperoxidación aumentada durante la regeneración hepática inducida por dos estímulos distintos: hepatectomía parcial e intoxicación con tetracloruro de carbono. En ambos modelos de regeneración existe una coincidencia temporal entre los tiempos de lipoperoxidación máxima y las etapas de síntesis de DNA de los hepatocitos.

Los niveles de lipoperoxidación se comportan de manera completamente independiente en las distintas fracciones subcelulares. El aumento se manifiesta primordialmente en las fracciones de citosol y membrana plasmática.

Los datos de lipoperoxidación disminuída en los microsomas, y quizá también los de quimioluminiscencia, apoyan la idea de que en el hígado en regeneración se activan mecanismos de control para evitar el daño por especies reactivas de oxígeno.

El aumento en la lipoperoxidación hepática no se debe al daño quirúrgico ni está linealmente relacionado con la pérdida de tejido.

Los cambios lipoperoxidativos debidos a hepatectomía parcial sólo se manifiestan de manera dramática en el hígado de los animales, aunque existen modestos aumentos en la lipoperoxidación del riñón y la mucosa gástrica. Hay evidencias reportadas de que estos tejidos pueden responder a estímulos proliferativos desencadenados por la hepatectomía parcial.

El aumento en la lipoperoxidación hepática sólo se manifiesta en hepatectomías de más del 40% de masa hepática. Este umbral de pérdida de tejido es el que se requiere también para que la respuesta proliferativa del hígado sea dramática y sincronizada (Bucher y Swaffield, 1964)

La coincidencia temporal, la especificidad en el organismo y la necesidad del mismo umbral de pérdida de tejido para la lipoperoxidación aumentada y la regeneración hepática clásica sugieren que ambos fenómenos pueden estar relacionados.

PERSPECTIVAS

Medir la lipoperoxidación con métodos no invasivos en el animal hepatectomizado íntegro para corroborar su existencia *in vivo*.

Identificar el origen celular y la especie reactiva responsable de la lipoperoxidación aumentada.

Realizar manipulaciones farmacológicas de la lipoperoxidación y de la regeneración hepática, para establecer si existe una relación causal entre ambos fenómenos, tanto en el modelo de hepatectomía del 70% como en el de intoxicación aguda con tetracloruro de carbono.

Caracterizar la relación de la lipoperoxidación aumentada con las dos etapas identificadas en la regeneración hepática (iniciación o "priming" y progresión) mediante el uso del modelo de hepatectomía parcial temporal.

Caracterizar más ampliamente la lipoperoxidación hepática con respecto a las etapas del ciclo celular, utilizando la influencia del ritmo circadiano en la regeneración, y establecer el modo en el que la permanencia en G₀ ejerce efecto sobre la lipoperoxidación.

Definir si los aumentos en la lipoperoxidación membranal son responsables de las alteraciones reportadas en la fluidez de la bicapa lipídica, las actividades de proteínas transmembranales y la disociación intercelular durante la regeneración hepática.

Identificar si el aumento de lipoperoxidación en órganos extrahepáticos se relaciona con los efectos mitogénicos del HGF liberado en respuesta a la hepatectomía.

Explorar más detalladamente los cambios en lipoperoxidación nuclear en los distintos modelos de regeneración hepática, para eventualmente definir si los cambios por especies reactivas de oxígeno tienen efectos directos sobre la proliferación o, incluso, sobre la carcinogénesis.

Identificar si existen efectos de especies reactivas de oxígeno en otras moléculas durante la regeneración hepática, y caracterizar su influencia en el proceso. Se propone estudiar la activación de factores transcripcionales por especies reactivas de oxígeno. Específicamente, la activación del factor transcripcional NF- κ B, que parece jugar un papel importante en las etapas iniciales de la regeneración hepática (Rebecca Taub, FASEB Conference, 1994) y en el que ha sido bien caracterizada la activación por especies reactivas de oxígeno (Schreck et al, 1991).

APÉNDICE I

FACTORES SÉRICOS EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Desde los años 50 muchas hipótesis de la homeostasis de los tejidos se basan en la propuesta de presencia de estimuladores e inhibidores de la proliferación celular. En el estudio del fenómeno de regeneración hepática Weiss y Kavanau propusieron un modelo en donde las células hepáticas producían un inhibidor de la proliferación, que actuaba como regulador del proceso. Como la concentración del inhibidor era proporcional al número de células, la hepatectomía parcial producía una disminución en la concentración y las células eran liberadas de la inhibición y empezaban a proliferar. Conforme la regeneración iba incrementando la masa funcional, la concentración del inhibidor aumentaba nuevamente y la proliferación volvía a detenerse (Alison, 1986).

Después vino la observación de que la sangre de animales hepatectomizados mostraba propiedades hepatotróficas bajo ciertas condiciones.

Impulsada por estos antecedentes, se inauguró con entusiasmo la búsqueda y caracterización de los estimuladores e inhibidores responsables de la regeneración hepática. Se identificaron una cantidad considerable de estimuladores de la proliferación producidos por el tejido hepático, y se probaron y demostraron propiedades hepatotróficas en muchos de los factores de crecimiento caracterizados en otros tejidos.

Los frutos de esta búsqueda hasta nuestros días han resultado indudablemente notables (cuadro 7). Se han identificado factores de origen hepático, y extrahepático. Dentro de los de origen hepático se encuentran moléculas producidas por los hepatocitos (ALR), así como por otros tipos celulares (TNF e interleucinas, por las células de Kupffer; HGF por las células de Ito).

En el estudio de la regeneración hepática se ha asumido que el control del crecimiento hepático ocurre solamente en términos de disponibilidad y mecanismos de acción de los factores de crecimiento y la manera cómo estos factores se vuelven accesibles al hepatocito.

Pero a pesar de toda esta información todavía no ha sido posible explicar cómo se alcanza la masa óptima de hígado y como se mantiene. Esto quizá indique que lo que parecía una manera lógica de abordar la cuestión está todavía lejos de dar respuestas concretas.

Dejando aparte la posibilidad de que en el proceso intervengan eventos que no se relacionen con las moléculas mitogénicas (cambios metabólicos, por ejemplo), está claro que la codificación y decodificación de las señales moleculares constituye todavía una indescifrable red de eventos paralelos, con efectos debidos a concentración, sinergismos y antagonismos.

Cuadro 7. Mitógenos y comitógenos hepáticos.

HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) ³ *6,7
ALR (aumentador de la regeneración hepática) *7
EGF (factor de crecimiento epidérmico)² *1,7 (en ratón)
Insulina ² *1,7
Glucagon ² *1
HPTB (hepatopoyetina B) ³
TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa)³ * 7
IGF2 (factor de crecimiento parecido a la insulina, tipo 2) ² * 7
aFGF (factor ácido de crecimiento de fibroblastos)³
TNF (factor de necrosis tumoral)*⁴
Estrógenos ^{3,5}
Hormonas tiroideas *1,7
Vasopresina ³
Norepinefrina ^{2,3}
Angiotensina II y III ³
Somatomedina-C ²
Lactato y piruvato a altas concentraciones ²

Inhibidores

TGF- β (factor de crecimiento transformante beta)³ *7
HPI (inhibidor de la proliferación de hepatocitos)³
IL-1 β (interleucina 1-beta)³
Glucocorticoides *1

*con efecto *in vivo* sobre la regeneración, probado uno o varios de estos métodos: uso de anticuerpos específicos, desarrollo de ratones transgénicos o administración directa al hígado intacto (modelo de fistula de Eck).

Referencias: ¹Alison, 1986; ²Leffert et al, 1988; ³Michalopoulos, 1990; ⁴Akerman et al, 1993; ⁵Ni y Yager, 1994; ⁶Shiota, 1994; ⁷Francavilla et al, 1994.

APÉNDICE II ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Características químicas de formación e interconversión

Los términos "especies reactivas de oxígeno" y "radicales libres de oxígeno" designan a las formas del oxígeno que son más reactivas que el oxígeno molecular en su estado basal.

A esta categoría pertenecen el oxígeno molecular en su estado de oxígeno singulete $^1\text{O}_2$, y las formas parcialmente reducidas de oxígeno: ión superóxido O_2^- , hidropéroxilo HO_2^\cdot , hidroxilo OH^\cdot y peróxido de hidrógeno H_2O_2 .

El oxígeno molecular, O_2 , posee un electrón desapareado en cada uno de sus orbitales externos. Esto, aunado a su alta electronegatividad, lo hace notablemente reactivo. Sin embargo, presenta lo que se llama "restricción de spin", debido a que sus electrones externos tienen direcciones de spin paralelas, lo que disminuye su capacidad para combinarse con un par de electrones con el arreglo normal de giro en direcciones opuestas.

La reactividad del oxígeno molecular puede incrementarse durante ciertas reacciones en las que se invierte el spin de uno de los electrones externos. Este proceso produce el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), que es altamente reactivo en virtud de que carece de restricciones de spin. Un mecanismo para la formación de oxígeno singulete es la acción de luz en presencia de un fotosensibilizador.

La restricción de spin del oxígeno también desaparece si se abstrae un electrón individual de otra molécula, en lugar de un par, ya que en este caso la inversión de spin no es necesaria. Esta característica es la que hace posible la reducción univalente del oxígeno, que tiene como consecuencia la formación de radicales libres.

Un radical libre es una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo.

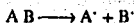
Un compuesto se vuelve radical libre por ganancia de un electrón



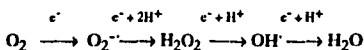
al perder un electrón,



o durante la ruptura homolítica de un enlace covalente



La reducción secuencial univalente del oxígeno molecular produce radicales libres

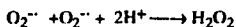


El radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) se produce por la transferencia de un electrón al oxígeno molecular.

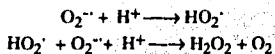


La formación de superóxido también se puede iniciar al exponer el oxígeno molecular a electrones de suficiente energía, como la radiación ionizante y otras fuentes (Southorn y Powis, 1988)

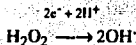
El ión superóxido puede sufrir una reacción de dismutación en donde dos moléculas de superóxido reaccionan para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2).



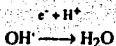
La reacción de dismutación involucra un primer paso en donde se protona el superóxido, dando lugar al radical hidropéroxilo (HO_2^\cdot)



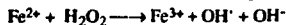
Cuando se transfiere un electrón al peróxido de hidrógeno se forma el altamente reactivo radical hidroxilo (OH^\cdot).



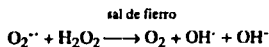
Con la adición de otro electrón, el radical hidroxilo se convierte en agua



El radical hidroxilo (OH[•]) también se forma en la llamada reacción de Fenton, donde el peróxido de hidrógeno interacciona con iones ferrosos o cúpricos.



y en la reacción de tipo Haber-Weiss, catalizada por hierro, en donde el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido interaccionan entre sí en presencia de trazas de iones de metales de transición, formando radical hidroxilo, ion hidroxilo y oxígeno.



(Southorn y Powis, 1988)

La radiación ionizante causa la ruptura heterolítica del agua a átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo; en presencia de oxígeno, también se produce el radical superóxido y peróxido de hidrógeno. Ciertas longitudes de onda de la luz pueden causar fotólisis de los enlaces químicos y generar radicales libres. Contaminantes atmosféricos como el ozono o los dióxidos de nitrógeno pueden reaccionar con moléculas biológicas para formar radicales libres reactivos. También se producen radicales libres en la combustión de materia orgánica, como el humo de fogatas y de cigarro.

Formación de especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos

Las reacciones anteriores pueden llevarse a cabo en cualquier ambiente químico que posea los componentes necesarios, y de este modo tanto el interior de las células como el ambiente extracelular resultan ser adecuados para que ocurran. Por esta razón, las reacciones de formación e interconversión detalladas en la sección anterior son fuentes potenciales de especies reactivas de oxígeno dentro de los sistemas biológicos, y constituyen la manera en la que los cambios ambientales afectan la exposición de la materia viva a radicales libres.

Sin embargo, aunque estas causas externas modulan la exposición a especies reactivas de oxígeno, la fuente más importante de especies reactivas de oxígeno para los organismos vivos es la producción continua dentro del organismo por reacciones de oxidación-reducción.

Los radicales libres de oxígeno se forman durante el metabolismo aeróbico normal. Las reacciones redox que ocurren durante el transporte de electrones en los organelos subcelulares o sistemas membranales son responsables de la generación de ión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En los eucariotes, de este modo, las mitocondrias, peroxisomas, núcleos, retículo endoplásmico y membrana plasmática son sitios de formación de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones fisiológicas.

Los dos sitios más importantes de formación de radicales superóxido en mitocondrias son la región de la ubiquinona-citocromo *b* y la flavoproteína NADH deshidrogenasa. Una fuente importante de radical superóxido es la "fuga univalente" en la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Durante la fosforilación oxidativa, la citocromo oxidasa mitocondrial acopla la fosforilación del ADP a la reducción tetravalente controlada del oxígeno para formar agua. En este proceso, los intermediarios parcialmente reducidos normalmente están unidos fuertemente a los sitios activos del sistema enzimático, pero se pueden liberar en concentraciones moderadas bajo condiciones fisiológicas, y en cantidades considerables cuando las enzimas son perturbadas con inhibidores, desacoplantes, inductores y pseudosustratos.

Lo mismo sucede en la cadena microsomal de transporte de electrones. Así, otra fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno es el retículo endoplásmico, que produce superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno. La NADPH-citocromo *c* (P450)reductasa y el citocromo P450 han sido propuestos como los sitios de generación de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 .

Los peroxisomas producen peróxido de hidrógeno durante el metabolismo de los ácidos grasos, y en la transformación de glicolato a glioxilato, a través de la enzima glicolato oxidasa.

La membrana nuclear es otra fuente de especies reactivas de oxígeno en la célula. Las especies detectadas son también $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 . Existe un pigmento autooxidable (con picos a 559, 531 y 428 nm) que está involucrado como un aceptor de electrones en la oxidación de NADPH y puede ser la fuente de radicales superóxido. La NADPH-citocromo *c* reductasa es supuestamente el segundo generador de superóxido.

El sistema de la NADPH oxidasa presente en la membrana plasmática de células inflamatorias genera radical superóxido durante el llamado "estallido respiratorio", que es un componente importante en la actividad microbicida de las células inmunes. El complejo enzimático de la NADPH oxidasa ha sido identificado también en otros tipos celulares. (Aitken y Fisher, 1994).

Una gran variedad de enzimas catalizan la reducción univalente de oxígeno molecular a radical superóxido, entre las que se encuentran la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, deshidrogenasa dihidroorótica, deshidrogenasas de flavina y peroxidasas.

La reducción univalente del oxígeno también ocurre *in vivo* en reacciones de óxido-reducción no enzimáticas (por ejemplo, hidroquinona + $O_2 \longrightarrow$ semiquinona + $O_2^{\cdot -}$ + H^+) y durante reacciones de autooxidación de catecolaminas, flavinas y ferredoxinas reducidas.

Las reacciones que se han propuesto como formadoras de oxígeno singlete *in vivo* son la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro, la dismutación espontánea de radical superóxido y la oxidación de sales halogenadas por peróxido de hidrógeno como parte de la actividad antimicrobiana de las células inflamatorias.

Efectos sobre moléculas biológicas

Todos los componentes celulares pueden ser blancos potenciales para el ataque por radicales libres: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las reacciones principales incluyen la iniciación de procesos de autooxidación en cadena, reacciones de ramificación, adición de radicales a dobles ligaduras, abstracción de hidrógenos de carbonos alifáticos y oxidación de grupos sulfhidrilo, tioéter y amino (Cerutti, 1985).

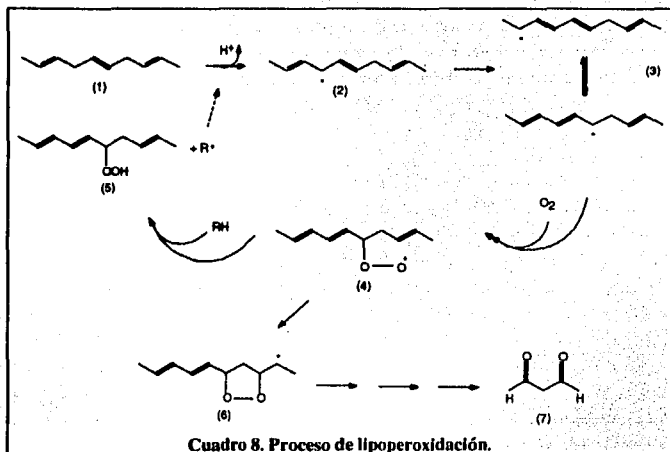
De este modo, el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno puede producir peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en los organelos y la membrana plasmática, oxidación de enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, carbonilación y polimerización de proteínas, despolimerización de polisacáridos, hidroxilación de purinas o pirimidinas, y cortes de cadena sencilla o doble del DNA (Southorn y Powis, 1988).

En las proteínas se han identificado los residuos de aminoácidos que son modificados por reacciones oxidativas: metionina, histidina, cisteína, prolina, triptófano, lisina y tirosina. Sus modificaciones químicas pueden dar lugar a modificaciones estructurales que a su vez desencadenen alteraciones funcionales (Galeotti et al, 1989).

Sin embargo, por mucho el daño mayor, que también ha sido el más extensamente investigado, es a los lípidos de membrana. Como consecuencia de las reacciones de radicales libres, los fosfolípidos y el colesterol sufren cambios químicos que alteran profundamente las propiedades estáticas y dinámicas de la bicapa lipídica. Como la membrana es una unidad en donde todos los componentes están estrictamente interrelacionados y donde los lípidos no sólo juegan un papel de soporte, el daño lipoperoxidativo resulta de importancia biológica (Galeotti et al, 1989). El mecanismo de lipoperoxidación está esquematizado en el cuadro 8 (basado en Buege y Aust, 1978; Southorn y Powis, 1988).

La lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados es un ejemplo del tipo de reacciones en cadena que pueden ocasionar los radicales libres. Cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, puede formarse una molécula estable. Este hecho permite explicar las reacciones de terminación de la cadena. (Southorn y Powis, 1988).

Aunque el radical inicial produce sólo efectos locales, los radicales secundarios producidos y los productos de degradación pueden tener efectos biológicos en sitios distantes de donde se inició el proceso.



La lipoperoxidación usualmente se inicia con el ataque de un radical a un ácido graso poliinsaturado (1). El radical inicial, que puede ser hidroxilo, hidroperoxilo y quizá el oxígeno singulete, remueve un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos secundarios de la cadena, lo que deja un electrón desapareado en el carbono y crea un radical lipídico (2). Este experimenta un rápido rearrreglo molecular, formándose un dieno conjugado (3), que reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical hidroperoxilo (4), que puede tomar un hidrógeno de otra molécula, volviéndola un nuevo radical, y convertirse en un hidroperoxido lipídico (5). Cada nuevo radical es capaz de reaccionar también con el oxígeno molecular y continuar la reacción en cadena. El hidroperoxido lipídico es un compuesto estable hasta que entra en contacto con iones de metales de transición, con los que reacciona produciendo más radicales libres que a su vez inician y propagan otras reacciones en cadena. El radical hidroperoxilo puede también extraer un átomo de hidrógeno del grupo CH_2 adyacente y formar un endoperóxido lipídico (6). La formación de endoperóxidos lipídicos en ácidos grasos insaturados que contienen cuando menos 3 dobles ligaduras alternadas con grupos metileno (CH_2) puede dar lugar a la formación de dialdehído malónico (7) como producto de degradación.

Los efectos de las especies reactivas de oxígeno dependen fuertemente de la densidad del sistema en el que la reacción tiene lugar. Por ejemplo, la misma tasa de formación de radicales será más eficiente en polimerizar los componentes membranales en un grado mayor que componentes citosólicos (Zs-Nagy, 1989).

Métodos de detección

Tradicionalmente, las reacciones biológicas de radicales libres se han inferido con la identificación de los productos finales de la lipoperoxidación, como aldehídos o hidrocarburos gaseosos. La cuantificación de dialdehído malónico ha sido particularmente usado (MDA, por sus siglas en inglés). El dialdehído malónico de materiales biológicos puede existir en forma libre y formando complejos con varios constituyentes del tejido. La peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles ligaduras (principalmente ácido araquidónico) se considera su fuente mayoritaria. El método más ampliamente utilizado para su determinación está basado en su reacción con el ácido tiobarbitúrico, TBA. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA eliminando dos moléculas de agua para dar un pigmento cristalino de color rosa con un máximo de absorbancia espectrofotométrica entre los 532 y los 535 nm.

Como las condiciones de calentamiento ácido de esta prueba ocasionan la descomposición de los peróxidos lipídicos y los complejos del MDA presentes en la muestra (Bird y Draper, 1984), el método del TBA refleja no sólo la concentración de MDA formado *in vivo*, sino también la degradación de los hidroperóxidos lipídicos formados *in vivo* y la susceptibilidad para la formación de hidroperóxidos lipídicos *in vitro* (Götz et al, 1993).

La medición, mediante cromatografía de gases, de trazas de hidrocarburos volátiles exhalados por los animales experimentales, resulta útil para estimar la lipoperoxidación en el animal vivo. Sus características de no invasividad hacen a este método especialmente útil para seguir el curso temporal en el animal íntegro. Puede medirse etano, que se produce en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3, o pentano, que se deriva de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 (Dillard y Tappel, 1988).

Los dienos conjugados se forman en proporción directa a la formación de hidroperóxidos lipídicos, y su coeficiente de extinción a 232-233 nm es alto. Su medición es más precisa en fracciones subcelulares aisladas y en membranas que contengan niveles altos de ácidos grasos poliinsaturados (Dillard y Tappel, 1988).

La propiedad de algunas moléculas conocida como quimioluminiscencia resulta una herramienta útil en la detección de radicales libres. El luminol (5-amino-2,3-dihidrotalazina-1,4-diona) es una de estas moléculas quimioluminiscentes, que al ser

oxidado por especies reactivas de oxígeno, y se transforma en el anión electrónicamente excitado aminofalato, el cual al relajarse al estado basal, emite fotones. La quimioluminiscencia del luminol carece de especificidad para identificar a la especie de oxígeno implicada, ya que se desencadena por radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete. Sin embargo, el método es útil para detectar producción celular y presencia de especies reactivas de oxígeno en general, lo que lo hace adecuado para una primera aproximación experimental. Como la emitancia es alrededor de los 450 nm, es posible utilizar un contador de centelleo líquido para la detección. (Cadenas y Sies, 1984).

En general, es recomendable el uso de varios métodos para confirmar la existencia de lipoperoxidación *in vivo*.

Mecanismos antioxidantes

Debido al hecho que los radicales libres están siendo producidos continuamente en pequeñas cantidades por procesos metabólicos normales, todas las células aerobias poseen mecanismos para evitar los efectos de las especies reactivas de oxígeno, que se denominan defensas antioxidantes.

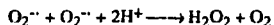
La organización estructural de la célula es un importante medio para dificultar las reacciones oxidativas, ya que permite separar las moléculas cuya reacción facilita la producción de radicales libres, como los depósitos de Fe^{2+} y el oxígeno.

De hecho, las concentraciones intracelulares de moléculas potencialmente formadoras de radicales se mantienen al mínimo, ya que la citocromo oxidasa mitocondrial consume la mayoría del oxígeno molecular disponible.

Las células contienen también mecanismos enzimáticos específicos para remover radicales libres de oxígeno y sus productos, así como sustancias que actúan como "atrapadores" de radicales.

Las distintas formas de superóxido dismutasa en eucariontes (citoplásmica, que contiene Cu y Zn, y de matriz mitocondrial, que contiene Mg) aceleran en 10^4 veces la dismutación espontánea del radical superóxido a pH fisiológico. El metal del sitio activo es reducido por un radical superóxido y reoxidado por un segundo radical superóxido.

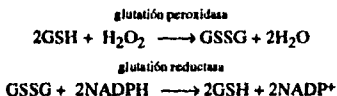
SOD



La aceleración de esta reacción asegura que no haya radical superóxido disponible para formar radicales hidroxilo por catálisis de Haber-Weiss.

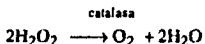
Existen dos sistemas enzimáticos para contender con el peróxido de hidrógeno.

A bajas concentraciones la mayor parte del peróxido de hidrógeno es transformada en agua por las distintas glutatión peroxidasas (la selenoenzima y la que no posee grupo prostético metálico), mediante la conversión de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG). La enzima glutatión reductasa cataliza la regeneración del glutatión reducido usando NADPH proveniente del ciclo de las pentosas.



La glutatión peroxidasas cataliza también la reducción de los peróxidos lipídicos, con lo que previene la propagación de la lipoperoxidación.

A concentraciones altas de peróxido de hidrógeno, la catalasa se vuelve la principal responsable de su eliminación.



Los tejidos poseen además una gran variedad de antioxidantes no enzimáticos para prevenir daño por radicales libres. La vitamina E (formada por varios isómeros del tocoferol) es un antioxidante de fase lipídica que se incorpora a las membranas y convierte al radical superóxido, hidroxilo, y radicales lipoperóxido a formas menos reactivas. Ejerce su acción donando un hidrógeno al radical con la consecuente formación de un radical de vitamina E que es particularmente estable debido al fenómeno de resonancia entre sus dobles enlaces. Otros compuestos actúan de manera similar. Por ejemplo, la cisteína y la cisteamina (beta-mercaptopetilamina) son capaces de apagar la reactividad de los radicales libres debido a que donan electrones de sus grupos sulfhidrilo. La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante de fase acuosa (Southorn y Powis, 1988).

La ceruloplasmina, lactoferrina, transferrina, ácido úrico y albúmina son capaces de unir metales pesados, impidiendo su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

Existen varios nutrientes naturales que pueden actuar como antioxidantes, como los carotenoides y los flavonoides, cuya función en las plantas parece ser la de protegerlas de los radicales libres formados durante la fotosíntesis por la cadena de transporte de electrones del cloroplasto. Moléculas pequeñas y proteínas localizadas en el citosol y las membranas o presentes en los fluidos extracelulares (glutatión, ascorbato, vitamina E, β -

caroteno, ubiquinona, ácido úrico, ceruloplasmina y transferrina) actúan como "apagadores" de las especies reactivas de oxígeno. Incluso la glucosa se ha visto que es capaz de eliminar el radical hidroxilo con eficiencia considerable. Más protección celular se logra con otros sistemas enzimáticos que involucran reacciones de óxido-reducción (DT-diaforasa, NADH-semidehidroascorbato reductasa, metionin-sulfóxido reductasa, glutatión reductasa) y procesos de reparación (enzimas de reparación del DNA).

Efectos peroxidativos del tetracloruro de carbono

El ejemplo clásico de un compuesto hepatotóxico que actúa en virtud de su capacidad lipoperoxidativa es el tetracloruro de carbono, CCl₄. Con la ruptura del enlace carbono-halógeno tiene lugar la generación de radicales libres, y éstos son los responsables de la toxicidad, ya que se impide con antioxidantes. El radical libre implicado es el radical triclorometilo [•]CCl₃, cuya formación es catalizada por el sistema de oxidasas microsomales. De hecho, existe una forma específica de citocromo P450 que es la responsable de la bioactivación del CCl₄ y es rápidamente destruída durante este proceso. El radical triclorometilo es altamente reactivo y puede iniciar directamente la lipoperoxidación. Sin embargo, es más probable que reaccione con el oxígeno molecular, formando un radical triclorometilperoxilo



El CCl₄ induce lipoperoxidación *in vivo* e *in vitro*. La intoxicación de animales experimentales con CCl₄ resulta en un aumento en la tasa de lipoperoxidación, medida tanto por aumento en las concentraciones de dienos conjugados, dialdehído malónico, etano y pentano exhalados por los animales y una disminución en los niveles de ácido araquidónico en los fosfolípidos microsomales. Además, se ha detectado el radical triclorometilo formado *in vivo*, utilizando resonancia paramagnética electrónica (EPR)(Younes, 1988).

REFERENCIAS

- Aitken J. y Fisher H. (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, **16**, 259-267.
- Akerman P.A., Cote P.M., Yang S.Q., Mc Clain C., Nelson S., Bagby G., y Diehl A.M. (1993) Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor- α . *Hepatology*, **17**, 1066-1073.
- Alison M.R. (1986) Regulation of hepatic growth. *Physiological Reviews*, **66**, 499-541.
- Baba A., Lee E., Ohta A., Tatsuno T. e Iwata H. (1981) Activation of adenylate cyclase of rat brain by lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**, 3379-3384.
- Barbason H. (1976) Influence of the circadian rhythm of cell division on the effect of X-irradiation in the regenerating rat liver. *Int. J. Radiation. Oncology Biol. Phys.*, **1**, 911-914.
- Becker J., Mezger V., Courgeon A.M. y Best-Belpomme M. (1991) On the mechanism of action of H_2O_2 in the cellular stress. *Free Radical Research Communications* **12-13**, 455-460.
- Benedetti A., Casini A., Ferrali M. y Comporti M. (1979) Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochemical Journal*, **180**, 303-312.
- Bird R.P. y Draper H.H. (1984) Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology*, **105**, 299-305.
- Bruchhausen F.V., Wurm G. y Just I. Oxidative and cooxidative reactions during biosynthesis of prostaglandins, eicosanoids and leukotrienes, en *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms* Vol. 1, Chow Ch.K. ed. CRC Press. 1988, Boca Raton, Florida, p 117-133.
- Bruscalupi, G., Curatola G., Lenaz G., Leoni S., Mangiantini M.T., Mazzanti L., Spagnuolo S. y Trentalance A. (1980) Plasma membrane changes associated with rat liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, **597**, 263-273.
- Bucher N.L.R. y Swaffield M.N. (1964) The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Research*, **24**, 1611-1625.
- Buege J.A. y Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **52**, 302-310.

- Cadenas E. y Sies H. (1984) Low level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods in Enzymology*, **105**, 221-231.
- Cerruti P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-381.
- Chesseman K.H., Collins M., Madix S., Milia A., Proudfoot K., Slater T.F., Burton G.W., Webb A. e Ingold K.U. (1986) Lipid peroxidation in regenerating rat liver. *FEBS Letters*, **209**, 191-196.
- Chojkier M., Houghlum K., Solis-Herruzo J. y Brenner D.A. (1989) Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation?. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 16957-16962.
- Cochrane C.G., Schraufstatter I.U., Hyslop P.A. y Jackson J.H. (1988) Cellular and biochemical events in oxygen injury., en *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology, Proceedings of the Upjohn-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 82*, Cerutti P.A., Fridovich I. y Mc. Cord J., eds., Alan R. Liss Inc., 1988, New York, 125-136.
- Cockerill M.J., Player T.J. y Horton A.A. (1983) Studies on lipid peroxidation in regenerating rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **750**, 208-213.
- Coni P., Simbula G., Carcereri A., Menegazzi M., Suzuki H., Sarma D.S.R., Ledda-Columbano G. y Columbano A. (1993) Differences in the steady-state levels of c-fos, c-jun and c-myc messenger RNA during mitogen-induced liver growth and compensatory regeneration. *Hepatology*, **17**, 1109-1116.
- Crawford, D. Zbinden I., Amstad P. and Cerutti P. (1988) Oxidant stress induces the protooncogenes c-fos and c-myc in mouse epidermal cells. *Oncogene* **3**, 27-32.
- Curtin N.J. y Snell K. (1983) Enzymic retrodifferentiation during hepatocarcinogenesis and liver regeneration in rats *in vivo*. *British Journal of Cancer*, **48**, 495-505.
- Davies K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 9895-9901.
- Defeng W y Cederbaum A.I. (1992) Presence of functionally active cytochrome P450IIE1 in the plasma membrane of rat hepatocytes. *Hepatology*, **15**, 515-524.
- Del Maestro R. (1984) Systemic consequences of O₂⁻ production. *Methods in Enzymology* **105**, 386-389.
- Devary Y., Gottlieb R.A., Lau L.F. y Karin M. (1991) Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Molecular and Cellular Biology*, **11**, 2804-2811.

Dillard C.J. y Tappel A.L. Consequences of biological lipid peroxidation., en *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms* Vol. 1, Chow Ch.K. ed. CRC Press. 1988, Boca Raton, Florida, p 103-115.

Farber J.L., Kyle M.E. y Coleman J.B. (1990) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigation*, **62**, 670-679.

Fausto N. y Webber E.M. (1993) Control of liver growth. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, **3**, 117-135.

Fowler F., Banks R.K. y Maillard M.E. (1992) Characterization of sodium-dependent aminoacid transport activity during liver regeneration. *Hepatology*, **16**, 1187-1194.

Francavilla A., Zeng Q., Polimeno L., Carr B., Sun D., Porter K.A., Van Thiel D.H. y Starzl T. (1993) Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model for hepatic regeneration. *Hepatology*, **19**, 210-216.

Francavilla A., Hagiya M., Porter K.A., Polimeno L., Ihara I. y Starzl T. (1994) Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology*, **20**, 747-757.

Galeotti T., Borello S. y Massoti G. Oxy-radical sources, scavenger systems and membrane damage in cancer cells., en *Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes*, Das, Farmington, Conn; Essmann, Flushing, N.Y. (eds.). S. Karger, publisher. Basel, Switzerland, 1989, p 129-148.

Geesin J.C., Gordon J.S. y Berg R.A. (1990) Retinoids affect collagen synthesis through inhibition of ascorbate-induced lipid peroxidation in cultured human dermal fibroblasts. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, **278**, 350-355.

Geesin J.C., Hendricks L.J., Gordon J.S. y Berg R.A. (1991) Modulation of collagen synthesis by growth factors: the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **289** (1), 6-11.

Goldman R., Ferber E. y Zort U. (1992) Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A₂. *FEBS Letters*, **309**, 190-192.

Götz M.E., Dirr A., Freyberger A., Burger R. y Reiderer P. (1993) The thiobarbituric acid assay reflects susceptibility to oxygen induced lipid peroxidation *in vitro* rather than levels of lipid hydroperoxides *in vivo*: a methodological approach. *Neurochemistry International*, **22**, 255-262.

Gutiérrez-Salinas J., Aranda-Fraustro A., Paredes-Díaz R. y Hernández-Muñoz R. (1994) Partial reversion by sucrose administration of ethanol-induced inhibition of liver regeneration in the rat. *Manuscrito en preparación*.

Hansberg W. y Aguirre J. (1990) Hiperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxigen. *Journal of Theoretical Biology*, **142**, 201-221.

Harman D. Radicales libres: envejecimiento y enfermedad. En la Conferencia Davis "Los radicales de oxígeno en las patologías humanas". Editado por SmithKline Beecham, Farmacéutica. 1991

Hernández-Muñoz R., Glender W., Díaz-Muñoz M., García-Sáinz J.A. y Chagoya V. (1984) Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*, **33**, 2599-2604.

Higgins G.M. y Anderson R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. *Archives of Pathology*, **12**, 186-202.

Horimoto M., Hayashi N., Sasaki Y., Ito T., Kaneko A., Tanaka Y., Miyoshi E., Fusamoto H. y Kamada T. Sequential expression of cell cycle related proteins during rat liver regeneration. IASL Meeting 1994, *Hepatology*, **19**, Abstract # 146.

Ikebuchi Y., Masumoto N., Tasaka K., Koike K., Kasahara K., Miyake A y Tanizawa O. (1991) Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonate release in human amnion cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 13233-13237.

Koch K.S. y Leffert H.L. (1979) Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. *Cell*, **18**, 153-163.

Koshland D.E. (1992) The molecule of the year. NO news is good news. *Science*, **258**, 1861-1863.

Lambotte L., d'Udekem Y., Lambert F., Gressens P., Amrani M. y Dubois J. Possible role of free radicals in liver regeneration. In *Advances in the Biosciences*, Vol. 76. Pergamon Press. 1989. Great Britain.

Lambotte L. y Tagliaferri E. Liver regeneration after temporary partial hepatectomy. In *the Digestive Disease Week of the American Association for the Study of Liver Diseases*, mayo 16-19, 1993, A11, Abstract #42.

Leffert H., Alexander N.M., Faloona G., Rubalcava B. y Unger R. (1975) Specific endocrine and hormonal receptor changes associated with liver regeneration in adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **72** (10), 4033-4036.

- Leffert H.L., Koch K.S., Lad P.J., Shapiro I.P., Skelly H. y de Hemptinne B. "Hepatocyte regeneration, replication and differentiation" in *The Liver: Biology and Pathobiology*. 2nd Ed. Arias I.M., Jakoby W.B., Popper H., Schachter D. y Shafritz A., eds. Raven Press. New York, 1988.
- Lorenzi M., De Martino A., Carlucci F., Tabucchi A., Porcelli B., Pizzichini M., Marinello E. y Pagani R. (1993) Nitrogen metabolism during liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1157**, 9-14.
- Loten E.G. y Redshaw-Loten J.C. (1986) Preparation of rat liver plasma membranes in a high yield. *Analytical Biochemistry*, **154**, 183-185.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265.
- Matsumoto K., Tajima H., Hamanoue M., Kohno S., Kinoshita T. y Nakamura T. (1992) Identification and characterization of "injurin", an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **89**, 3800-3804.
- Mead J.E., Braun L., Martin D. y Fausto N. (1990) Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Research*, **50**, 7023-7030.
- Michalopoulos, G. K. (1990) Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB Journal*, **4**, 176-187.
- Michalopoulos G.K. y Zarnegar R. (1992) Hepatocyte Growth Factor (Editorial). *Hepatology*, **15**, 149-155.
- Miquel J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research., en *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* Vol.1, Miquel J., Quintanilla A.T. y Weber H. Eds. CRC Press. 1989, Boca Raton, Florida, p 3-13.
- Nagy I. Zs. Functional consequences of free radical damage to cell membranes., en *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* Vol.1, Miquel J., Quintanilla A.T. y Weber H. Eds. CRC Press. 1989, Boca Raton, Florida, p 199-207.
- Ni N. y Yager J.D. (1994) Comitogenic effects of estrogens on DNA synthesis induced by various growth factors in cultured female rat hepatocytes. *Hepatology*, **19**, 183-192.
- Nishihira T., Tanaka J., Nishikawa K., Jikko A., Taki Y., Morimoto T., Koizumi K., Kamiyama Y., Ozawa K. y Tobe T. (1986) Biological significance of enhanced mitochondrial membrane potential in regenerating liver. *Hepatology*, **6**, 220-224.

- O Brian C.A., Ward N.E., Weinstein B., Bull A.W. y Marnett L.J. (1988) Activation of rat brain protein kinase by lipid oxidation products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **155**, 1374-1380.
- Obata M. (1992) Investigation of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *Nippon-Geka-Gakkai-Zasshi*, **93**, 833-41.
- Paulsen J.E. (1990) The time course of mouse liver regeneration after carbon tetrachloride injury is influenced by circadian rhythms. *Chronobiology International*, **7**, 271-275.
- Rao G.N., Lassegue B., Griendling K.K. y Alexander R.W. (1993) Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid. *Oncogene*, **8**, 2759-2764.
- Rao M.S. y Subbarao V. (1986) DNA synthesis in exocrine and endocrine pancreas after partial hepatectomy in Syrian golden hamsters. *Experientia*, **42**, 833-834.
- Recknagel R.O y Glende E. A. (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymology*, **105**, 331-337.
- Reiners J.J. y Busch H. (1980) Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regenerating liver and Novikoff hepatoma. *Biochemistry*, **19**, 833-841.
- Robin M.A., Maratrat M., Loeper J., Durand-Schneider A.M., Tinel M., Callet F., Beaune P.H., Feldmann G. y Pessayre D. Cytochrome p-450 follows a microtubule-dependent vesicular route to the plasma membrane. IASL Meeting 1994, *Hepatology*, **19**, Abstract # 321.
- Roesel J., Rigsby D., Bailey A., Alvarez R., Sánchez J.D., Campbell V., Srresta K. y Miller D.M. (1989) Stimulation of protooncogene expression by partial hepatectomy is not tissue specific. *Oncogene Research*, **5**, 129-136.
- Rubin J. S, Bottaro D.P. and Aaronson S.T. (1993) Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1155**, 357-371.
- Rushmore T.H., Morton M.R. y Pickett C.B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA sequence required for functional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 11632-11639.
- Schreck R., Rieber P. y Baeuerle P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*, **10**, 2247-2258.

Schreck R. y Baeuerle P.A. (1991) A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cell Biology*, **1**, 39-42.

Shiota G., Wang T.C., Nakamura T. y Schmidt E. (1994) Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology*, **19**, 962-972.

Slater T.F., Chesseman K.H., Benedetto C., Collins M., Emery S., Madix S.P., Nodes J.T., Proudfoot K., Burton G.W. e Ingold K. U. (1990) Studies on the hyperplasia ("regeneration") of the rat liver following partial hepatectomy. Changes in lipid peroxidation and general biochemical aspects. *Biochemical Journal*, **265**, 51-59.

Southorn P.A. y Powis G. (1988) Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, **63**, 381-389.

Storz G., Tartaglia L.A. y Ames B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*, **248**, 189-194.

Takahashi M., Ota S., Terano A., Yoshiura K., Matsumura M., Niwa Y., Kawabe T., Nakamura T. y Omata M. (1993) Hepatocyte growth factor induces mitogenic reaction to the rabbit gastric epithelial cells in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**, 528-534.

Tewari, M., Dobrzanski P., Monh K., Cresman D.E., Hsu J.Ch., Bravo R. y Taub R. (1992) Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I κ B that inhibits NF- κ B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel κ B site-binding complex. *Molecular and Cellular Biology*, **12**, 2892-2908.

Traub O., Drüge P.M. y Willecke K. (1983) Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **80**, 755-759.

Tsai J.L., King K.L., Chang C.C. y Wei Y.H. (1992) Changes in mitochondrial respiratory functions and superoxide dismutase activity during liver regeneration. *Biochemistry International*, **28**, 205-217.

Ueda K., Yoshioka T., Takehara Y. y Abe K. (1983) Lipoperoxides, vitamin E and activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in regenerating rat liver. *Biochemistry International*, **7**, 663-669.

Van Kuijk F.J.G.M., Sevanian A., Handelman G.J. y Dratz E. A. (1987) A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochemical Science*, **12**, 31-34.

Vartanian L.S., Sadovnikova I.P., Gurevich S.M. y Sokolova I.S. (1992) Formation of superoxide radicals in membranes of subcellular organelles in regenerating liver. *Biokhimiia*, **57**, 671-8.

Wach F., Hein R., Adelman-Grill C. y Krieg T. (1987) Inhibition of fibroblast chemotaxis by superoxide dismutase. *European Journal of Cell Biology*, **44**, 124-127.

Webber E.M., Godowski P.J. y Fausto N. (1994) *In vivo* response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*, **14**, 489-497.

Wolfson N., Wilbur K.M. y Bernheim F. (1956) Lipid peroxide formation in regenerating rat liver. *Experimental Cell Research*, **10**, 556-558

Yamaoka Y., Ohsawa T., Takasan H., Ozawa K. y Honjo I. (1974) Energy requirement in regenerative and atrophic processes of the liver in man and other mammals. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*. **139**, 234-240.

Younes M. Lipid peroxidation and hepatotoxicity., en *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms* Vol. 1, Chow Ch.K. ed. CRC Press. 1988, Boca Raton, Florida, p 159-172.

Fuentes no publicadas

Trabajos expuestos en la FASEB Summer Conference on "Hepatic Regeneration and Carcinogenesis: Molecular and Cellular Pathways", Copper Mountain, Colorado, E.U.A, del 7-12 de Agosto de 1994:

Antonio Francavilla, Veterans Administration Hospital, Pittsburgh.

Antonio Martínez-Hernández, Veterans Administration Medical Center, Memphis.

George Michalopoulos, University of Pittsburgh Medical Center, Philadelphia.

Rebecca A. Taub, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia.