

11261

5

2EJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS TOXICOS DE LA INGESTA AGUDA DE ETANOL SOBRE EL HIGADO EN
REGENERACION Y SU REVERSION PARCIAL POR LA INGESTA DE SACAROSA**

**TESIS QUE PRESENTA EL MEDICO CIRUJANO JOSE GUTIERREZ SALINAS PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)**

**TUTOR: Dr. ROLANDO E. HERNANDEZ MUÑOZ, Departamento de Bioenergética, Insitute de
Fisiología Celular, UNAM.**

Octubre, 1995.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Esta tesis fué elaborada bajo la tutoría del Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz,
del Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la
Universidad Nacional Autónoma de México**

**A MIS PADRES: Sra. Mercedes Salinas Aldaco
Sr. Raúl Gutiérrez Rivero**

A MI HERMANA: Lic. Mercedes Gutiérrez Salinas

GRACIAS.

**"L'alcohol em destruirá el fetge/i les arnes la pell
el fum els pulmons/i els homes el cervell.
Podreu fullejar els meus somnis/grapejar els records
i estripar-me plors i versos/jocs i amors.
Peró no pas aquest poema/volador i petit.
Gust d'amor/color magrana/que he escrit per al meu amic..."**

Joan Manuel Serrat

**"Vaga el mundo por el tiempo
a la par del viento
en el gran silencio.
Todas las cosas importantes
las insignificantes
a que jugamos todos.
Pero se engaña y se destruye tontamente
sin importarle a la gente
las argucias de su mente.
Sistemas e individuos se preocupan
más por lo que a ellos les gusta que por algo que sea real."**

Rodrigo González (ROCKDRIGO)

AGRADECIMIENTOS

MI más profundo agradecimiento al Dr. Rolando E. Hernández Muñoz por su orientación durante la realización de mis estudios así como la asesoría en el trabajo de laboratorio.

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas que contribuyeron para la elaboración de esta tesis:

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y al Biol. Rafael Cañedo Merino del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, por su colaboración en la determinación de los metabolitos celulares para el cálculo del potencial redox.

Agradezco la ayuda de M.C. Rodolfo Paredes Díaz de la Unidad de Microscopía Electronica del Instituto de Fisiología Celular, por el manejo de las muestras para microscopía de luz y electrónica así como la obtención de las microfotografías.

Muy especialmente deseo agradecer al Lic. en Nut. Fernando López Barrera por facilitarme las técnicas para la determinación de la actividad específica de las enzimas así como por su asesoramiento inicial en el manejo de los programas de cómputo utilizados para el análisis de los datos experimentales.

También deseo expresar mi agradecimiento al Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) su gestión ante la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM para obtener la beca del primer año de mis estudios así como también mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el segundo año de mis estudios.

CUERPO SINODAL

Dr. Alfonso Cáramez Trejo Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.	Presidente
Dr. Guillermo Mendoza Hernández Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.	Secretario
Dr. Rolando E. Hernández Muñoz Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM	1er. Vocal
Dr. Rafael Villalobos Molina Sección de Terapéutica Experimental, Departamento de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV, IPN.	2o. Vocal
Dr. Mario L. Calcagno Montans Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.	Suplente
Dr. Enrique Piña Garza Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.	Suplente

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	
A. Efectos generales del etanol	3
B. Metabolismo hepático del etanol	4
C. Efectos tóxicos del etanol sobre el hígado	8
D. Regeneración hepática	10
E. Regeneración hepática y etanol	14
JUSTIFICACION	16
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODOS	
A. Material Biológico	18
B. Procedimiento general	18
C. Microscopía de luz y electrónica	18
D. Marcadores de regeneración hepática	19
E. Determinación de actividad enzimática	20
F. Determinación de metabolitos	21
RESULTADOS	
A. Supervivencia	24

B.	Hallazgos a microscopía de luz y electrónica	
	a. Microscopía de luz	24
	b. Microscopía electrónica	27
C.	Metabolitos séricos	32
D.	Marcadores de regeneración hepática	35
E.	Actividad de enzimas citosólicas y mitocondriales	37
F.	Etanolemia	45
G.	Metabolitos celulares	47
H.	Regeneración hepática con otros carbohidratos	53
	DISCUSION	55
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	62
	BIBLIOGRAFIA	63

RESUMEN

Durante el proceso de regeneración hepática existen cambios a nivel metabólico y molecular que tienen la finalidad de restituir el tejido hepático perdido. En este trabajo se determinaron indicadores fisiológicos, metabólicos y de regeneración para determinar los efectos de la administración de sacarosa en un modelo de ingesta aguda de etanol sobre el hígado en regeneración; explorando el efecto de este carbohidrato en la reversión de los efectos deletéreos de este xenobiótico.

Ratas macho Wistar fueron sometidas a hepatectomía parcial (retiro del 70% del hígado) e inmediatamente después de la cirugía se les administró una dosis única de etanol, sacarosa o una mezcla de sacarosa-etanol, sacrificándose a diversos tiempos obteniéndose el hígado remanente en donde se aisló la fracción citosólica y mitocondrial además de muestras para estudios morfológicos con microscopio de luz y electrónico. Tanto en la fracción citosólica como mitocondrial se determinó la actividad específica de las siguientes enzimas: alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa, transaminasa-gutámico oxaloacética, citocromo oxidasa y malato deshidrogenasa. Para evaluar el proceso regenerativo se determinaron los siguientes indicadores: a) síntesis *de novo* de DNA; b) actividad específica de la enzima timidín quinasa y, c) restitución del tejido hepático. Como indicadores fisiológicos se determinó la concentración sanguínea de los siguientes metabolitos: glucosa, triacilglicéridos, albúmina, urea, amonio y bilirrubina total. En extractos perclóricos se determinó lactato, piruvato, el par redox NADP/NADPH, hidroxibutirato y acetoacetato.

El grupo de animales tratados con etanol muestran disminución estadísticamente significativa con respecto a ratas únicamente con hepatectomía parcial en la síntesis *de novo* de DNA al igual que en los otros dos marcadores de regeneración (actividad específica de timidín quinasa y ganancia de peso del hígado remanente). Por el contrario, los grupos de animales parcialmente hepatectomizados que recibieron sacarosa o la mezcla sacarosa-etanol presentaron el mismo perfil que las ratas en estado regenerante y que no recibieron ningún otro tratamiento. Por su parte, tanto las actividades enzimáticas como los metabolitos determinados indican que el grupo de animales tratados con etanol presentan alteraciones importantes en estos indicadores y su perfil microscópico señala mayor daño a las estructuras subcelulares. Los grupos que recibieron sacarosa o la mezcla sacarosa-etanol presentan actividades enzimáticas y concentración de metabolitos muy semejantes entre sí y

semejantes al grupo de ratas que fueron únicamente parcialmente hepatectomizadas.

Los resultados indican que en el modelo de regeneración hepática en ratas, el etanol produce alteraciones estructurales, metabólicas y fisiológicas que son revertidas parcialmente por la administración de simultánea de sacarosa.

INTRODUCCION

A. Efectos generales del etanol.

El alcoholismo es una enfermedad de curso crónico, sujeto a recaídas que se caracteriza por la ingesta excesiva y compulsiva de bebidas alcohólicas que tiene como consecuencia un daño en la esfera bio-psico-social del individuo que la padece. Una persona alcohólica es el sujeto que no tiene control sobre la ingesta de alcohol y no es capaz de abstenerse de beber llegando a un estado de intoxicación aguda que, con el tiempo, tiende a ser crónico. El alcoholismo como enfermedad ocupa uno de los primeros lugares de morbi-mortalidad entre la población adulta de nuestro país, por lo que los estudios encaminados a entender los mecanismos fisiopatológicos y de tratamiento de esta enfermedad son de importancia prioritaria (Consejo Nacional Antialcohólico 1985).

Los efectos fisiopatológicos causados por la ingesta de etanol descritos tanto en humanos como en modelos experimentales en animales varían de acuerdo al tiempo de ingesta (crónica o aguda), el sexo del sujeto y la sensibilidad específica del mismo (Lieber 1991). En humanos se ha invocado inclusive un factor genético que determina la predisposición al daño producido por el etanol, además de existir diferencias raciales en la oxidación del mismo (Kennedy 1990). Las alteraciones que se han descrito por la ingesta crónica comprenden degeneración importante en hígado, corazón, músculo estriado, testículo, y sistema nervioso (Lieber, 1982; 1984; 1991; Rosenblum 1989; Altura 1989). Se ha propuesto que estos daños son el resultado del metabolismo oxidativo del etanol, el cual produce metabolitos secundarios derivados directa o indirectamente de éste, que son los principales responsables de las alteraciones provocadas en los tejidos. Este daño está directamente relacionado con el tiempo y la cantidad de etanol ingerido (Lieber 1991, Altura 1989).

En el caso de la ingesta aguda de etanol, existen alteraciones a diversos niveles dependiendo de la cantidad ingerida, si el sujeto está en ayuno o ha ingerido alimentos, así como de exposiciones previas (Lieber 1991). En este caso, las manifestaciones de daño más evidentes son relacionadas con el sistema nervioso central (SNC) y/o periférico (SNP), actuando como un inhibidor al disminuir la conducción del impulso nervioso a través del axón de la neurona (Kennedy 1990). En la ingestión aguda, existe una depresión en la formación reticular del tallo cerebral lo que produce un aumento de la excitación de la corteza, liberándola, lo que explica los cambios en el estado mental que son característicos

de la llamada "embriaguez" (Depto Psiquiatría 1986). Además de las alteraciones al SNC y SNP, la ingesta aguda de etanol produce alteraciones a nivel sistémico que son el resultado de las acciones propias del etanol como molécula polar (efecto de solvente); por su metabolismo oxidativo (oxidación del etanol a acetato con cambios en los niveles de los dinucleótidos de adenina NAD Y NADH), o por sus derivados metabólicos primarios o secundarios (acetaldehído y acetato y radicales libres, respectivamente). Estos efectos tienen consecuencias a distintos niveles celulares tales como la alteración de la utilización de oxígeno por la mitocondria; formación de los llamados "aductos" (unión química del acetaldehído principalmente con aminas y péptidos) en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Medina 1985; Gaines 1977; Stevens 1981) y alteraciones en muchas de las principales vías metabólicas, tales como el ciclo de Krebs y las involucradas en la utilización del oxígeno, glucosa y lípidos (Kennedy 1990, Lieber 1991).

B. Metabolismo hepático del etanol.

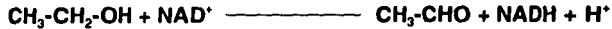
El hígado es el órgano de la economía que principalmente metaboliza al etanol ya que posee al menos tres mecanismos bien definidos de eliminación y metabolismo de éste (Lieber, 1984; 1991). Las alteraciones fisiopatológicas descritas incluyen a la hepatitis, la esteatosis y la cirrosis alcohólica (Feuer 1990). Por otro lado, existen otros órganos que son dañados por el etanol y que son afectados independientemente del daño producido al hígado. Gastritis, enfermedad ácido péptica, alteraciones del aparato cardio-circulatorio, predisposición al cáncer de laringe, estómago, boca y garganta; alteraciones al aparato locomotor y al sistema nervioso central y periférico, son ejemplo de alteraciones a órganos y sistemas relacionados con la ingesta de etanol (Feuer 1990).

Una vez que se ingiere etanol, éste pasa rápidamente a través de las membranas mucosas. Si el estómago está vacío, el alcohol es absorbido en el tracto digestivo superior pero si hay alimentos, entonces el etanol es absorbido en el tracto digestivo inferior. Además, la absorción depende de la concentración del etanol ingerido: a mayor concentración, más rápido se absorbe. Después de la absorción, el alcohol se difunde rápidamente a través de los capilares y membranas de todos los órganos y así es distribuido uniformemente a toda el agua corporal (Kennedy 1990).

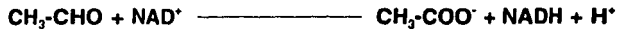
Una vez que el etanol llega al hígado, este lo oxida hasta acetato por medio de tres sistemas bien definidos (Figura 1) que son:

- a) Sistema de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa

(ALDH). La primera localizada preferentemente en citosol y que convierte al etanol en acetaldehído. Este paso requiere de una molécula de nicotinamida adenín-dinucleótido (NAD) como coenzima.

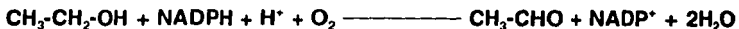


El acetaldehído resultante pasa a la mitocondria en donde es convertido a acetato por medio de la ALDH que también utiliza al NAD como coenzima.



Estas dos enzimas pueden metabolizar hasta cerca del 80% del etanol ingerido lo que las hace ser la principal vía de detoxificación de etanol en mamíferos. Por otro lado, tanto la ADH como la ALDH no se localizan exclusivamente en el hígado, sino que se han identificado isoenzimas de ellas en estómago, intestino delgado, pulmón, riñón y ojo (Kennedy 1990). Estas isoenzimas han sido caracterizadas por sus constantes catalíticas y su sensibilidad a diversos inhibidores como son el pirazol o el metil-pirazol para el caso de la ADH y disulfiram y cianamida para la ALDH (Kennedy 1990, Mufti 1989).

b) Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS; por sus siglas en inglés: Microsomal Ethanol-Oxidizing System). El MEOS es un sistema que es inducible por el alcoholismo crónico y su principal enzima metabolizante del etanol es el citocromo P450-IIE1. Este sistema se localiza en las cisternas del retículo endoplásmico liso y utiliza al oxígeno y como coenzima al NADPH tal como se ilustra a continuación (Lieber 1991; Kennedy 1990).



El acetadehído así formado es convertido a acetato por la ALDH, nuevamente con auxilio de una molécula de NAD⁺. El sistema MEOS es capaz de metabolizar y eliminar algunas drogas incluyendo a los barbituratos, lo que explica la resistencia que tienen los alcohólicos a este tipo de drogas. Sin embargo, cuando se ha ingerido una gran cantidad de etanol, el sistema MEOS metaboliza preferentemente al etanol con lo que los barbituratos no se metabolizan, produciendo un incremento en la susceptibilidad de los alcohólicos a los barbituratos cuando están ebrios.

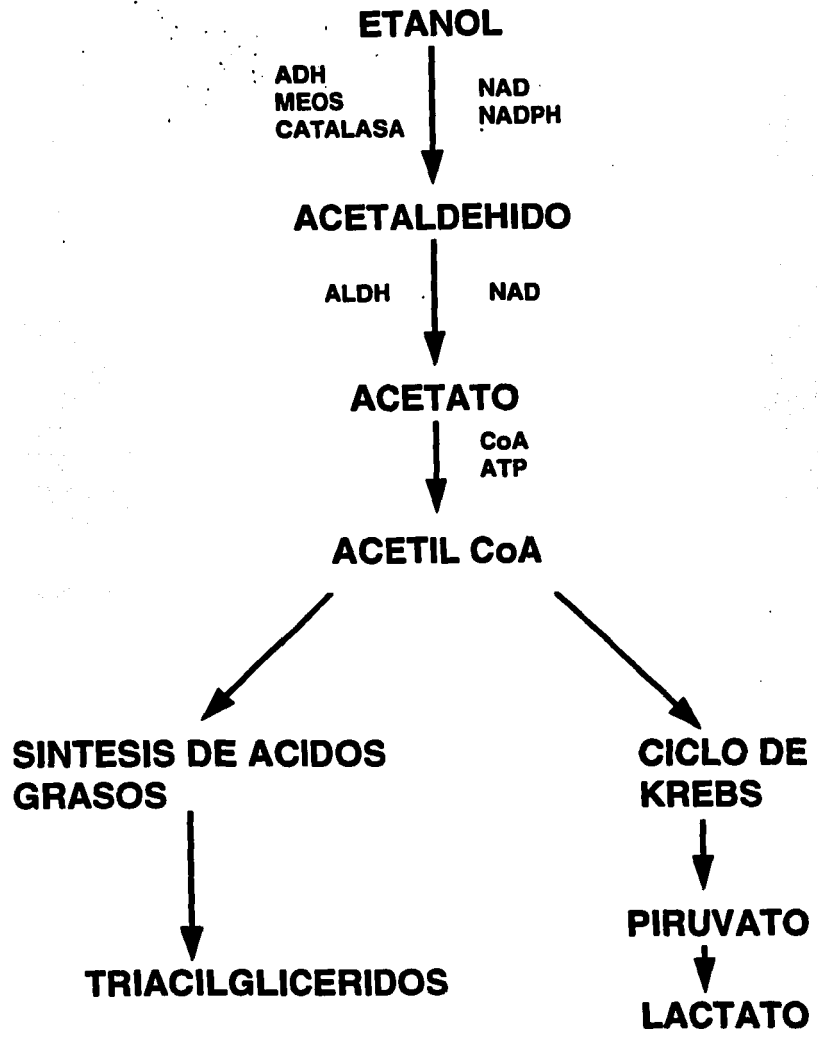
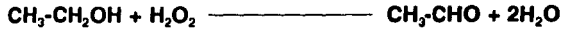


FIGURA 1: Metabolismo oxidativo del etanol y su relación con el metabolismo intermedio del hepatocito (modificado de Crow 1979). ADH: Alcohol deshidrogenasa; MEOS: sistema microsomal de oxidación del etanol; ALDH: aldehído deshidrogenasa; CoA: Coenzima A.

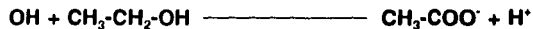
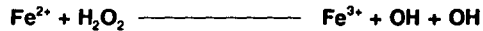
c) Sistema de la catalasa. Localizada en los peroxisomas y que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar al etanol. Este sistema está en estrecha relación con el sistema de glutatión oxidado-reducido y, al igual que el sistema MEOS, es inducible por alcoholismo crónico (Thurman 1989, Lieber 1991). El etanol puede servir como donador de hidrógenos en la reacción:



Esta reacción es dependiente de la disponibilidad de peróxido de hidrógeno, por lo que un incremento de éste o un decremento en la catalasa pueden activar o inhibir esta reacción.

Además de los tres sistemas anteriores de oxidación del etanol, se han descritos otros sistemas de eliminación del etanol, pero que contribuyen escasamente al metabolismo de esta molécula (Kennedy 1990). Tales sistemas son:

a) Oxidación no enzimática del etanol. El peróxido de hidrógeno puede interactuar con el etanol en una reacción catalizada por un metal de transición (como es el hierro), en una reacción tipo Fenton.



La reacción de Fenton produce el radical libre hidroxilo (OH) que puede oxidar al etanol a acetaldehído, mientras que el hierro puede ser reducido de nuevo al interactuar con un radical superóxido, dando como resultado un ciclo catalítico que regenera radicales hidroxilo y, de esta forma, oxidar etanol en presencia de un adecuado aporte de peróxido de hidrógeno y radical superóxido.

b) Reacciones de esterificación. El etanol puede reaccionar con ácidos grasos para formar etil-ésteres siendo catalizada la reacción por una enzima que en principio fué purificada del corazón. La reacción no parece necesitar de coenzimas, ni ATP y representa una mínima parte en la eliminación del etanol.

Los tres sistemas principales descritos anteriormente, convierten al etanol en acetaldehído el cual a su vez es convertido en acetato por la ALDH. El acetato es el producto final de la oxidación del etanol en el hígado y es liberado a la sangre para ser posteriormente

oxidado hasta CO_2 en los tejidos periféricos (Lieber 1991, Kennedy 1990).

En general, el conjunto de los tres sistemas hace que exista un aumento en la concentración de NADH y NADP⁻ lo que produce una alteración al estado redox intracelular, provocando con ello alteraciones en las principales vías metabólicas que condicionan las alteraciones hepáticas características del alcohólico. (Pösö 1976; Christensen 1979; Lieber 1991).

C. Efectos tóxicos del etanol sobre el hígado.

Como ya se mencionó, el hígado es el principal órgano que metaboliza al etanol, también es el más frecuentemente afectado. Los tres sistemas descritos anteriormente provocan consecuencia metabólicas indeseables para el hepatocito. Si bien, el hepatocito es capaz de metabolizar muy eficazmente al etanol, esta eficacia es pagada por un precio metabólico muy alto. Por otro lado, además de las alteraciones metabólicas provocadas por el etanol, existen otras dos formas descritas por medio de las cuales el etanol puede alterar al hepatocito.

La primera es por las propiedades polares propia de esta molécula. El etanol es una molécula altamente polar lo que hace que interaccione principalmente con los componentes lipídicos de las membranas celulares, provocando su inestabilidad estructural y afectando su función (Polokoff 1985). Una segunda forma de daño proviene de los derivados directos e indirectos del metabolismo del etanol (Feuer 1990). De los derivados directos del metabolismo del etanol tenemos principalmente al acetaldehído que tiene la propiedad de reaccionar con los grupos amino de las proteínas creando los "aductos" de acetaldehído (aldimias del nitrógeno de las lisinas), que alteran la estructura terciaria de las proteínas interfiriendo con la función de éstas. La presencia de aductos de acetaldehído no solo se ha demostrado en las proteínas celulares, sino también en los lípidos y los ácidos nucleicos, lo que pone de manifiesto la toxicidad de éste (Weiner H 1979). De los derivados secundarios producidos en la célula, durante el metabolismo del etanol, se han descrito como principales a los radicales libres derivados del oxígeno (Lieber 1991). Estos radicales libres son moléculas o átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son altamente reactivos, y por ende, peligrosos para el organismo. Proteínas, lípidos y ácidos nucleicos pueden ser "atacados" por los radicales libres y alterar de manera significativa las funciones celulares.

El metabolismo oxidativo de la célula es alterado de forma importante cuando el etanol es oxidado por el sistema de la ADH/ALDH. Como se mencionó, estas dos enzimas requieren

NAD para oxidar al etanol lo que produce un exceso de NADH tanto citoplásmico como intramitocondrial, provocando una alteración al balance redox general de la célula (Christensen 1979). En relación con este punto, es patente que el etanol altera de forma importante el metabolismo intermedio de la célula; es el control del metabolismo de la glucosa el más afectado (Crow 1992).

El hígado juega un importante papel en el control de la glucemia, ya sea tomando o liberando glucosa a la circulación sanguínea dependiendo del estado hormonal y alimenticio del sujeto. Inmediatamente después de la ingesta de alimentos, existe un aumento neto en la glucosa sanguínea la cual es convertida a glucógeno en el hígado. Durante el ayuno, el hígado es el productor neto de glucosa ya que degrada al glucógeno almacenado en él o activando la gluconeogénesis a partir de precursores tales como lactato, piruvato, alanina y glicerol (Devlin 1992, Voet 1993).

Los cambios en el metabolismo de los carbohidratos producidos por el etanol en el hígado normal, han sido ampliamente estudiado en animales de laboratorio y en humanos (Crow 1992). Las interacciones entre el etanol y el metabolismo de los carbohidratos se ven reflejadas en cambios en la concentración de glucosa en sangre (glucemia), y alteraciones al metabolismo de los carbohidratos en el hepatocito.

El efecto del etanol sobre la glucemia varía de acuerdo al estado nutricional del individuo. Cuando se ha comido y los depósitos de glucógeno hepático son altos, la ingesta de etanol produce una hiperglicemia. En el estado de ayuno, la ingesta de etanol produce hipoglucemia (Sneyd 1992).

La disminución de la concentración de glucosa en sujetos o animales de experimentación en estado de ayuno, después de la ingesta de etanol, puede ser producida por una disminución en el aporte de glucosa por parte del hígado, o en un aumento en la utilización periférica de la glucosa. Se ha propuesto la hipótesis de que en el primer caso, existe un bloqueo en la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, lactato y piruvato, pero es posible realizar gluconeogénesis a partir de fructosa (Freinkel 1963). Experimentos llevados a cabo por Freinkel revelaron que la ingesta de etanol no solo disminuye el aporte de glucosa por el hígado, sino que además existe un bloqueo en la utilización periférica de ella por los tejidos. De esta forma, la hipoglucemia se desarrolla cuando el bloqueo de la producción de glucosa por el hígado sobrepasa a su utilización por los tejidos periféricos (Freinkel 1963).

Las secuelas metabólicas de la ingestión de etanol son predominantemente hepáticas siendo estos cambios metabólicos los que probablemente sean los responsables de las

alteraciones encontradas en este órgano en sujetos alcohólicos. Estos cambios metabólicos no solo involucran el metabolismo de los carbohidratos sino también afectan el metabolismo de los lípidos y de las proteínas (Lieber 1991). Alteraciones al metabolismo de los lípidos trae como consecuencia un acumulamiento de estos en el hepatocito produciendo el llamado hígado graso (Kennedy 1990). Por su parte, la alteración más importante al metabolismo de las proteínas está expresado en un exceso en la síntesis de colágena que da como consecuencia la fibrósis del parénquima hepático (Kennedy 1990).

El conjunto de todas estas alteraciones metabólicas pueden ser responsables de una amplia gama de cambios patológicos siendo estos tan leves que sean asintomáticos o tan extensos que produzcan la muerte del individuo (Mufti 1989). El estado patológico que más ha sido estudiado es la cirrosis hepática (Figura 2).

La cirrosis hepática se caracteriza por necrosis y una respuesta inflamatoria general del parénquima hepático, aunado a un incremento en el depósitos de colágena (alteración en el metabolismo protéico) y grasa (alteración al metabolismo de los lípidos) en la célula. Durante el desarrollo de la cirrosis, extensas áreas de tejido hepático son sustituidas por depósitos de colágena y grasa lo que trae como consecuencia la formación de nódulos (tejido cicatrizal). Los factores exactos que desencadenan estas alteraciones no se conocen con precisión pero están asociadas íntimamente con la ingesta aguda y/o crónica de etanol (Lieber 1991).

En contraparte al desarrollo de la cirrosis, el hepatocito tiene la capacidad de recuperarse de un suceso adverso mientras no sobrepase ciertos límites. La capacidad para recuperar tejido y función después de un suceso adverso se conoce con el nombre de regeneración hepática.

D. Regeneración hepática.

Ha sido reconocido por años que, posterior a un daño químico o retiro quirúrgico parcial de su tejido, el hígado inicia una serie de cambios conocidos en conjunto con el nombre de regeneración, que están encaminados a la recuperación del tejido perdido o afectado en el aspecto anatómico y funcional (Higgins y Anderson 1931). Los mecanismos exactos por los cuales el hígado se regenera aún no se conocen con precisión y ha recibido mucha atención en los últimos tiempos, ya que la regeneración hepática es un excelente modelo experimental para estudiar los procesos que determinan la proliferación celular (Michalopoulos 1991).

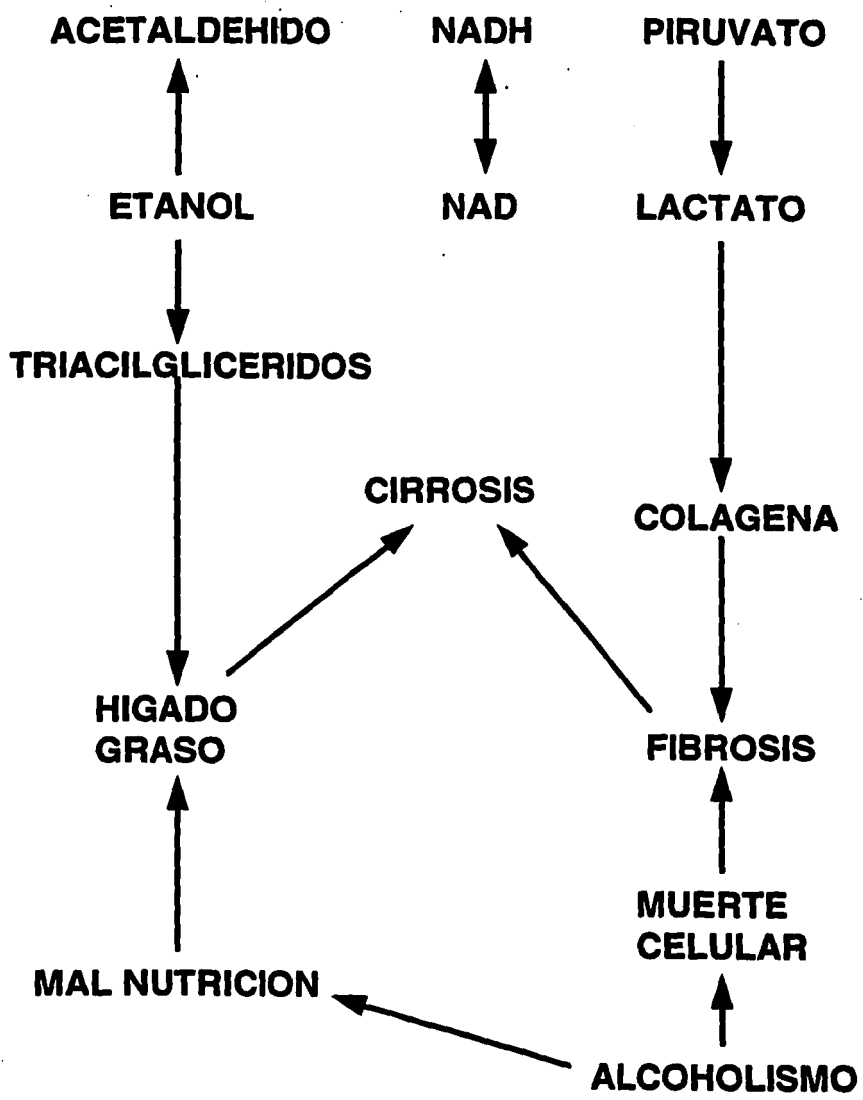


FIGURA 2: Relación del metabolismo intermedio y la oxidación del etanol en el posible desarrollo de la cirrosis hepática (Modificado de Crow 1979).

Los mecanismos que regulan la proliferación de los hepatocitos han sido estudiados en modelos de hígado fetal, cáncer hepático y regeneración hepática. En todos estos casos, la proliferación celular es el factor común a todos ellos y es este fenómeno el que está sujeto a regulación precisa por parte de la célula, el tejido y el organismo en general (Fausto 1993).

De los modelos más utilizados para el estudio de la regeneración hepática, el más común es la hepatectomía parcial (retiro quirúrgico del 70% del tejido hepático) en animales de laboratorio (rata, conejo, cuyo, perro). Puesto que el hígado está dividido en lóbulos, es posible quitar algunos de ellos que representen el equivalente del 70% del tejido hepático total y dejar un remanente del 30%. El proceso de crecimiento del hígado implica la proliferación de las células de el (los) lóbulo(s) remanente(s). Esto último no implica la restauración de los lóbulos escindidos; esto es, no debe confundirse el fenómeno de crecimiento y restitución de una parte amputada (como la amputación de la cola en una lagartija), con el fenómeno de la regeneración hepática. En este último caso, el(los) lóbulo(s) remanente(s) entra(n) en proliferación celular hasta restituir al tejido hepático funcional que originalmente tenía. Este crecimiento y proliferación terminan a los 10-14 días (en la rata), después de la cirugía (Fausto 1993, Higgins 1931). Una pregunta importante que todavía no ha sido contestada, es explicar el funcionamiento óptimo del hígado remanente que mantiene al tejido funcional. Responder a esta pregunta requiere un detallado examen de los mecanismos que inician, mantienen y terminan la regeneración hepática. En este tipo de estudios, es de ayuda el identificar las fases del proceso regenerativo e intentar identificar los eventos que regulan cada una de ellas. En fibroblastos quiescentes, y en algunos tipos de células epiteliales en cultivo, la activación del crecimiento parece estar dividida en dos fases: competencia y progresión. En el estado de competencia (o competente), la célula pone en marcha los mecanismos para poder entrar al ciclo celular (paso de la célula de la fase G0 a G1). En el estado de progresión, la célula que ha entrado a la fase G1 avanza hasta completar un ciclo celular para replicar al DNA. La separación entre estas dos fases es hasta cierto punto arbitraria, pero la importancia de ambos conceptos radica en que permite la búsqueda de factores cuya expresión está restringida a un tiempo determinado durante el ciclo celular. Con ello, es posible determinar las diferencias fundamentales entre una célula quiescente (en estado G0) y otra que ha iniciado la proliferación (estado G1) (Figura 3).

La proliferación hepática se inicia 12 o 14 horas después de la hepatectomía parcial lo que permite una separación entre un estado pre-replicativo (0 a 14 horas) y un estado replicativo (14 a 24 horas) (Steiner 1966). Por conveniencia, se distingue una fase inicial que

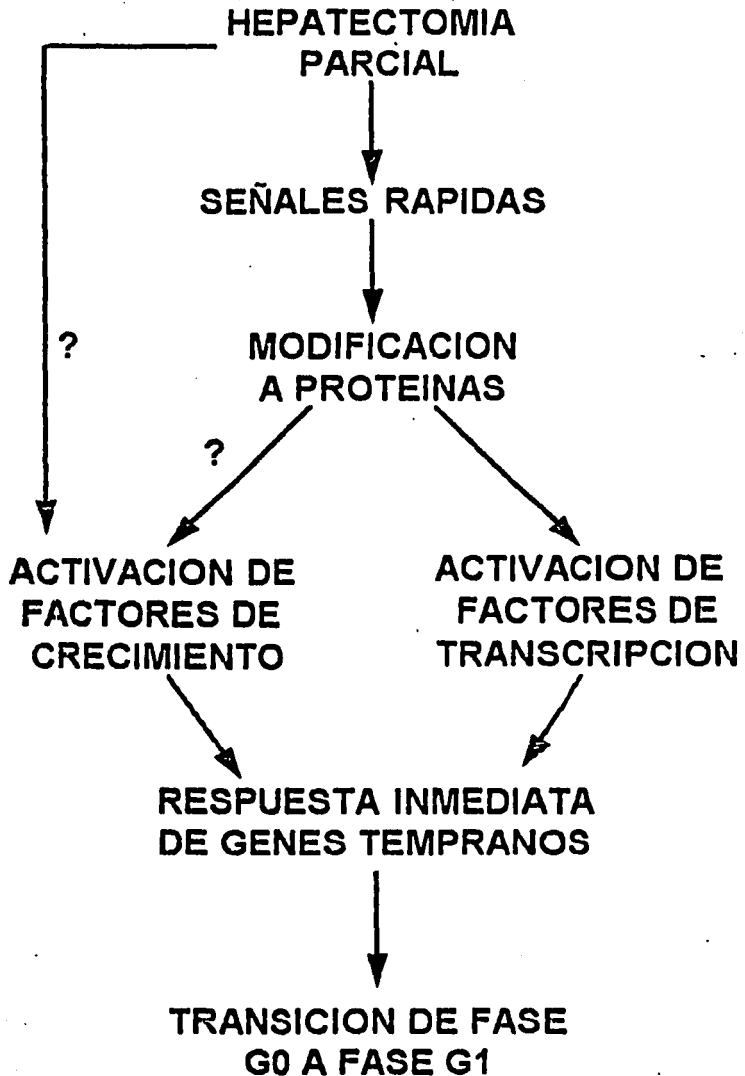


FIGURA 3: Posibles eventos celulares que originan el inicio de la división celular en el hígado en regeneración (Tomado de Fausto 1993).

es la de competencia (o fase de iniciación) que corresponde al paso de la fase G0 a fase G1 y corresponde a las primeras 4 horas después de la hepatectomía parcial y, una segunda fase de progresión que indica el paso de la fase G1 a la fase S. La fase G1 inicia en diversas áreas del parénquima hepático remanente y su duración es variable por lo que la fase de progresión es menos sincrónica que la de iniciación pero termina cuando la célula sintetiza DNA el cual tiene un pico de síntesis a las 22-24 horas (en rata). La sucesión entre la fase de inicio y progresión depende directa o indirectamente de la activación/inibición de genes, la activación y regulación de circuitos autócrinos y parácrinos, y la activación de la maquinaria necesaria para la replicación del DNA (Fausto 1993).

Es precisamente en estas fases tempranas de la regeneración, cuando el proceso es más susceptible de ser interrumpido o alterado ya que las señales iniciales pueden ser bloqueadas dando como consecuencia la no regeneración del tejido (Fausto 1993).

E. Regeneración hepática y etanol.

Estudios hechos en animales de laboratorio han demostrado que la ingesta aguda o crónica de etanol inhibe el proceso de la regeneración hepática pero se desconocen al momento los mecanismos exactos de esa inhibición (Wands 1979; Orrego 1981).

Para demostrar que el etanol inhibe a la regeneración hepática se han utilizado marcadores que indican la proliferación celular tales como la determinación de la síntesis *de novo* del DNA; determinación de la actividad específica de enzimas relacionadas directa o indirectamente con la síntesis de DNA (por ejemplo, ornitín descarboxilasa, timidín quinasa); determinación de la ganancia de peso en el hígado remanente; determinación de la aparición de factores de crecimiento celular (tales como el factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento epidermoide, entre otros); determinación de poliaminas (espermina, espermidina, putrescina); y más recientemente, determinación de la activación de genes tempranos (c-myc, c-fos, c-ras)(Michaloupulus 1990). Estos indicadores han sido de utilidad para tratar de discernir los mecanismos de daño provocados por el etanol en el hígado regenerante, sin embargo, poco se ha estudiado acerca de los cambios en el metabolismo intermedio que el etanol provoca en el hígado en regeneración. Este tipo de estudios pueden ayudar a discernir los mecanismos metabólicos puestos en juego para enfrentarse a una intoxicación con etanol y que explique a su vez algunas alteraciones moleculares en el proceso regenerativo.

El etanol afecta de manera importante al hepatocito por lo menos a dos niveles que interactúan entre sí: a) nivel metabólico y b) nivel molecular. Entendemos como nivel

metabólico todas aquellas reacciones bioquímicas anabólicas y catabólicas (metabolismo intermedio) que se llevan a cabo en una célula, y entendemos por nivel molecular todos aquellos procesos relacionados con la expresión genética y la duplicación del DNA hasta la culminación en una división mitótica inclusive (Devlin 1992, Lewin 1992). Estos dos niveles actuando en conjunto y de manera sincrónica constituyen la homeostasis celular (Devlin 1992).

En modelos experimentales con animales de laboratorio con hepatectomía parcial (retiro quirúrgico del 70% del tejido hepático) y con una ingesta aguda de etanol (hasta 5 g/kg peso) previa a la cirugía, Wands (1979) y Orrego (1981) reportaron una disminución en la ganancia de peso del hígado remanente y en la incorporación de [³H]timidina al DNA que se sintetiza *de novo*. Esta inhibición es directamente proporcional al tiempo de administración; esto es, entre más tempranamente se administre el etanol antes de la cirugía, existe una menor incorporación de [³H]timidina al DNA así como menor recuperación de tejido hepático. A su vez Leevy (1979) demostró que en ratas con ingesta de una sola dosis de etanol durante las primeras 12 h posteriores a cirugía produce una disminución en la síntesis de DNA, el crecimiento hepático y en la actividad específica de la enzima ornitín descarboxilasa.

Los datos anteriores señalan el efecto tóxico temprano del etanol en la regeneración hepática que afecta a nivel molecular. Por su parte, Pösö (1976, 1979) reportó un aumento en las concentraciones de lactato, piruvato y aceto-acetato en el hígado remanente de ratas intoxicadas con etanol en comparación de ratas que solo fueron parcialmente hepatectomizadas, sugiriendo una alteración en el estado metabólico general del hepatocito que puede influir en el proceso regenerativo.

JUSTIFICACION

Los mecanismos exactos por los cuales el etanol produce daño al hepatocito no se conocen con precisión. Los estudios encaminados a dilucidar estos mecanismos ayudarían en la prevención y/o tratamiento de los problemas fisio-patológicos que desencadena este xenobiótico en el organismo.

Durante la regeneración hepática, el metabolismo intermedio del hepatocito se modifica profundamente para llevar a cabo el proceso mitótico. Tales procesos metabólicos de ajuste pueden ser alterados por la presencia del etanol ya que este xenobiótico altera los procesos metabólicos generales en el hepatocito normal por lo que es de esperar que la presencia de esta molécula perturbe el metabolismo general del hígado en regeneración.

Puesto que los carbohidratos son la fuente primaria de obtención de energía en la célula y que el etanol altera el metabolismo energético del hepatocito, la presencia de carbohidratos puede favorecer el metabolismo intermedio del hígado más aún cuando está en estado regenerante puesto que en ese estado existe una mayor demanda metabólica.

OBJETIVOS

Los objetivos generales del presente estudio consisten en:

- A). Determinar el efecto metabólico del etanol en ratas que han sido parcialmente hepatectomizadas; así como elucidar los posibles mecanismos por los cuales este xenobiótico interfiere con la regeneración hepática.**
- B) Determinar el efecto que sobre el metabolismo general tiene la ingesta de etanol sobre el hígado en regeneración y como es modificado por la presencia de sacarosa.**
- C) Establecer el perfil metabólico del hígado en regeneración, con la ingesta de etanol y con la presencia de sacarosa.**

- D) Determinar si la ingesta de sacarosa es capaz de revertir los efectos tóxicos que el etanol tiene sobre el hígado en regeneración tomando en cuenta indicadores de regeneración, metabólicos y funcionales en las ratas sometidas a hepatectomía parcial.**

- E) Establecer la relación que guarda la ingesta de sacarosa con la reversión de los daños provocados en el hígado en regeneración en ratas intoxicadas con etanol.**

MATERIAL Y METODOS

A. Material biológico.

Se emplearon ratas macho Wistar (230-260 g de peso) alimentadas con Nutricubos (Purina Rat Chow, St. Louis MO.) y agua *ad libitum*, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

B. Procedimiento general.

Los animales fueron sometidos a laparotomía seguido de hepatectomía parcial (HP; retiro del 70% del tejido hepático) de acuerdo a la técnica de Higin y Anderson (1931), bajo anestesia continua con éter dietílico. Los animales así operados se agruparon de acuerdo a cada uno de los siguientes tratamientos, administrados por sonda gástrica inmediatamente después de la cirugía: a) etanol (EtOH; 5g/kg peso; solución al 63% en agua); b) sacarosa (Sac; 1g/100g peso, en solución acuosa); c) mezcla sacarosa-etanol (Sac-EtOH; sacarosa disuelta en EtOH a las concentraciones descritas en a y b); d) grupo de ratas con solo hepatectomía parcial (grupo HP) sin tratamiento alguno y como controles, ratas únicamente laparotomizadas (sometidas al estrés quirúrgico y que desde ahora definiremos como: ratas control o sham).

A diversos tiempos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previa anestesia con pentobarbital (40 mg/kg). La sangre fué recolectada agregando EDTA (10mg) como anticoagulante y el hígado fué aislado e inmediatamente homogenizado en 5 volúmenes de amortiguador de sacarosa (sacarosa 0.25 M, Tris 0.01 M, EGTA 0.3 mM y albúmina bovina 0.2%, pH 7.4) frío. El homogenado fué sometido a centrifugación diferencial para la obtención de fracción mitocondrial y citosólica. Para la obtención de fracción mitocondrial, el homogenado fué centrifugado a 7500 rpm mientras que para la obtención de fracción citosólica el homogenado fué centrifugado a 45000 rpm.

C. Microscopía de luz y electrónica.

Muestras de hígado fueron procesadas para examinarlas con microscopio de luz y electrónico. Para microscopía de luz, el tejido fué fijado en 10 volúmenes de formaldehído (10% v/v en amortiguador de fosfatos; pH 7), y teñido por técnicas convencionales con hematoxilina/eosina, observándo los cortes con un microscopio Leitz-Dialux 20.

Para microscopía electrónica, las muestras se fijaron por dos horas en glutaraldehído

(2% v/v en solución amortiguadora de fosfatos pH 7) para posteriormente ser teñirlas con acetato de uranilo y citrato de plomo, observándose éstas en un microscopio electrónico JEOL 1200EX-II.

D. Marcadores de regeneración hepática.

La regeneración hepática se evaluó a las 24 h post-tratamiento tomando en cuenta los tres marcadores siguientes: a) incorporación de [³H]timidina al DNA nuclear; b) determinación de la actividad de la enzima timidín quinasa (TK) en citosol; y, c) cuantificación del tejido hepático restituido de acuerdo a las fórmulas usadas por Orrego (1981).

Dos horas antes del sacrificio, a los animales se les aplicó por vía intraperitoneal una dosis de [³H]timidina (10 μ Ci/100 g peso corporal). Una vez sacrificados, se retiró el hígado remanente y se homogenizó en 5 volúmenes de solución A de citrato (citrato 2.5%; Tritón X-100 0.14%). El homogenado se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos descartando el sobrenadante. El precipitado fué resuspendido en 5 volúmenes de la misma solución A y colocada en la parte superior de la solución B (Sacarosa 0.88 M, ácido cítrico 2.5 %) centrifugándose 10 minutos a 3500 rpm recuperándose los núcleos en el fondo del tubo (Reiners y Busch, 1988). Los núcleos fueron resuspendidos en 2 volúmenes de solución A y se tomó una muestra en donde se aisló DNA por precipitación ácida (1 volumen de núcleos en 4 volúmenes de solución acuosa de ácido tricloroacético; 5% v/v) y cuantificación (100 μ l de precipitado ácido) de radioactividad incorporada en cpm por miligramo de DNA, expresándose como porcentaje de ganancia con respecto al control. Se determinó la cantidad de DNA por el método colorimétrico de Burton (1983) utilizando difenitamina como colorante.

La actividad de la enzima TK se determinó de acuerdo a la técnica de Fukui (1971) en fracción citosólica obtenida por centrifugación diferencial ya descrito con anterioridad. Brevemente, 200 μ g de proteína de fracción citosólica fueron incubados 60 minutos en 5 ml de amortiguador de TRIS (TRIS-HCl 1mM; EDTA 0.1 mM; MgCl₂; ATP 4.5 mM; pH 8.0) al cual se le agregó 1 μ mol de [³H]timidina (90Ci/mMol) y 100 μ mol de timidina fría. Al término de la incubación, se paró la reacción calentando 2 minutos en agua hirviendo. La mezcla fué centrifugada 5 minutos a 3000 rpm, tomándose el sobrenadante el cual fué filtrado (filtro Whatman No. 5) y lavado 3 veces con 10 volúmenes de etanol. El filtro fué secado y colocado en viales para determinar la radioactividad incorporada agregándose 10 ml de líquido de centelleo.

La recuperación del tejido hepático posterior a la HP se determinó de acuerdo con las

fórmulas de Orrego y cols. (1981). Para ello, el peso del hígado resecado fué tomado como el 70% del peso total del hígado y así, el peso total antes de la hepatectomía fué calculado como: $(100/70) \times$ peso del hígado removido. El peso esperado del hígado remanente fué calculado como: $(30/100) \times$ el peso del hígado antes de la hepatectomía. Al momento del sacrificio, el hígado remanente fué pesado y el porcentaje de hígado ganado después del tratamiento fué calculado como: $(\text{peso actual del hígado remanente} - \text{peso esperado del hígado remanente})/\text{peso del hígado antes de la hepatectomía} \times 100$. Así, la ganancia de peso del hígado remanente es expresada como un porcentaje a la 24 h después del(os) tratamiento(s).

E. Determinación de actividad enzimática.

En la fracción citosólica se cuantificó la actividad específica de las siguientes enzimas:

- a. Alcohol deshidrogenasa (ADH) por el método de Bonnischen (1983);
- b. Lactato deshidrogenasa (LDH) por el método de Wahlefeld (1983).
- c. Malato deshidrogenasa (MDH) de acuerdo al método de Smith (1986);
- d. Transaminasa glutámico-oxaloacética (TGO) por el método de Rej y Horder (1983);

En la fracción mitocondrial, se determinó la actividad específica de las siguientes enzimas:

- a. Glutámico deshidrogenasa (GDH) por el método de Tottmar (1973);
- b. Transaminasa glutámico oxaloacética por el método de Rej y Horder (1983);
- c. Malato deshidrogenasa de acuerdo al método de Smith (1986);
- d. Citocromo oxidasa (COx) por el método de Rafael (1983).

Alcohol deshidrogenasa: La actividad específica de la ADH fué determinada en 100 μg de proteína citosólica disuelta en 3 ml de amortiguador de glicina (Glicina 21 mM, semicarbazida 75 mM, pH 8.7) y NAD (24mM) iniciando la reacción con 10 μl de etanol (30 mM) siguiendo la reacción por 5 minutos a 340 nm.

Lactato deshidrogenasa: Esta enzima fué determinada en 20 μg de proteína citosólica en 3 ml de amortiguador de Tris-NaCl (Tris-HCl 81.3 mM; NaCl 200 mM; pH 7.2) agregando NADH (0.244 mM) e iniciando la reacción con piruvato (9.76 mM disuelto en Tris-NaCl) siguiéndola por 3 minutos a 340 nm.

Malato deshidrogenasa: La actividad específica de esta enzima fué determinada tanto en fracción citosólica (200 µg proteína) como en fracción mitocondrial (100 µg proteína) utilizando 3 ml de amortiguador de dietanolamina (Dietanolamina 0.1 M; MgCl₂ 5 mM; pH 9.2) agregado de NAD (3.6 mM). La reacción se inició agregando 0.25 ml de solución de malato (malato 250 mM) y siguiendo la reacción por 3 minutos a 340 nm.

Transaminasa-Glutámico-Oxaloacética: Esta enzima fué determinada tanto en fracción citosólica como en fracción mitocondrial (100 µg c/u) en 3 ml de amortiguador de aspartato-Tris (aspartato 300 mM; Tris 100 mM; pH 7.8) al que se agregó 0.1 ml de una solución de enzimas (malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa a 2 mg/ml de cada una en una solución de agua/glicerol 1:1); 0.5 ml de solución de fosfato de piridoxal (5.4 mM) y NADH (0.3 mg/ml). La reacción fué iniciada agregando α-cetoglutarato (12 mM) y siguiendo la reacción por 3 minutos a 340 nm.

Glutámico deshidrogenasa: La actividad específica de esta enzima fué determinada en 50 µg de proteína mitocondrial en un amortiguador de fosfato-acetato (KH₂PO₄ 75 mM; acetato de amonio 1.2 M; pH 7.4) agregado de NADH (9 mM) y ADP (90 mM). La reacción fué iniciada agregando 50 µl α-cetoglutarato (480 mM) siguiendo la reacción por 5 minutos a 340 nm.

Citocromo oxidasa: Esta enzima fué determinada por oximetría, utilizando 100 µg de proteína mitocondrial disuelta en 10 ml de amortiguador de fosfatos-EDTA (KH₂PO₄ 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7.2) agregado de ácido ascórbico (0.1 M), Citocromo "C" (5mg/ml) y N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (50 mM) en un oxímetro (Gilson N1), siguiendo la reacción por dos minutos.

F. Determinación de metabolitos.

De la sangre obtenida, se aisló el plasma en donde se determinaron los siguientes metabolitos: a) glucosa; b) triacilglicéridos; c) albúmina; d) bilirrubina total; e) urea, f) amonio (en sangre total).

La glucosa, albúmina, bilirrubina total y triacilglicéridos fueron determinados utilizando "kits" de reactivos marca Sigma (Sigma Chemicals St. Louis MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. La urea fué determinada en un extracto perclórico de plasma (1:5; ácido perclórico 4% p/v; neutralizado con KOH antes de la determinación) por el método de

Gutman y Bergmeyer (1963) utilizando ureasa y determinando a 436 nm. El amonio fué determinado por el método de Bergmeyer y Beutler (1973) utilizando un extracto ácido de sangre total (1:1; ácido tricloroacético 10% p/v).

Se determinó en extracto ácidos de hígado los siguientes metabolitos: a) piruvato (Lamprecht 1983); b) lactato (Noll 1983); c) β -hidroxibutirato y acetoacetato (Kientsch-Engel 1983); d) NAD^+ y NADPH , Klingenberg (1983). El procedimiento general fué el siguiente: Inmediatamente después del sacrificio, se tomó una muestra de hígado al que se agregó 5 volúmenes de ácido perclórico (6% v/v) frío e inmediatamente homogeneizado. El homogenado fué centrifugado 5 minutos a 5000 rpm; recolectándose el sobrenadante y dividido en alícuotas las cuales se congelaron a -70°C hasta su procesamiento posterior, previa neutralización con K_2CO_3 .

El piruvato fué determinado utilizando un amortiguador de trietanolamina (trietanolamina 0.4 M; EDTA 100 mM; pH 7.6) y NADH (5 mM) iniciando la reacción con lactato deshidrogenasa y siguiéndola por 5 minutos a 340 nm.

El lactato fué determinado utilizando un amortiguador de glicina-hidrazina (glicina 1 M; hidrazina 0.4 M; EDTA 5 mM; pH 9.5) y NAD^+ (50 mM) iniciando la reacción con lactato deshidrogenasa, siguiéndola por 3 minutos a 340 nm.

El acetoacetato fué determinado utilizando un amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4 , 0.1 M; pH 7.0) y NADH (60 mM) e iniciando la reacción con β -hidroxibutirato deshidrogenasa, siguiéndola por 5 minutos a 340 nm.

El β -hidroxibutirato fué determinado en un amortiguador de Tris-hidrazina (Tris 0.1 M; hidrazina 0.1 M; pH 8.5) y NAD^+ (1.3 mM) iniciando la reacción con β -hidroxibutirato deshidrogenasa, siguiéndola por 5 minutos a 340 nm.

El NADPH fué determinado en un amortiguador de trietanolamina-fosfato (Trietanolamina 0.5 M; KH_2PO_4 0.1 M; K_2HPO_4) con α -cetoglutarato (0.1 M) iniciando la reacción con glutamato deshidrogenasa y siguiéndola por 5 minutos a 340 nm.

El NADP^+ fué determinado usando una solución de MgSO_4 (1 M) y glucosa-6-fosfato (200 mM) iniciando la reacción agregando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y siguiéndola a 340 nm.

La relación NAD/NADH fué calculada usando la siguiente ecuación: $\text{NAD}/\text{NADH} = [\text{sustrato oxidado}]/[\text{sustrato reducido}] \times 1/K_{\text{eq}}$. Se tomó en cuenta la K_{eq} de la lactato deshidrogenasa para la fracción citosólica y la K_{eq} de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa para la fracción mitocondrial (Christensen 1979).

Se determinó el curso temporal de la concentración de EtOH en muestras de sangre total tomadas de la punta de la cola en los grupos tratados con EtOH. La determinación se realizó en un extracto perclórico (ácido perclórico 0.66 M, 1:5) de acuerdo a la técnica de Bernt y Gutman (1974).

La proteína en todas las muestras fué determinada de acuerdo al método de Lowry (1951) utilizando albúmina bovina como estandar.

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por la "t" de Student.

RESULTADOS

A. Sobrevivencia.

El grupo de animales que fueron HP y que recibieron etanol, presentaron una sobrevivencia del 75% a 24 h posteriores al tratamiento indicando con ello el riesgo que conlleva la administración de este tóxico durante la regeneración. Por otra parte, los grupos que recibieron sacarosa, mezcla Sac-EtOH o simplemente fueron HP tuvieron una sobrevivencia del 100% para cualquier tiempo dado, indicando con ello un efecto benéfico en la sobrevivencia del animal cuando recibe Sac en animales tratados con EtOH.

B. Hallazgos a microscopía de luz y electrónica.

Como un primer paso para caracterizar la acción deletérea del etanol y el efecto de la sacarosa sobre la morfología general del hepatocito, se tomaron muestras de hígado de cada uno de los grupos tratados y se observaron a microscopía de luz y electrónica.

a. Microscopía de luz.

Los hallazgos encontrados a microscopía de luz están contenidos en la **Figura 4 y Tabla I**. Los datos a evaluar fueron: picnosis, tipo de población celular predominante (oscura o clara), edema, infiltrado de células inflamatorias y la congestión de los vasos sanguíneos. Estos marcadores determinan el grado de daño del tejido (Stenger 1966).

Cuando una muestra de hígado en regeneración es vista al microscopio de luz, pueden apreciarse dos tipos de poblaciones de hepatocitos (**Figura 4-A y 4-B**): un tipo de hepatocitos que se tiñen intensamente con los colorantes (células oscuras) y, un segundo tipo que se tiñen en menor grado (células claras) (Stenger y Virágh 1966). Se considera que las células oscuras están dañadas o que están en fase G0 mientras que las células claras son consideradas como células que han pasado por la fase G1 y están en fase S o G2 del ciclo celular indicando su pronta división por mitosis (Stenger y Virágh 1966, Lewin 1992). Esta disminución en la coloración de las células es debido a que, cuando un hepatocito entra en fase de replicación, antes de la división mitótica, tiene que aumentar su masa celular con el objeto de tener suficiente material citoplásmico para las dos células, por lo que los materiales de tinción se ven diluidas en estas células (Lewin 1992). Por otro lado, las células en fase G0 o dañadas retienen más colorante porque lo concentran en menor volumen. En las muestras de los grupos tratados con EtOH, fué patente el predominio de la población celular oscura

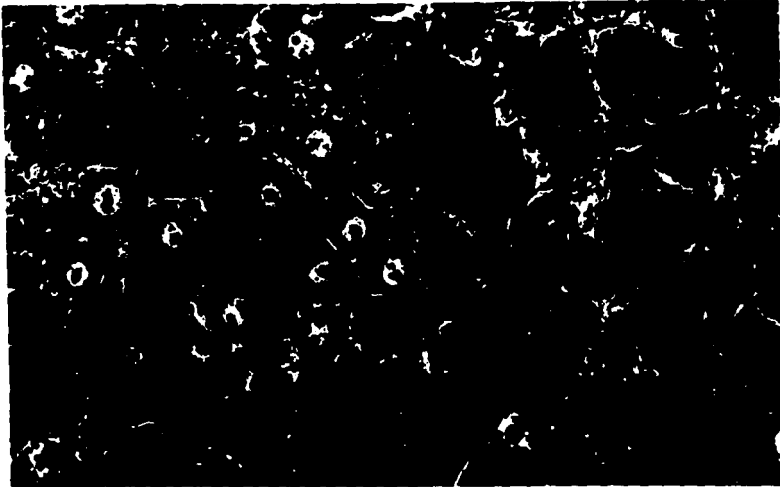
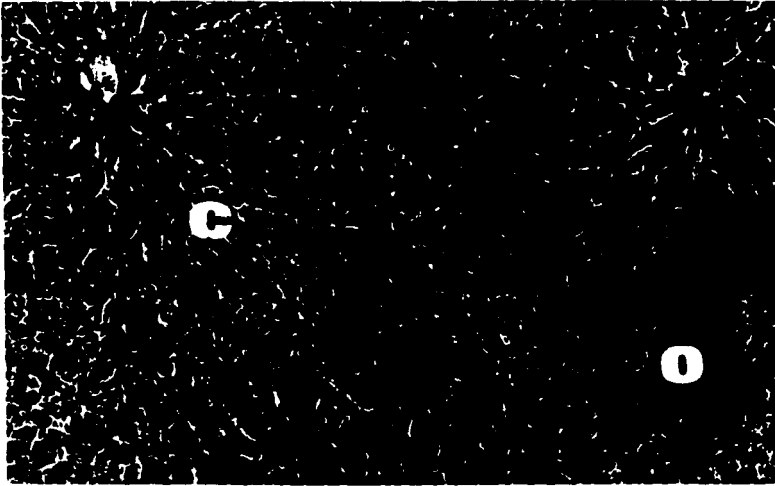


FIGURA 4: Microfotografías con microscopio de luz de una muestra representativa de hígado en regeneración teñido con hematoxilina/eosina, que demuestran la presencia de células "claras" (que se tiñen poco) y células "oscuras" (que se tiñen intensamente). La presencia de células claras denota un proceso regenerativo mientras que las células oscuras indican un tejido dañado. **A:** Población representativa de una muestra de tejido (20x) para observar las células claras (C; parte central y superior izquierda) y las células oscuras (O; parte central e inferior derecha). **B:** Detalle de la figura A (40x) en donde se observan células claras (flechas) rodeadas por células oscuras.

FALLA DE ORIGEN

TABLA I: VALORACION DEL TEJIDO HEPATICO POR MICROSCOPIA DE LUZ DE CADA UNO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

PARAMETRO	GRUPOS				
	CONTROL	HP	HP + E	HP + S	HP + E + S
PICNOSIS (CELULAS/CAMPO)	0/40	2/40	7/40	3/40	3/40
POBLACION CELULAR (OBSCURA/CLARA) %	0/100	10/90	40/60	20/80	20/80
EDEMA CELULAR	ND	+	+++	++	++
INFILTRADO	ND	+	+	+	+
CUERPOS VACUOLARES	ND	++	++++	++	++
CONGESTION	ND	+	+++	++	++

La evaluación histológica fué realizada de acuerdo a los allazgos por microscopía de luz en un campo de 40x en tinciones de hematoxilina/eosina. La clasificación de la población celular en "clara" y "obscura" esta basada de acuerdo a la intensidad de color que toma el tejido.
+ leve; ++ moderado; +++ acentudado; ++++ severo. ND no detectado; HP: hepatectomía parcial; S: sacarosa; E: etanol.

sugiriendo con ello una detención en el ciclo celular mientras que aquellas que recibieron Sac o la mezcla Sac-EtOH presentan una abundancia en células claras en la misma magnitud que las ratas únicamente con hepatectomía parcial lo que indica que el tejido se encuentra en fase de duplicación.

En la Tabla I están contenidos los resultados de la evaluación conjunta del tejido en cada uno de los grupos de estudio. La picnosis y el tipo de población celular indican el grado de "daño" o "regeneración" que presenta el hígado después de haber sido sometido a algún tipo de estrés (Stenger y Virágh 1966). La picnosis fué mayor en las ratas que recibieron EtOH mientras que las que recibieron Sac o la mezcla Sac-EtOH tienen la misma cantidad de células picnóticas por campo. También se encontró mayor cantidad de cuerpos vacuolares, edema celular y congestión en el grupo tratado con EtOH. Estos mismos indicadores son muy semejantes entre los grupos únicamente con hepatectomía parcial, el que recibió Sac o la mezcla Sac-EtOH.

b. Microscopía electrónica.

Las Figuras 5 a la 7 muestran el aspecto típico que a microscopía electrónica presentan los hepatocitos de cada uno de los grupos de estudio.

La Figura 5-A muestra un hepatocito procedente de una rata control en donde se observan las estructuras celulares conservadas y en estado normal.

La Figura 5-B muestra un hepatocito de rata 24 h después de la hepatectomía parcial. Se pueden observar gotas de grasa en el citoplasma además de una estructura general distinta al de la rata control. El núcleo se observa dentado y con condensaciones de cromatina; el retículo endoplásmico rugoso (RER) y liso (REL) presentaron sus cisternas dilatadas y hay un aumento en la presencia de ribosomas en el RER. Las mitocondrias se encuentran aumentadas de tamaño y su forma es irregular. Los gránulos de glucógeno y el aparato de Golgi no fueron observados.

La Figura 6 muestra un hepatocito de rata con HP que recibió EtOH, 24 h después del tratamiento. Como puede observarse, existe un aumento considerable en las gotas de grasa intracitoplásmicas. No existen imágenes de gránulos de glucógeno y la arquitectura del retículo endoplásmico rugoso y liso está completamente alterada, denotado por un aumento del espacio entre las cisternas y una disminución en la presencia de ribosomas en el RER. Las mitocondrias están considerablemente aumentadas de tamaño y su forma es completamente irregular. El núcleo se observa con indentaciones a su alrededor y un aumento

en la condensación de la cromatina.

La Figura 7-A muestra un hepatocito de rata hepatectomía parcial que recibió sólo sacarosa. El perfil que muestra fué semejante al de la rata únicamente con hepatectomía parcial con discreta disminución en las gotas de grasa con la presencia de gránulos de glucógeno.

La Figura 7-B muestra un hepatocito de rata que recibió la mezcla de Sac-EtOH. El perfil se asemeja al de la rata que sólo fué HP, aunque logran distinguirse algunos gránulos de glucógeno con disminución importante en las gotas de grasa. El resto de los organitos celulares que se evaluaron presentaron un perfil muy semejante al de los grupos de ratas únicamente con hepatectomía parcial o que recibieron sacarosa.

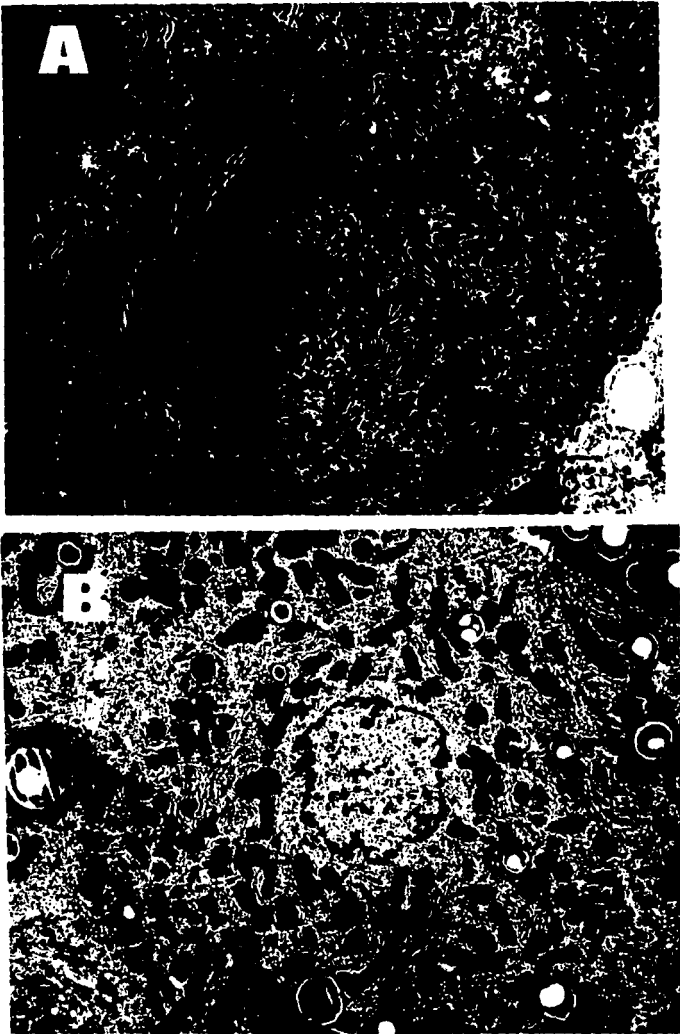


FIGURA 5: Microfotografías a microscopio electrónico (7000x) representativa de una muestra de tejido hepático proveniente de una rata control (A) y otra sometida a hepatectomía parcial (B). La barra horizontal representa 10 μm .

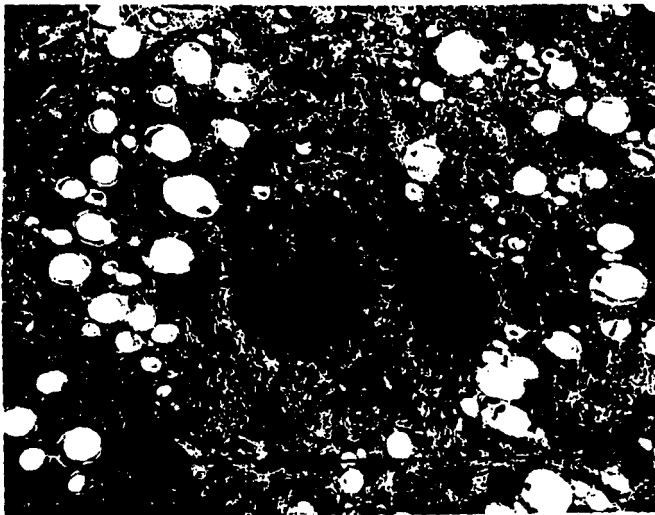


FIGURA 6: Microfotografías a microscópio electrónico (7000x) de una muestra de hígado de rata con HP e ingesta de etanol. Pueden observarse la abundancia en gotas de grasa dentro del citoplasma (flechas), con desorganización general de los componentes intracelulares. La barra horizontal representa 10 μm

FALLA DE ORIGEN

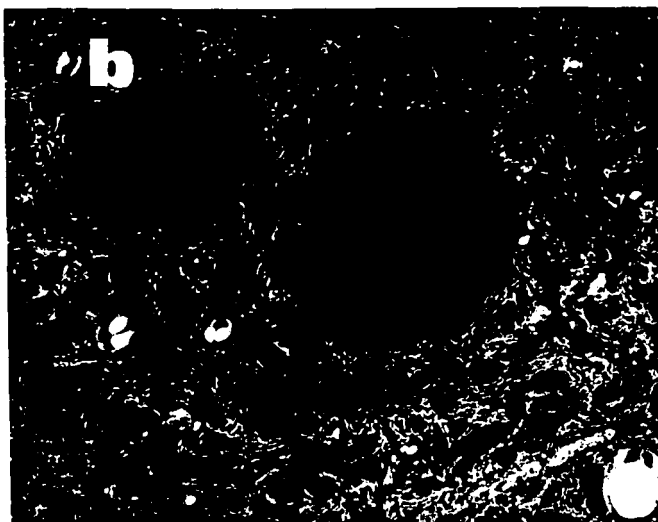
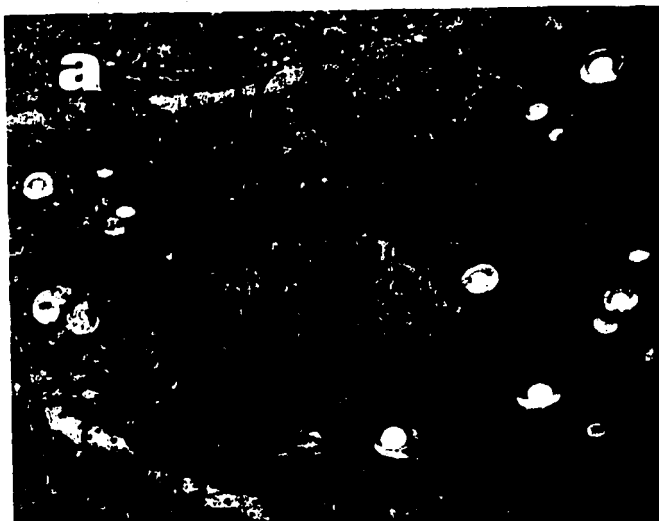


FIGURA 7: Microfotografías a microscopio electrónico (7000x) de una muestra de hígado de rata con HP e ingesta de sacarosa (A) y mezcla sacarosa-etanol (B). Ambas células muestran una imagen semejante a la rata HP con disminución en la cantidad de grasa y conservación parcial de la estructura de los organitos intracelulares. La barra horizontal representa 10 μm .

FALLA DE ORIGEN

C. Metabolitos séricos.

Los metabolitos séricos determinados fueron agrupados en dos tipos generales: los relacionados con la función del hígado y los relacionados con la homeostasis general. Todos ellos fueron determinados 24 h posteriores a los tratamientos.

La **Tabla II** contiene los metabolitos que se consideraron estrechamente asociados a la función hepática (bilirrubina, albúmina y urea); la **Tabla III** muestra los metabolitos que se tomaron en cuenta más como indicadores de la homeostasis general (triacilglicéridos, glucosa y amonio).

De los indicadores que revelan la función hepática, la albúmina fué el que más se afectó con la ingesta de etanol (**Tabla II**). Todos los grupos restantes no presentan alteraciones en ninguno de los otros metabolitos determinados, presentando valores muy semejantes entre ellos y con el control, indicando la conservación de la homeostasis hepática en los grupos con ingesta de Sac y Sac-EtOH. Es de considerar que el grupo que recibió únicamente sacarosa presentó el valor más bajo de urea lo que puede indicar una disminución en la utilización de aminoácidos para la obtención de energía ya que en estas ratas, el suplemento de carbohidratos recibidos puede ser metabólicamente energético en contraposición a los aminoácidos (Kabadi, 1987).

Por otro lado, en todos los grupos de estudio se presenta una hipoglucemia que es un poco más importante en el grupo que recibió etanol (**Tabla III**). Por el contrario, los triacilglicéridos se elevaron en todos los grupos, pero ese incremento fué mayor en las ratas tratadas con etanol, mientras que los valores para los grupos con Sac, mezcla Sac-EtOH o únicamente con hepatectomía parcial, fueron muy semejantes entre sí.

TABLA III: EFECTO DE LA HEPATECTOMIA PARCIAL, ETANOL Y/O SACAROSA EN METABOLITOS SERICOS REPRESENTATIVOS DEL METABOLISMO GENERAL.

PARAMETRO	GRUPOS				
	CONTROL	HP	HP + E	HP + S	HP + S + E
GLUCOSA (mg/dl)	140.90 ± 12.2	89.74 ± 7.13*	83.3 ± 8.7*	87.33 ± 4.5*	96.70 ± 7.5*
TRIGLICERIDOS (mg/dl)	62.0 ± 7.0	137.6 ± 18.3*	173 ± 15.4*,**	125.0 ± 21.0*	111.0 ± 19*,***
AMONIO (µmol/ml)	0.16 ± 0.06	0.22 ± 0.05*	0.35 ± 0.06*	0.16 ± 0.04	0.27 ± 0.09

Las notas son las mismas que en la tabla II.

TABLA II: EFECTO DE LA HEPATECTOMIA PARCIAL, ETANOL Y/O SACAROSA SOBRE LOS METABOLITOS SERICOS QUE REFLEJAN LA FUNCION HEPATICA.

PARAMETRO	GRUPOS				
	CONTROL	HP	HP + E	HP + S	HP + S + E
ALBUMINA (g/dl)	5.15 ± 0.14	4.81 ± 0.40	3.98 ± 0.12 ^{*,**}	4.83 ± 0.33	4.88 ± 0.11 ^{***}
BILIRRUBINA (mg/dl)	0.38 ± 0.06	0.41 ± 0.06	0.50 ± 0.12	0.44 ± 0.08	0.57 ± 0.09
UREA (µmol/ml)	8.15 ± 0.26	7.80 ± 0.25	8.45 ± 1.23	5.98 ± 0.40 ^{*,**}	7.46 ± 0.70

Los metabolitos estan expresados como la media (± ES) de 4 a 6 experimentos independientes. La diferencia estadística fué a $p < 0.05$ de acuerdo con la t de Student. * vs grupo control; ** vs grupo HP; *** vs grupo con etanol. HP: hepatectomía parsial; E: etanol; S: sacarosa;

D. Marcadores de regeneración hepática.

La Figura 8 muestra los tres marcadores de regeneración hepática evaluados en cada uno de los grupos de estudio: incorporación de [³H]timidina al DNA nuclear; actividad específica de timidín quinasa (TK) y, ganancia de peso del hígado remanente.

La Figura 8-A muestra la incorporación de [³H]timidina a los núcleos de ratas hepatectomía parcial y con ingesta de etanol, Sac, o la mezcla Sac-EtOH. El eje de las ordenadas indica la ganancia en veces en comparación con las ratas sólo sometidas al estrés quirúrgico (controles, no mostrados). Como puede verse, la incorporación de marca radioactiva aumenta hasta 16 veces en las ratas tratadas únicamente con hepatectomía parcial, mientras que las que recibieron etanol sólo aumentaron en 6 veces la incorporación. Por otro lado, las ratas que recibieron sacarosa o la mezcla Sac-EtOH tienen un aumento en la síntesis de DNA muy similar al de ratas tratadas únicamente con hepatectomía parcial, indicando con ello que la presencia de Sac en conjunto con el etanol revierte el efecto inhibitorio que el etanol tiene sobre la síntesis de DNA.

La Figura 8-B muestra la actividad de la enzima TK medida 24 h posteriores a los tratamientos. Los resultados están expresados en porcentaje sobre el control (ratas falsamente operadas) y como puede observarse, las ratas únicamente con hepatectomía parcial tienen un aumento de 370% sobre el control mientras que el resto de los grupos presenta sólo un discreto incremento en la actividad, siendo el grupo que recibió la mezcla Sac-EtOH el que mayor actividad presentó de los grupos en estudio y el grupo que recibió etanol fué el que presentó la menor actividad.

La Figura 8-C muestra el incremento de peso húmedo ganado por el hígado remanente 24 h posteriores a los tratamientos. La máxima ganancia es obtenida en los grupos que recibieron sacarosa, la mezcla Sac-EtOH y las que fueron tratadas únicamente con hepatectomía parcial. Por el contrario, las ratas que recibieron etanol muestran mucho menor incremento en la ganancia de peso húmedo.

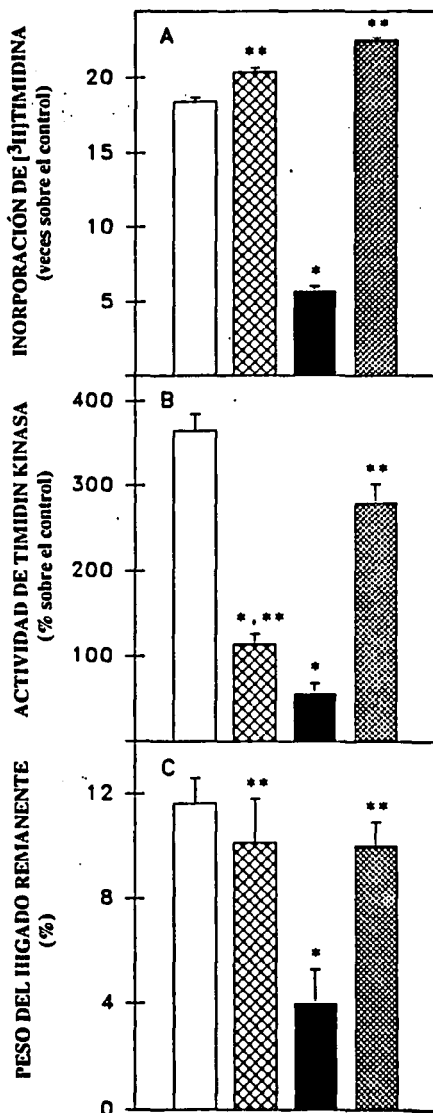


FIGURA 8: Indicadores de regeneración hepática: **A)** incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina al DNA nuclear; **B)** actividad específica de timidín quinasa y, **C)** ganancia de peso en el hígado remanente. Barra blanca: HP; barra con entrecruzado abierto: HP + sacarosa; barra negra: HP + etanol; barra con entrecruzado cerrado: HP + mezcla sacarosa-etanol. Los asteriscos denotan significancia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo al siguiente patrón: * vs HP; ** vs HP + etanol.

E. Actividad de enzimas citosólicas y mitocondriales.

Como parte de la exploración general de los efectos que el etanol tiene sobre el metabolismo del hepatocito, se determinó la actividad específica de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo intermedio. Estas enzimas fueron determinadas a distintos tiempos y hasta 24 h posteriores a los tratamientos. Se dividieron en tres tipos de acuerdo a su localización: a) enzimas citosólicas (ADH y LDH); b) enzimas mitocondriales (GDH y COx) y, c) enzimas localizadas en ambos compartimentos (TGO y MDH).

Desde las primeras tres horas posteriores a la hepatectomía parcial existe una disminución del 20% en todos los grupos de estudio en la actividad específica de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) la cual es inhibida a las 24 h hasta un 50 % de la actividad total, con respecto al control (Figura 9). Esta disminución en la actividad específica de la ADH es prevenida parcialmente por la ingesta de etanol a las 12 h posteriores al tratamiento, pero, nuevamente, al cumplirse 24 h, la actividad de esta enzima disminuye y se asemeja a la actividad que presentaron las ratas únicamente hepatectomizada. Para saber si la carga energética por ingesta de carbohidratos (isocalóricamente al etanol) puede dar el mismo resultado, se le dieron a las ratas una ingesta isocalórica de sacarosa y como muestra la Figura 9, la carga de carbohidratos no solamente no activa a la ADH, sino que presenta una inhibición aún mayor que la que presenta la misma enzima en una rata que solamente fué hepatectomizada. Por otro lado, se observa que la ADH en las ratas hepatectomizadas, independientemente del compuesto que reciban, presenta una disminución en su actividad específica, con respecto al control, del 50 %, 24 h posteriores a la hepatectomía. Los datos anteriores sugieren un mecanismo de activación de la ADH en presencia de etanol pero, tal activación es transitoria.

Por su parte, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) no presenta cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo bajo ninguna circunstancia (Figura 10). Sin embargo existe una ligera activación de esta enzima a las 24 h posteriores al tratamiento en las ratas que recibieron etanol. Estos datos muestran que esta enzima no es afectada significativamente por el proceso de regeneración o la ingesta de EtOH.

La enzima citocromo oxidasa (que se localiza en la membrana interna mitocondrial) y la glutámico deshidrogenasa (localizada en matriz mitocondrial) no son afectadas de manera importante en su actividad específica con ninguno de los tratamientos (Figuras 11 y 12). Estos datos sugieren que una enzima de membrana y otra de matriz mitocondrial no son alteradas por el proceso regenerativo o la presencia de Sac y/o EtOH.

Para determinar si existe algún cambio en la actividad de una enzima que se encuentre tanto en citosol como en mitocondria, se determinó la actividad específica de la enzima transaminasa glutámico-oxaloacética (TGO) y malato deshidrogenasa (MDH) tanto en citosol como en mitocondria. Como puede verse en la Figura 13-A, la TGO citosólica presenta una leve disminución en su actividad a las 12 h posteriores a hepatectomía pero tiende a recuperarse a las 24 h. La ingesta de etanol hace que la actividad se recupere a las 12 h pero nuevamente se equipara al control a las 24 h. La ingesta de carbohidratos no reproduce tal fenómeno.

Por su parte, la TGO mitocondrial presenta una inhibición en su actividad desde las primeras 6 h posteriores a hepatectomía con o sin etanol (Figura 13-B); esta inhibición es revertida por la presencia de carbohidratos. Por su parte, en los animales que únicamente fueron hepatectomizados o recibieron carbohidratos existe una tendencia a recuperar la actividad a las 24 h, lo que no sucede en el caso de los animales que recibieron etanol.

La enzima MDH citosólica (Figura 14-A) presenta un aumento en su actividad específica a las 12 h posteriores a hepatectomía y que recibieron etanol o carbohidratos. Esta activación se pierde a las 24 h. En contraste, las ratas únicamente hepatectomizadas no presentan cambios a lo largo del tiempo. Por su parte, la enzima MDH mitocondrial presenta desde las primeras 6 h pos-tratamiento una inhibición en su actividad específica independientemente de la presencia de etanol o carbohidratos. Esta inhibición temprana es sostenida levemente a las 12 h para ya no existir a las 24 h (Figura 14-B). Sin embargo, los animales que recibieron etanol presentan una inhibición sostenida hasta las 12 h posteriores al tratamiento para recuperarse a las 24 h.

Los resultados obtenidos con MDH y TGO sugieren que durante las primeras 24 h de regeneración celular existe una inhibición transitoria en la actividad enzimática mitocondrial, no siendo así para el citosol el cual presenta sólo cambios mínimos. Además, la presencia de etanol modifica en el corto plazo la actividad de estas enzimas lo que sugiere una posible alteración a los mecanismos de control de estas enzimas.

ALCOHOL DESHIDROGENASA

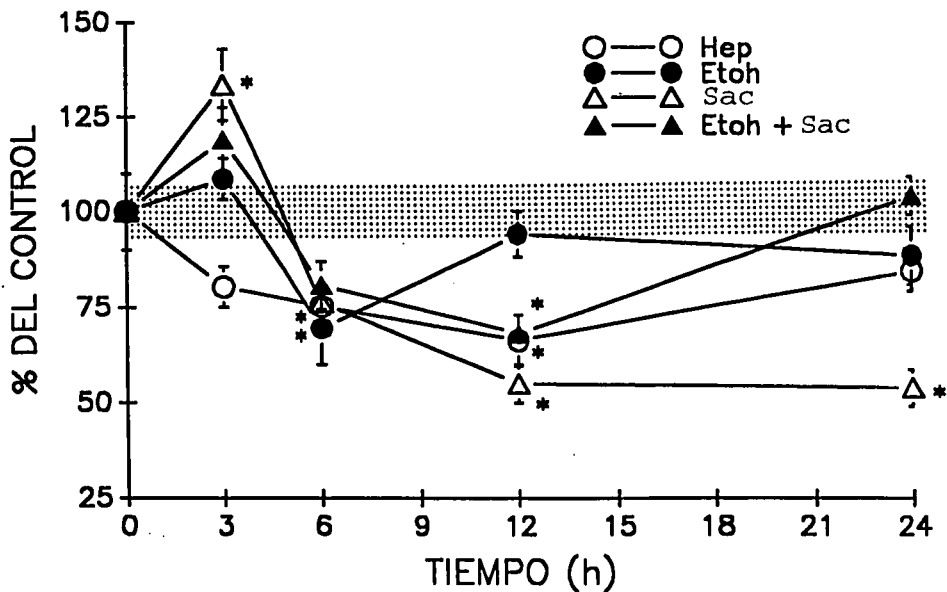


FIGURA 9. Curso temporal de la actividad específica de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en cada uno de los grupos de estudio. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (sham).

HP: hepatectomía parcial

EtOH: HP + etanol

Sac: HP + sacarosa

EtOH + Sac: HP + etanol + sacarosa

LACTATO DESHIDROGENASA

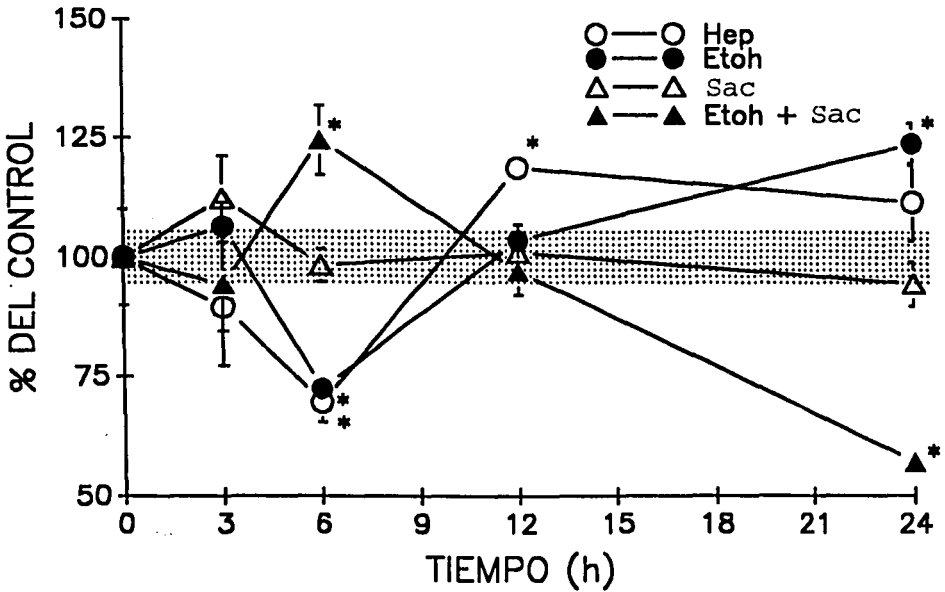


FIGURA 10. Curso temporal de la actividad específica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cada uno de los grupos de estudio. Para clave vease la figura 9.

CITOCROMO OXIDASA

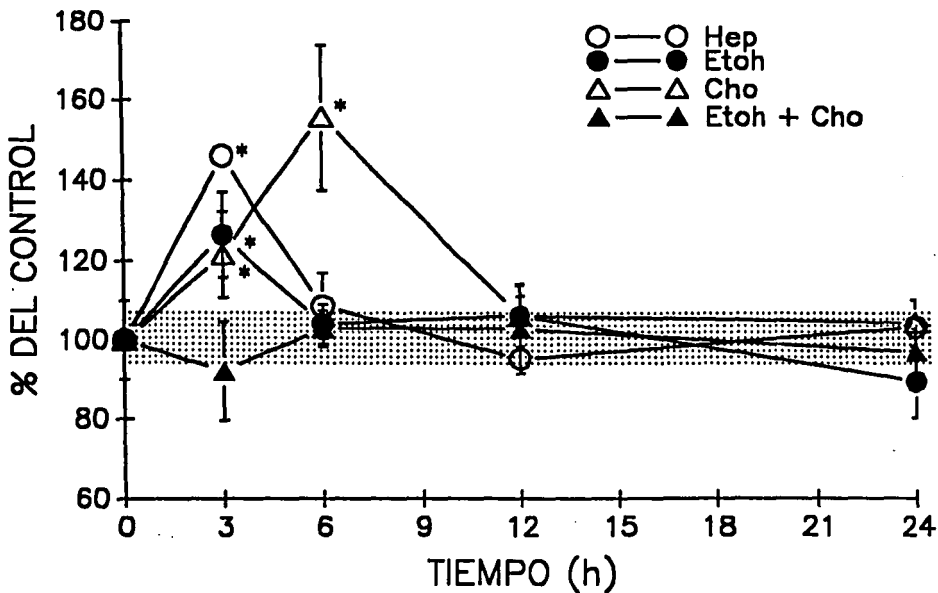


FIGURA 11. Actividad específica de la enzima mitocondrial citocromo oxidasa (ejemplo de enzima de membrana) en los grupos de estudio. Para clave vease la figura 9.

GLUTAMICO DESHIDROGENASA

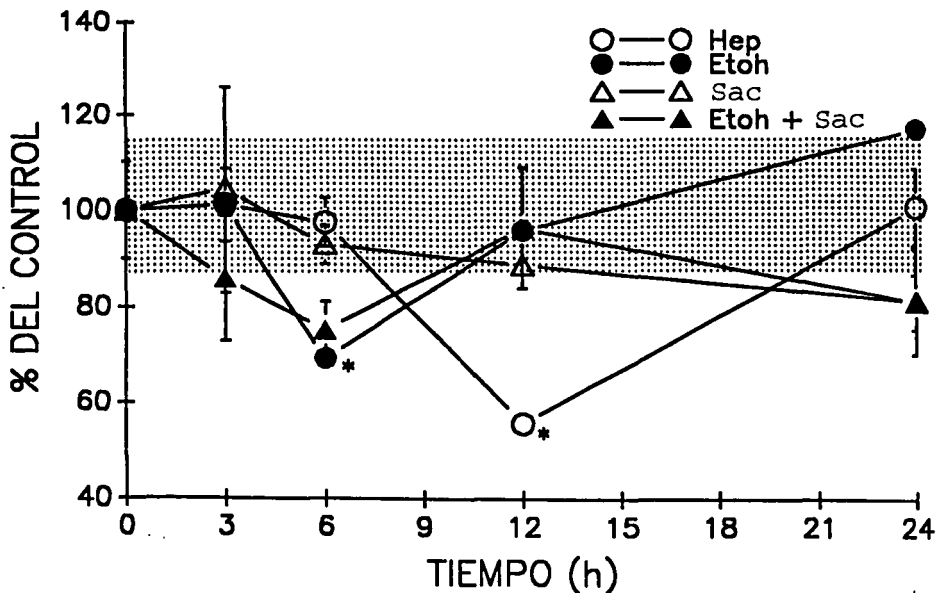


FIGURA 12. Actividad específica de la enzima glutámico deshidrogenasa (ejemplo de enzima de matriz mitocondrial) en los grupos de estudio. Para clave vease la figura 9.

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALOACETICA

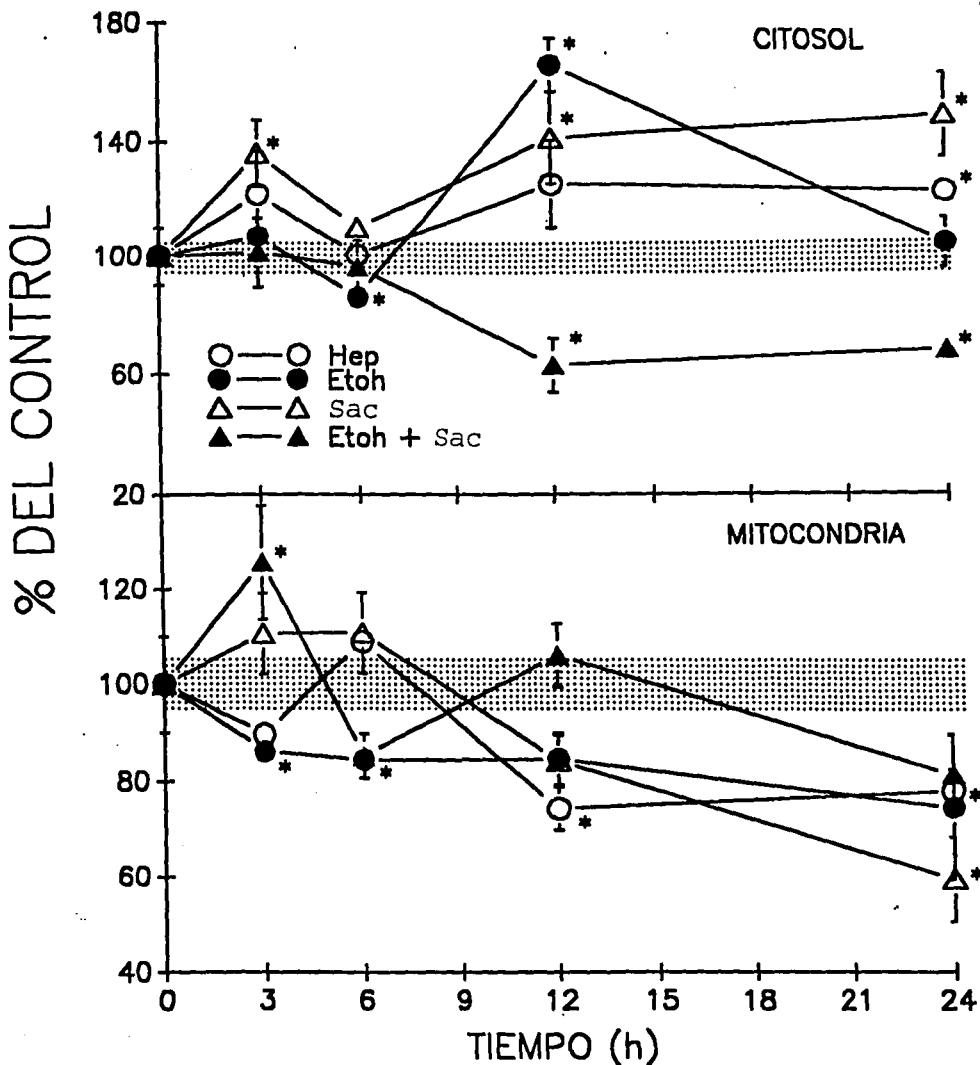


FIGURA 13. Curso temporal de la actividad específica de la enzima transaminasa glutámico-oxaloacética de citosol (A) y de mitocondria (B) en cada uno de los grupos de estudio. Para clave vease la figura 9.

MALATO DESHIDROGENASA

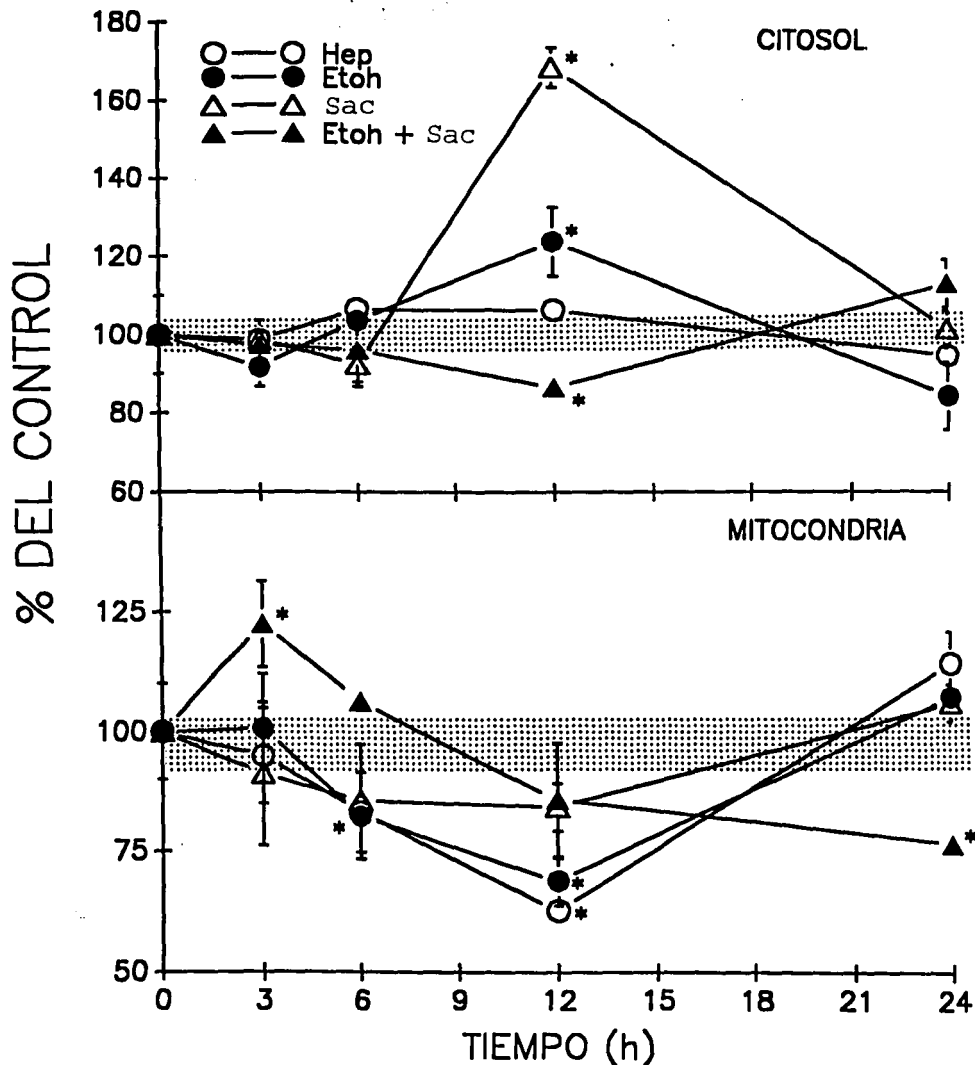


FIGURA 14. Curso temporal de la actividad específica de la enzima malato deshidrogenasa de citosol (A) y mitocondria (B) en cada uno de los grupos de estudio. Para clave vease la figura 9.

F. Etanolemia.

La Figura 15 muestra la concentración de etanol en sangre periférica en los grupos que recibieron etanol (falsa operada + EtOH; HP + EtOH y HP + mezcla Sac-EtOH). En estos grupos el etanol desaparece de la sangre 9 h posteriores a los tratamientos y la concentración máxima se alcanza a las tres horas pero con distinta magnitud, siendo el grupo control el que alcanza la mayor concentración (37.5 mmol/l) seguido del grupo HP + mezcla Sac-EtOH (25 mmol/l), y el grupo HP + EtOH (16 mmol/l). En la primera hora existe una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de etanol entre el grupo control y los grupos con ingesta de Sac-EtOH y sólo EtOH, siendo en estos dos últimos en donde existe una menor concentración. A las tres y cinco horas posteriores al tratamiento hay una mayor concentración de etanol en las ratas con ingesta de mezcla Sac-EtOH en comparación con las ratas con sólo ingesta de EtOH; sin embargo, los animales que se sometieron a HP presentaron una menor etanolemia que las ratas control. Lo anterior puede indicar una disminución en la absorción de etanol para las ratas parcialmente hepatectomizadas o también puede indicar un aumento en el metabolismo degradativo del etanol en las ratas en estado regenerante.

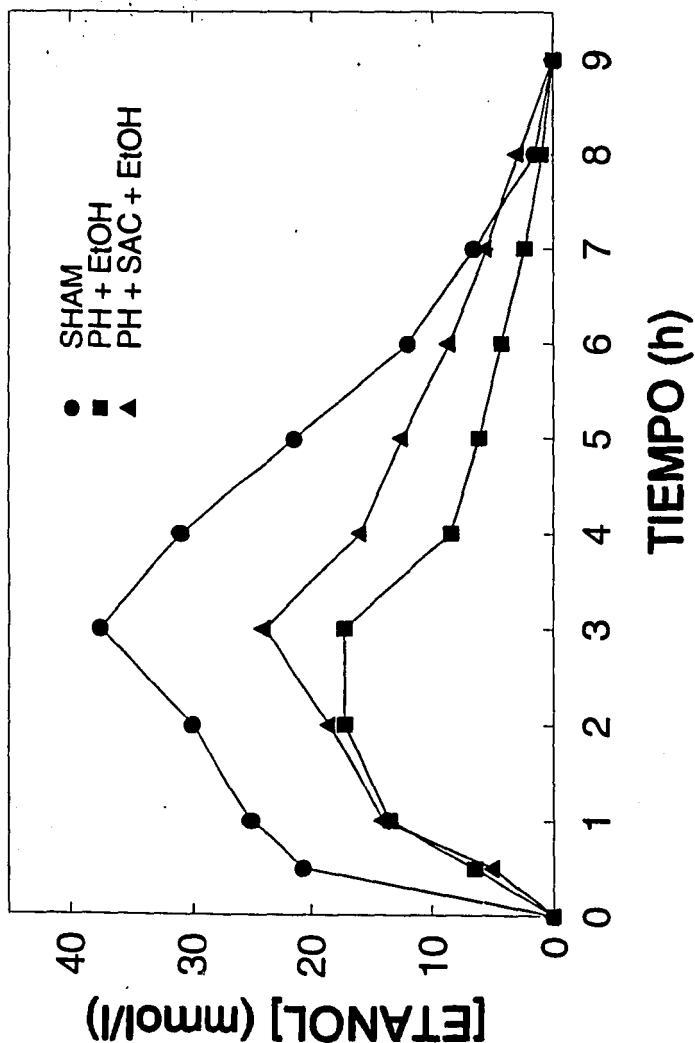


FIGURA 15. Curso temporal de la concentración de etanol en sangre total tomada de la punta de la cola en las ratas tratadas con etanol. HP: hepatectomía parcial + etanol; EtOH: sham operada + etanol; Sac: HP + mezcla sacarosa-etanol.

G. Metabolitos celulares.

Las Figura 16 a la 18 muestran la concentración de los metabolitos celulares determinados: lactato, piruvato, β -hidroxibutirato, acetoacetato, y los pares redox NADP⁺/NADPH y NAD⁺/NADH; 24 horas posteriores a los tratamientos.

En la Figura 16 se muestran las concentraciones de piruvato, lactato y la relación lactato/piruvato. Como puede verse en la Figura 16-A, en todos los grupos existe un aumento en las concentraciones de piruvato con relación al control, sin embargo, este incremento es mayor en el grupo con ingesta de etanol. Por su parte, el lactato aumenta como consecuencia de la hepatectomía parcial pero disminuye en los grupos que tienen sacarosa. El aumento en el lactato es mayor en el grupo con ingesta de etanol. A pesar de las variaciones en la concentración de estos metabolitos, la relación entre ambos disminuye significativamente, en relación con el control, en todos los grupos independientemente del tratamiento recibido (Figura 16-B).

La Figura 17 muestra las concentraciones de acetoacetato, β -hidroxibutirato y la relación β -hidroxibutirato/acetoacetato. La hepatectomía produce una disminución en la concentración de acetoacetato en todos los grupos a excepción del grupo que recibió etanol (Figura 17-A) el cual presenta la misma concentración de este metabolito que el grupo control. Además, el grupo HP y el que recibió solo Sac, presentan concentraciones de acetato mas bajas en relacion con el grupo control y con los que recibieron etanol. Por su parte, la concentración de β -hidroxibutirato aumenta, en relación al control, en todos los grupos con excepción del grupo que recibió la mezcla Sac-EtOH (Figura 17-A). A pesar de las diferencias en la concentración entre ambos metabolitos, la relación β -hidroxibutirato/acetoacetato en el grupo con HP o con ingesta de Sac, es mayor comparados con los grupos que recibieron únicamente EtOH o la mezcla Sac-EtOH (Figura 14-B). La relación se encuentra aumentada por efecto de la hepatectomía parcial y disminuye por efecto del etanol.

La Figura 18 muestra la relación NAD⁺/NADH calculado apartir de los pares lactato/piruvato y β -hidroxibutirato/acetoacetato para conocer el estado redox del citosol y la mitocondria respectivamente. Como muestra la Figura 18-A, el potencial redox citosólico (dado por el par redox lactato-piruvato) se encuentra más oxidado en los animales parcialmente hepatectomizados no importando el tratamiento dado mientras que en mitocondria el estado redox es más reducido (dado por la relación β -hidroxibutirato-acetoacetato) (Figura 18-B).

La Figura 19 muestra las concentraciones de NADP⁺, NADPH y la relación

NADPH/NADP⁺ en los grupos de estudio. Existe un aumento en la concentración de NADPH en todos los grupos, a excepción del que recibió sólo EtOH mientras que ocurre lo inverso con el NADP⁺; esto es, las concentraciones de este metabolito disminuyen en todos los grupos pero el que recibió solo etanol tiende a aumentarlos (Figura 19-A). Esta diferencia se expresa mejor en la relación NADPH/NADP⁺ (Figura 19-B) en donde se puede apreciar que existe un aumento general en todos los grupos de estudio pero no así para el grupo que recibió sólo EtOH indicando un estrés oxidativo en este grupo.

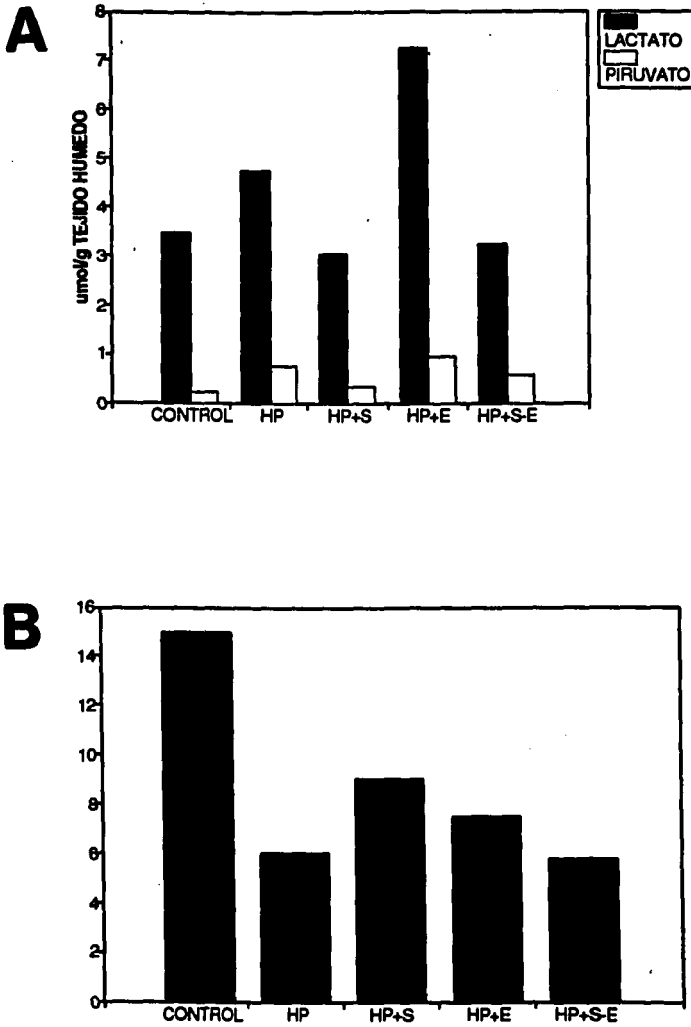


FIGURA 16. Concentración de piruvato y lactato (**A**) y la relación lactato/piruvato (**B**) en extractos perclóricos de hígado en cada uno de los grupos de estudio.

HP: Hepatectomía parcial; S: Sacarosa; E: Etanol

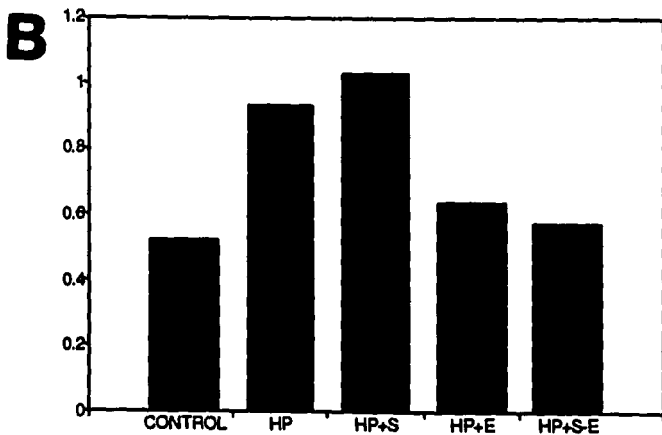
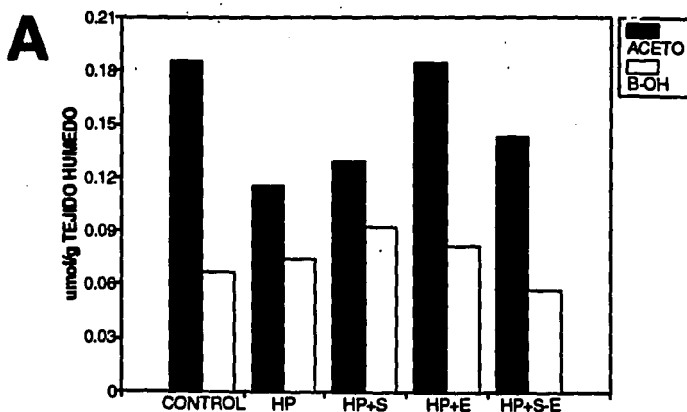


FIGURA 17. Concentración de β -hidroxibutirato y acetoacetato (**A**) y la relación β -hidroxibutirato/acetoacetato (**B**) en extractos perclóricos del hígado en cada uno de los grupos de estudio. ACETO: acetoacetato; B-OH: β -hidroxibutirato. Para abreviaciones vease la figura 16.

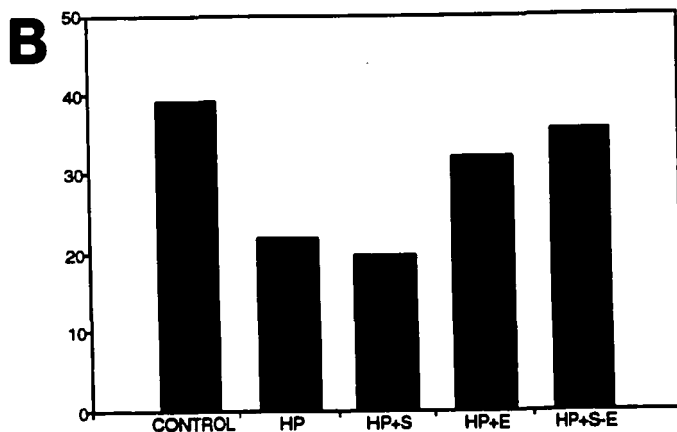
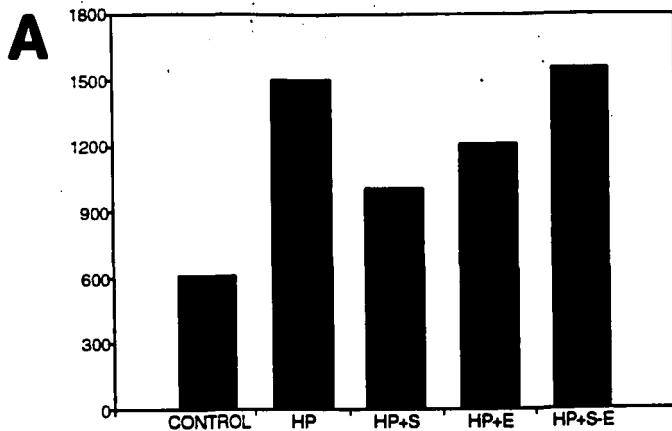


FIGURA 18. Relación NAD⁺/NADH en citosol (**A**) y mitocondria (**B**) en los grupos de estudio, calculado a partir de las concentraciones de piruvato y lactato (para citosol) y β-hidroxibutirato y acetoacetato (mitocondria) como reflejo del estado redox en esos compartimientos.

Para abreviaciones vease la figura 16.

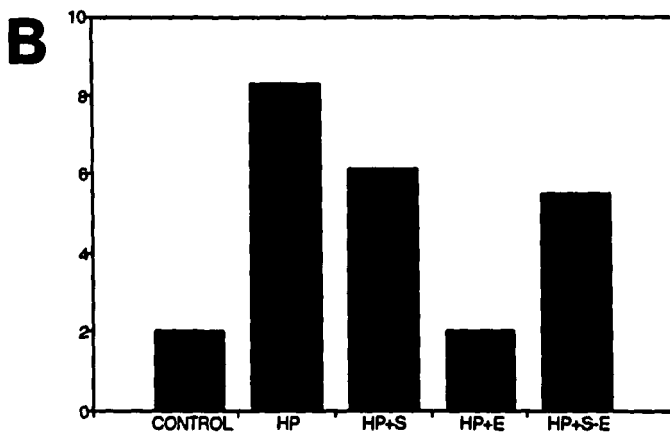
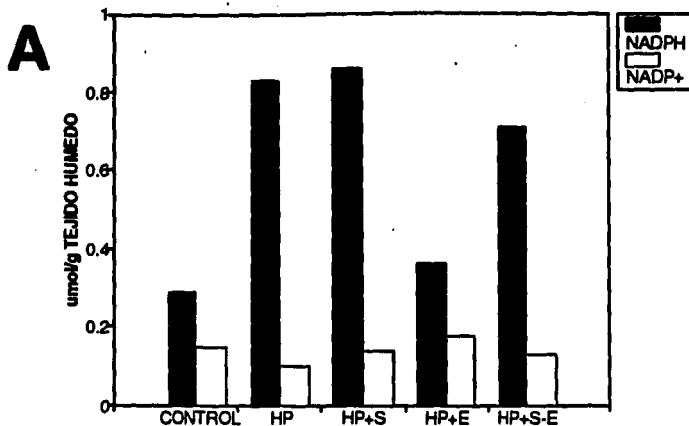


FIGURA 19. Concentración de NADPH y NADP+ (**A**) y la relación NADPH/NADP+ (**B**) en extractos perclóricos de hígado en los grupos de estudio. Para abreviaciones vease la figura 16.

H. Regeneración hepática con otros carbohidratos.

La Figura 20 muestra la concentración de [³H]timidina incorporada al DNA en hígado de ratas parcialmente hepatectomizadas y que se les administró EtOH junto con uno de los siguientes carbohidratos: sacarosa; maltosa; fructosa; fructosa + glucosa; glucosa. Como puede verse, únicamente el grupo que recibió la solución de sacarosa-etanol tiene una incorporación de radioactividad semejante al grupo HP mientras que el resto de los carbohidratos presentan una incorporación de radioactividad menor al grupo HP y semejante al que solo recibió etanol, indicando que el efecto sobre este marcador de regeneración es exclusivo de la sacarosa.

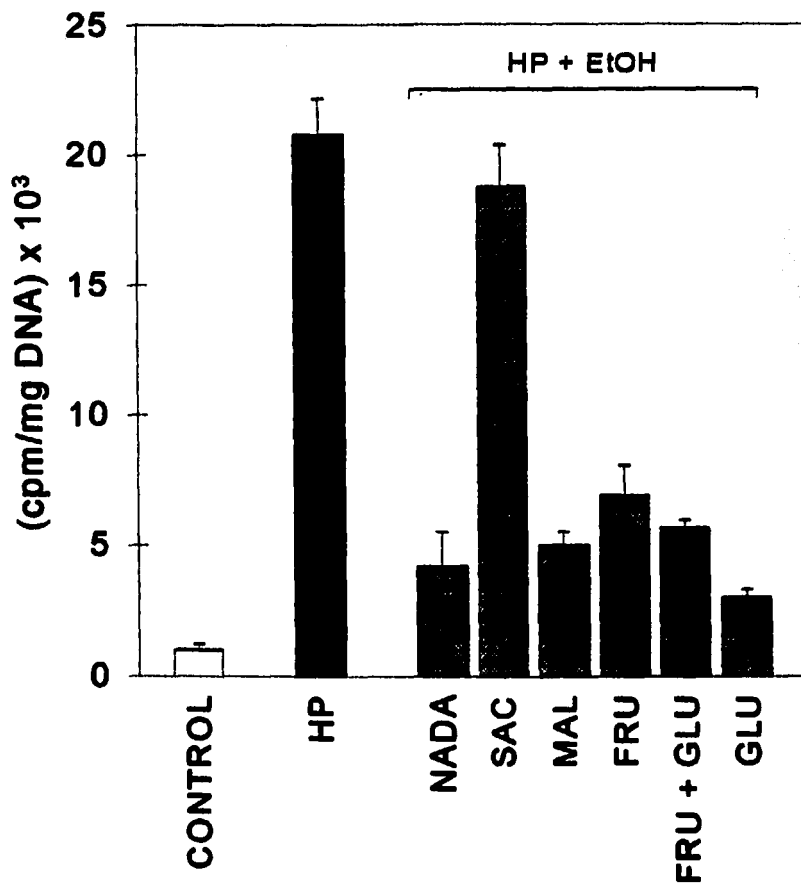
INCORPORACION DE [³H] TIMIDINA

FIGURA 20. Incorporación de [³H]timidina al DNA en hígado de ratas parcialmente hepatectomizadas con ingesta de etanol y los siguientes carbohidratos o combinación de ellos: Sacarosa (S); maltosa (MAL); fructosa (FRU); glucosa (GLU). HP: hepatectomía parcial; EtOH: etanol.

DISCUSION

Los factores que determinan la inhibición de la regeneración hepática por la ingesta de etanol no son del todo conocidos. Investigaciones dirigidas para determinar las causas de tales alteraciones ayudarían a prevenir y/o tratar estos daños en el hombre.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que la presencia de sacarosa al mismo tiempo que el etanol produce una disminución de los efectos citotóxicos de este xenobiótico. Tanto la sobrevivencia como los valores de los metabolitos séricos, que revelan la función hepática, así como el estado general de los animales parcialmente hepatectomizados que recibieron etanol y sacarosa son las mismas a los del grupo que sólo fué parcialmente hepatectomizado (Tablas I y II).

Las posibles explicaciones de estos resultados pueden analizarse por los efectos observados en dos niveles distintos: a) cambios en la absorción intestinal; b) cambios metabólicos en el hepatocito causados por la presencia de carbohidratos.

La sacarosa es un disacárido formado por una molécula de glucosa unida a otra de fructosa por un enlace glucosídico. Al ingresar al sistema digestivo, la sacarosa es hidrolizada en sus dos componentes por una disacaridasa (sacarosa- α -glucosidasa) localizada en la membrana plasmática luminal de las células del intestino delgado y, de esta forma, tanto la glucosa como la fructosa resultantes atraviesan la mucosa intestinal para ingresar al torrente sanguíneo y ser aprovechados por los tejidos (Devlin 1993).

Es conocido que la absorción de medicamentos y xenobióticos por el intestino es afectado por la presencia de nutrientes o alimentos. El etanol no está exento de éste fenómeno y estudios hechos por Pfeiffer y cols. (1992) han demostrado que la presencia de lípidos, proteínas y carbohidratos, ya sea en combinación o en forma única, retardan el proceso de absorción de etanol por el estómago que es el lugar donde preferentemente es absorbida esta molécula (Knight 1992, Levitt 1994, McHugh 1993, Pfeiffer 1992). Las razones de tal fenómeno están relacionadas con procesos físicos y bioquímicos.

En particular, los carbohidratos (glucosa, fructosa principalmente) producen un aumento en las contracciones gástricas lo que hace que un bolo alimenticio pase rápidamente del estómago al duodeno además de que, como moléculas únicas, producen una "desviación" del metabolismo de las células de la mucosa intestinal para el transporte y metabolismo de los glúcidos; aunque el etanol por sus características fisicoquímicas es una molécula que atraviesa las membranas sin necesidad de trasportadores, su absorción por el

tracto digestivo (principalmente el estómago) depende de la presencia de alimentos ya que pueden estos actuar como barrera física para la difusión intraluminal de este xenobiótico (Knight 1992, McHugh 1993, Levitt 1994). De esta forma, cantidades menores de etanol llegarían a los tejidos por retraso en su absorción. Los resultados parciales obtenidos con la etanolemia (Figura 15) indican que al inicio del tratamiento existe una disminución en la concentración de etanol en las ratas que recibieron la mezcla sacarosa-etanol lo cual puede apoyar la hipótesis de una disminución en la absorción del etanol en el estómago por la presencia de la sacarosa.

La presencia de etanol, glucosa y fructosa en el hepatocito no carece de consecuencias metabólicas. Se sabe que el etanol produce alteraciones en el metabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos en la célula relacionados principalmente con el metabolismo oxidativo del etanol (Lieber 1982, 1984, 1991; Rosenblum 1989; Altura 1989). Además, el hígado en regeneración requiere una gran cantidad de energía obtenida principalmente de la degradación del glucógeno a glucosa y los lípidos (Arnon 1995). Es de esperar que un hígado en regeneración, con toda la demanda metabólica que impone la división celular sea afectado por el metabolismo del etanol. Recordemos que el etanol es convertido a acetaldehído por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa produciendo una molécula de NADH; esta molécula puede "pasar" a la mitocondria via las lanzaderas de malato-aspartato o malato-glutamato (Voet 1993). El acetaldehído formado pasa a su vez a la mitocondria donde es nuevamente oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa produciendo acetato y una molécula de NADH, la ganancia total al oxidar etanol es de dos moléculas de NADH y una molécula de acetato el cual puede ser oxidado para la producción de energía en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y cadena respiratoria (Figura 21).

El aumento en las cantidades de NADH en el citoplasma y la mitocondria producen "desviaciones" del metabolismo normal que traen como consecuencia que el metabolismo de la glucosa (principal combustible celular) sea afectado ya que el aumento en el NADH citosólico produce un incremento en la producción de lactato con disminución en el piruvato el cual disminuye su entrada en la mitocondria y por tanto disminuye su descarboxilación con la consecuente falta de producción de acetil-CoA (Lieber 1982, 1984, 1991; Rosenblum 1989; Altura 1989). El piruvato que entra a la mitocondria se enfrentaría a la escasez de NAD ya que la enzima aldehído deshidrogenasa utiliza esta coenzima para transformar el acetaldehído en acetato con lo que se puede establecer una competencia metabólica y por tanto un bloqueo en la utilización de la glucosa como sustrato energético a nivel citosólico y mitocondrial

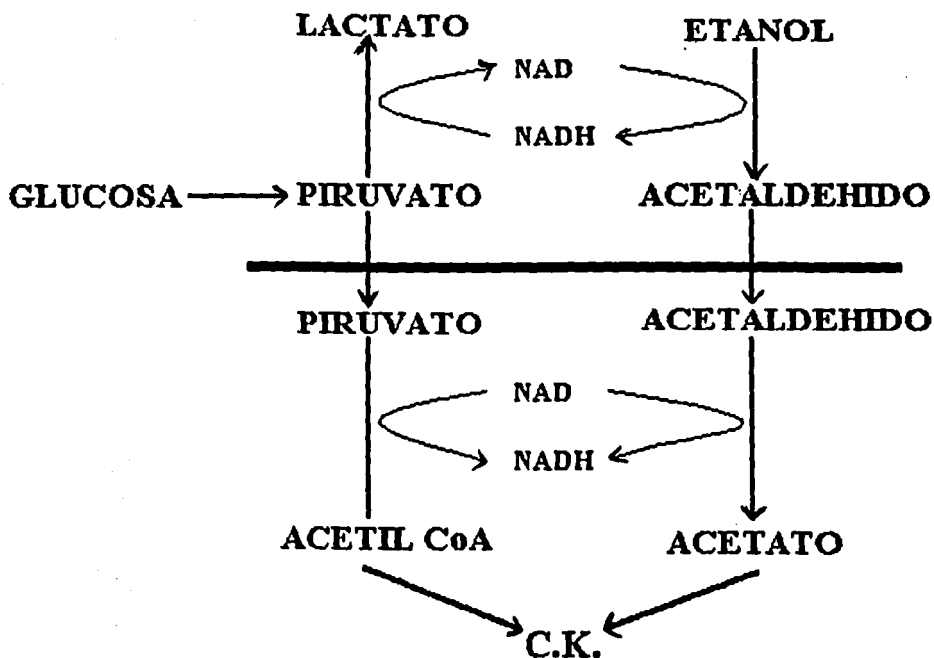


FIGURA 21. Relación entre el metabolismo oxidativo de la glucosa y el metabolismo oxidativo del etanol en el hepatocito.

(Figura 17). Los resultados obtenidos con la determinación del estado redox citosólico y mitocondrial muestran un estado redox más reducido en la mitocondria en el grupo de ratas tratadas con EtOH (Figuras 17 a 19) 24 horas posteriores a los tratamientos. Por otro lado, con la presencia de sacarosa, la célula tiende a un estado redox más oxidado en citosol y menos reducido en mitocondria que es el mismo estado redox que se encuentra en el grupo con hepatectomía parcial. El estado redox oxidado citosólico provocado por la hepatectomía parcial y la presencia de sacarosa puede favorecer la oxidación de etanol en el hígado y esto se ve reflejado en la menor cantidad de este xenobiótico encontrado en sangre en los grupos de tratados unicamente con hepatectomía parcial y aquellas que recibieron la mezcla sacarosa-etanol (Figura 15).

Durante la regeneración hepática el hígado obtiene su energía principalmente del metabolismo degradativo de los carbohidratos, principalmente glucosa que es obtenida por la degradación del glucógeno (Devlin 1993). Puesto que se ha comprobado que el etanol bloquea la utilización de carbohidratos, no es sorprendente que el hepatocito regenerante tenga problemas en ese rubro por la presencia de este xenobiótico. La glucosa se degrada principalmente por la glucólisis y el etanol produce un bloqueo de esta vía principalmente por la producción de un estado óxido-reductor desfavorable, sin embargo, este bloqueo existe para la glucosa pero no para la fructosa (Kennedy 1990). Al ingresar a la célula, la fructosa es transformada por la fructoquinasa a fructosa-1-fosfato que a su vez es tomada por la aldolasa obteniéndose dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído. La dihidroxiacetona fosfato puede ser transformada a glucosa o a piruvato mientras que el gliceraldehído es convertido a glicerol por una deshidrogenasa y la utilización de una molécula de NADH. El glicerol puede más tarde, ser transformado a piruvato y servir como fuente de energía (Kennedy 1990; Devlin 1993) (Figura 22).

Por todo lo dicho con anterioridad, una hipótesis que puede ser formulada es la siguiente: El metabolismo degradativo de la fructosa puede suplir de material energético a la célula en forma de piruvato además de compensar parcialmente las pozas de NAD al ser fuente de oxidación de NADH por la transformación del gliceraldehído en glicerol y de esta forma poder "compensar" al metabolismo intermedio del hepatocito (Figura 23).

La ingesta de sacarosa provee tanto de glucosa como de fructosa y es probable que sea el metabolismo degradativo de la fructosa el material "compensatorio" en una célula que se enfrenta a la regeneración y a un tóxico como es el etanol. Datos obtenidos por Okabe (1991), Davies (1990), Mourelle (1991) y Veech (1994) en modelos *in vitro* o de hígado

perfundido señalan que la aplicación de fructosa previene los daños causados por paracetamol o hipoxia debido a la acumulación de fructosa-1-fosfato que puede suplir de energía a la célula cuando el metabolismo de la glucosa se altera por estas condiciones. La alteración del metabolismo intermedio en el hígado en regeneración por la presencia de etanol es causante de la disminución del fenómeno regenerativo. Con la presencia de fructosa, la regeneración es "compensada" y puede llevarse a cabo. La hipótesis anterior no explica porque cuando se administra glucosa y fructosa (componentes de la sacarosa) por separado en presencia de etanol, la regeneración no se lleva a cabo (Figura 20). Un fenómeno de absorción gástrica distinto para la glucosa, fructosa y sacarosa, en presencia de etanol puede ser posible ya que como se mencionó con anterioridad, la presencia de bolo alimenticio en el estómago afecta la absorción de etanol. Este fenómeno debe ser investigado con más atención. Sin embargo, los resultados obtenidos con los metabolitos séricos, celulares y actividad específica de las enzimas demuestran que, tanto el etanol como los carbohidratos administrados estuvieron presentes en el hígado y es precisamente una "competencia metabólica" lo que está ocurriendo en la célula al estar presentes tanto el etanol como los carbohidratos. Recordemos que el hepatocito en regeneración debe requerir gran cantidad de sustratos metabólicos para llevar a cabo la división mitótica, lo que significa un aumento en los requerimientos energéticos del mismo. La presencia de carbohidratos podría ser favorable para este fenómeno y una probable explicación para el efecto de la sacarosa en el hígado en regeneración con presencia de etanol.

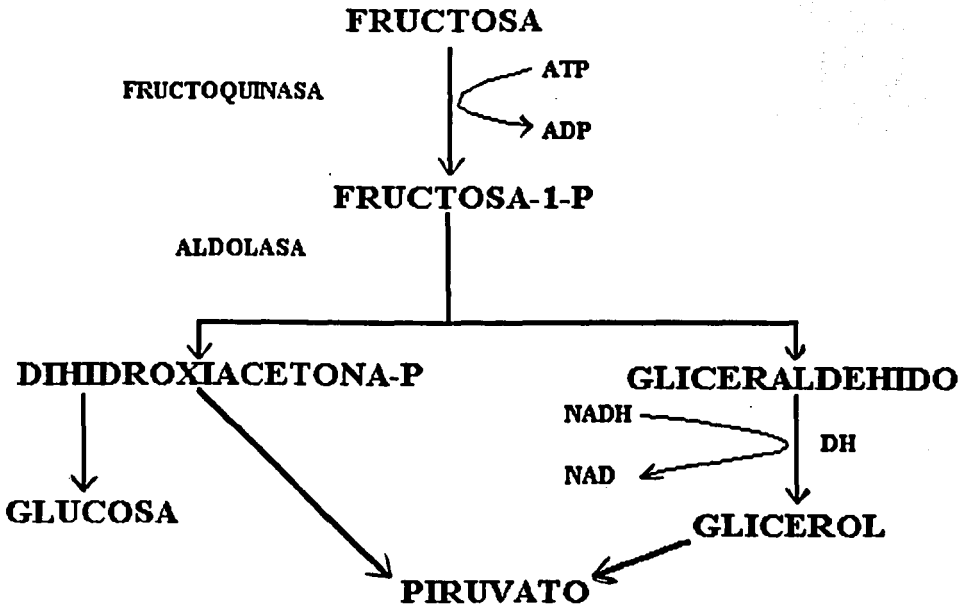
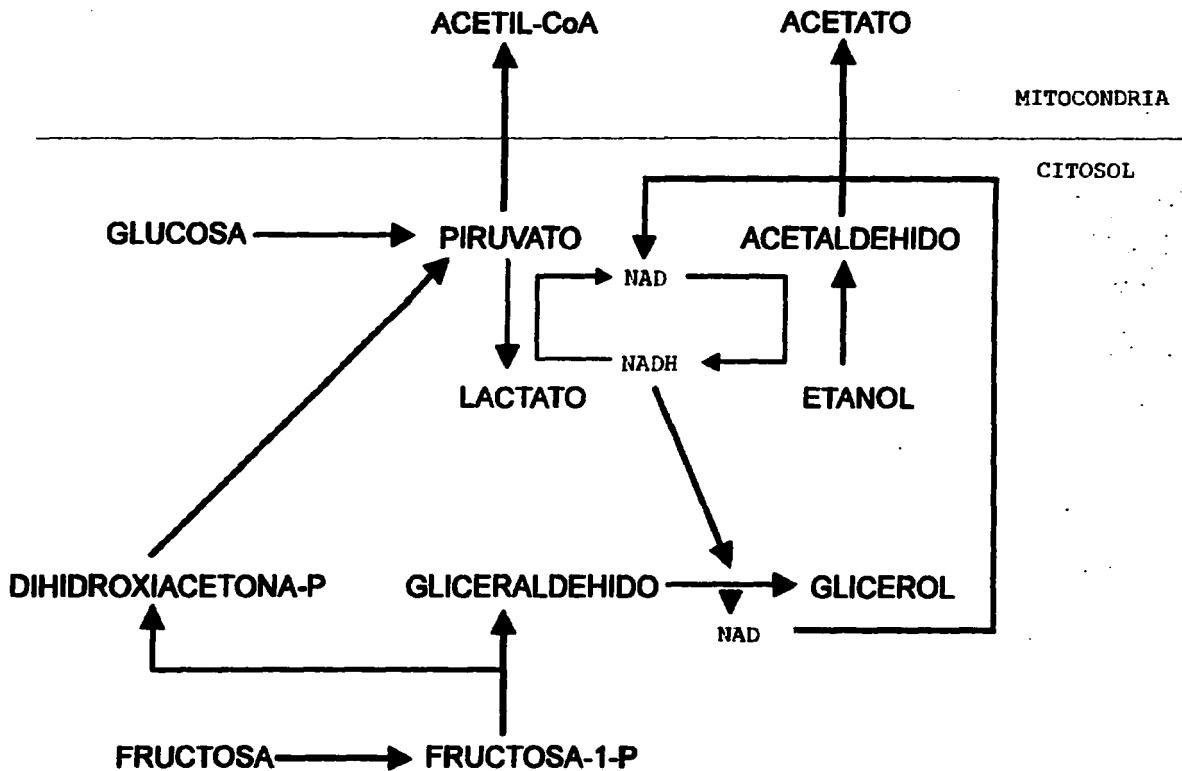


FIGURA 22. Metabolismo degradativo de la fructosa en el hepatocito.

FIGURA 23. Probables interrelaciones entre el metabolismo de la glucosa, la fructosa y el etanol en el hepatocito.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la ingesta de sacarosa puede disminuir el efecto hepatotóxico por la ingesta de etanol en el hígado en regeneración. Los indicadores histológicos, funcionales, bioquímicos y de regeneración que se determinaron así lo indican.

Es probable que este efecto se deba al metabolismo intermedio de la fructosa contenida en la molécula de sacarosa aunado a un fenómeno de retardo en la absorción del etanol por el sistema digestivo debido a la presencia física de la sacarosa. Sin embargo, esto sólo es una hipótesis ya que no se cuenta con mayores datos que puedan esclarecer estos fenómenos. Sin embargo, los resultados obtenidos con los metabolitos séricos (**Tablas I y II**) señalan un mejor desempeño funcional del hígado en el grupo de ratas con HP y con ingesta de la mezcla Sac-EtOH que los que recibieron sólo EtOH indicando con ello un efecto protector de la sacarosa. Este efecto protector puede ser como un competidor metabólico del etanol en el hepatocito ya que los resultados obtenidos con los metabolitos celulares y las actividades enzimáticas demuestran cambios específicos en ellos debido a la presencia de etanol y/o sacarosa.

Estudios encaminados a elucidar las causas reales del efecto protector de la sacarosa o sus componentes (glucosa o fructosa) deben ser llevados a cabo ya que esto ayudaría a elucidar los factores relacionados con el proceso regenerativo del hepatocito y los mecanismos de daño causados por la presencia del etanol.

BIBLIOGRAFIA

Altura BM, Altura BT and Gebrewold A (1990) Comparative effects of ethanol, acetaldehyde and acetate on arterioles and venules in skeletal muscle: Direct *in situ* studies on the microcirculation and their possible relationship to alcoholic myopathy. Microcirculation, Endothelium and Lymphatics 6:107-126.

Arnon R, Degli ES and Zern MA (1995) Molecular biological aspects of alcohol-induced liver disease. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 19:247-256.

Bergmeyer HU and Beutler HO (1974) Ammonia. en: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer HU and Bergmeyer UK eds) Academic Press, New York pp 454-460.

Bernt E and Gutmann I (1974) en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer, Ed) Vol 3, 2a ed Verlag Chemie, Academic Press, New York pp 1499-1502.

Bonnischen RK (1983) en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer, eds) Vol 1, 3a ed Verlag Chemie, Academic Press, New York pp 139-141.

Burton K (1983) Determination of DNA concentrations with dephenylamine. en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer, eds) Vol 1, 3a ed Verlag Chemie, Academic Press, New York pp 163-170.

Consejo Nacional Antialcohólico: Programa contra el alcoholismo y el uso de bebidas alcohólicas. Secretaría de Salud. Consejo Nacional Antialcohólico e Instituto Mexicano de Psiquiatría (Eds) México DF 1985.

Christensen EL and Higgins JJ (1979) Effect of acute an chronic administration of ethanol on the redox states of brain and liver. En: Biochemistry and pharmacology of ethanol (E Majchrowicz and EP Noble eds) Plenum press, New York pp 191-247.

Crow KE and Batt RD (1992) Human metabolism of alcohol. CRC Press Inc, Boca Ratón, Florida.

Davies DR, Detheux M and Van Schaftingen E (1990) Fructose-1-phosphate and the regulation of glucokinase activity in isolated hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 192:283-289.

Departamento de Psiquiatría y Salud Mental (1986) Alcoholismo. Facultad de Medicina UNAM (Ed.) México DF.

Devlin, TM (1993) *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 3a. ed, Wiley-Liss Inc. New York, New York.

Diehl AM, Thorgeirsson SS and Steer CJ (1990) Ethanol inhibits liver regeneration in rats without reducing transcripts of key protooncogenes. *Gastroenterology* 99:1105-1112.

Fausto N and Webber EM (1993) Control of liver growth. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 3:117-135.

Feuer G and Dela Iglesia FA (1990) *Molecular Biochemistry of Human Disease*. Vol III, CRC Press Boca Ratón Florida, 246-259.

Frank WO, Rayyes AN, Washington A and Hold PR (1979) Effect of acute ethanol administration upon hepatic regeneration. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 93:402-413.

Freinkel N, Singer DL, Arky RA and Foster A (1963) Ethanol hypoglycemia I: Carbohydrate metabolism of patients with clinical ethanol hypoglycemia and the experimental reproduction of the syndrome with pure ethanol. *Journal of Clinical Investigation* 42: 1112-1132.

Fukui N (1971) Factor regulating thymidine kinase in regenerating liver. *Journal of Biochemistry* 69:1075-1082.

Gaines KC; Salhany JM; Tuma DJ and Sorrel MF (1977) Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS Letters* 75:115-119.

Gutman D and Bergmeyer HU (1968) Methods in Enzymology. Academic Press New York pp 1791-1798.

Higgins CM and Anderson RM (1931) Experimental pathology of liver: restoration of liver of the white rat following partial surgical removal. Archives of Pathology 12:186.

Kabadi UM (1987) The association of hepatic glycogen depletion with hyperammonemia in cirrhosis. Hepatology 7:821-824.

Kennedy NP and Tipton KF (1990) Ethanol metabolism and alcoholic liver disease. Essays in Biochemistry 12:138-195.

Kientsch-Engel RI and Siess EA (1983) β -hidroxibutirate and acetoacetate. en: Methods of enzymatic analisis (Bergmeyer J and Grabl M eds) Vol VIII Verlag Chemie, Deerfield Beach pp 60-69.

Klingenberg M (1983) Nicotinamide-adenine dinucleotides and dinucleotide phosphates. en: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer HU and Grabl M, eds.) Vol. VII, 3a. Ed. Verlagsgesellschaft Germany pp 251-271.

Knight LC, Maurer AH, Wikander R, Krevsky B, Malmud LS and Fishher RS (1992) Effect of ethyl alcohol on motor function in canine stomach. Ammerican Journal o Physiology 262:G227-237.

Lamprecht W and Heinz F (1983) Lactate. en: Methods of enzymatic analisis (Bergmeyer J and Grabl M eds) Vol 6 Verlag Chemie, Deerfield Beach pp 570-577.

Lebsack ME, Gordon ER and Lieber CS (1981) Effect of chronic ethanol consumption on aldehyde dehydrogenase activity in the baboon. Biochemical Pharmacology 30:2273-2277.

Leevy CM and Chen T (1979) Ethanol inhibition of liver regeneration. Gastroenterology 71:1151-1152.

Lewin B (1992) Gene. 3th edititon, Oxford University Press, New York, New York.

Levitt MD, Levitt DG, Furner J and DeMaster EG (1994) Can the liver account for first-pass metabolism of ethanol in the rat? Ammerican Journal of Physiology 267:G452-457.

Lieber CS (1982) Medical disorders of alcoholism. Pathogenesis and treatment. (Lloyd H Smith ed) Major Problems in Internal Medicine, Vol XXII WB Saunders Company, Philadelphia pp 436-525.

Lieber CS (1984) Alcohol and the liver: 1984 update. Hepatology 4:1243-1260.

Lieber CS (1991) Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 15:573-592.

Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265.

Luk GD and Baylin SB (1984) Inhibition of intestinal epitehelial DNA synthesis and adaptive hyperplasia after jejunectomy in the rat by suppression of polyamine biosynthesis. Journal of Clinical Investigation 74:698-704.

McHugh K, Castonguay TW, Collins SM and Weingarten HP (1993) Characterization of suppression of food intake following acute colon inflammation in the rat. Ammerican Journal of Physiology 265:R1001-1005.

Medina VA; Donohue TM, Sorrel MF and Tuma DJ (1985) Covalent binding of acetaldehyde to hepatic proteins during ethanol oxidation. Journal Laboratory and Clincial Medicine 105:5-10.

Michalopoulos GK (1990) Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. The FASEB Journal 4:176-187.

Mufti SI (1989) Ethanol metabolites as indicator of alcohol abuse. En: Diagnosis of alcohol abuse (Ronald Ross W, ed) CRC Press Boca Raton, Florida pp 9-26.

Mourelle M, Beales D and McLean AEM (1991) Prevention of paracetamol-induced liver injury by fructose. Biochemical Pharmacology 41:1831-1837.

Noll F (1983) Lactate. En: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer J and Grabl M eds) Vol 6 Verlag Chemie, Deerfield Beach pp 582-588.

Okabe H, Kurosawa K, Hatanaka N, Yoshitake J and Tagawa K (1991) Protection of cellular and mitochondrial functions against toxic damage by fructose in perfused liver. Biochimica et Biophysica Acta 1098:41-48.

Orrego H, Crossley IR, Saldivia V, Medline A, Varghese G and Israel Y (1981) Long-term ethanol administration and short- and long-term liver regeneration after partial hepatectomy. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 97:221-230.

Pfeiffer A, Hogl B and Kaess H (1992) Effect of ethanol and commonly ingested alcoholic beverages on gastric emptying and gastrointestinal transit. Clinical Investigation 70:487-491.

Polokoff MA, Simon TJ, Harris RA, Simon FR and Iwahashi M (1985) Chronic ethanol increases liver plasma membrane fluidity. Biochemistry 24:3114-3120.

Pösö AR and Forsander OA (1976) Influence of ethanol oxidation rate on the lactate/piruvate ratio and phosphorylation state of the liver in fed rats. Acta Chemica Scandinavica B30: 801-806.

Pösö AR and Pösö H (1979) Ethanol elimination in regenerating rat liver: the roles of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde. Acta Chemica Scandinavica B33:249-255.

Pösö AR and Pösö H (1979) Relationship between the phosphorylation state and the rate of ethanol elimination in regenerating rat liver. FEBS letters 100:273-275.

Rafael J (1983) en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer and Bergmeyer J, Eds) Vol 3, 2a ed Verlag Chemie, Weinheim, Germany. pp 266-273.

Reiners JJ Jr and Busch H (1980) Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regeneration liver an Novikoff hepatoma. Biochemistry 19:833-841.

Rej R and Horder M Aspartate aminotransferase (1983) en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer, Ed) Vol 3, 2a ed Verlag Chemie, Academic Press, New York pp 416-424.

Rosenblum ER; Gavaler JS and VanThiel DH (1989) Lipid peroxidation: A mechanism for alcohol-induced testicular injury. Free Radical Biology and Medicine 7:569-577.

Smith AF (1986) Malate dehydrogenase en: Methods of Enzymatic Analysis (HU Bergmeyer, Ed) Vol 3, 2a ed Verlag Chemie, Academic Press, New York pp 166-171.

Sneyd JGT (1992) Interactions of ethanol and carbohydrate metabolism. en: Human metabolism of alcohol (Crow KE and Batt RD eds.) CRC Press Inc, Boca Ratón, Florida pp 115-122.

Steiner JW, Perz ZM and Taichman LB (1966) Cell population dynamics in the liver. A reviewer of quantitative morphological techniques applied to the study of physiological and pathological growth. Experimental and Molecular Pathology 5:146-181.

Stenger RJ and Confer DB (1966) Hepatocellular ultrastructure during liver regeneration after subtotal hepatectomy. Experimental and Molecular Pathology 5:455-474.

Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A and Peterson CM (1981) Acetaldehyde adducts with hemoglobin. Journal of Clinic Investigation 67:361-369.

Tottmar SOC, Petterson H and Kiessling KH (1973) Biochem Journal 135:577-586.

Thurman RG and Handler JA (1989) New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. Drug Metabolism Reviews 20: 679-688.

Veech RL; Gates DN; Crutchfield C; Gitomer WL, Kashiwaya Y; King MT and Wondergem R (1994) Metabolic hyperpolarization of liver by ethanol: the importance of Mg and H in determining impermeant intracellular anionic change and energy of metabolic reactions. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 18:1040-1056.

Virágh S and Bartók I (1966) An electron microscopic study of the liver following partial hepatectomy. American Journal of Pathology 49:825-839.

Voet D, Voet JG (1993) Bioquímica. Ediciones Omega SA Barcelona, España.

Wahlefeld, A (1983) Lactate dehydrogenase: UV method with L-lactate and NAD. en: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer HU and Grabl M, eds.) Vol. 3, 3a. Ed. Verlagsgesellschaft Germany pp 126-132.

Wands JR, Carter EA, Bucher NLR and Isselbacher KJ (1979) Inhibition of hepatic regeneration in rats by acute and chronic ethanol intoxication. Gastroenterology 77:528-531.

Weiner H (1979) Acetaldehyde metabolism. en: Biochemistry and pharmacology of ethanol (E Majchrowicz and EP Noble eds) Plenum Press, New York pp 125-144.